

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 541**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2009 E 09739983 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2282773**

54 Título: **Métodos y composiciones para elaborar anticuerpos y derivados de anticuerpos con fucosilación del núcleo reducida**

30 Prioridad:

02.05.2008 US 50173 P

28.08.2008 US 92700 P

21.10.2008 US 107289 P

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

06.05.2014

73 Titular/es:

SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)

21823 30th Drive, S.E.

Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

ALLEY, STEPHEN C.;

JEFFREY, SCOTT C.;

SUSSMAN, DJANGO;

BENJAMIN, DENNIS R.;

TOKI, BRIAN y

BURKE, PATRICK J.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 458 541 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

Métodos y composiciones para elaborar anticuerpos y derivados de anticuerpos con fucosilación del núcleo reducida

Antecedentes de la invención

5 Las proteínas terapéuticas recombinantes se producen mediante diversos métodos diferentes. Un método preferido es la producción de proteínas recombinantes a partir de líneas celulares hospedadoras de mamífero. Las líneas celulares, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), se modifican con ingeniería genética para expresar la proteína terapéutica de interés. Diferentes líneas celulares presentan ventajas y desventajas para la producción de proteínas recombinantes, incluyendo las características y la productividad de las proteínas. La selección de una línea celular para la producción comercial compensa a menudo la necesidad de una
10 alta productividad con la habilidad de proporcionar una calidad del producto consistente con las propiedades que se requieren para un producto dado. Una importante clase de proteínas terapéuticas recombinantes que requieren características de alta calidad consistentes y procesos de títulos elevados son los anticuerpos monoclonales.

15 Los anticuerpos monoclonales producidos en células hospedadoras de mamíferos pueden presentar una variedad de modificaciones post-translacionales, incluyendo la glicosilación. Los anticuerpos monoclonales, tales como las IgG1, tienen un sitio de glicosilación N-ligada en la asparagina 297 (Asn297) de cada cadena pesada (dos por anticuerpo intacto). Los glicanos unidos a Asn297 en los anticuerpos son habitualmente estructuras biantenarias complejas con muy baja o ninguna N-acetilglucosamina de bisección (GlcNAc de bisección) con cantidades bajas de ácido siálico terminal y cantidades variables de galactosa. Los glicanos además, habitualmente, tienen niveles elevados de fucosilación del núcleo. Se ha mostrado que la reducción de la fucosilación del núcleo en los
20 anticuerpos modifica las funciones efectoras de la Fc, en particular la unión al receptor Fc-gamma y la actividad ADCC. Esta observación ha conducido al interés en las líneas celulares de ingeniería genética para que produzcan anticuerpos con fucosilación del núcleo reducida.

25 Métodos para la ingeniería genética de líneas celulares para reducir la fucosilación del núcleo incluyen la inactivación génica o knock-out, introducción de modificaciones en un gen o knock-in y ARN interferente (ARNi). En la inactivación génica, el gen que codifica FUT8 (enzima alfa 1,6-fucosiltransferasa) es inactivado. La FUT8 cataliza la transferencia de un residuo fucosil desde GDP-fucosa a la posición 6 de la GlcNAc Asn-ligada (N-ligada) de un N-glicano. La FUT8 se presenta como la única enzima responsable de la adición de fucosa al carbohidrato biantenarico N-ligado en Asn297. La introducción de modificaciones en un gen o técnica knock-in añade genes que codifican
30 enzimas tales como GNTIII o una alfa manosidasa II de Golgi. Un aumento de los niveles de tales enzimas en las células desvía los anticuerpos monoclonales de la vía de fucosilación (lo que conduce a una fucosilación del núcleo disminuida), y a tener una cantidad aumentada de N-acetilglucosaminas de bisección. El ARNi habitualmente también establece como objetivo la expresión génica de FUT8, lo que conduce a niveles de transcripción de ARNm reducidos o a inactivar la expresión génica por completo.

35 Alternativas a la ingeniería genética de líneas celulares incluyen el uso de inhibidores de molécula pequeña que actúan sobre enzimas en la vía de glicosilación. Los inhibidores tales como la castanospermina actúan pronto en la vía de glicosilación, produciendo anticuerpos con glicanos inmaduros (por ejemplo, niveles altos de manosa) y niveles bajos de fucosilación. Los anticuerpos producidos mediante tales métodos generalmente carecen de la estructura de un glicano N-ligado complejo asociada con anticuerpos maduros.

40 En contraste, la presente invención proporciona análogos de fucosa de molécula pequeña para su uso en la producción de anticuerpos recombinantes que tengan glicanos N-ligados complejos, pero con fucosilación del núcleo reducida.

Resumen de la invención

45 La invención proporciona métodos y composiciones para la preparación de anticuerpos y derivados de anticuerpos con fucosilación del núcleo reducida. Los métodos y las composiciones están basados en parte en los resultados inesperados presentados en los Ejemplos que muestran que el cultivo de células hospedadoras, que expresan un anticuerpo o un derivado de anticuerpo, en presencia de un análogo de la fucosa (que tienen la fórmula I, II, III, IV, V o VI) produce un anticuerpo con fucosilación del núcleo reducida (es decir, fucosilación reducida de N-acetilglucosamina de las cadenas de azúcar ligadas a un N-glucósido complejo enlazadas a la región Fc a través de la N-acetilglucosamina del terminal reductor de las cadenas de azúcar). Tales anticuerpos y derivados de
50 anticuerpos pueden mostrar una función efectora aumentada (ADCC), en comparación con anticuerpos o derivados de anticuerpos producidos a partir de células hospedadoras cultivadas en ausencia del análogo de fucosa.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones de anticuerpos y derivados de anticuerpos. Los anticuerpos y derivados de anticuerpos pueden estar producidos mediante los métodos que se describen en la presente patente.

Se revelan adicionalmente análogos de fucosa. Los análogos de fucosa pueden ser añadidos a medios de cultivos celulares de mamíferos para inhibir o reducir la fucosilación del núcleo. También se proporcionan medios de cultivo que comprenden una cantidad efectiva de un(os) análogo(s) de fucosa de este tipo.

5 Estos y otros aspectos de la presente invención pueden entenderse más completamente en referencia a la siguiente descripción detallada, ejemplos no limitativos de modos de realización específicos, y las figuras anexas.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 muestra un análisis (electroferogramas) de glicanos aislados de un anticuerpo anti-CD70 (h1F6) producido a partir del control (A) y células hospedadoras (B y C) tratadas con peracetato de alquinil fucosa (AlkF). Los paneles muestran la identidad y distribución relativa de glicanos. "G0" hace referencia a la estructura de carbohidrato en la que no hay galactosa en los dos terminales no reductores. "G1" hace referencia a una estructura de carbohidrato en la que uno de los terminales no reductores tiene una galactosa (una mezcla de dos isómeros). "G2" hace referencia a una estructura de carbohidrato en la que ambos terminales no reductores tienen una galactosa. "G0-F" hace referencia a una estructura de carbohidrato en la que no hay galactosa en ninguno de los dos terminales no reductores y no hay fucosilación del núcleo. Panel 1A: glicanos aislados del control (no tratados) anticuerpo h1F6. Panel 1B: glicanos aislados de anticuerpos h1F6 expresados en presencia de 50 μm de peracetato de alquinil fucosa. Panel 1C: glicanos aislados de anticuerpos h1F6 expresados en presencia de 50 μm de peracetato de alquinil fucosa y tratados con β -galactosidasa para eliminar la galactosa de los glicanos G1 y G2.

20 La Figura 2 muestra los resultados de los ensayos de la función efectora (ADCC) con anticuerpos producidos a partir de células hospedadoras cultivadas en presencia de peracetato de alquinil fucosa (AlkF). La lisis específica del anticuerpo de control anti-CD70 (círculos sombreados), anticuerpo anti-CD70 a partir de células hospedadoras cultivadas en presencia de 50 μm y 100 μm de AlkF (círculos en blanco y triángulos, respectivamente) y se determinó la IgG de control de no unión (rombos sombreados) mediante el ensayo de liberación de ^{51}Cr . Las células diana de CD70+786-O se mezclaron con PMBC (células mononucleares de sangre periférica) en un efector a una relación diana de 10:1.

25 La Figura 3 muestra los resultados de los ensayos de unión del receptor $\text{Fc}\gamma$ con el anticuerpo anti-CD70 de control y el anticuerpo a partir de células hospedadoras cultivadas en presencia de 50 μm de peracetato de alquinil fucosa (AlkF). La afinidad relativa para cada receptor fue determinada mediante un ensayo de unión de tipo competitivo entre el anticuerpo parental marcado y concentraciones en aumento de anti-CD70 mAb parental no marcado (cuadrados sombreados) o no fucosilados en el núcleo (triángulos sombreados). La Figura 3A muestra la competición de unión para las células que expresan el receptor $\text{Fc}\gamma$ (CD16) humano. La Figura 3B muestra la competición de unión para las células que expresan el receptor $\text{Fc}\gamma$ (CD16) murino.

35 La Figura 4 muestra los resultados del análisis LC-MS (Q-Tof) de cuatro anticuerpos cultivados en ausencia o presencia de peracetato de alquinil fucosa (partes superior e inferior, respectivamente, de cada par de paneles). G0, G1 y G0-F son tal como se indica *supra*. "G1-F" hace referencia a la estructura de carbohidrato en la que uno de los terminales no reductores tiene una galactosa y no hay fucosilación del núcleo (una mezcla de dos isómeros). Figura 4A: anticuerpo anti-CD70. Figura 4B: anticuerpo anti-CD19. Figura 4C: anticuerpo anti-CD30. Figura 4D: anticuerpo anti-CD33.

40 La Figura 15 muestra los resultados de los ensayos de la función efectora (ADCC) de un anticuerpo CD 19 humanizado cultivado en ausencia o presencia de peracetato de alquinil fucosa (fucosilado en el núcleo (cuadrados) o no fucosilado en el núcleo (triángulos), respectivamente) en células NK que tienen los fenotipos 158V y 158F (paneles A y B, respectivamente).

La Figura 6 muestra los resultados de una titulación de peracetato de alquinil fucosa ("peracetato Alk Fuc") en un cultivo de células hospedadoras que expresan el anticuerpo h1F6 y el efecto en la producción de Ab con fucosilación del núcleo (G0).

45 Descripción detallada de la invención

Definiciones

50 El término "anticuerpo" hace referencia a (a) polipéptidos de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activa de los polipéptidos de inmunoglobulina, *es decir*, polipéptidos de la familia de la inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que contienen un sitio de unión al antígeno que se une de manera inmuno-específica a un antígeno específico (*por ejemplo*, CD70) y un dominio Fc que comprende una(s) cadena(s) de azúcar ligada a un N-glucósido complejo, o (b) derivados sustituidos de forma conservadora de tales polipéptidos de inmunoglobulina o fragmentos que se unen de manera inmuno-específica al antígeno (*por ejemplo*, CD70). Los anticuerpos se describen en general en, *por ejemplo*, Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press,

1988). A menos que resulte evidente de otro modo a partir del contexto, la referencia a un anticuerpo también incluye derivados de anticuerpos tal como se describen en más detalle a continuación.

5 Un "derivado de anticuerpo" significa un anticuerpo, tal como se ha definido anteriormente (incluyendo un fragmento de anticuerpo), o un dominio o región Fc de un anticuerpo que comprende una cadena de azúcar ligada a un N-glucósido complejo, que se modifica mediante unión covalente de una molécula heteróloga tal como, *por ejemplo*, mediante unión de un polipéptido heterólogo (*por ejemplo*, un dominio de unión al ligando de una proteína heteróloga), o mediante glicosilación (distinta de fucosilación del núcleo), desglucosilación (distinta de la no fucosilación del núcleo), acetilación, fosforilación u otra modificación no asociada habitualmente con el anticuerpo o el dominio o región Fc.

10 El término "anticuerpo monoclonal" hace referencia a un anticuerpo que se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariótico o procarriótico, o un clon fago, y no el método mediante el cual es producido. Por tanto, el término "anticuerpo monoclonal" no está limitado a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridomas.

15 El término "región Fc" hace referencia a la región constante de un anticuerpo, *por ejemplo*, un dominio C_H1-bisagra-C_H2-C_H3, de manera opcional que tenga un dominio C_H4, o un derivado sustituido de manera conservadora de una región Fc de este tipo.

El término "dominio Fc" hace referencia al dominio de la región constante de un anticuerpo, *por ejemplo*, un dominio C_H1, bisagra, C_H2, C_H3 o C_H4, o un derivado sustituido de manera conservadora de un dominio Fc de ese tipo.

Un "antígeno" es una molécula a la que un anticuerpo se une específicamente.

20 Los términos "unión específica" y "se une específicamente" significan que el anticuerpo o derivado de anticuerpo se unirá, de manera altamente selectiva, con su correspondiente antígeno diana y no con la multitud de otros antígenos. Habitualmente, el anticuerpo o derivado de anticuerpo se une con una afinidad de al menos 1×10^{-7} M, y preferiblemente 1×10^{-8} M a 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, o 1×10^{-12} M y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (*por ejemplo*, BSA, caseína) distinto al antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

25 Los términos "inhibir" o "inhibición de" significan reducir en una cantidad mensurable, o prevenir completamente.

30 Tal como se utiliza en la presente patente, "peracetato de alquínil fucosa" hace referencia a cualquiera o todas las formas de alquínil fucosa (5-etinilarabinosa) con grupos acetato en las posiciones R¹⁻⁴ (ver la fórmula I y II, infra), incluyendo tetraacetato de 6-etinil-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo, incluyendo los isómeros (2S, 3S, 4R, SR, 6S) y (2R, 3S, 4R, 5R, 6S), y tetraacetato de 5-((S)-1-hidroxiprop-2-inil)-tetrahidrofuran-2,3,4-triilo, incluyendo los isómeros (2S,3S,4R,SR) y (2R,3S,4R,SR), y la forma aldosa, a menos que se indique de otro modo por el contexto. Los términos "triacetato de alquínil fucosa", "diacetato de alquínil fucosa" y "monoacetato de alquínil fucosa" hacen referencia a las formas indicadas tri-, di- y mono- acetato de la alquínil fucosa, respectivamente.

35 A menos que se indique de otro modo por el contexto, el término "alquilo" hace referencia a un hidrocarburo ramificado o recto, saturado, no sustituido o sustituido que tiene de 1 a 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferidos de 1 a 3, 1 a 8 o 1 a 10 átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, y 3,3-dimetil-2-butilo.

40 Grupos alquilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden ser sustituidos opcionalmente con uno o más grupos, preferiblemente 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), incluyendo, pero sin limitarse a: halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquénilo C₂-C₈), -O-(alquínilo C₂-C₈), arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de -H, alquilo -C₁-C₈, alquénilo -C₂-C₈, alquínilo -C₂-C₈, o arilo. En algunos modos de realización, los grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquénilo C₂-C₈), -O-(alquínilo C₂-C₈), arilo, y R' pueden ser sustituidos adicionalmente. Tales sustituyentes adicionales incluyen, por ejemplo, alquilo -C₁-C₈, alquénilo -C₂-C₈, alquínilo -C₂-C₈, halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquénilo C₂-C₈), -O-(alquínilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -NH₂, -NH(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente de H, alquilo -C₁-C₈, alquénilo -C₂-C₈, alquínilo -C₂-C₈, o arilo en donde dichos sustituyentes adicionales son preferiblemente no sustituidos. En algunos modos de realización, los grupos O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquénilo C₂-C₈), -O-(alquínilo C₂-C₈), arilo, y R' no son adicionalmente sustituidos.

5 A menos que se indique de otro modo por el contexto, los términos "alqueno" y "alquino" hacen referencia a cadenas de carbono sustituidas o no sustituidas rectas o ramificadas que tienen de 2 a 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono en los mismos), siendo preferidos de 2 a 3, 2 a 4, 2 a 8 o 2 a 10 átomos de carbono. Una cadena de alqueno tiene al menos un enlace doble en la cadena y una cadena de alquino tiene al menos un enlace triple en la cadena. Ejemplos de grupos alqueno incluyen, pero no se limitan a, etileno o vinilo, alilo, -1 buteno, -2 buteno, - isobuteno, -1 penteno, -2 penteno, 3-metil-1-buteno, -2 metil 2 buteno, y -2,3 dimetil 2 buteno. Ejemplos de grupos alquino incluyen, pero no se limitan a, acetilénico, propargilol, acetileno, propino, -1 butino, -2 butino, -1 pentino, -2 pentino, y -3 metil 1 butino.

10 Grupos alqueno y alquino, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden ser opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), incluyendo pero sin limitarse a: halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo -C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, o arilo. En algunos modos de realización, los grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, R' pueden ser sustituidos adicionalmente. Tales sustituyentes adicionales incluyen, por ejemplo, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente de H, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, o arilo, en donde dichos sustituyentes adicionales son preferiblemente no sustituidos. En algunos modos de realización, los grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, y R' no son sustituidos adicionalmente.

25 A menos que se indique de otro modo por el contexto, el término "alqueno" hace referencia a un radical hidrocarburo sustituido o no sustituido saturado ramificado o de cadena recta que tiene de 1 a 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), siendo preferido de 1 a 8 o 1 a 10 átomos de carbono y con dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos diferentes de carbono de un alcano parental. Alquenos típicos incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno, y similares.

30 Grupos alqueno, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden ser opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferiblemente 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), incluyendo, pero sin limitarse a: halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, o -arilo. En algunos modos de realización, los grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), arilo, y R' pueden ser adicionalmente sustituidos. Tales sustituyentes adicionales incluyen, por ejemplo, alquilo C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente de H, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, o arilo en donde dichos sustituyentes adicionales son preferiblemente no sustituidos. En algunos modos de realización, los grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, y R' son no sustituidos adicionalmente.

45 A menos que se indique de otro modo por el contexto, el término "arilo" hace referencia a un radical hidrocarburo aromático monovalente sustituido o no sustituido de 6-20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono en el mismo) derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno a partir de un único átomo de carbono de un sistema de anillo aromático. Algunos grupos arilo están representados en las estructuras a modo de ejemplo como "Ar". Los grupos arilo habituales incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, fenilo, naftaleno, antraceno, bifenilo, y similares.

50 Un grupo arilo, ya sea solo o como parte de otro grupo, puede ser opcionalmente sustituido con uno o más, preferiblemente 1 a 5, o incluso 1 a 2 grupos que incluyen, pero no se limitan a: halógeno, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -NO₂, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, o arilo. En algunos modos de realización, los grupos alquilo C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), arilo y R' pueden ser adicionalmente sustituidos. Tales sustituyentes incluyen, por ejemplo, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde R" se selecciona independientemente de -H, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, o arilo en donde dichos sustituyentes

adicionales son preferiblemente no sustituidos. En algunos modos de realización, los grupos alquilo - C₁-C₈, alqueno - C₂-C₈, alquino - C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), arilo y R' no son sustituidos adicionalmente.

5 A menos que se indique de otro modo por el contexto, el término "heterociclo" hace referencia a un sistema de anillo monocíclico sustituido o no sustituido que tiene de 3 a 7, o 3 a 10, átomos de anillo (también denominados miembros de anillo) en donde al menos un átomo de anillo es un heteroátomo seleccionado de N, O, P, o S (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono y heteroátomos en el mismo). El heterociclo puede tener de 1 a 4 heteroátomos de anillo seleccionados independientemente de N, O, P, o S. Uno o más átomos de N, C, o S en un heterociclo pueden ser oxidados. Un heterociclo monocíclico
10 preferiblemente tiene 3 a 7 miembros de anillo (por ejemplo, 2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O, P, o S). El anillo que incluye el heteroátomo puede ser aromático o no aromático. A menos que se señale de otro modo, el heterociclo está unido a su grupo lateral en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que da como resultado una estructura estable.

15 Los heterociclos se describen en Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), en particular los capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 hasta la actualidad), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. 82:5566 (1960).

20 Ejemplos de grupos "heterociclo" incluyen a modo de ejemplo y sin limitación piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, fucosilo, aziridinilo, azetidínilo, oxiranilo, oxetanilo, y tetrahidrofuranilo.

Un grupo heterociclo, ya sea solo o como parte de otro grupo, puede ser opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferiblemente 1 o 2 grupos, que incluyen pero no se limita a: alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, o -arilo. En algunos modos de realización, los grupos O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, arilo, y R' pueden ser adicionalmente sustituidos. Tales sustituyentes incluyen, por ejemplo, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, o arilo en donde dichos sustituyentes adicionales son preferiblemente no sustituidos. En algunos modos de realización, los grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, arilo, y R' son no sustituidos.

35 A modo de ejemplo y no como limitación, los heterociclos enlazados a carbono pueden enlazarse en las siguientes posiciones: posición 2, 3, 4, 5, o 6 de una piridina; posición 3, 4, 5, o 6 de una piridazina; posición 2, 4, 5, o 6 de una pirimidina; posición 2, 3, 5, o 6 de una pirazina; posición 2, 3, 4, o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrolo o tetrahidropirrolo; posición 2, 4, o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol; posición 3, 4, o 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol; posición 2 o 3 de una aziridina; posición 2, 3, o 4 de una azetidina. Ejemplos de heterociclos enlazados a carbono pueden incluir 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, o 5-tiazolilo.

45 A modo de ejemplo y no como limitación, los heterociclos enlazados a nitrógeno pueden enlazarse en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, o 1H-indazol; posición 2 de un isoindol, o isoindolina; y posición 4 de una morfolina. Aún más habitualmente, los heterociclos enlazados a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo, y 1-piperidinilo.

50 A menos que se señale de otro modo, el término "carbociclo", hace referencia a un sistema de anillo sustituido o no sustituido, saturado o no saturado monocíclico no aromático que tiene 3 a 6 átomos de anillo (y todas las combinaciones y sub-combinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono en el mismo) en donde todos los átomos de anillo son átomos de carbono.

Los grupos carbociclo, ya sean solos o como parte de otro grupo, pueden ser opcionalmente sustituidos con, por ejemplo, uno o más grupos, preferiblemente 1 o 2 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado de halógeno), incluyendo, pero sin limitarse a: halógeno alquilo C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de H, alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, o arilo. En algunos modos de realización, los grupos alquilo -C₁-C₈, alqueno -C₂-C₈, alquino -C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-

(alquinilo C₂-C₈), -arilo y R' pueden ser adicionalmente sustituidos. Tales sustituyentes adicionales incluyen, por ejemplo, alquilo -C₁-C₈, alquenilo -C₂-C₈, alquinilo -C₂-C₈, halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente de H, alquilo -C₁-C₈, alquenilo -C₂-C₈, alquinilo -C₂-C₈, o arilo en donde dichos sustituyentes adicionales son preferiblemente no sustituidos. En algunos modos de realización, los grupos alquilo -C₁-C₈, alquenilo -C₂-C₈, alquinilo -C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), arilo y R' son no sustituidos.

Ejemplos de sustituyentes carbocíclicos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo, ciclooctilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, y -ciclooctadienilo.

Cuando cualquier variable ocurre más de una vez en cualquier constituyente o en cualquier fórmula, su definición en cada ocasión en que ocurre es independiente de su definición en cualquier otra. Las combinaciones de sustituyentes y/o variables se permiten únicamente si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables.

A menos que se indique de otro modo por el contexto, un guión (-) designa el punto de unión a la molécula de cadena lateral. Por consiguiente, el término "-(alquilen C₁-C₁₀)arilo" o "alquilen(arilo) -C₁-C₁₀" hace referencia a un radical alquilen C₁-C₁₀ tal como se define en la presente patente, en donde el radical alquilen se une a la molécula de cadena lateral en cualquiera de los átomos de carbono del radical alquilen, y uno de los átomos de hidrógeno enlazado a un átomo de carbono del radical alquilen es reemplazado con un radical arilo tal como se define en la presente patente.

Cuando un grupo en particular es "sustituido", ese grupo puede tener uno o más sustituyentes, preferiblemente de uno a cinco sustituyentes, de manera más preferible de uno a tres sustituyentes, de la manera más preferible de uno a dos sustituyentes, seleccionados independientemente de la lista de sustituyentes. El grupo puede, sin embargo, generalmente tener cualquier número de sustituyentes seleccionados de halógeno.

Se pretende que la definición de cualquier sustituyente o variable en una localización en particular en una molécula sea independiente de sus definiciones en cualquier otro lugar de esa molécula. Se debe entender que los sustituyentes y los patrones de sustitución en los compuestos de la presente invención puedan ser seleccionados por una persona experta en el arte para proporcionar compuestos que sean químicamente estables que puedan ser sintetizadas fácilmente mediante técnicas conocidas en el arte además de aquellos métodos explicados en la presente patente.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno Federal o Estatal o incluido en la lista de la Farmacopea de EE.UU. o en otras farmacopeas reconocidas en general para su uso en animales, y más concretamente en humanos. El término "ingrediente farmacéuticamente compatible" hace referencia a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que el anticuerpo o derivado del anticuerpo se administra.

El término "biológicamente aceptable" significa adecuado para su uso en el cultivo de líneas celulares para la elaboración de anticuerpos. Ejemplos de sales biológicamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, sulfonato de benceno, p-toluensulfonato, y pamoato (es decir 1,1'-metilen bis-(2 hidroxí 3-naphtoato)). Una sal biológicamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion de acetato, un ion de succinato u otro contra-ion. El contra-ion puede ser cualquier fracción orgánica o inorgánica que estabiliza la carga en el compuesto parental. Además, una sal biológicamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal biológicamente aceptable pueden tener múltiples contra-iones. Por lo tanto, una sal biológicamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contra-iones.

Un "solvato biológicamente aceptable" o "solvato" hace referencia a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un análogo de fucosa. Ejemplos de disolventes que forman solvatos biológicamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético, y etanolamina.

La expresión "pequeños grupos sustractores de electrones" hace referencia a cualquier sustituyente que tenga mayor electronegatividad en el sitio de la unión del sustituyente que, por ejemplo, un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxí o en relación al sustituyente presente en la fucosa en ese sitio. En general, el pequeño grupo sustractor de electrones tiene 10 o menos átomos (distintos de hidrógeno) e incluye grupos tales como nitro; ciano y cianoalquilo

de manera opcional además tiene una estructura tal como un ácido siálico, N-acetilglucosamina de bisección o similares.

De acuerdo con los presentes métodos, habitualmente sólo una cantidad sin importancia de fucosa se incorpora a la(s) cadena(s) de azúcar ligada(s) a un N-glucósido complejo. Por ejemplo, en diversos modos de realización, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, o menos de aproximadamente el 1% del anticuerpo o derivado de anticuerpo presenta fucosilación del núcleo por la fucosa. En algunos modos de realización, sustancialmente ninguna proporción (*es decir*, menos del 0,5%) del anticuerpo o derivado del anticuerpo presenta fucosilación del núcleo por la fucosa.

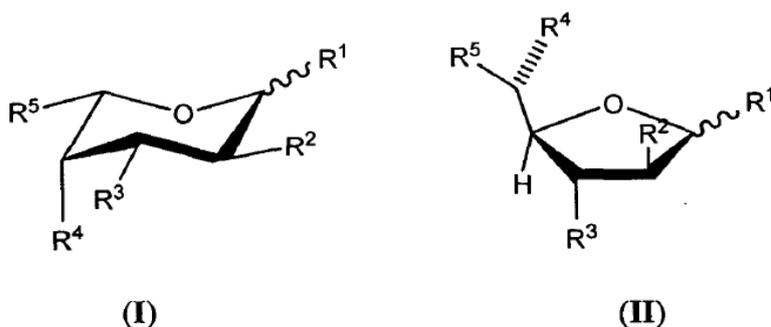
En determinados modos de realización, tan sólo una pequeña cantidad de un análogo de fucosa (o metabolito o producto del análogo de fucosa) se incorpora a la(s) cadena(s) de azúcar ligada(s) a un N-glucósido complejo. Por ejemplo, en diversos modos de realización, menos del aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, o menos de aproximadamente 1% del anticuerpo o derivado del anticuerpo tiene fucosilación del núcleo por un análogo de fucosa o un metabolito o producto del análogo de fucosa. En algunos modos de realización, sustancialmente ninguna proporción (*es decir*, menos de 0,5%) del anticuerpo o derivado del anticuerpo tiene fucosilación del núcleo por un análogo de fucosa o un metabolito o producto del análogo de fucosa.

Análogos de fucosa

En un aspecto, se describen análogos de fucosa que reducen la incorporación de fucosa en la(s) cadena(s) de azúcar ligada(s) a un N-glucósido complejo de anticuerpos o derivados de anticuerpos producidos por células hospedadoras. Análogos de fucosa adecuados (identificados a continuación como Fórmula I, II, III, IV, V y VI) son aquellos que pueden ser añadidos a los medios de cultivo de la célula hospedadora y que inhiben la fucosilación del núcleo de las cadenas de azúcar ligadas a un N-glucósido complejo de anticuerpos o derivados de anticuerpos. El análogo de fucosa es habitualmente recuperado por las células hospedadoras (*por ejemplo*, mediante transporte activo o difusión pasiva).

En algunas realizaciones, un análogo de fucosa (o un metabolito intracelular o producto del análogo de fucosa) inhibe una(s) enzima(s) en la vía de salvamento de la fucosa. (Tal como se utiliza en la presente patente, un metabolito intracelular puede ser, por ejemplo, un análogo modificado con GDP o un análogo completa o parcialmente desesterificado. Un producto puede ser, por ejemplo, un análogo completa o parcialmente desesterificado). Por ejemplo, un análogo de fucosa (o un metabolito intracelular o producto del análogo de fucosa) puede inhibir la actividad de la fucoquinasa, o GDP-fucosa-pirofosforilasa. En algunos modos de realización, un análogo de fucosa (o un metabolito intracelular o producto del análogo de fucosa) inhibe la fucosiltransferasa (preferiblemente una 1,6-fucosiltransferasa, por ejemplo, la proteína FUT8). En algunas realizaciones, un análogo de fucosa (o un metabolito intracelular o producto del análogo de fucosa) puede inhibir la actividad de una enzima en la vía sintética de novo para la fucosa. Por ejemplo, un análogo de fucosa (o un metabolito intracelular o producto del análogo de fucosa) puede inhibir la actividad de GDP-manosa 4,6-deshidratasa y/o GDP-fucosa sintetasa. En algunos modos de realización, el análogo de fucosa (o un metabolito intracelular o producto del análogo de fucosa) puede inhibir un transportador de fucosa (*por ejemplo*, el transportador de GDP-fucosa).

En algunos modos de realización, el análogo de fucosa tiene la siguiente fórmula (I) o (II):



o una sal o solvato biológicamente aceptable del análogo, en donde cada fórmula (I) o (II) puede ser el anómero alfa o beta o la forma aldosa correspondiente. En las fórmulas anteriores, cada R¹-R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH, -OC(O)H, -OC(O) alquilo C₁-C₁₀, -OC(O) alquenilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquínilo C₂-C₁₀, -OC(O)arilo, -OC(O)heterociclo, -OC(O) alquilen arilo C₁-C₁₀, -OC(O) alquilen arilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen arilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₂-C₁₀, -OC(O) alquenilen heterociclo C₂-C₁₀, -OC(O) alquínilen heterociclo C₂-C₁₀,

-OC(O) alquinileno arilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₂-C₁₀, y -OC(O) alquinileno heterociclo C₂-C₁₀; y R⁵ se selecciona del grupo que consiste en -C≡CH, -C≡CCH₃, -CH₂CN y -CO(O)CH₃.

5 En algunos modos de realización, el análogo de fucosa tiene la fórmula (I) o (II), en donde cada R¹-R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH, -OC(O)H, -OC(O) alquilo C₁-C₁₀, -OC(O) alqueno C₂-C₁₀, -OC(O) alqueno C₂-C₁₀, -OC(O) arilo, -OC(O) heterociclo, -OC(O) alquilen arilo C₁-C₁₀, -OC(O) alquilen arilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquinileno arilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₂-C₁₀, y -OC(O) alquinileno heterociclo C₂-C₁₀; y R⁵ se selecciona del grupo que consiste en -C≡CH, -C≡CCH₃, -CH(OAc)CH₃, -CH₂CN, y -CO(O)CH₃.

10 En algunos modos de realización, el análogo de fucosa tiene la fórmula (I) o (II), en donde R⁵ es tal como se define en la presente patente, y cada R¹-R⁴ es distinto de hidroxilo.

En algunos modos de realización, el análogo de fucosa tiene la fórmula (I) o (II), en donde cada R¹-R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH, y -OAc; y R⁵ se selecciona del grupo que consiste en -C≡CH, -C≡CCH₃, -CH(OAc)CH₃, -CH₂CN, y -CO(O)CH₃.

15 En algunos modos de realización, el análogo de fucosa tiene la fórmula (I) o (II), en donde cada R¹-R⁴ es -OH o un éster seleccionado del grupo que consiste en -OC(O)H, -OC(O) alquilo C₁-C₁₀, -OC(O) alqueno C₂-C₁₀, -OC(O) alqueno C₂-C₁₀, -OC(O) arilo, -OC(O) heterociclo, -OC(O) alquilen arilo C₁-C₁₀, -OC(O) alquilen arilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquinileno arilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₁-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₂-C₁₀, -OC(O) alquinileno heterociclo C₂-C₁₀, -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃ (donde n es 0-5), y -OC(O)CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃ (donde n es 0-5); y R⁵ se selecciona del grupo que consiste en -C≡CH, -C≡CCH₃, -CH₂C≡CH, -C(O)OCH₃, -CH(OAc)CH₃, -CN, -CH₂CN, -CH₂X (en donde X es Br, Cl o I), y metoxiran.

20 En algunos modos de realización, el análogo de fucosa tiene un peso molecular de menos de 2000 daltons. En algunas realizaciones, el análogo de fucosa tiene un peso molecular de menos de 1000 daltons.

En algunas realizaciones, R⁵ es no sustituido.

En algunos modos de realización, cada R¹-R⁴ es no sustituido.

25 En algunos modos de realización, R⁵ no es una cetona (-C(O)alquilo).

En algunos modos de realización, R⁵ no es -CHCH₃OAc.

En algunos modos de realización, R⁵ no es -CHCH₃OAc, cuando cada R¹-R⁴ es -OAc.

En algunos modos de realización, R⁵ no es -C≡CH₃.

En algunos modos de realización, R⁵ no es -C≡CH₃, cuando cualquier R¹-R⁴ es -OAc.

30 En algunos modos de realización, R⁵ no es -C≡CH₃, cuando cualquier R¹-R⁴ es -OC(O)alquilo.

En algunos modos de realización, R⁵ no es -C≡CH₃, cuando cada R¹-R⁴ es -OC(O)alquilo.

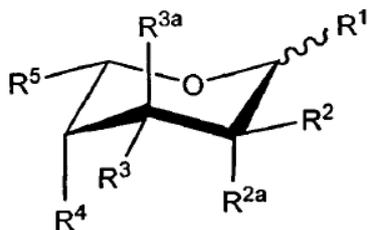
En algunos modos de realización, R⁵ no es -C≡CH₃, cuando cada R¹-R⁴ es OH.

35 En algunos modos de realización, el análogo de fucosa es peracetato de alquil fucosa. En algunas realizaciones, el análogo de fucosa es triacetato de alquil fucosa. En algunas realizaciones, el análogo de fucosa es diacetato de alquil fucosa. En algunos modos de realización, el análogo de fucosa es una mezcla de peracetato de alquil fucosa, triacetato de alquil fucosa y diacetato de alquil fucosa.

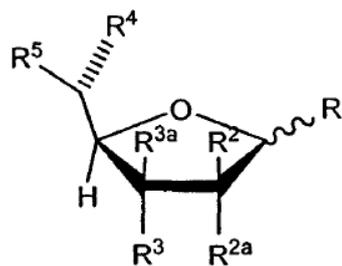
En algunos modos de realización, el análogo de fucosa es una mezcla de peracetato de alquil fucosa, triacetato de alquil fucosa, diacetato de alquil fucosa y monoacetato de alquil fucosa.

40 En cualquiera de los diversos modos de realización, el análogo de fucosa no es fucosa. En algunas realizaciones, el análogo de fucosa no es peracetato de alquil fucosa. En algunas realizaciones, el análogo de fucosa no es galactosa o L-galactosa.

En otro grupo de realizaciones, el análogo de fucosa tiene la siguiente fórmula (III) o (IV):



(III)



(IV)

o una sal o solvato biológicamente aceptable del mismo, en donde cada fórmula (III) o (IV) puede ser el anómero alfa o beta o la correspondiente forma aldosa; y en donde,

5 cada R¹-R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en flúor, cloro, -OH, -OC(O)H, -OC(O) alquilo C₁-C₁₀, -OC(O) alquenilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquinilo C₂-C₁₀, -OC(O)arilo, -OC(O)heterociclo, -OC(O) alquilen(arilo) C₁-C₁₀, -OC(O) alquilen(arilo) C₂-C₁₀, -OC(O) alquinil(arilo) C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₁-C₁₀, -OC(O) alquilenil(heterociclo) C₂-C₁₀, -OC(O) alquinil heterociclo C₂-C₁₀, -OCH₂OC(O) alquilo, -OCH₂OC(O)O alquilo; -OCH₂OC(O) arilo, -OCH₂OC(O)O arilo, -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -O-tri-alquilsililo C₁-C₃ y -O alquilo C₁-C₁₀, en donde cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0-5; y

10 cada R^{2a} y R^{3a} se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F y Cl;

R⁵ se selecciona del grupo que consiste en -CH₃, -CHF₂, -CH=C=CH₂, -C=CH, -C≡CCH₃, -CH₂C≡CH, -C(O)OCH₃, -CH(OAc)CH₃, -CN, -CH₂CN, -CH₂X (en donde X es Br, Cl o I), y metoxiran;

en donde R⁵ es distinto de -CH=C=CH₂ o -CHF₂, al menos uno de R¹, R², R³, R^{2a} y R^{3a} es flúor o cloro.

En algunos modos de realización de las fórmulas (III) o (IV), R¹ es F.

15 En algunos modos de realización de las fórmulas (III) o (IV), R² es F.

En algunos modos de realización de las fórmulas (III) o (IV), R³ es F.

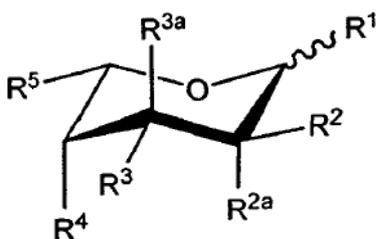
En algunos modos de realización de las fórmulas (III) o (IV), R¹ y R² son cada uno F.

En algunos modos de realización de las fórmulas (III) o (IV), R² y R^{2a} son cada uno F.

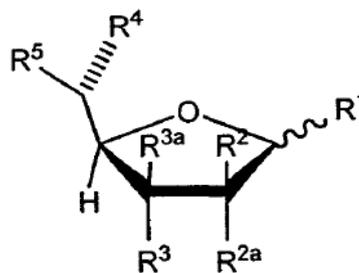
20 En algunos modos de realización de las fórmulas (III) o (IV), R¹, R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -OH y -OAc; R² es F; y R⁵ es -CH₃.

En algunos modos de realización de las fórmulas (III) o (IV), R¹, R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -OH y -OAc; R² es F; R^{2a} y R^{3a} son cada uno H; y R⁵ es -CH₃.

En otro grupo de realizaciones, el análogo de fucosa tiene la siguiente fórmula (V) o (VI):



(V)



(VI)

o una sal o solvato biológicamente aceptable del mismo, en donde cada fórmula (V) o (VI) puede ser el anómero alfa o beta o la forma aldosa correspondiente; y en donde,

- 5 cada R^1 , R^2 , R^{2a} , R^3 , R^{3a} y R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH, -OC(O)H, -OC(O) alquilo C_1 - C_{10} , -OC(O) alquenilo C_2 - C_{10} , -OC(O) alquinilo C_2 - C_{10} , -OC(O) arilo, -OC(O)heterociclo, -OC(O) alquilen(arilo) C_1 - C_{10} , -OC(O) alquilen(arilo) C_2 - C_{10} , -OC(O) alquini(arilo) C_2 - C_{10} , -OC(O) alquilen heterociclo C_1 - C_{10} , -OC(O) alquilen(heterociclo) C_2 - C_{10} , -OC(O) alquini(heterociclo) C_2 - C_{10} , -OCH₂OC(O) alquilo, -OCH₂OC(O)O alquilo, -OCH₂OC(O) arilo, -OCH₂OC(O)O arilo, -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -OC(O)CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -O-tri-alquilsililo C_1 - C_3 , -O alquilo C_1 - C_{10} , y un grupo sustractor de electrones pequeño, en donde cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0-5;
- 10 R^5 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en -CH₃, -CH₂X, -CH(X')-alquilo C_1 - C_4 sustituido o no sustituido con un halógeno, -CH(X')-alqueno C_2 - C_4 sustituido y no sustituido con halógeno, -CH(X')-alquino C_2 - C_4 sustituido o no sustituido con halógeno, -CH=C(R¹⁰)(R¹¹), -C(CH₃)=C(R¹²)(R¹³), -C(R¹⁴)=C=C(R¹⁵)(R¹⁶), carbociclo C_3 sustituido o no sustituido con metilo o halógeno, -CH(X')-carbociclo C_3 sustituido o no sustituido con metilo o halógeno, -CH(X')-heterociclo C_3 sustituido o no sustituido con metilo o halógeno, -CH₂N₃, -CH₂CH₂N₃, y benciloximetilo, o R^5 es un grupo sustractor de electrones pequeño;

en donde R^{10} es hidrógeno o alquilo C_1 - C_3 sustituido o no sustituido con halógeno; R^{11} es alquilo C_1 - C_3 sustituido o no sustituido con halógeno; R^{12} es hidrógeno, halógeno o alquilo C_1 - C_3 sustituido o no sustituido con halógeno; R^{13} es hidrógeno, o alquilo C_1 - C_3 sustituido o no sustituido con halógeno; R^{14} es hidrógeno o metilo; R^{15} y R^{16} se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo y halógeno; X es halógeno; X' es halógeno o hidrógeno; y

- 20 adicionalmente, cada R^1 , R^2 , R^{2a} , R^3 y R^{3a} son opcionalmente hidrógeno; opcionalmente dos R^1 , R^2 , R^{2a} , R^3 y R^{3a} en átomos de carbono adyacentes se combinan para formar un doble enlace entre dichos átomos de carbono adyacentes; y

- 25 dado que al menos uno de R^1 , R^2 , R^{2a} , R^3 , R^{3a} , R^4 y R^5 es un grupo sustractor de electrones pequeño, o R^5 comprende un halógeno, sitio de insaturación, carbociclo, heterociclo o azida, excepto cuando (i) R^2 y R^{2a} son ambos hidrógeno, (ii) R^3 y R^{3a} son ambos hidrógeno, (iii) R^1 es hidrógeno, (iv) un enlace doble es presente entre dichos átomos de carbono adyacentes, o (v) R^5 es benciloximetilo; y

en donde el anticuerpo o derivado de anticuerpo presenta una fucosilación del núcleo reducida en comparación con el anticuerpo o derivado de anticuerpo de la célula hospedadora cultivada en ausencia de análogo de fucosa.

En algunos modos de realización de las fórmulas (V) y (VI), R^{2a} y R^{3a} son cada uno hidrógeno.

- 30 En algunos modos de realización de las fórmulas (V) y (VI), R^5 se selecciona del grupo que consiste en -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂C≡CH, -CH=CHCH₃, -ciclopropilo, -oxirano, -oxirano sustituido con metilo, -CH₂F, -CH₂Cl, -CH₂Br, -CH₂I, -CH=C=CH₂, -CH₂N₃ y -CH₂CH₂N₃.

- 35 En algunos modos de realización de las fórmulas (V) y (VI), el pequeño grupo sustractor de electrones se selecciona de flúor, cloro, bromo, -CHF₂, -CH=C=CH₂, -C≡CH, -C≡CCH₃, -CH₂C≡CH, -CO₂H, -C(O)O-alquilo C_1 - C_4 , -CH(OAc)CH₃, -CN, -CH₂CN, -CH₂X (en donde X es Br, Cl o I), y metoxiran.

En algunos modos de realización de las fórmulas (V) y (VI), al menos dos de R^1 , R^2 , R^{2a} , R^3 , R^{3a} y R^4 se seleccionan independientemente de pequeños grupos sustractores de electrones.

En algunas realizaciones de las fórmulas (V) y (VI), el análogo de fucosa se selecciona de los compuestos de las Tablas 1, 2 o 3.

- 40 Aunque los presentes métodos inventivos y cultivos celulares pueden incluir los análogos de fucosa proporcionados en las fórmulas I, II, III, IV, V y VI anteriores, la presente invención proporciona compuestos de cada una de las anteriores fórmulas que pueden ser preparadas utilizando la metodología proporcionada en la presente patente. En algunos modos de realización, los compuestos de la invención son distintos de los compuestos identificados en los Ejemplos como 6, 7, 9, 10, 22, 24, 26, 54, 56-58, 61-62, 65 y 66, además de 2-fluoro-desoxifucosa.

- 45 Anticuerpos y derivados de anticuerpos

- 50 Los anticuerpos que pueden ser producidos mediante los presentes métodos pueden ser monoclonales, quiméricos, humanizados (incluyendo los "chapados" o recubiertos, del inglés "veneered"), o anticuerpos humanos. Anticuerpos adecuados también incluyen fragmentos de anticuerpo, tales como anticuerpos de cadena única, o similares que tienen una región o dominio Fc con una cadena de azúcar ligada a un N-glucósido complejo (*por ejemplo*, una región o dominio Fc de la IgG1 humana). La región o dominio Fc puede incluir un sitio de unión al receptor Fc-gamma.

Habitualmente, los anticuerpos son humanos o humanizados. En algunos modos de realización, los anticuerpos pueden ser de roedores (*por ejemplo*, ratón y rata), burro, oveja, conejo, cabra, conejillo de Indias, camélido, caballo, o pollo.

5 Los anticuerpos pueden ser mono-específicos, bi-específicos, tri-específicos, o de mayor multi-especificidad. Los anticuerpos multi-específicos pueden ser específicos para diferentes epítomos de diferentes antígenos diana o pueden ser específicos para diferentes epítomos en el mismo antígeno diana. (*ver, por ejemplo*, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; U.S. Pat. Nos. 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; y 5.601.819; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.)

10 Los anticuerpos pueden además ser descritos en términos de su afinidad de unión a un antígeno diana de 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M.

15 En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes de un anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como los anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Métodos para la producción de anticuerpos quiméricos se conocen en el arte. (*ver, por ejemplo*, Morrison, Science, 1985, 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; U.S. Pat. Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.)

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, incluyendo un anticuerpo chapado. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo que se unen al antígeno deseado y que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs, por sus siglas en inglés) de una especie no humana, y regiones marco y constantes de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos de la región marco en las regiones marco humanas serán sustituidos con el correspondiente residuo de la CDR del anticuerpo donante para modificar, o preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región marco se identifican mediante métodos bien conocidos en el arte, *por ejemplo*, mediante modelización de interacciones de los residuos de CDR y de región marco para identificar residuos de la región marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos de región marco inusuales en posiciones concretas. (*Ver, por ejemplo*, Queen et al., U.S. Pat. No. 5.585.089; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323.) Los anticuerpos pueden ser humanizados utilizando una variedad de técnicas conocidas en el arte tales como injertos de CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; U.S. Pat. Nos. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento (veneering) o acondicionamiento de la superficie (resurfacing) ((EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973), e intercambio de cadenas (del inglés chain shuffling) (U.S. Pat. No. 5.565.332).

35 El anticuerpo puede además ser un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden realizarse mediante una variedad de métodos conocidos en el arte tales como métodos de expresión en fago (phage display) utilizando genotecas de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulina humana. *Ver por ejemplo*, U.S. Pat. Nos. 4.444.887 y 4.716.111; WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741. Además, un anticuerpo humano que reconoce un epítipo seleccionado puede ser generado utilizando una técnica denominada "selección guiada", en la que un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, *por ejemplo*, un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (*ver, por ejemplo*, Jaspers et al., 1994, Biotechnology 12:899-903). Los anticuerpos humanos pueden además ser producidos utilizando ratones transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden ser obtenidos a partir de los ratones transgénicos inmunizados utilizando tecnología de hibridomas convencional. Para una visión de conjunto de la tecnología para la producción de anticuerpos humanos, *ver, por ejemplo*, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la Patente Europea nº 0 598, 877; Patentes estadounidenses nº 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598.

Ejemplos de anticuerpos incluyen HERCEPTIN® (trastuzumab; Genentech), RITUXAN® (rituximab; Genentech), lintuzumab (Seattle Genetics, Inc.), Palivizumab (Medimmune), Alemtuzumab (BTG) y Epratuzumab (Immunomedics).

50 En ejemplos de modos de realización, un anticuerpo o derivado de anticuerpo se une específicamente a CD19, CD20, CD21, CD22, CD30, CD33, CD38, CD40, CD70, CD133, CD138, o CD276. En otros modos de realización, el anticuerpo o derivado de anticuerpo se une específicamente a BMPR1B, LAT1 (SLC7A5), STEAP1, MUC16, factor potenciador de megacariocitos (MPF), Napi3b, Sema 5b, PSCA hlg, ETBR (receptor de Endotelina tipo B), STEAP2, TrpM4, CRIPTO, CD21, CD79a, CD79b, FcRH2, HER2, HER3, HER4, NCA, MDP, IL20R α , Brevican, Ephb2R, ASLG659, PSCA, PSMA, GEDA, BAFF-R, CXCR5, HLADOB, P2X5, CD72, LY64, FCRH1, o IRTA2.

Los anticuerpos pueden ser sometidos a ensayo para su unión específica a un antígeno diana mediante métodos convencionales, tales como por ejemplo, sistemas de inmunoensayos competitivos y no competitivos utilizando

técnicas tales como Western blots, radioinmunoensayos, ensayo ELISA (ensayo por inmovilización ligada a enzimas), inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A. (ver, *por ejemplo*, Ausubel et al., eds., Short Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., New York, 4th ed. 1999); Harlow & Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999).)

Además, la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno diana y la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno puede ser determinada mediante resonancia de plasmones de superficie, análisis de competencia con FACS utilizando anticuerpos marcados u otros ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de ensayo de unión competitivo es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de un antígeno marcado (*por ejemplo*, ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades en aumento de anticuerpo no marcado, y la detección del anticuerpo enlazado al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo y las constantes de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos mediante análisis del gráfico de Scatchard. La competición con un segundo anticuerpo puede además ser determinada utilizando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno es incubado con el anticuerpo de interés conjugado a un compuesto marcado (*por ejemplo*, ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades en aumento de un segundo anticuerpo no marcado. De manera alternativa, la afinidad de unión de un anticuerpo y las constantes de afinidad y disociación de una interacción anticuerpo-antígeno pueden ser determinadas mediante resonancia de plasmones de superficie.

Los anticuerpos pueden ser realizados a partir de fragmentos que contienen antígenos del antígeno diana mediante procedimientos estándar según el tipo de anticuerpo (ver, *por ejemplo*, Nature, 256:495, (1975); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (C.S.H.P., NY, 1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989) y WO 90/07861; Dower et al., WO 91/17271 y McCafferty et al., WO 92/01047 (cada uno de los cuales se incorpora a modo de referencia a todos los propósitos). Como ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando una amplia variedad de técnicas que incluyen, *por ejemplo*, el uso de tecnologías de hibridomas, recombinante, y expresión en fago o phage display, o una combinación de las mismas. Las técnicas de hibridomas se tratan en general en, *por ejemplo*, Harlow et al., supra, y Hammerling, et al., en Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Ejemplos de métodos de phage display que pueden ser utilizadas para elaborar anticuerpos incluyen, *por ejemplo*, las reveladas en Briinnan et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280; Solicitud PCT N° PCT/GB91/01 134; Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y patentes estadounidenses n°. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Ejemplos de técnicas que pueden ser utilizadas para producir Fvs y anticuerpos de cadena única incluyen las descritas en las patentes estadounidenses n° 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., 1991, Methods in Enzymology 203:46-88; Shu et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995-7999; y Skerra et al., 1988, Science 240:1038-1040.

Ejemplos de derivados de anticuerpos incluyen fusiones de Ig-dominios de unión, en donde el dominio de unión puede ser, por ejemplo, un ligando, un dominio extracelular de un receptor, un péptido, un péptido no natural o similar. Ejemplos de fusiones con inmunoglobulinas o regiones Fc incluyen: etanercept que es una proteína de fusión de sTNFR1I con la región Fc (patente estadounidense n° 5.605.690), alefacept que es una proteína de fusión de LFA-3 expresada en células de presentación al antígeno con la región Fc (patente estadounidense n° 5.914.111), una proteína de fusión de antígeno-4 asociado a linfocito T citotóxico (CTLA-4) con la región Fc (J. Exp. Med. 181:1869 (1995)), una proteína de fusión de interleucina 15 con la región Fc (J. Immunol. 160:5742 (1998)), una proteína de fusión de factor VII con la región Fc (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:12180 (2001)), una proteína de fusión de interleucina 10 con la región Fc (J. Immunol. 154:5590 (1995)), una proteína de fusión de la interleucina 2 con la región Fc (J. Immunol. 146:915 (1991)), una proteína de fusión de CD40 con la región Fc (Surgery 132:149 (2002)), una proteína de fusión de Flt-3 (tirosina quinasa similar a fms) con la región Fc del anticuerpo (Acta. Haemato. 95:218 (1996)), una proteína de fusión de OX40 con la región Fc del anticuerpo (J. Leu. Biol. 72:522 (2002)), y proteínas de fusión con otras moléculas CD (*por ejemplo*, CD2, CD30 (TNFRSF8), CD95 (Fas), CD106 (VCAM-I), CD137), moléculas de adhesión (*por ejemplo*, ALCAM (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), cadherinas, ICAM (molécula de adhesión celular interna)-1, ICAM-2, ICAM-3) receptores de citocinas (*por ejemplo*, interleucina-4R, interleucina-5R, interleucina-6R, interleucina-9R, interleucina-10R, interleucina-12R, interleucina-13Ralfa1, interleucina-13Ralfa2, interleucina-15R, interleucina-21Ralfa), quimiocinas, moléculas de señal de inducción a la muerte celular (*por ejemplo*, B7-H1, DR6 (receptor de muerte 6), PD-1 (muerte programada -1), TRAIL R1), moléculas co-estimuladoras (*por ejemplo*, B7-1, B7-2, B7-H2, ICOS (co-estimulador inducible)), factores de crecimiento (e.g., ErbB2, ErbB3, ErbB4, HGFR), factores inductores de diferenciación (*por ejemplo*, B7-H3), factores activadores (*por ejemplo*, NKG2D), moléculas de transferencia de señal (*por ejemplo*, gp130), BCMA, y TACI.

Métodos de elaboración de anticuerpos y derivados de anticuerpos sin fucosilación del núcleo

- Pueden producirse anticuerpos y derivados de los mismos que son de utilidad en los presentes métodos mediante técnicas de expresión recombinantes, a partir de hibridomas, de mielomas o a partir de otras células de mamíferos que expresan anticuerpos. La expresión recombinante de un anticuerpo o derivado del mismo que se une a un antígeno diana implica, habitualmente, la construcción de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o derivado del mismo. Una vez que se ha obtenido el ácido nucleico que codifica una proteína de este tipo, el vector para la producción de la molécula de proteína puede ser producido mediante tecnología de ADN recombinante, utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Técnicas estándar tales como las descritas en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 3ª ed., 2001); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2ª ed., 1989); Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, New York, 4ª ed., 1999); and Glick & Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press, Washington, D.C., 2ª ed., 1998), pueden ser utilizadas para métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, cultivo celular, incorporación de transgenes, y expresión de proteínas recombinantes.
- Por ejemplo, para la expresión recombinante de un anticuerpo, un vector de expresión puede codificar una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de la cadena pesada o ligera, enlazado de manera operativa a un promotor. Un vector de expresión puede incluir, *por ejemplo*, la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula del anticuerpo (*ver, por ejemplo*, WO 86/05807; WO 89/01036; y la patente estadounidense 5.122.464), y el dominio variable del anticuerpo puede ser clonado en un vector de ese tipo para la expresión de la cadena pesada o ligera completa. El vector de expresión es transferido a una célula hospedadora mediante técnicas conocidas en el arte, y las células transfectadas se cultivan entonces mediante técnicas conocidas en el arte en presencia de un análogo de fucosa para producir el anticuerpo. Habitualmente, para la expresión de anticuerpos de doble cadena, pueden ser expresados conjuntamente vectores que codifican tanto la cadena pesada como la ligera en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa.
- Una variedad de células y líneas celulares de mamíferos pueden ser utilizadas para expresar un anticuerpo o derivado del mismo. Por ejemplo, pueden utilizarse células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (*por ejemplo*, DG44, Dxb11, CHO-K, CHO-K1 y CHOS). En algunos modos de realización, se utilizan líneas celulares de humanos. Líneas celulares de mieloma adecuadas incluyen SP2/0 y IR983F y líneas celulares de mieloma humano tales como Namalwa. Otras células adecuadas incluyen células de riñón embrionarias humanas (*por ejemplo*, HEK293) células de riñón de mono (*por ejemplo*, COS), células epiteliales humanas (*por ejemplo*, HeLa), PERC6, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, BHK, y K6H6. Otras células hospedadoras adecuadas incluyen las células YB2/0. En otros modos de realización, las células hospedadoras no son células YB2/0.
- En algunos modos de realización, las células hospedadoras proceden de un hibridoma. En algunas realizaciones, las células hospedadoras no son un hibridoma producido por una fusión generada con células de mieloma NS0. En otros modos de realización, las células hospedadoras no proceden de un hibridoma.
- En algunas realizaciones, las células hospedadoras no contienen inactivación génica del transportador de fucosa. En algunas realizaciones las células hospedadoras no contienen inactivación génica de la fucosiltransferasa (*por ejemplo*, FUT8). En algunas realizaciones, las células hospedadoras no contienen activación génica de un ácido nucleico que codifica GnTIII. En algunos modos de realización, las células hospedadoras no contienen activación génica de un ácido nucleico que codifica una alfa manosidasa II de Golgi.
- Una variedad de sistemas de vectores de expresión-hospedador mamífero pueden ser utilizados para expresar un anticuerpo o derivado del mismo. Por ejemplo, células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (*por ejemplo*, DG44, Dxb11, CHO-K1 y CHO-S) en conjunto con un vector tal como el elemento promotor de genes de expresión temprana del citomegalovirus humano, o promotor EF-1 α de ovario de hámster chino, es un sistema de expresión efectivo para la producción de anticuerpos y derivados de los mismos (*ver, por ejemplo*, Foecking et al., 1986, *Gene* 45:101; Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8:2; Allison, Patente estadounidense 5.888.809).
- Las líneas celulares se cultivan en el medio de cultivo apropiado. Medios de cultivo adecuados incluyen los que contienen, por ejemplo, sales, fuentes de carbono (*por ejemplo*, azúcares), fuentes de nitrógeno, aminoácidos, oligoelementos, antibióticos, agentes de selección, y similares, según se requiera para el crecimiento. Por ejemplo, medios comercialmente disponibles tales como el medio F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma), medios de cultivo celular PowerCHO™ (Lonza Group Ltd.), medio libre de suero para cultivo de hibridomas (HSFM) (GIBCO), son adecuados para el cultivo de células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede ser complementado según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como GENTAMICINA™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario puede además incluirse en

concentraciones apropiadas que fueran conocidas para los expertos en el arte. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH, y similares, pueden ser las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y resultarán evidentes para los expertos en el arte.

5 Los medios de cultivo preferiblemente no están complementados con fucosa. En algunos modos de realización, los medios de cultivo son medios libres de suero. En algunos modos de realización, los medios de cultivo son medios libres de proteínas derivadas de animales (*es decir*, libres de proteína animal).

10 Una cantidad efectiva de un análogo de fucosa se añade a los medios de cultivo. En este contexto, una “cantidad efectiva” hace referencia a una cantidad de análogo de fucosa que es suficiente para reducir la incorporación de fucosa en una cadena de azúcar ligada a un N-glucósido complejo de un anticuerpo o derivado de anticuerpo en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o al menos un 50%. En algunas realizaciones, la cantidad efectiva del análogo de fucosa es suficiente para reducir la incorporación de fucosa en una cadena de azúcar ligada a un N-glucósido complejo de un anticuerpo o derivado de anticuerpo en al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90%.

15 Las células que expresan el anticuerpo o derivado de anticuerpo pueden ser cultivadas cultivando la célula hospedadora en cualquier volumen de medio de cultivo complementado con el análogo de fucosa. Las células pueden ser cultivadas en cualquier sistema de cultivo adecuado y según cualquier método conocido en el arte, incluyendo matraces en T, centrifugadora y matraz de agitación, bolsas de cultivo celular WaveBag®, frascos rotativos, biorreactores y biorreactores de tanque agitado. Pueden también cultivarse células dependientes de anclaje en microportadores, *por ejemplo*, esferas poliméricas, que se mantienen en suspensión en biorreactores de tanque agitado. De manera alternativa, las células pueden ser cultivadas en una suspensión de célula única. El medio de cultivo puede ser añadido en un proceso en lotes, *por ejemplo*, en los que el medio de cultivo se añade una vez a las células en un único lote, o en un proceso de alimentación por lotes en el que se van añadiendo periódicamente pequeños lotes de medio de cultivo. El medio puede ser cosechado al final del cultivo o varias veces durante el cultivo. Los procesos de producción de perfusión continua son también conocidos en el arte, e implican la alimentación continua de medio fresco en el cultivo, a la vez que se retira continuamente el mismo volumen del reactor. Los cultivos de perfusión alcanzan, en general, densidades celulares más elevadas que los cultivos en lotes y pueden mantenerse durante semanas o meses con cosechas repetidas.

25 Para las células cultivadas en cultivo por lotes, el volumen del medio de cultivo es habitualmente al menos 750 mL, 1 litro, 2 litros, 3 litros, 4 litros, 5 litros, 15 litros, 20 litros o más. Para aplicaciones industriales, el volumen del medio de cultivo puede ser al menos 100 litros, al menos 200 litros, al menos 250 litros, al menos 500 litros, al menos 750 litros, al menos 1000 litros, al menos 2000 litros, al menos 5000 litros o al menos 10.000 litros. El análogo de fucosa puede ser añadido al tren de cultivos de siembra en serie (seed train), al medio de cultivo por lotes inicial, después de una fase de crecimiento rápida, o de forma continua con el medio de cultivo (*por ejemplo*, durante la alimentación continua). Por ejemplo, el análogo de fucosa puede ser añadido en un estado temprano a un tren de cultivos de siembra en serie de materia prima en una concentración de 10X o 100X, de tal manera que adiciones posteriores de medios de cultivo cambien la concentración del análogo de fucosa a un nivel que sea aún efectivo para lograr una no fucosilación del núcleo del anticuerpo o derivado del anticuerpo. De manera alternativa, el análogo de fucosa se añade directamente a los medios de cultivo, obviando la necesidad de dilución. En cualquier caso, el análogo de fucosa se añade habitualmente relativamente pronto en el proceso de cultivo celular, y se mantiene una concentración efectiva a lo largo del proceso de cultivo para optimizar la producción del anticuerpo o derivado de anticuerpo deseado.

35 En algunas realizaciones, los anticuerpos o derivados de anticuerpos producidos por los presentes métodos comprenden al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o al menos un 50% de proteína no fucosilada en el núcleo (*por ejemplo*, que carezca de fucosilación del núcleo), en comparación con anticuerpos o derivados de anticuerpos producidos a partir de las células hospedadoras en ausencia de un análogo de fucosa. En algunos modos de realización, los anticuerpos o derivados de anticuerpos producidos por los presentes métodos comprenden al menos un 60%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de anticuerpo o derivado de anticuerpo no fucosilado en el núcleo, en comparación con un anticuerpo o derivado producido a partir de células hospedadoras cultivadas en ausencia de un análogo de fucosa. En algunos modos de realización, una composición de anticuerpos o derivados de anticuerpo producidos mediante los métodos presentes, comprende menos del 100% de anticuerpos no fucosilados en el núcleo y/o derivados de anticuerpos.

45 La cantidad de análogo de fucosa (de cualquiera de las fórmulas I, II, III, IV, V y VI) que es efectiva puede ser determinada mediante metodologías de cultivo celular estándar. Por ejemplo, pueden emplearse ensayos de cultivo celular para ayudar a identificar rangos de dosificación óptimos. La cantidad precisa a ser empleada también depende del tiempo de administración, la línea celular hospedadora, la densidad celular y similar. Las dosis efectivas pueden ser extrapoladas a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo con modelos *in vitro*.

En algunas realizaciones, el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 10 nM a 50 mM. En algunas realizaciones, el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 10 nM a 10 mM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 100 nM a 5 mM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 100 nM a 3 mM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 100 nM a 2 mM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 100 nM a 1 mM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 1 μM a 1 mM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 10 nM a 1 mM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 10 nM a 500 μM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 1 μM a 500 μM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 1 μM a 250 μM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo en una concentración de 10 μM a 100 μM. En algunas realizaciones el análogo de fucosa está presente en el medio de cultivo (a la temperatura apropiada para el mantenimiento/crecimiento de células hospedadoras) en una concentración de al menos 10 nM. En algunas realizaciones, el análogo de fucosa es soluble en el medio de cultivo (en la temperatura apropiada para el mantenimiento/crecimiento de células hospedadoras) en una concentración de al menos 100 nM.

El contenido (*por ejemplo*, la relación) de las cadenas de azúcar en las que la fucosa no está enlazada a una N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar, versus las cadenas de azúcar en las que la fucosa está enlazada a una N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar puede ser determinado, *por ejemplo*, tal como se describe en los Ejemplos. Otros métodos incluyen la hidrazinólisis o digestión de enzimas (*ver, por ejemplo*, Biochemical Experimentation Methods 23: Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), editado por Reiko Takahashi (1989)), marcaje fluorescente o marcaje con radioisótopos de la cadena de azúcar liberada, y a continuación separación de la cadena de azúcar marcada mediante cromatografía. Además, las composiciones de las cadenas de azúcar pueden ser determinadas mediante el análisis de las cadenas por el método HPAEC-PAD (*ver, por ejemplo*, J. Liq Chromatogr. 6:1557 (1983)). (*ver en general* la publicación de solicitud de patente estadounidense nº 2004-0110282.).

En algunas realizaciones, los anticuerpos o derivados de anticuerpos producidos mediante los métodos presentes, tienen una función efectora más elevada (*por ejemplo*, actividad ADCC) que los anticuerpos o derivados de anticuerpos producidos en ausencia de un análogo de fucosa. La actividad de función efectora puede ser modulada modificando la concentración del análogo de fucosa en el medio de cultivo y/o la duración de la exposición al análogo de fucosa. La actividad ADCC puede ser medida utilizando ensayos conocidos en el arte, y en ejemplos de realización aumenta en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces o 20 veces, en comparación con el anticuerpo parental fucosilado en el núcleo. La actividad citotóxica contra una línea celular cultivada positiva en antígeno puede ser evaluada midiendo la función efectora (*por ejemplo*, tal como se describe en Cancer Immunol. Immunother. 36:373 (1993)).

Los anticuerpos y derivados de anticuerpos pueden ser purificados utilizando, *por ejemplo*, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de inmunoafinidad, siendo una técnica preferida la cromatografía de inmunoafinidad. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y del isótopo de cualquier dominio Fc que esté presente en el anticuerpo o derivado de anticuerpo. La proteína A puede ser utilizada para purificar anticuerpos o derivados de anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas de la IgG1 2, o 4 humana.

La proteína G puede ser utilizada para isótopos de ratón y para algunos anticuerpos humanos y derivados de anticuerpos. La matriz a la que el ligando de afinidad se une es con la mayor frecuencia agarosa, pero otras matrices se encuentran también disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como el vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten unas tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más reducidos que los que se consiguen con agarosa. Cuando el anticuerpo o derivado de anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es de utilidad para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio de iones (intercambio catiónico o aniónico), precipitación de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en gel de sílice, cromatografía en heparina SEFAROSA™ sobre una resina de intercambio de aniones o cationes (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofocalización, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio también se encuentran disponibles, dependiendo del anticuerpo o derivado de anticuerpo a ser recuperado.

A continuación de cualquiera de la(s) etapa(s) de purificación, la mezcla que comprende el anticuerpo o derivado de anticuerpo de interés y contaminantes puede estar sujeta a cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo (*por ejemplo*, utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 - 4,5, preferiblemente realizado a concentraciones bajas de sal (*por ejemplo*, desde aproximadamente 0 - 0,25M de sal)).

Usos de los anticuerpos y derivados de anticuerpos

Los anticuerpos y derivados de anticuerpos preparados de acuerdo a los presentes métodos pueden ser formulados para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas. Los anticuerpos y derivados pueden ser formulados como composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del anticuerpo o derivativo y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles (aceptables). Por ejemplo, una composición farmacéutica o no farmacéutica incluye habitualmente uno o más soportes (*por ejemplo*, líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los que tienen su origen en el petróleo, animales, vegetales o sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares). El agua es un soporte más habitual cuando la composición farmacéutica es administrada por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol pueden ser empleadas como soportes líquidos, en particular para soluciones inyectables. Excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, aminoácidos, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, carbonato cálcico, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerina, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. La composición, si se desea, puede además contener cantidades sin importancia de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampón de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. Ejemplos de soportes farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contienen habitualmente una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína, habitualmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de soporte para proporcionar la forma para su adecuada administración al paciente. Las formulaciones corresponden al modo de administración.

Habitualmente, las composiciones para la administración por vía intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, el producto farmacéutico puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como la lidocaína para calmar el dolor en el sitio de inyección. En general, los ingredientes se suministran o bien separados o mezclados entre sí en formas de unidades de dosificación, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un envase sellado herméticamente, tal como una ampolla o un saquito indicando la cantidad de agente activo. Cuando el producto farmacéutico va a ser administrado mediante infusión, puede ser dispensado con una botella de infusión que contiene suero salino o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando el producto farmacéutico se administra mediante inyección, una ampolla de agua estéril para inyección o suero salino puede proporcionarse de manera que los ingredientes puedan mezclarse previamente a su administración.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no tienen la intención de limitar el alcance de la invención.

Ejemplos**Ejemplo 1: Síntesis de peracetato de alquinil fucosa y procedimiento general para la síntesis de análogos de fucosa**

La preparación de peracetato de alquinil fucosa (también denominado peracetil alquinil fucosa y alquinil peracetil fucosa) (Compuesto 7) fue descrita por Sawa et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:12371-12376 y Hsu et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:2614-2619, con la siguiente modificación. Se empleó una secuencia de homologación de Corey-Fuchs para instalar un grupo alquinilo, tal como se describe por by Pelphrey et al., 2007, J. Med. Chem. 50:940-950.

Métodos generales para otros análogos de fucosa: reactivos y disolventes comunes fueron adquiridos de Fisher o Sigma-Aldrich, excepto por lo que sigue a continuación: se adquirió L-galactono-1,4-lactona de Carbosynth Limited. Los espectros de ¹H-RMN se registraron en un espectrómetro Varian Mercury a 400 MHz. Se obtuvieron datos de LC/MS en un instrumento de Waters-Micromass utilizando una HP 1100 HPLC con un detector de matriz de fotodiodos o PDA (por sus siglas en inglés). La columna utilizada fue una columna Phenomenex SynergiMax RP-C12 (2 mm x 150 mm) eluyendo con un gradiente de MeCN-agua que contiene 0,05% de ácido fórmico. Se realizó cromatografía en columna Flash (FCC), utilizando gel de sílice de EM Science con malla de 230-400 ASTM, o utilizando un cromatotrón. Se utilizaron placas de gel de sílice GHLF de Analtech para cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) y se aplicó tinción a placas de TLC con vainillina o yodo. Se realizó una HPLC utilizando un sistema de Waters Alliance con un detector PDA.

Ejemplo 2: expresión de anticuerpos en presencia de peracetato de alquinil fucosa

Para determinar el efecto del peracetato de alquinil fucosa en la glicosilación de anticuerpos, se cultivó una línea celular CHO DG44 que expresa un anticuerpo monoclonal anti-CD70 de la IgG1 humanizada, h1F6 (ver la publicación de patente internacional WO 06/113909) a $3,0 \times 10^5$ células por mL en 30 mLs de medios de cultivo CHO a 37°, CO₂ al 5%, mediante agitación a 100 RPM en matraces de agitación de 125 mL. Los medios de cultivo CHO

se complementaron con factor de crecimiento insulínico (IGF), penicilina, estreptomina y 50 o 100 μM de peracetato de alquiniil fucosa (preparado tal como se describe en el Ejemplo 1). Los cultivos se alimentaron en el 3^{er} día con un volumen del 2% de medios de alimentación que contenían 2,5 o 5 mM de peracetato de alquiniil fucosa para los cultivos de 50 y 100 μM de peracetato de alquiniil fucosa, respectivamente. En el 4^o día, cada cultivo se dividió en la relación 1:4 en medios de cultivo fresco. Los cultivos se alimentaron con un volumen del 6% de los medios de alimentación con contenido de 833 μM o 1,66 mM de peracetato de alquiniil fucosa en los días 5, 7, 9 y 10. Los medios acondicionados se recogieron en el día 13 pasando los medios a través de un filtro de 0,2 μm .

La purificación del anticuerpo fue realizada aplicando los medios acondicionados a una columna de proteína A previamente equilibrada con 1X de tampón de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), pH 7,4. Después de la lavar la columna con 20 volúmenes de columna de 1XPBS, los anticuerpos se eluyeron con 5 volúmenes de columna de tampón de elución de IgG Immunopure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se añadió un volumen del 10% de 1M tris pH 8,0 a la fracción eluida. La muestra fue dializada durante la noche en 1X PBS.

Ejemplo 3: Análisis LC-MS (Q-Tof) de anticuerpos producidos mediante expresión en presencia de peracetato de alquiniil fucosa

Para identificar el patrón de glicosilación presente en los anticuerpos h1F6 purificados del Ejemplo 2, se redujeron los enlaces disulfuro entre cadenas de anticuerpos mediante la adición de 10 μL de 100 mM DTT a 90 μL de 1mg/mL de anticuerpo en PBS y la incubación a 37°C durante 15 min. Esta solución (20 μL) se inyectó en una columna PLRP-S HPLC (Polymer Laboratories; Amherst, MA), que ejecuta el siguiente gradiente: disolvente A, TFA al 0,05% en agua; disolvente B, TFA al 0,035% en acetonitrilo; un gradiente lineal de 70 a 50% A, de 0 a 12,5 min. El efluente HPLC fue analizado con un espectrómetro de masas Q-Tof de ionización por electrospray (Waters, Milford, MA) con un voltaje de cono de 35 V que recoge desde m/z 500 a 4000. Los datos para la cadena pesada fueron desentrañados utilizando la función MaxEnt1 en MassLynx 4.0.

De forma sorprendente, las cadenas pesadas de anticuerpos de las células cultivadas en presencia de peracetato de alquiniil fucosa mostraron una reducción de aproximadamente 146 Da, en comparación con los anticuerpos de control (*es decir*, cadenas pesadas de anticuerpos cultivadas en ausencia de peracetato de alquiniil fucosa). Esta observación sugirió que la adición de peracetato de alquiniil fucosa al cultivo no modificó manifiestamente el patrón de glicosilación de los anticuerpos. En lugar de ello, la adición de peracetato de alquiniil fucosa generó un cambio de poca importancia pero detectable en la glicosilación. El cambio es la masa es consecuente con la ausencia de fucosa en los anticuerpos.

Ejemplo 4: Electroforesis capilar de oligosacáridos

Para caracterizar adicionalmente los glicanos en los anticuerpos h1F6 del Ejemplo 3, se llevó a cabo la electroforesis capilar. Se intercambió el tampón de las muestras de los anticuerpos con agua. Se trataron 300 μg de cada muestra con PNGasaF durante la noche a 37°C para liberar oligosacáridos. La proteína componente de la muestra fue retirada mediante adición de metanol frío (-20°C) y se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante se secó y los oligosacáridos fueron marcados utilizando APTS (sal trisódica del ácido 1,3,6-trisulfónico-8-aminopireno) en 1M de cianoborohidruro de sodio/THF a 22°C durante la noche. Los oligosacáridos marcados fueron diluidos con agua y analizados mediante electroforesis capilar utilizando PA-800 de Beckman Coulter en un capilar revestido con N-CHO (Beckman Coulter). Para la Figura 1A, las muestras se pusieron en un tampón de gel N-ligado (Beckman Coulter, Fullerton, Calif., USA). Para las Figuras 1B y 1C, las muestras se pusieron en 40 mM de EACA, 0,2% HPMC a un pH 4,5. Las muestras fueron inyectadas durante 8 segundos a 0,5 psi y se separaron a 30kV durante 15 minutos. Los oligosacáridos marcados se detectaron utilizando fluorescencia inducida por láser (LFI) con una excitación de longitud de onda de 488 λ . Se detectó fluorescencia de emisión a 520 λ .

Muestras de anticuerpos fueron también tratadas con β -galactosidasa para eliminar la galactosa. Se intercambió el tampón de las muestras de anticuerpos con agua. Se trataron 300 μg de cada muestra con PNGasaF durante la noche a 37°C para liberar oligosacáridos. La proteína componente de la muestra fue eliminada mediante adición de metanol frío (-20°C) y centrifugación durante 10 minutos a 14.000 rpm. Los sobrenadantes se secaron, fueron re-suspendidos en agua y tratados con β -galactosidasa. Los oligosacáridos se secaron y a continuación se marcaron utilizando APTS en 1M de cianoborohidruro de sodio/THF a 22°C durante la noche. Los oligosacáridos marcados fueron diluidos con agua y analizados mediante electroforesis capilar utilizando PA-800 de Beckman Coulter en un capilar revestido con N-CHO (Beckman Coulter), poniendo las muestras en 40 mM de EACA, 0,2% HPMC a un pH 4,5. Las muestras fueron inyectadas durante 8 segundos a 0,5 psi y se separaron a 30kV durante 15 minutos. Los oligosacáridos marcados se detectaron utilizando fluorescencia inducida por láser (LFI) con una excitación de longitud de onda de 488 λ . Se detectó fluorescencia de emisión a 520 λ .

Un análisis de los datos de electroforesis capilar se muestra en la Figura 1. En referencia a la Figura 1A, se muestra el electroferograma de glicanos del anticuerpo h1F6 de control. La Figura 1B muestra un electroferograma de glicanos del anticuerpo h1F6 producido a partir de una célula hospedadora cultivada en presencia de peracetato de

alquinil fucosa. Una comparación de las Figuras 1A y 1B revela cantidades aumentadas de G0-F no fucosilado en el núcleo (y una reducción correspondiente en los niveles G0 y G1 fucosilados en el núcleo). Debido a que el pico G1 no fucosilado en el núcleo migró conjuntamente con el G0 fucosilado en el núcleo, fue difícil determinar la distribución relativa de los diferentes glicanos. Para desentrañar los datos, se trataron muestras de anticuerpos separadas con β -galactosidasa. En referencia a la Figura 1C, eliminar la galactosa de manera efectiva colapsó el electroferograma a dos picos, G0 y G0-F (carente de fucosa). En esta muestra tratada con β -galactosidasa, aproximadamente un 85% de los oligosacáridos es no fucosilado en el núcleo y un 6% está fucosilado en el núcleo. El resto consiste en especies de poca importancia.

Ejemplo 5: Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

Para confirmar que parte del anticuerpo h1F6 producido en el Ejemplo 2 no se encontraba fucosilado en el núcleo (en comparación con el anticuerpo parental), la actividad del anticuerpo fue determinada mediante ensayo de ADCC. El ensayo de actividad ADCC fue un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar, tal como se describe previamente (ver McEarchern et al., Blood 109:1185 (2007)). Brevemente, células tumorales diana de la línea celular 786-O fueron marcadas con $100\ \mu\text{Ci}\ \text{Na}_2^{51}\text{Cr}_2\text{O}_7$ y a continuación lavadas. Las células efectoras (NK) se prepararon a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) no adherentes obtenidas a partir de Fc γ R11A 158V donantes normales (Lifeblood, Memphis, TN). La fracción de célula fue enriquecida para las células CD16 $^+$ NK a continuación de la centrifugación sobre gradiente de densidad Ficoll-Paque mediante eliminación de subconjuntos de T, B, y monocitos y depleción negativa de células CD4, CD8, CD20, y CD14 $^+$ utilizando perlas inmunomagnéticas (EasySep, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Se mezclaron células tumorales diana de 786-O marcadas con $\text{Na}_2^{51}\text{Cr}_2\text{O}_7$ con mA b y las células efectoras CD 16+ a una relación célula efectora:diana de 10:1.

Tras una incubación de 4 h a 37°C, la radioactividad (^{51}Cr) liberada en el cultivo de sobrenadante se midió y el porcentaje específico de lisis celular se calculó como (cpm de la muestra de ensayo-cpm espontáneo)/(cpm total – cpm espontáneo) x 100. El cpm espontáneo y total fueron determinados de los sobrenadantes de las células diana incubados en el medio solo y a partir de células lisadas con 1% triton-X100, respectivamente.

En referencia a la Figura 2, en el ensayo de ADCC utilizando PMBC como una fuente de células asesinas naturales (NK) (con el fenotipo 158V), el anti-CD70 mA b de control (círculos sombreados) lisaron las células CD70+ diana en una forma dependiente de la dosis, mientras que no se observó lisis alguna con el IgG humano de control de no unión (rombos sombreados). En contraste, el anticuerpo anti-CD70 aislado de las células hospedadoras cultivadas en presencia de peracetato de alquinil fucosa ("AlkF") ha aumentado la actividad ADCC (círculos y triángulos en blanco). La lisis máxima media (EC_{50}) del anticuerpo anti-CD70 de control fue de aproximadamente 9 ng/mL mientras que las concentraciones EC_{50} de mA b producido en presencia de 50 μM y 100 μM de AlkF fueron 0,5 y 0,3 ng/mL, respectivamente. Los últimos anticuerpos dieron lugar, además, a lisis específica máxima más elevada (53,3 \pm 3,8 y 54,8 \pm 4,7 por ciento) en comparación con la alcanzada con el anti-CD70 mA b de control (42,5 \pm 5,8 por ciento).

Ejemplo 6: ensayos de unión a Fc γ R

Se realizaron ensayos de unión al receptor Fc γ para comparar la unión del anticuerpo de control CD70 con los anticuerpos no fucosilados en el núcleo del Ejemplo 2. Brevemente, las líneas celulares CHO DG-44 estables que expresan Fc γ R11A V158 humano o Fc γ R1V murino se combinaron con 50 nmol/L o 200 nmol/L de anti-CD70 IgG1 marcado Alexa Fluor 488, respectivamente, en presencia de diluciones en serie de cada uno de los siguientes anticuerpos anti-CD70 en PBS, tampón de BSA al 0,1% (p/v): anticuerpo de control h1F6, y anticuerpo h1F6 de células hospedadoras cultivadas con peracetato de alquinil fucosa. Las mezclas se incubaron durante 60 minutos en hielo en la oscuridad. Las células marcadas fueron detectadas utilizando un analizador LSRII FACS, y se analizaron los datos mediante mínimos cuadrados no lineales ajustados a una ecuación logística de 4 parámetros utilizando Prism v5.01 para calcular los valores de EC_{50} .

Los anticuerpos anti-CD70 no fucosilados en el núcleo (triángulos) compitieron por la unión a los receptores huFc γ (Figura 3A) y receptores muFc γ (Figura 3B) con anticuerpos parentales anti-CD70 marcados con fluorescencia (cuadrados). El anti-CD70 no fucosilado en el núcleo sobre compitió con el anticuerpo anti-CD70 parental (control) para la unión al receptor murino, muFc γ R1V, con valores de EC_{50} de 20,8 nM y 368,9 nM, respectivamente (una diferencia de 18 veces). El anti-CD70 no fucosilado en el núcleo también sobre compitió con el anticuerpo parental en la unión al receptor humano, huFc γ R11A V158, con valores de EC_{50} de 7,99nM y 112,9nM, respectivamente (una diferencia de 14 veces).

Ejemplo 7: Expresión de otros anticuerpos en presencia de peracetato de alquinil fucosa

Para confirmar el efecto del peracetato de alquinil fucosa en la glicosilación de anticuerpos adicionales, los anticuerpos expresados a partir de las líneas celulares siguientes: CD70 Ab h1F6 en células DG44; CD19 Ab hBU12 en células DG44 (ver la Solicitud provisional estadounidense N° 61/080,169, registrada el 11, de julio de 2008);

5 CD30 Ab cAC10 en células DG44; y CD33 Ab HuM195 en células SP2/0 y CHO-K1 (ver también U.S Ser. No. 12/253,895, registrada el 17 de octubre de 2008). Brevemente, las líneas celulares fueron inicialmente cultivadas a $3,0 \times 10^5$ células por mL en 30 mLs de medios de selección CHO a 37°C, 5% CO₂ y con agitación a 100 RPM. Los medios fueron complementados con factor de crecimiento insulínico (IGF), penicilina, estreptomicina y 50 µM de peracetato de alquinil fucosa, tal como se describe. Los cultivos se alimentaron en el 3^{er} día con un volumen del 2% de medios de alimentación que contenían 2,5 mM de peracetato de alquinil fucosa. En el 4^o día, cada cultivo se dividió en la relación 1:4 en medios de cultivo fresco. Los cultivos se alimentaron con un volumen del 6% de los medios de alimentación con contenido de 833 µM de peracetato de alquinil fucosa en los días 5, 7, 9 y 10. Los medios acondicionados se recogieron en el día 13 pasando los medios a través de un filtro de 0,2 µm.

10 La purificación del anticuerpo fue realizada aplicando los medios acondicionados a una columna de proteína A previamente equilibrada con 1X de tampón de fosfato salino (PBS), pH 7,4. Los anticuerpos se eluyeron con 5 volúmenes de columna de tampón de elución de IgG Inmunopure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se añadió un volumen del 10% de 1M tris pH 8,0 a la fracción eluida. La muestra fue dializada durante la noche en 1X PBS.

15 El análisis Qtof de los anticuerpos reveló resultados similares a los del Ejemplo 3. En relación a las cadenas pesadas de anticuerpos producidos a partir de células hospedadoras cultivadas en ausencia de peracetato de alquinil fucosa, se observó que las cadenas pesadas de anticuerpos de células cultivadas en presencia de peracetato de alquinil fucosa se reducen en aproximadamente 146 Da, consecuente con ausencia de fucosa. En referencia a la Figura 4, para el pico G0 (no galactosa) para cada anticuerpo, el cambio observado en la masa entre la cadena pesada de células cultivadas en ausencia y en presencia de peracetato de alquinil fucosa (partes superiores e inferiores de cada panel), fue una reducción de 144 Da (anticuerpo anti-CD70, Figura 4A), 145 Da (anticuerpo anti-CD19, Figura 4B), 146 Da (anticuerpo anti-CD30, Figura 4C), y 146 Da (anticuerpo anti-CD33, Figura 4D). Estas reducciones en el peso molecular son consecuentes con la pérdida de cualquier otra azúcar encontrada en un carbohidrato del anticuerpo distinto de la fucosa: manosa y galactosa, 162 da, N-acetilglucosamina, 203 Da, y ácido siálico, 291 Da.

25 **Ejemplo 8: Ensayos de función efectora**

Se determinó las funciones efectoras, ADCC y ACCP, de un anticuerpo CD19 humanizado, no fucosilado en el núcleo, hBU12. La actividad ADCC se midió en general tal como se describe en el Ejemplo 5, utilizando células de Ramos. Se aislaron células NK de individuos con fenotipos 158V y 158F FcγRIIIa.

30 Se evaluó la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), utilizando un método previamente descrito (ver McEarchern et al., Blood 109:1185 (2007)). Brevemente, las células de Ramos diana fueron incubadas con tinción fluorescente PKH26 (Sigma, St. Louis, MO), previamente a la adición del anticuerpo y los macrófagos humanos primarios. Los macrófagos se generaron a partir de PBMC humanas normales cultivadas durante 10 a 14 días con 500 U/ml de G-MCSF humano (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Tras una incubación de 1 h a 37°C, los macrófagos fueron marcados con un anticuerpo CD11b conjugado con FITC (BD Pharmingen). La captación de las células diana mediante los macrófagos (fagocitosis) fue evaluada mediante citometría de flujo y visualizada por inmunofluorescencia utilizando un microscopio Carl Zeiss Axiovert 200M. Se determinó la fagocitosis específica mediante corrección de los valores de fondo de hlgG1.

40 En referencia a las Figuras 5A y 5B, el anticuerpo CD19 no fucosilado en el núcleo (triángulos rellenos) mostraron un aumento de aproximadamente 100 veces en el EC₅₀ en el fondo de 158 V, con un aumento de 3,5 veces en la lisis de células diana máxima, en comparación con el anticuerpo de control (fucosilado en el núcleo) (cuadrados rellenos). En el fondo del 158F, el anticuerpo CD19 no fucosilado en el núcleo (triángulos en blanco) presentaba un aumento de 100 veces en el EC₅₀ y un aumento de 10 veces en la lisis de células diana máxima, en comparación con el anticuerpo de control (fucosilado en el núcleo). En contraste, no se observó ningún cambio en la actividad ADCP entre el anticuerpo no fucosilado en el núcleo y el anticuerpo de control (datos no mostrados).

45 **Ejemplo 9: Expresión de anticuerpos a partir de hibridomas**

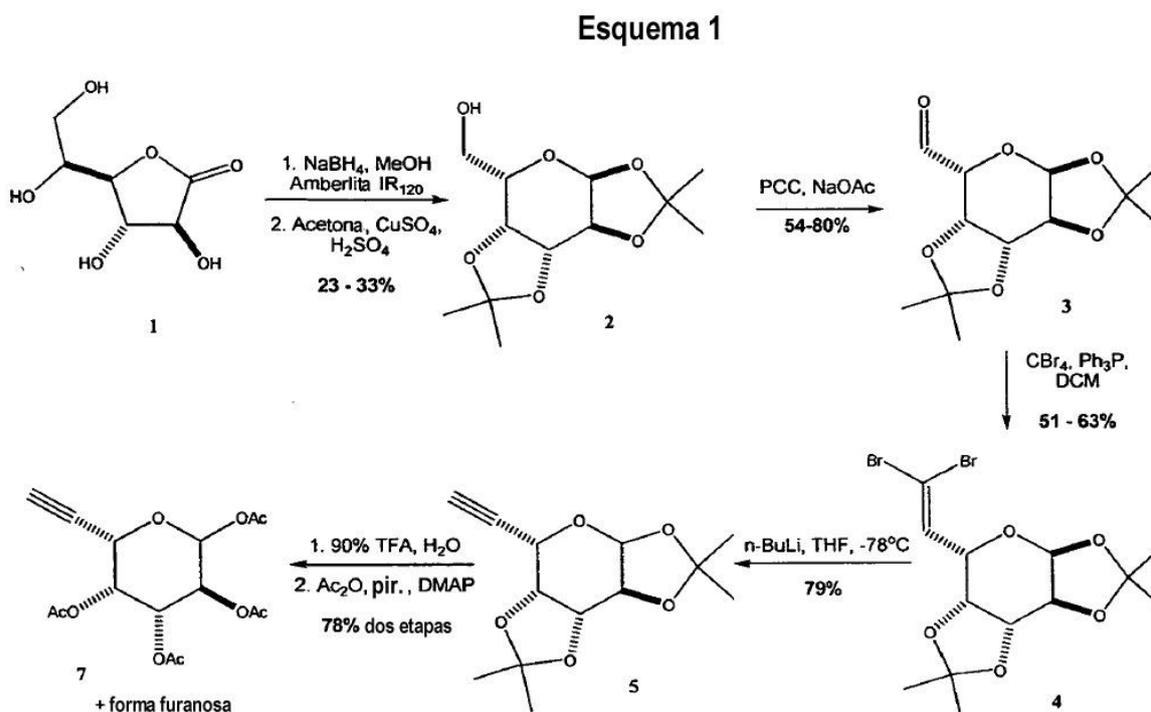
Se sometieron a ensayo tres líneas de hibridomas que expresan anticuerpos para determinar el efecto del peracetato de alquinil fucosa en la fucosilación del núcleo en los anticuerpos de estas líneas celulares. Estos hibridomas fueron: 1) una fusión celular de célula de bazo de ratón BALB/C y mieloma de ratón P2X63-AG 8.653 que expresa el anticuerpo BR96 del antígeno anti-ley quimérico; 2) una fusión celular de célula de bazo de ratón BALB/C y mieloma de ratón NS0 que expresa un anticuerpo anti-Liv1 murino; y 3) una fusión celular de célula de bazo de ratón BALB/C y mieloma de ratón SP2/0 que expresa un anticuerpo anti-Liv-1 murino. Estos hibridomas fueron cultivados a $3,0 \times 10^5$ células por mL en 30 mLs de Medio libre de suero para cultivo de hibridomas (Invitrogen, Carlsbad CA), complementado con 50 µM de peracetato de alquinil fucosa a 37°C, 5% CO₂ y con agitación a 100 RPM en un matraz de agitación de 125 mL. Los cultivos fueron alimentados en el 3^{er} día con un volumen del 2% de un medio de alimentación. En el cuarto día, cada cultivo se dividió en la relación 1:4 en medios de cultivo fresco. Los cultivos se alimentaron con un volumen del 6% de los medios de alimentación en los días 5, 7,

9 y 10. Los medios acondicionados se recogieron cuando la viabilidad del cultivo cayó por debajo del 60% o en el día 13, pasando los medios a través de un filtro de 0,2 μm .

La purificación del anticuerpo fue realizada aplicando los medios acondicionados a una columna de proteína A previamente equilibrada con 1X de tampón de fosfato salino (PBS), pH 7,4. Después de lavar la columna con 20 volúmenes de columna de 1X PBS, los anticuerpos se eluyeron con 5 volúmenes de columna de tampón de elución de IgG Immunopure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se añadió un volumen del 10% de 1M tris pH 8,0 a la fracción eluida. La muestra fue dializada durante la noche en 1X PBS.

A la concentración de peracetato de alquilil fucosa sometida a ensayo, la fucosilación del núcleo fue inhibida en el hibridoma de la fusión BALB/C-SP2/0, pero no de las fusiones BALB/C/P2X63-AG 8.653 y NS0.

10 Ejemplo 10: Síntesis de tetraacetato de 5-etinilarabinosa (7)



1,2:3,4-Di-O-isopropiliden- α -L-galactosa (2): Los compuestos en el esquema 1 se prepararon en general tal como se describe en Hsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:2614-19 (2004). Brevemente, se combinó L-galactono-1,4-lactona (1) 10 g, 56,1 mmol en CH_3OH (60 ml) con agua (250,0 ml) a 0°C , y se añadió resina (10 g) Amberlita IR 120 (H+). Se añadió en partes NaBH_4 (1.0 equiv. 2.22 g, 56 mmol) en el transcurso de 1h (6 adiciones) con agitación lenta. Después de que se completara la adición de NaBH_4 , la mezcla de reacción se agitó lentamente durante 1h a 0°C durante 15 min para promover la descomposición del NaBH_4 restante. El líquido fue decantado, la resina se lavó con metanol (2 x 25mL) y la solución se concentró bajo presión reducida y a continuación bajo alto vacío durante la noche, lo que dio como resultado la formación de un cristal. Al sólido resultante se añadió acetona (220,0 ml), CuSO_4 (22 g) y H_2SO_4 (2 ml), y la solución se agitó fuertemente a temperatura ambiente durante al menos 24 h. Después de 24 h, la inspección mediante TLC (50% acetato de etilo en hexanos) mostró la formación del producto mediante tinción con tinción por inmersión en vainillina y calor ($R_f \sim 0.5$). La mezcla de reacción fue neutralizada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (~ 15 g) y se filtró en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía Flash radial con una elución con gradiente del 10% a 50% de acetato de etilo en hexanos. Las fracciones limpias se combinaron para proporcionar 3,3 g; (23%): ^1H RMN (CD_3OD , 400MHz) δ : 5.48(d, $J=4,5\text{Hz}$, 1H), 4.62 (dd, $J=7.8, 2.3\text{Hz}$, 1H), 4.24 (dd, $J=4.9, 2.3\text{Hz}$), 4.27 (dd, $J=8.0, 1.8\text{Hz}$), 3.85 (m, 1H), 3.64 (m, 2H), 1.51 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.32 (s, 6H).

1,2:3,4-di-O-isopropiliden- α -L-galactal piranosido (3): Se agitó durante 1h una suspensión de clorocromato de piridinio (PCC) (8,2 g, 38 mmol), acetato de sodio (6,2 g, 76 mmol) y tamices moleculares de 4- \AA (16 g) en cloruro de metileno seco (114 ml). A esta mezcla se añadió una solución de alcohol (Compuesto 2) (3,3 g, 12,7 mmol) en cloruro de metileno seco (57 ml) gota a gota, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción fue diluida con hexano/éter (1:1, 300 ml), y la solución se filtró a través de un lecho de gel de sílice. La almohadilla de filtrado se lavó con acetato de etilo (200 mL). El filtrado se concentró bajo presión reducida y alto vacío durante la noche para obtener 2,9 g (88%): ^1H RMN (C_6D_6 ; 400MHz) δ 9.61 (s, 1H), 5.44 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H),

4.27 (dd, J=2.3Hz, 1H), 4.24 (dd, J=2.3Hz, 1H), 4.13(d, J=2.3Hz, 1H), 4.04 (dd, J=2.3Hz, 1H), 1.32(s, 3H), 1.2 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.93 (s, 3H).

5 Dibromo-olefina (4): A un matraz de fondo redondo de 25 mL secado con llama se añadió CBr_4 (2,38 g, 7,14 mmol) y cloruro de metileno (50 mL). La solución se enfrió a 0°C y se añadió Ph_3P (3,71 g, 14,3 mmol). La mezcla se agitó durante 15 min, y el aldehído (Compuesto 3) (0,62 g, 2,38 mmol) fue añadido como una solución en cloruro de metileno (5 mL). La reacción se monitorizó mediante TLC. Después de 5 min., la reacción se completó. La mezcla se concentró bajo presión reducida a aproximadamente 5 mL y ésta fue directamente purificada mediante cromatografía en columna flash con 10% seguido de 25% de acetato de etilo en hexanos. Las fracciones que contenían el producto (tinciones de color morado oscuro con tinción con vainillina ($R_f=0,5$ en 25% de acetato de etilo en hexanos)), se combinaron y se concentraron para obtener 495 mg. (51%): ^1H RMN (CDCl_3 ; 400MHz) δ : 6.86 (d, J=8.2Hz, 1H), 5.39 (d, J=4.9Hz, 1H), 4.62 (dd, J=8.0, 1.8Hz, 1H), 4.37 (dd, J=7.8, 2.3 Hz), 4.03 (dd, J= 5.1, 2.5Hz, 1H), 3.90 (dd, J=5.8, 2.0Hz, 1H), 1.1 (s, 3H), 1.0 (s, 3H), 0.67 (s, 3H), 0.63 (s, 3H).

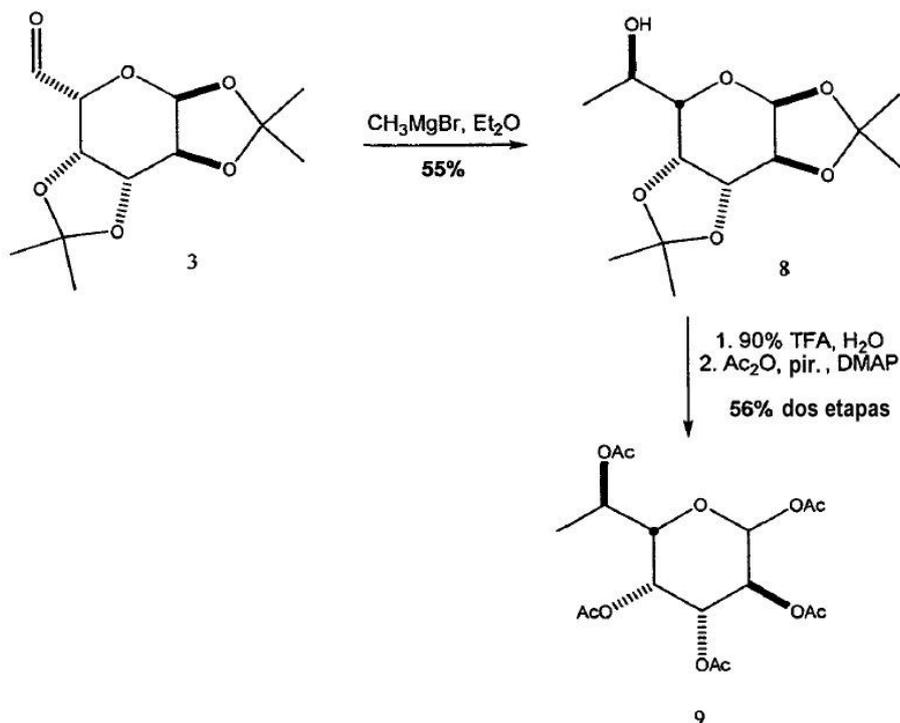
15 6,7-Desoxi-1,2:3,4-di-O-isopropiliden- α -L-galacto-hept-6-inopiranosido (5): Al dibromo olefina (Compuesto 4) (500 mg, 1.2 mmol) en THF (15 mL) a -78°C se añadió n-BuLi (3.0 mL de 1,6M de solución en hexanos; 4,87 mmol) y la reacción se agitó durante 1h antes de ser tratada con una solución de cloruro de amonio. Las capas se separaron y la acuosa se extrajo con hexano (3x50 mL). Los extractos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. El residuo resultante fue purificado mediante cromatografía radial para obtener 483 mg (79%): ^1H RMN (CDCl_3 ; 400MHz) δ : 5.39(d, J=5.0Hz, 1H), 4.69 (t, J=2.3Hz, 1H), 4.36 (dd, J=7.6, 2.5Hz), 4.01 (dd, J=5.0, 2.5Hz, 1H), 3.94 (dd, J=7.6, 2.0Hz, 1H), 2.01 (d, J=2.3Hz, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.92 (s, 3H).

20 5-etinilarabinosa (6): Se añadió lentamente a un matraz que contenía el alquino (Compuesto 5) (0,483 g, 1,9mmol), una solución de TFA (10 ml, 90% TFA en H_2O). La reacción fue agitada en hielo durante 1h y se concentró en vacío.

25 Tetraacetato de 5-etinilarabinosa (7): (Procedimiento general) El residuo resultante de 5-etinilarabinosa (Compuesto 6) fue tratado con piridina (10 ml), N,N,dimetilaminopiridina (5,0 mg), y anhídrido acético (10 ml), agitado durante la noche, concentrado a un residuo y diluido con diclorometano. La mezcla fue aspirada en una placa de cromatotrón radial y eluida con 25% seguido de un 50% de acetato de etilo en hexanos. El producto fue aislado como una mezcla inseparable de piranosa y furanosa α y β -anómeros. Rendimiento: 495 mg (76%): LRMS (ESI+) m/z 365 (M+Na)+, 283 (M-OAc)+

Ejemplo 11. Síntesis de pentaacetato de 6-Metil-L-galactosa

Esquema 2

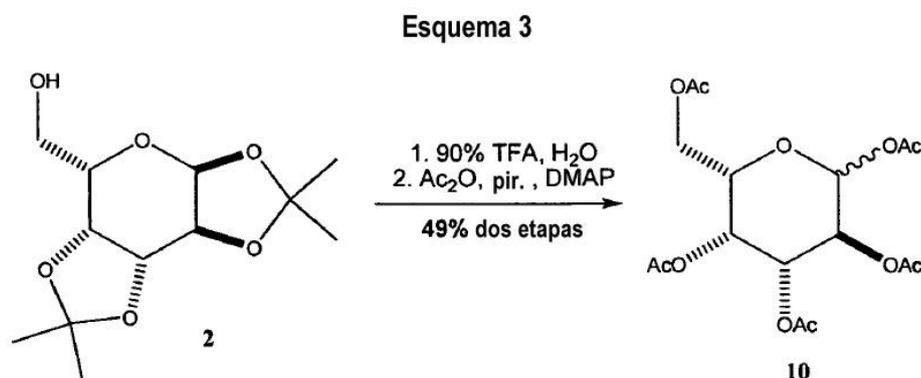


1,2:3,4-di-O-isopropiliden- α -L-6-metilgalactopiranosido (8): En referencia al Esquema 2, a un matraz secado con llama se añadió éter (2 mL) y CH_3MgBr (258 mL de una solución de 3M). Este paso se continuó con la adición de aldehído (Compuesto 3) (100 mg) en éter (2 mL), añadido gota a gota. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante varias horas y fue monitorizada mediante TLC. La mezcla de reacción fue extinguida con cloruro de amonio acuoso saturado y la mezcla fue extraída con éter (3x50 mL). Los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre MgSO_4 . La filtración y la concentración dio un residuo que fue analizado mediante ^1H RMN revelando una mezcla diastereomérica. El residuo fue purificado mediante cromatografía radial en una placa de 1 mm, eluyendo con 10% a 25% de acetato de etilo en hexanos ($R_f=0,2$; 25% acetato de etilo en hexanos). El rendimiento fue 59 mg (55%); ^1H RMN-isómero mayor (CDCl_3 ; 400MHz) δ : 5.61 (d, 1H), 4.62 (dd, 1H), 4.38 (d, 1H), 4.73 (dd, 1H), 4.04 (m, 1H), 1.56 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.28 (d, 3H).

Pentaacetato de 6-Metil-L-galactosa (9): el Compuesto 9 se preparó a partir del Compuesto 8 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido en el Ejemplo 10. LRMS (ESI+) m/z 345 (M-OAc)+.

Ejemplo 12: Síntesis de pentaacetato de L-galactosa

15



Pentaacetato de L-galactosa (10): El compuesto 10 fue sintetizado a partir del compuesto 2 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido en el Ejemplo 10. (49% en general): LRMS (ESI+) m/z 331 (M-OAc)+.

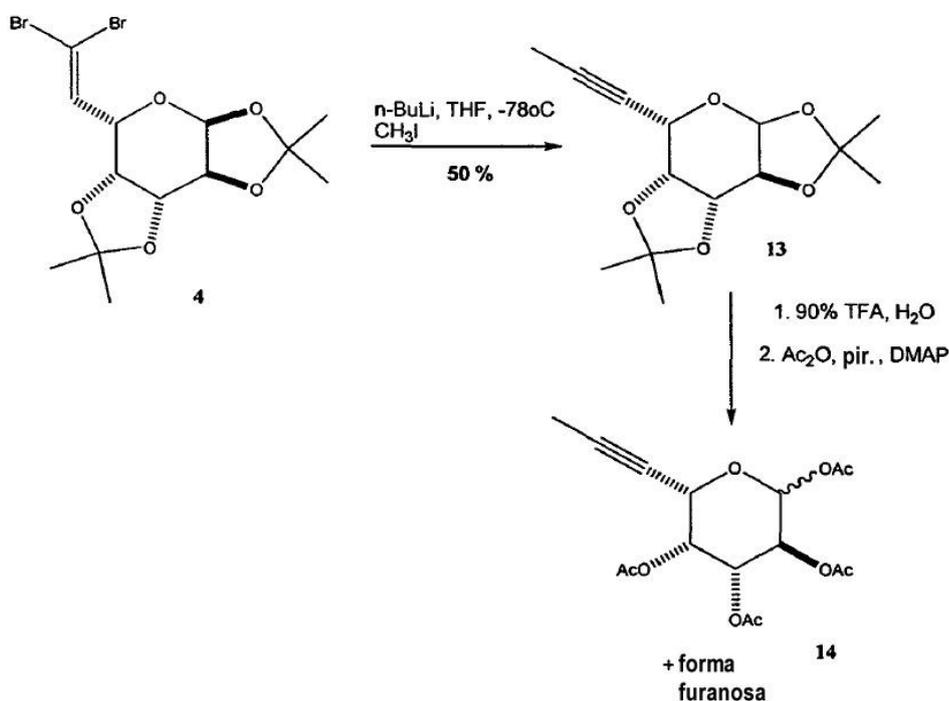
20 Ejemplo 13: Síntesis de tetraacetato de 5-vinilarabinosa

6,7-Desoxi-1,2:3,4-di-O-isopropiliden- α -L-galacto-hept-6-enopiranosido (11): En referencia al Esquema 4, a una solución a -78°C de $\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Br}$ (192 mg, 0,54 mmol) en THF (2 mL) se añadió $n\text{-BuLi}$ (0,34 mL de 1.6M de solución en THF; 0,54 mmol). La mezcla se agitó a -78°C durante 15 min, seguido de la adición de aldehído (Compuesto 3) (46,3 mg, 0,18 mmol). Se dejó templar la mezcla a una temperatura ambiente más de 1,5h antes de ser diluida con dietil éter (25 mL) y se extinguió con cloruro de amonio acuoso saturado (25 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante fue purificado en gel de sílice (10% acetato de etilo en hexano; TLC $R_f=0.56$ 25% acetato de etilo en hexanos) para obtener 22,8 mg (49%); ^1H RMN (CDCl_3 ; 400MHz) δ : 5.93 (ddd, 1H), 5.59 (d, 1H), 5.37 (dt, 1H), 5.28 (dt, 1H), 4.62 (dd, 1H), 4.31 (m, 2H), 4.23 (dd, 1H), 1.54 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.35 (s, 3H).

30 Tetraacetato de 5-vinilarabinosa (12): Se preparó el Compuesto 12 a partir del Compuesto 11 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido en el Ejemplo 10. Rendimiento: 62% en general.

Ejemplo 14: Síntesis de tetraacetato de 5-(1-propinil)-arabinosa

Esquema 5

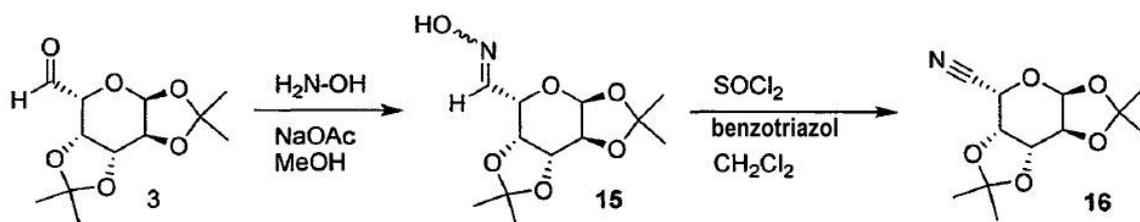


6,7-Desoxi-1,2:3,4-di-O-isopropiliden- α -L-galacto-oct-6-inopiranosido (13): En referencia al Esquema 5, a una solución a -78°C de dibromo-olefina (Compuesto 4) (52 mg, 0,126 mmol) en THF(1,6 mL) se añadió $n\text{-BuLi}$ (0,3 mL de 1,6M de solución en THF; 0,5 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 h a -78°C . Se añadió una solución de yoduro de metilo (47 μL , 0,63 mmol) en THF (0,5 mL) gota a gota, y la mezcla de reacción se dejó templar a temperatura ambiente durante varias horas. La mezcla de reacción se enfrió nuevamente a -78°C y se añadió cloruro de amonio acuoso saturado (20 mL). La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (3X20 mL) y los orgánicos combinados se lavaron con cloruro de sodio acuoso saturado, se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante fue purificado en gel de sílice, eluyendo con 10% de acetato de etilo en hexanos para obtener 19,9 mg (50%) del producto como un aceite.

5-(1-propinil)-arabinosa-1,2,3,4-tetraacetato (14): el Compuesto 14 fue preparado a partir del Compuesto 13 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido en el Ejemplo 10. Rendimiento: 58% en general.

Ejemplo 15: Síntesis de 5-ciano-arabinopiranos-1,2,3,4-tetraacetato y 5-ciano-arabinofuranosa-1,2,3,5-tetraacetato

Esquema 6



1,2:3,4-Di-O-isopropiliden- α -L-galactodialdo-1,5-piranos-6-oxima (15). El compuesto 15 se preparó en general tal como se describe en Streicher y Wunsch, *Carbohydr Res.* 338(22):2375-85 (2003). En referencia al esquema 6, el aldehído (Compuesto 3) (200 mg, 0,77 mmol), hidrocloreuro de hidroxilamina (161 mg, 2,32 mmol, 3,0 eq.), y NaOAc (127 mg, 1,55 mmol, 2,0 eq.) se diluyeron en MeOH (10 mL, 0,1 M) seguido de la adición de agua (1 mL, 105 v/v).

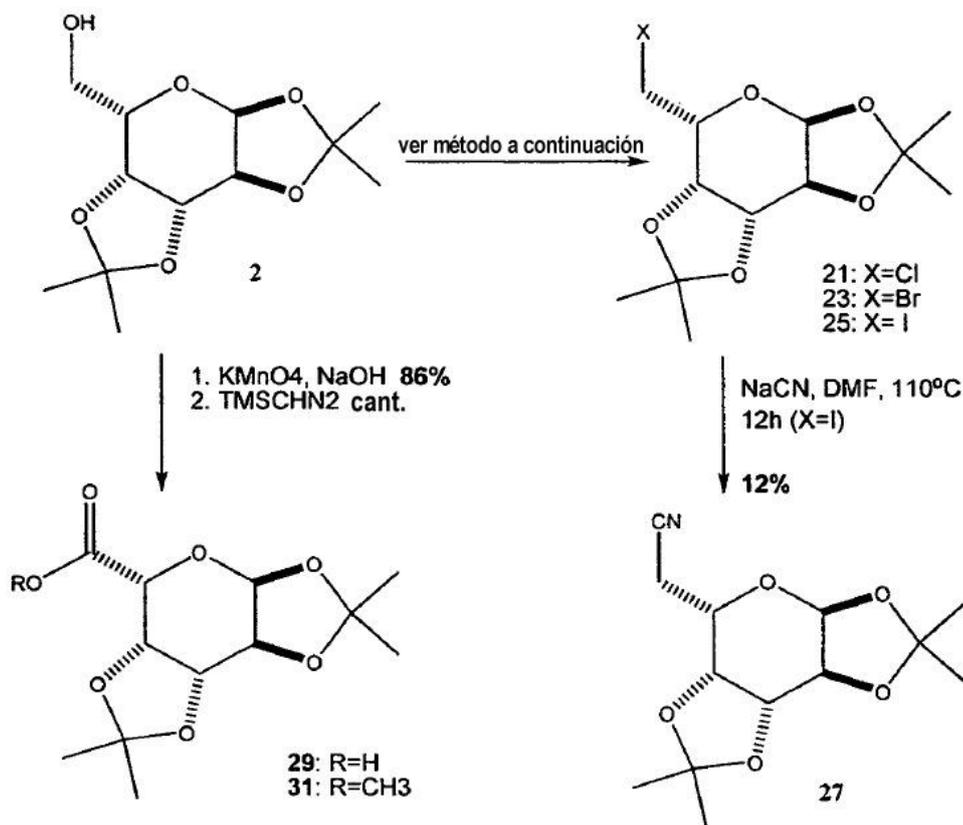
La reacción se mantuvo durante 20 h. La mezcla se concentró a la capa acuosa a la que fue extraída con éter (2x). Los orgánicos se extrajeron con éter (3x). La capa de Et₂O se secó (MgSO₄) y se concentró en vacío para proporcionar el producto como un sólido cristalino blanco. Rendimiento: (164 mg, 78%). LRMS (ESI+) m/z 274.1 (M+H)⁺. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: se detectó 1:1 mezcla de (E):(Z) isómeros de oxima. 1.33 (s, 12H), 1.46 (s, 6H), 1.54 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 4.29 (dd, *J* = 2.0 Hz, 8.0 Hz, 1H), 4.34-4.36 (m, 2H), 4.43 (dd, *J* = 2.0 Hz, 6.4 Hz, 1H), 4.62-4.63 (m, 3H), 5.00 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H).

Diacetonido de 5-ciano-fucosa (16) El compuesto 16 se prepara en general tal como se describe por Telvekar, Synthetic Communications 34(13):2331-2336 (2004). Los isómeros de oxima (Compuesto 15) (160 mg, 0,5 mmol) se disolvieron en CH₂Cl₂ (2 mL, 0,4 M). A éste se añadió una solución de benzotriazol (70 mg, 0,5 mmol), y cloruro de tionilo (43 mL, 0,5 mmol) en 0,5 mL de CH₂Cl₂. La reacción se completó mediante análisis con TLC en 5 min. Los contenidos fueron filtrados y el filtrado se lavó con NaHCO₃ sat. y agua. La fase orgánicas se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. El producto crudo fue purificado mediante elución FCC con 4:1 hexanos-EtOAc. Rendimiento 120 mg (81%). LRMS (ESI+) m/z 256.1 (M+H)⁺. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.35 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 4.34 (dd, *J* = 2.0 Hz, 7.6 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 2.8 Hz, 4.8 Hz, 1H), 4.66 (m, 2H), 5.54 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H).

5-Ciano-arabinopiranososa-1,2,3,4-tetraacetato (19) y 5-ciano-arabinofuranosa-1,2,3,5-tetraacetato (20): Los compuestos 19 y 20 fueron preparados a partir del compuesto 16 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido en el Ejemplo 10. Las formas de piranososa y furanososa resultantes se separaron mediante FCC (gradiente de elución - 4:1 a 3:2 hexanos-EtOAc). Secuencia de elución por TLC: piranososa R_f 0.34, furanososa (R_f.27) en 3:2 hexano-EtOAc. Rendimiento: 59 mg (piranososa), 52 mg (furanosa) (98% de rendimiento total combinado). LRMS (ESI+) m/z .284.1 (M-OAc)⁺, 366.0 (M+Na)⁺. Las asignaciones de ¹H-RMN fueron análogos a la alquinil fucosa sobre la que se informa en Hsu et al. (Hsu, Hanson et al., 2007; *supra*). Resumen de la ¹H-RMN de las formas de piranososa (CDCl₃) δ: 5.89 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, β-pir), 6.42 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, α-pir). Resumen de la ¹H-RMN de las formas de furanososa (CDCl₃) δ: 6.27 (s, 1H, α-fur), 6.38 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, β-fur).

Ejemplo 16: Síntesis de tetraacetatos de cloro, bromo y yodo-fucosa

Esquema 7



5 Diacetónido de 6-Cloro-fucosa (21). En referencia al Esquema 7, el alcohol (compuesto 2) (100 mg, 0,384 mmol), CCl₄ (1 mL, 10 mmol), y PPh₃ (300 mg, 1,15 mmol, 3 eq.) fueron disueltos en CHCl₂ (2 mL). Los contenidos fueron agitados durante 24 h seguido de concentración. El residuo se purificó mediante FCC (9:1 hexanos-EtOAc) para proporcionar el producto como un gel de color amarillo claro. Rendimiento: 107 mg (55%). LRMS (ESI+) m/z 279 (M+H)⁺. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.34 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 3.58 (dd, J = 6.8 Hz, 10.8 Hz, 1H), 3.68 (dd, J = 6.8 Hz, 10.8 Hz, 1H), 4.65 (dd, J = 2.4 Hz, 7.6 Hz, 1H), 5.54 (d, J = 5.2 Hz).

Tetraacetato de 6-cloro-fucosa (22). El compuesto 22 se preparó a partir del compuesto 21 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido en el Ejemplo 10. Rendimiento: 29 mg (38% en total). LRMS (ESI+) m/z 307,1 (M-OAc)⁺, 389,0 (M+Na)⁺.

10 Diacetónido de 6-bromo-fucosa (23). En referencia al esquema 7, el alcohol (Compuesto 2) (150 mg, 0.58 mmol) se disolvió en DMF (2 mL) seguido de la adición de PPh₃ (0,61 g, 2,3 mmol, 4 eq.). Se añadió N-bromosuccinimida (0,41 g, 2,3 mmol, 4 eq.) en DMF (1 mL) mediante jeringuilla durante 5min. La mezcla se calentó a 110°C durante 2 h. La reacción se enfrió y se extinguió con MeOH y se agitó durante 10 min. Se añadieron éter y NaHCO₃ saturado y las capas se separaron. La capa acuosa se lavó adicionalmente con éter y los extractos orgánicos se lavaron con agua y se secaron (Na₂SO₄). El disolvente fue evaporado y el residuo se purificó mediante FCC (9:1 hexanos-EtOAc) para proporcionar el producto como un sólido pegajoso. Rendimiento: 123 mg (66%). LRMS (ESI+) m/z 323 (M+H)⁺. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.34 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 3.43 (dd, J = 6.8 Hz, 10 Hz, 1H), 3.52 (dd, J = 6.8 Hz, 10.4 Hz, 1H), 3.98 (dt, J = 2.0 Hz, 6.8 Hz, 1H), 4.33 (dd, J = 2.4 Hz, 5.2 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 2.0 Hz, 8.0 Hz, 1H), 4.64 (dd, J = 2.4 Hz, 8.0 Hz, 1H), 5.55 (d, J = 5.2 Hz).

20 Tetraacetato de 6-bromo-fucosa (24). El compuesto 24 fue preparado a partir del compuesto 23 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido del Ejemplo 10. Rendimiento: 129 mg (86% en total). LRMS (ESI+) m/z 351,0 (M-OAc)⁺, 432,9 (M+Na)⁺.

25 Diacetónido de 6-yodo-fucosa (25). En referencia al Esquema 7, el azúcar protegido (Compuesto 2) (0,44 g, 1,7 mmol), PPh₃ (0,99 g, 3,7 mmol, 2,2 eq.), yodo (0,87 g, 3,4 mmol, 2,0 eq.), e imidazol (0,51 g, 7,4 mmol, 4,4 eq.), se disolvieron en tolueno/EtOAc (4 mL/2 mL). La mezcla se calentó a 90°C durante 6 h mientras se agitaba. La mezcla se enfrió en un baño de hielo, se diluyó con CHCl₃ y se extrajo con NaHCO₃ sat. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró a un aceite. El residuo fue purificado mediante FCC eluyendo con hexanos-EtOAc (gradiente 95:5 a 90:10). El producto fue aislado como un aceite transparente. Rendimiento: 0,27 g (43%). LRMS (ESI+) m/z 371.1 (M+H)⁺. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.32 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 3.20 (dd, J = 7.2 Hz, 9.6 Hz, 1H), 3.31 (dd, J = 7.2 Hz, 9.6 Hz, 1H), 3.94 (dt, J = 1.6 Hz, 7.2 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 2.4 Hz, 5.0 Hz, 1H), 4.40 (dd, J = 2.0 Hz, 8.0 Hz, 1H), 4.60 (dd, J = 2.4 Hz, 7.8 Hz, 1H), 5.53 (d, J = 4.8 Hz).

30 Tetraacetato de 6-yodo-fucosa (26). El compuesto 26 fue preparado a partir del compuesto 25 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido del Ejemplo 10. Rendimiento: 30,5 mg (75% en total). LRMS (ESI+) m/z 399,0 (M-OAc)⁺.

35 Ejemplo 17: Síntesis del tetraacetato de 6-ciano-fucosa

40 Diacetónido de 6-ciano-fucosa (27). El compuesto 27 fue preparado siguiendo el procedimiento por Streicher y Wunsch (Carbohydr. Res. 338(22): 2375-85 (2003)). En referencia al Esquema 7, se calentó yodo-galactosa (120 mg, 0,32 mmol) y NaCN (51 mg, 1 M) a 110°C en DMF durante 12 h. La mezcla se enfrió, dividió con CH₂Cl₂-agua y las capas se separaron. La capa acuosa se lavó adicionalmente con CH₂Cl₂ (2x) y los orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a un aceite marrón. La purificación con FCC (gradiente 9:1 a 4:1 hexanos-EtOAc) condujo al producto puro. Rendimiento: 10 mg (12%). ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.33 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 2.65 (dd, J = 6.8 Hz, 16 Hz, 1H), 2.70 (dd, J = 6.8 Hz, 16 Hz, 1H), 4.05 (dt, J = 2.0 Hz, 7.2 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 2.0 Hz, 8.0 Hz, 1H), 4.34 (dd, J = 2.8 Hz, 4.8 Hz, 1H), 4.65 (dd, J = 2.8 Hz, 8.0 Hz, 1H), 5.50 (d, J = 5.2 Hz).

45 Tetraacetato de 6-ciano-arabinosa (28). El compuesto 28 fue preparado a partir del compuesto 27 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido del Ejemplo 10. Rendimiento: 13 mg (98% en total). LRMS (ESI+) m/z 298,0 (M-OAc)⁺, 380,1 (M+Na)⁺.

Ejemplo 18: Síntesis del tetraacetato de carboxifucosa

50 Diacetónido de Carboxiarabinosa (29). Siguiendo un procedimiento para el epímero (Bentama, El Hadrami et al., Amino Acids 24(4):423-6 (2003)), el alcohol (Compuesto 2) (3,44 g, 13,22 mmol) se diluyó en 0,5 M de NaOH (80 mL, 40 mmol, 3 eq.). Después de 15 min, se añadió KMnO₄ (5,22 g, 33,04, 2,5 eq.), disuelto en 106 mL de agua. La reacción se agitó durante 18 h y el sólido se filtró. El filtrado fue extraído con EtOAc (3x) y las capas orgánicas se desecharon. La capa acuosa fue acidificada con 1M HCl a pH 2 y se extrajo con EtOAc (3x). Las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtraron, y se concentraron para obtener un sólido blanco que no necesitó

purificación adicional. Rendimiento: 3,1 g (86%). LRMS (ESI-) m/z 273.2 (M-H)-. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.36 (s, 6H), 1.46 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 4.40 (dd, J = 2.4 Hz, 4.8 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.64 (dd, J = 2.4 Hz, 8.0 Hz, 1H), 5.50 (d, J = 4.8 Hz).

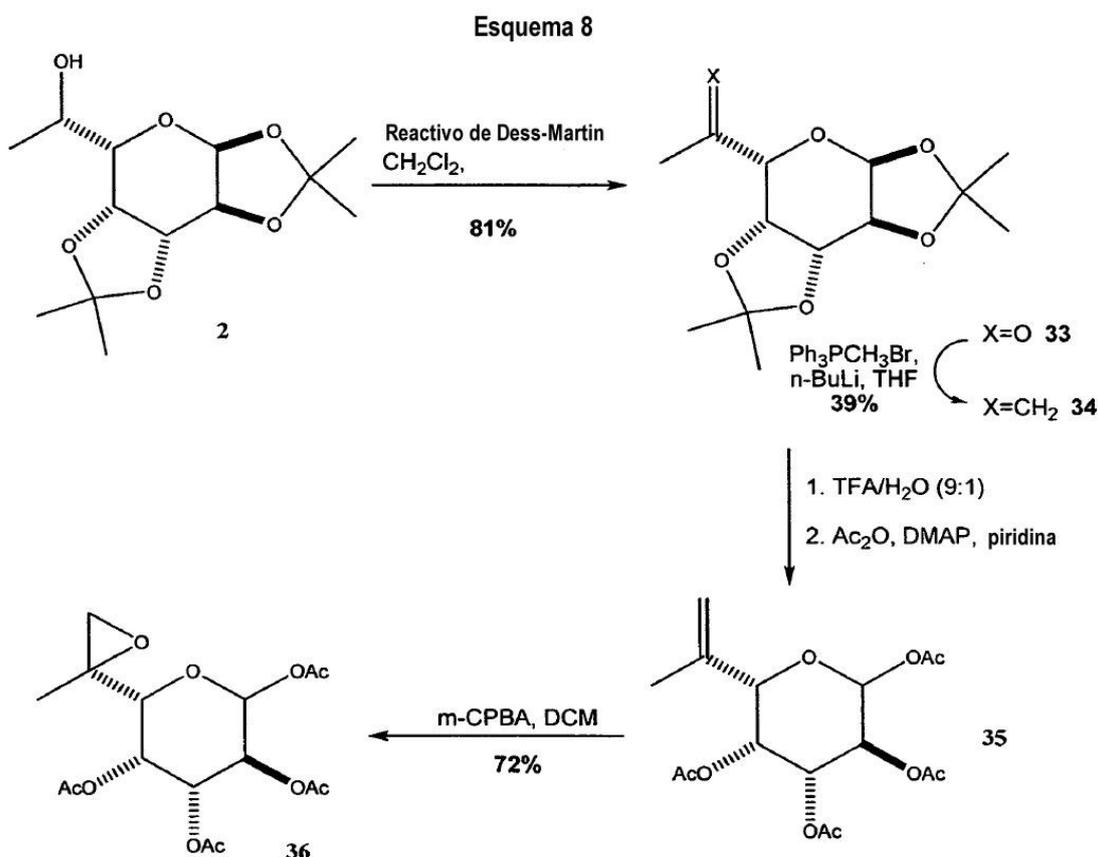
5 Tetraacetato de Carboxiarabinosa (30). El compuesto 30 fue preparado a partir del compuesto 29 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido del Ejemplo 10.

Ejemplo 19: Síntesis del tetraacetato de carboximetilarabinosa

10 Diacetónido de carboximetilarabinosa (31). El ácido (Compuesto 29) (100 mg, 0,365 mmol) fue disuelto en MeOH (3,65 mL, 0,1 M) y se enfrió a 0°C. Después de 15 min, se añadió 1 M TMSCHN₂ en éter (1,82 mL, 5 eq.) gota a gota mediante jeringuilla más de 15 min. No se detectó material de partida alguno después de 30 min. la reacción fue
extinguida con 5% HOAc/MeOH y los contenidos se evaporaron hasta que se secaron. Rendimiento: cant. LRMS (ESI+) m/z 289.1 (M+H)+. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.34 (s, 6H), 1.46 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.39 (dd, J = 2.4 Hz, 5.2 Hz, 1H), 4.59 (dd, J = 2.4 Hz, 7.6 Hz, 1H), 4.67 (dd, J = 2.4 Hz, 7.6 Hz, 1H), 5.67 (d, J = 5.2 Hz).

15 Tetraacetato de carboximetil-arabinosa (32). El compuesto 32 fue preparado a partir del compuesto 31 siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido del Ejemplo 10. Rendimiento: 105 mg (77% en total). LRMS (ESI+) m/z 317,0 (M-OAc)+, 398,9 (M+Na)+.

Ejemplo 20: Síntesis del tetraacetato de 5-metil-oxiran-arabinosa (tetraacetato de (3S,4R,5S,6R)-6-((S)-2-metiloxiran-2-il)-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo) (36):



20 1-((3aS,5R,5aS,8aR,8bS)-2,2,7,7-tetramiltetrahidro-3aH-bis[1,3]dioxolo(4,5-b:4',5'-d]piran-5-il)etanona (33): En referencia al esquema 8, a una mezcla de alcohol (Compuesto 2) (236 mg, 0,86 mmol) en DCM (10 mL) se añadió periodinano de dess-Martin (DMP; 438 mg, 1,03 mmol). Tras varias horas se añadió una parte adicional de DMP (100 mg, 0,23mmol), y la mezcla se agitó durante 1h adicional. La mezcla se aspiró directamente en una placa de cromatotrón radial de 1 mm y se eluyó con 25% de acetato de etilo en hexanos. El primer material importante fuera
25 de la placa fue el producto deseado (Rf=0.6; 25% de acetato de etilo en hexanos). Rendimiento: 190 mg (81 %):

LRMS (ESI+) m/z 272; ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 5.64 (d, J=5.1Hz, 1H), 4.63 (dd, J = 7.8, 2.6 Hz, 1H), 4.55 (dd, J = 7.8, 2.3 Hz), 4.35 (dd, J = 5.1, 2.5 Hz), 4.17 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 1.5 (2, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.34(s, 3H), 1.31 (s, 3H).

5 (3aS,5S,5aR,8aR,8bS)-2,2,7,7-tetrametil-5-(prop-1-en-2-il)tetrahidro-3aH-bis[1,3]dioxolo[4,5-b:4',5'-d]pirano (34): En referencia de nuevo al Esquema 8, el compuesto 34 fue preparado a partir del compuesto 33 (50 mg, 0.18 mmol) de manera similar a la utilizada en la preparación del compuesto 11, para obtener 19 mg (39%): ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 5.61 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 5.10 (d, J=2.1 Hz, 1H), 4.99 (dd, J = 3.1, 1.6 Hz, 1H), 4.34 (m, 2H), 4.19 (s, 1H), 1.82 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.34 (s, 6H).

10 Tetraacetato de (3S,4R,5R,6S)-6-(prop-1-en-2-il)-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo (35): En referencia de nuevo al Esquema 8, el compuesto 35 fue preparado a partir del compuesto 34 (11 mg, 0,04 mmol) siguiendo el procedimiento general para la hidrólisis y peracetilación del acetónido del Ejemplo 10. Rendimiento: 81% (11,7mg, 0,033mmol)

15 Tetraacetato de (3S,4R,5S,6R)-6-((S)-2-metiloxiran-2-il)-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo (36): En referencia al esquema 8, a una mezcla de peracetato (compuesto 35) (6 mg, 0,017 mmol) en DCM (1 mL) se añadió m-CPBA (12 mg, 0,052 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se aspiró en una placa de cromatografía radial de 1 mm y se eluyó con 25% de acetato de etilo en hexanos para obtener 4,6 mg (72%) del epóxido. LRMS (ESI+) m/z 397 (M+Na)+.

Ejemplo 21: Síntesis de tetraacetato de propargil fucosa (tetraacetato de (3S,4R,SR,6S)-6-(prop-2-inil)-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo) (37):

20 Se añadió anhídrido trifluorometansulfónico a -40°C (166 mL, 0,98 mmol, 1,5 eq.) más de 2 min mediante jeringuilla a una solución de la galactosa protegida (Compuesto 2) (170 mg, 0,65 mmol) y 2,6-lutidina (96 mL, 0,82 mmol, 1,25 eq.) en cloruro de metileno (3 mL). El material de partida se consumió en 1 h, y la reacción se extinguió con NaHCO₃ sat. La mezcla fue extraída con éter (3x) y las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtraron, y se concentraron. El producto crudo fue purificado mediante cromatografía flash (eluyendo con 9:1 hexanos-EtOAc) para proporcionar el producto como un aceite transparente. El triflato fue inmediatamente utilizado en la siguiente etapa.

30 Se añadió nBuLi (0,70 mL, 1,74 mmol, 2.6 M, 3,8 eq.) gota a gota a una solución de trimetilsililacetileno (0,23 mL, 1,61 mmol, 3,5 eq.) y HMPA (85 mL) en THF (1,5 mL) a -60°C. Después de 15 min de agitación, el triflato (180 mg, 0,46 mmol) se añadió y los contenidos se agitaron mientras se templaba a temperatura ambiente. Tras agitar durante la noche, la reacción se extinguió con NH₄Cl saturado y la mezcla se extrajo con éter (2x). Las capas orgánicas combinadas se secaron y se concentraron. Mediante LC/MS tuvo lugar el corte parcial del TMS. La purificación fue realizada utilizando cromatografía flash (eluyendo con 95:5 a 9:1 hexanos-EtOAc) y ambos productos fueron recogidos y concentrados a un aceite transparente. Rendimiento total: 61 mg (TMS protegido), 68 mg (desprotegido), rendimiento del 58%. Datos protegidos del TMS: LRMS (ESI+) m/z 341.1 (M+H)+, 363.1 (M+Na)+. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 0.15 (s, 9H), 1.34 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 2.52 (dd, J = 6.4 Hz, 16.8 Hz, 1H), 2.63 (dd, J = 8.4 Hz, 16.4 Hz, 1H), 3.91 (dt, J = 1.6 Hz, 6.0 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 2.4 Hz, 4.8 Hz, 1H), 4.32 (dd, J = 2.0 Hz, 8.0 Hz, 1H), 4.62 (dd, J = 2.4 Hz, 8.0 Hz, 1H), 5.50 (d, J = 5.2 Hz, 1H).

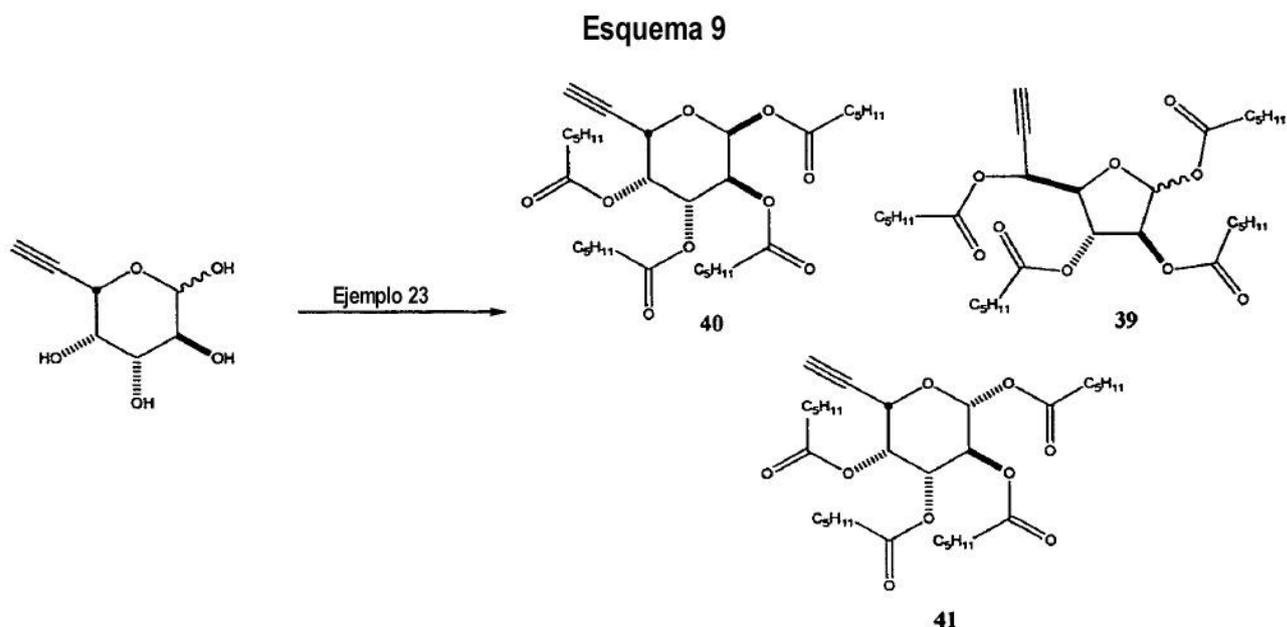
40 Los alquinos combinados se desprotegeron utilizando TFA (1 mL) y agua (100 µL) durante 2 h. La mezcla se concentró bajo alto vacío y fue peracetilada con anhídrido acético (1 mL), piridina (1 mL), y DMAP (3 mg), durante 3 días. La mezcla se concentró y purificó mediante cromatografía flash (eluyendo con 4:1 a 3:2 hexanos-EtOAc). Las fracciones deseadas se agruparon y concentraron para obtener el producto como un sólido pegajoso transparente. Rendimiento total: 32 mg (51%). LRMS (ESI+) m/z 297,1 (M-OAc)+, 379,0 (M+Na)+.

Ejemplo 22: Síntesis del tetrapropanoato de alquinil fucosa (mezcla de tripropionato de (3S,4R,5R)-5-((S)-1-(propioniloxi)prop-2-inil)-tetrahidrofuran-2,3,4-triilo) (38)

45 A una mezcla del compuesto 6 (25mg, 0,143mmol) en piridina se añadió ácido cloruro (1 mL de cloruro de propionilo). La mezcla de reacción solidificó y se añadió DCM (2 mL), y DMAP (5 mg) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató con bicarbonato de sodio acuoso saturado con agitación durante ~10 min. La mezcla de reacción fue vertida en agua y extraída con acetato de etilo (3 X 25 mL). Los extractos combinados se lavaron con 1N HCl (20 mL), bicarbonato de sodio acuoso saturado (20 mL) y salmuera antes de ser secados sobre MgSO₄, filtrados y concentrados. El residuo resultante fue purificado mediante cromatografía radial en una placa de 1 mm eluyendo con 25% de acetato de etilo en hexanos para obtener una mezcla heterogénea de isómeros α y β-piranosos y furanosos. Rendimiento: 26,8 mg (47%). LRMS (ESI+) m/z 421 (M+Na+), 325 (M-propionato)+.

Ejemplo 23: Síntesis de la mezcla de tetra-n-hexanoatos de alquinil fucosa (trihexanoato (3S,4R,5R)-5-((S)-1-(hexanoiloxi)prop-2-inil)-tetrahidrofuran-2,3,4-triilo y tetrahexanoato de (2S,3S,4R,5R,6S)-6-etinil-tetrahidro-

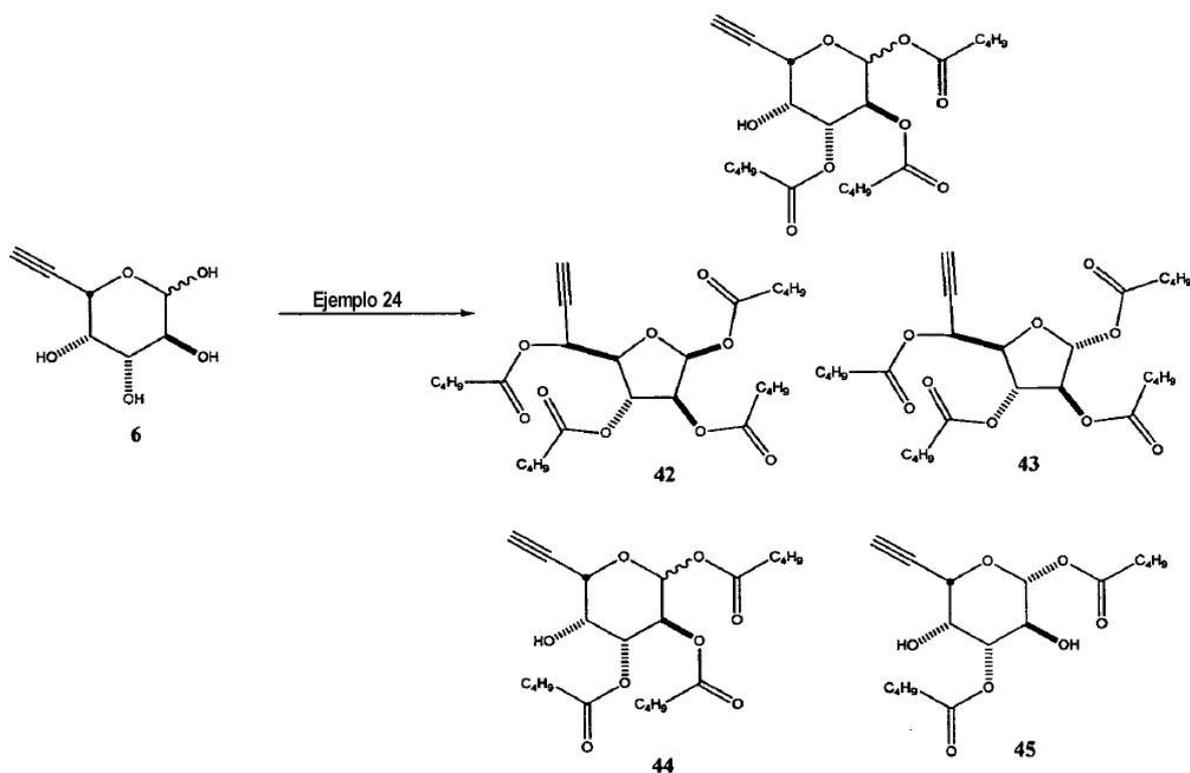
2H-piran-2,3,4,5-tetrailo (39 y 40, respectivamente); y tetrahexanoato de (2R,3S,4R,5R,6S)-6-etinil-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo (41):



- 5 En referencia al esquema 9, a una mezcla del compuesto 6 (25 mg, 0,143 mmol) en piridina (1 mL) se añadió DMAP (~5 mg) y anhídrido hexanoico (1 mL). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue tratada con bicarbonato sódico acuoso saturado con agitación cuatro ~10 min., y la mezcla de reacción fue vertida en agua y se extrajo con acetato de etilo (3 X 35 mL). Los extractos combinados se lavaron con 1N HCl (20 mL), bicarbonato sódico acuoso saturado (20 mL) y salmuera antes de secarse sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo resultante fue purificado mediante cromatografía radial en una placa de 1 mm eluyendo con 25% de hexanos de acetato de etilo para obtener productos mostrados en el esquema 9. Mezcla de trihexanoato de (3S,4R,5R)-5-((S)-1-(hexanoiloxi)prop-2-inil)-tetrahidrofuran-2,3,4-triilo y tetrahexanoato de (2S,3S,4R,5R,6S)-6-etinil-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo: LRMS (ESI+) m/z 589 (M+Na+). Tetrahexanoato de (2R,3S,4R,5R,6S)-6-etinil-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo: ¹H-RMN (CDCl₃) δ 5.70 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.52 (dd, J = 3.5, 1.2 Hz, 1H), 5.35 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 5.1 (dd, J = 8.2, 3.4 Hz, 1H), 4.60 (dd, J = 2.4, 0.6 Hz, 1H), 2.50-1.90 (m, 11H), 1.70-1.50 (m, 9H), 1.19-1.10 (m, 20H), 0.95-0.83(m, 15H); LRMS (ESI+) m/z 589 (M+Na+).
- 10
- 15

- 20 **Ejemplo 24: Síntesis de tripentanoato de tetrakis(trimetilacetato) de alquinil fucosa ((2S,3S,4R,5R)-5-((S)-1-(pentanoiloxi)prop-2-inil)-tetrahidrofuran-2,3,4-triilo (42) y tripentanoato de (2R,3S,4R,5R)-5-((S)-1-(pentanoiloxi)prop-2-inil)-tetrahidrofuran-2,3,4-triilo (43)); alquinil fucosa tris(trimetilacetato) (mezcla de tripentanoato (3S,4R,5R,6S)-6-etinil-5-hidroxi-tetrahidro-2H-piran-2,3,4-triilo (44); y dipentanoato de alquinil fucosa bi(trimetilacetato de (2R, 3S,4R,5R,6S)-6-etinil-3,5-dihidroxi-tetrahidro-2H-piran-2,4-diilo (45)):**

Esquema 10



A una mezcla del compuesto 6 (ver Ejemplo 10:25 mg, 0,143 mmol) en piridina (1 mL) se añadió DMAP (~5 mg) y anhídrido acético de trimetilo (1 mL). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató con bicarbonato de sodio acuoso saturado con agitación durante ~10 min., y la mezcla de reacción fue vertida en agua y extraída con acetato de etilo (3 X 25 mL). Los extractos combinados se lavaron con 1N HCl (20 mL), bicarbonato de sodio acuoso saturado (20 mL) y salmuera antes de ser secados sobre MgSO_4 , filtrados y concentrados. El residuo resultante fue purificado mediante cromatografía radial en una placa de 1 mm eluyendo con 25% de hexanos de acetato de etilo para obtener los productos que se muestran en el esquema 10.

Tripentanoato de (2S,3S,4R,5R)-5-((S)-1-(pentanoiloxi)prop-2-inil)-tetrahydrofuran-2,3,4-triilo: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 6.31 (d, $J=6.5\text{ Hz}$, 1H), 5.68 (dd, $J=7.0, 5.8\text{ Hz}$, 1H), 5.54 (dd, $J=9.2, 2.4\text{ Hz}$, 1H), 5.38 (dd, $J=7.0, 4.7\text{ Hz}$, 1H), 4.29 (dd, $J=9.2, 5.6\text{ Hz}$, 1H), 2.4 (d, $J=2.3\text{ Hz}$, 1H), 1.24 (s, 9H), 1.21 (s, 9H), 1.20 (s, 9H), 1.19 (s, 9H); LRMS (ESI+) m/z 533 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 409.

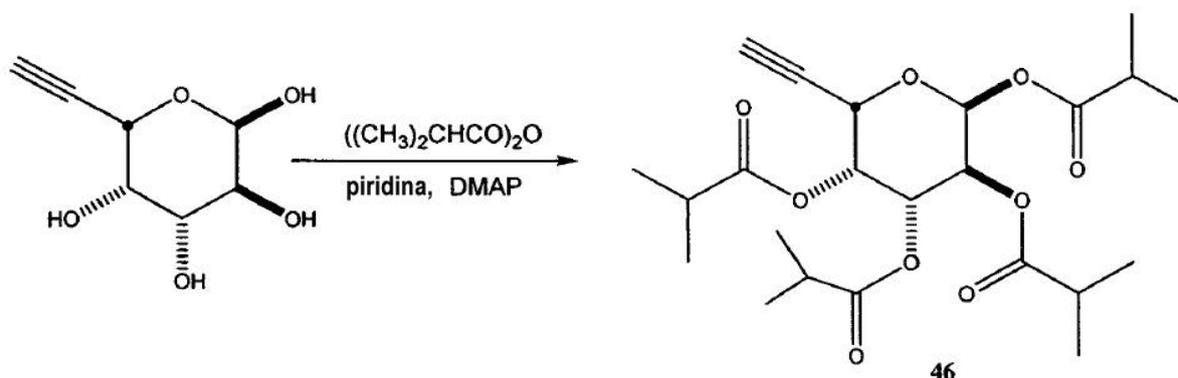
Tripentanoato de (2R,3 S,4R,5R)-5-((S)-1-(pentanoiloxi)prop-2-inil)-tetrahydrofuran-2,3,4-triilo: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 6.12 (d, $J=0.4\text{ Hz}$, 1H), 5.59 (dd, $J=6.8, 2.2\text{ Hz}$, 1H), 5.35 (dt, $J=4.1, 1.5\text{ Hz}$, 1H), 5.03 (dd, $J=1.0, 0.4\text{ Hz}$, 1H), 2.46 (d, $J=2.3\text{ Hz}$, 1H), 1.24 (s, 9H), 1.24 (s, 9H), 1.23 (s, 9H), 1.22 (s, 3H); LRMS (ESI+) m/z 533 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 409.

Mezcla de tripentanoato de (3S,4R,5R,6S)-6-etinil-5-hidroxi-tetrahydro-2H-piran-2,3,4-triilo: LRMS (ESI+) m/z 449 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

Dipentanoato de (2R,3S,4R,5R,6S)-6-etinil-3,5-dihidroxi-tetrahydro-2H-piran-2,4-diilo: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 5.54 (d, $J=8.2\text{ Hz}$, 1H), 4.84 (dd, $J=10.0, 3.2\text{ Hz}$, 1H), 4.52 (dd, $J=2.1, 1.1\text{ Hz}$, 1H), 4.15 (dd, $J=3.2, 1.2\text{ Hz}$, 1H), 4.08 (dd, $J=10.0, 8.1\text{ Hz}$, 1H), 2.58 (d, $J=2.2\text{ Hz}$, 1H), 1.26 (s, 9H), 1.25 (s, 9H); LRMS (ESI+) m/z 365 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

Ejemplo 25: Síntesis de tetrakis(2-metilpropanoato) (3S,4R,5R,6S)-6-etinil-tetrahydro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo (46):

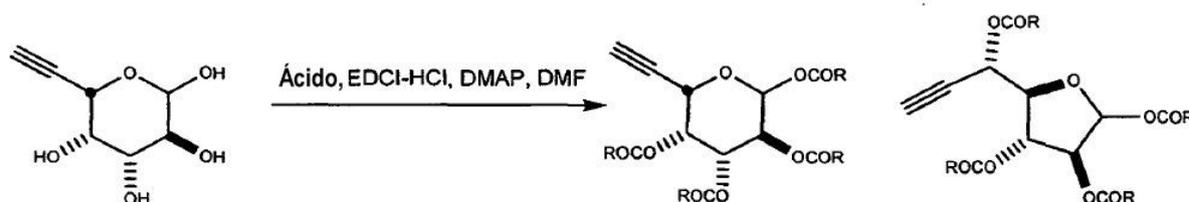
Esquema 11



(Sigue procedimiento 2) A una mezcla de tetra-ol (5 mg, 0,028 mmol) en piridina (0,2 mL) se añadió DMAP (~1 mg) y el anhídrido (0,2 mL o 200 mg). La mezcla fue agitada durante la noche a temperatura ambiente y fue tratada con bicarbonato de sodio acuoso saturado con agitación durante 10 min. La mezcla fue vertida en agua y extraída con acetato de etilo (3 X 25 mL). Los extractos combinados se lavaron con 1N HCl (20 mL), bicarbonato de sodio acuoso saturado (20 mL) y salmuera antes de ser secados sobre MgSO₄, filtrados y concentrados. El residuo resultante fue purificado mediante cromatografía radial en una placa de 1 mm eluyendo con 25% de hexanos de acetato de etilo para obtener el producto en la forma α-piranosas: ¹H-NMR (CDCl₃) δ 6.42 (d, J= 3Hz, 1H), 5.6 (s, 1H), 5.4 (m, 1H), 2.8-2.57 (m, 2H), 2.50-2.38 (m, 3H), 1.30-1.07 (m, 13H), 1.06-1.02 (m, 11H). LRMS (ESI+) m/z 477.1 (M+Na+).

10 Ejemplo 26:

Esquema 12



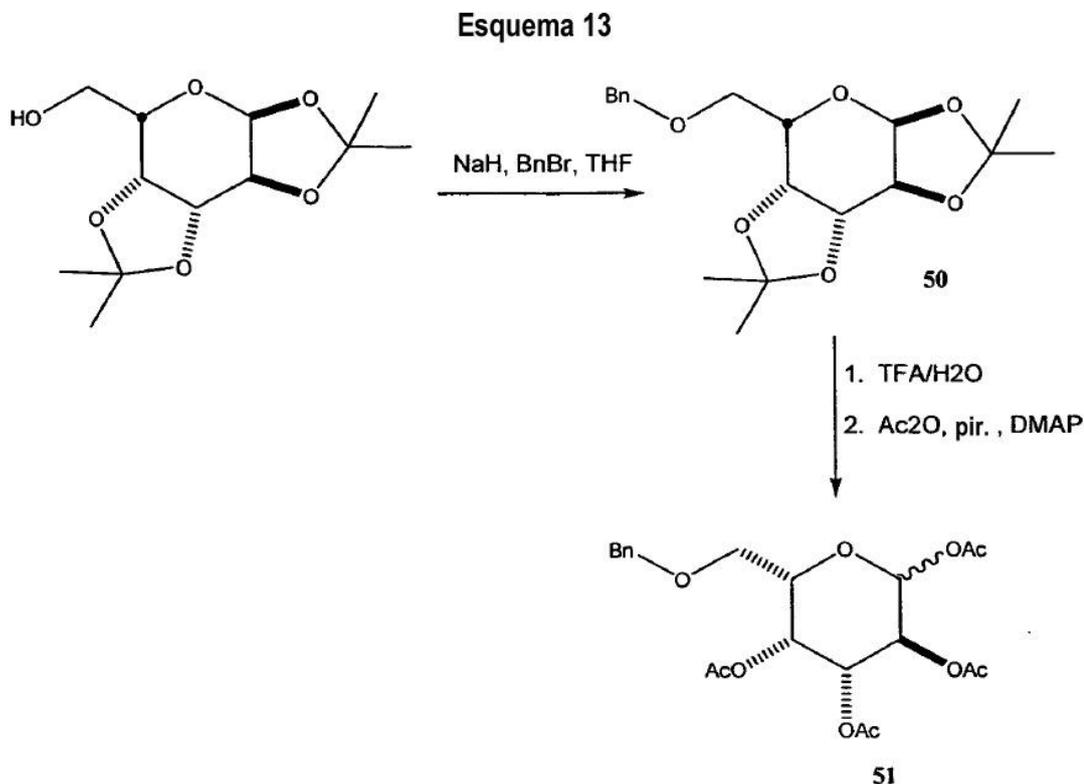
Procedimiento 3: A una solución de tetra-ol (5 mg, 0,028 mmol) en DMF (100 uL) se añadió ácido nicotínico (70 mg, 0,57mmol), DMAP (0,5 mg) y EDCI-HCl (55 mg, 0,28 mmol). La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla fue tratada con bicarbonato de sodio acuoso saturado (5 mL) con agitación durante 5 min. La mezcla resultante fue extraída con acetato de etilo (3 X 3 mL). Los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera, secados sobre MgSO₄, filtrados y concentrados bajo presión reducida. La mezcla fue purificada mediante cromatografía radial en una placa de 1 mm eluyendo con 5% de metanol en cloruro de metileno. Una banda principal única fue recogida y concentrada para obtener el peréster.

20 Los siguientes fueron preparados utilizando el procedimiento anterior:

tetranicotinato de (3S,4R,5R,6S)-6-etinil-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo (47): Rendimiento 12,1 mg (72%), LRMS (ESI+) m/z 594.85 (M+H).

tetrakis(3-(2-metoxietoxi)propanoato de (3S,4R,5R,6S)-6-etinil-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo (48): Rendimiento 18,5mg (95%), LRMS (ESI+) m/z 717 (M+Na)+.

25 tetraisonicotinato de (3S,4R,5R,6R)-6-etinil-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo (49): Rendimiento 13,0mg (78%), LRMS (ESI+) m/z 594 (M+H)+.

Ejemplo 27: Preparación de tetraacetato de (3S,4R,5R,6S)-6-(benciloximetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo:

5 (3aS,5S,5aR,8aR,8bS)-5-(benciloximetil)-2,2,7,7-tetramiltetrahidro-3aH-bis[1,3]dioxolo[4,5-b:4',5'-d]pirano (50): A una mezcla del alcohol (100 mg, 0,38 mmol) y bromuro de bencilo (83 mL, 0,72 mmol) en THF (2 mL) se añadió NaH (50 mg de una dispersión al 60% en aceite mineral) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A la mezcla se añadió NH₄Cl acuoso saturado (10 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 mL). Los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre MgSO₄. La filtración y concentración proporcionó un residuo que fue purificado mediante cromatografía radial en una placa de 1 mm, eluyendo con 10% de acetato de etilo en hexanos para obtener 63 mg (47%): ¹H-RMN (CDCl₃) δ 7.37-7.22 (m, 5H), 5.55 (d, *J*= 4.9 Hz, 1H), 4.64-4.53 (m, 3H), 4.32 (dd, *J*= 5.1, 2.3 Hz, 1H), 4.27 (dd, *J*= 7.8, 2.4 Hz, 1H), 4.01 (dt, *J*= 6.4, 1.9 Hz, 1H), 3.72-3.61 (m, 2H), 1.54 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.33 (s, 6H).

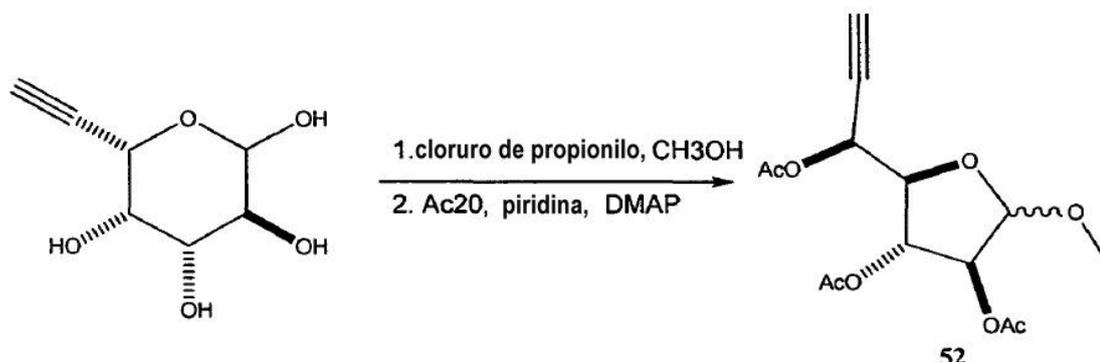
10

15 Tetraacetato de (3S,4R,5R,6S)-6-(benciloximetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo (51): A un matraz de fondo redondo cargado con éter de bencilo (63 mg, 0.18 mmol) y enfriado a 0°C se añadió TFAA/H₂O helado (9:1, 5 mL). La mezcla se agitó durante 1h y se concentró bajo presión reducida. El residuo se trató entonces con piridina (3 mL), DMAP (5 mg) y anhídrido acético (3 mL). La mezcla se agitó 16 h a temperatura ambiente y se concentró bajo presión reducida. El residuo fue purificado mediante cromatografía radial en una placa de 2 mm eluyendo con 25% de acetato de etilo en hexanos para obtener una mezcla de peracetatos de éter de bencilo de piranosa y furanosa, 97 mg (0,22 mmol, 122%): LRMS (ESI+) *m/z* 378,9 (M-OAc)+.

20

Ejemplo 28: preparación de diacetato de (2R,3R,4S)-2-((S)-1-acetoxiprop-2-inil)-5-metoxi-tetrahidrofuran-3,4-diilo (52):

Esquema 14

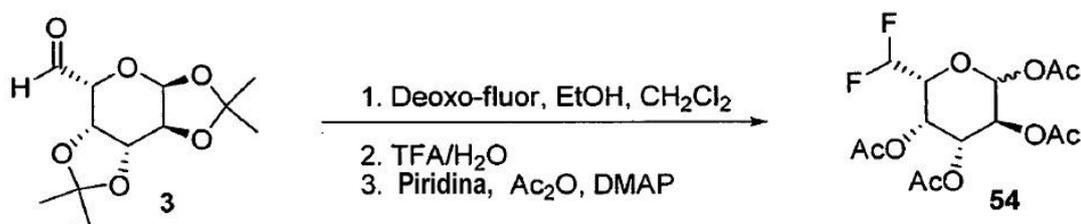


Diacetato de (2R,3R,4S)-2-((S)-1-acetoxiprop-2-inil)-5-metoxi-tetrahidrofuran-3,4-diilo (52): Un matraz de fondo redondo se cargó con CH₃OH (2 mL) y se añadió cloruro de propionilo (20 µL). Tras 5 min, el tetra-ol (~5 mg, 0,028 mmol) se añadió y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se concentró bajo presión reducida, el residuo fue tratado con piridina (1 mL), DMAP (0,5 mg) y anhídrido acético (1 mL), se agitó durante ~2 h y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante fue purificado mediante cromatografía radial para obtener una mezcla de dos triacetatos de furanosa como una mezcla inseparable, 6.1 mg (69%): LRMS (ESI+) *m/z* 336.95 (M+Na)+.

Ejemplo 29: tetraacetato de (3S,4R,5S,6R)-6-(difluorometil)tetrahidro-2H-pirano-2,3,4,5-tetrailo:

10

Esquema 15

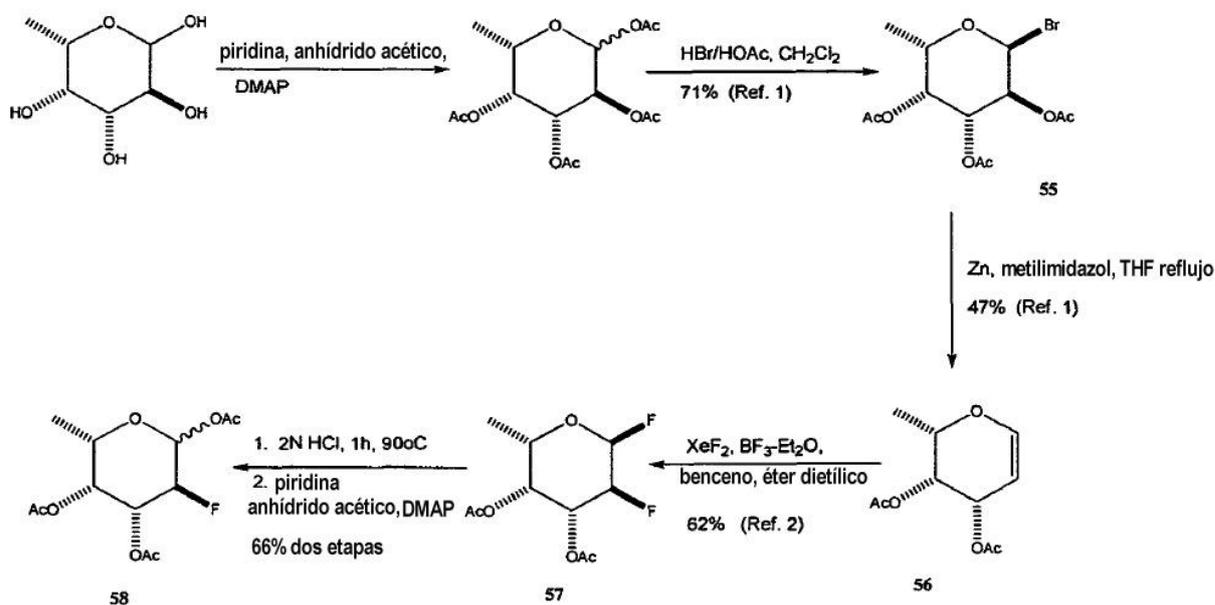


(3aS,5R,5aS,8aR,8bS)-5-(difluorometil)-2,2,7,7-tetrametiltetrahidro-3aH-bis[1,3]dioxolo[4,5-b:4',5'-d]pirano (53): una mezcla del aldehído (70 mg, 0,23 mmol) y etanol absoluto (3.1 µL, 54 mmol, 0,2 eq.) en cloruro de metileno (115 µL, 2 M), fue tratada con trifluoruro de bis (2-metoxietil)aminoazufre (Deoxo-fluor, 85 mL, 0,46 mmol, 1,7 eq.) en un tubo Eppendorf sellado herméticamente. Los contenidos se mantuvieron a 37°C durante 72h. La reacción se enfrió y se purificó a continuación mediante cromatografía flash (eluyendo con 9:1 a 4:1 hexanos-EtOAc). El difluoro-diacetonido intermedio fue aislado como un aceite transparente. Rendimiento: 35 mg, 46% rendimiento. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.34 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 3.85-3.92 (m, 1H), 4.33-4.38 (m, 2H), 4.62-4.67 (m, 1H), 5.56 (dd, *J* = 2 Hz, 4.8 Hz, 1H), 5.84 (dt, *J* = 6.8 Hz, 5.4 Hz, 1H).

Tetraacetato de (3S,4R,5S,6R)-6-(difluorometil)tetrahidro-2H-pirano-2,3,4,5-tetrailo (54): El compuesto mencionado anteriormente (30 mg, 0,11 mmol) fue tratado con ácido trifluoroacético (1 mL) y agua (100 µL) durante 2 h. La mezcla fue concentrada bajo alto vacío y peracetilada mediante cromatografía flash (eluyendo con 4:1 a 1:1 hexanos-EtOAc). Las fracciones deseadas fueron agrupadas y concentradas para obtener el producto como un sólido pegajoso transparente. Rendimiento total: 24 mg (62%). LRMS (ESI+) *m/z* 309 (M-OAc)+, 391 (M+Na)+.

Ejemplo 30: Preparación del peracetato de 2-Fluoro-2-Desoxifucosa (58)

Esquema 16

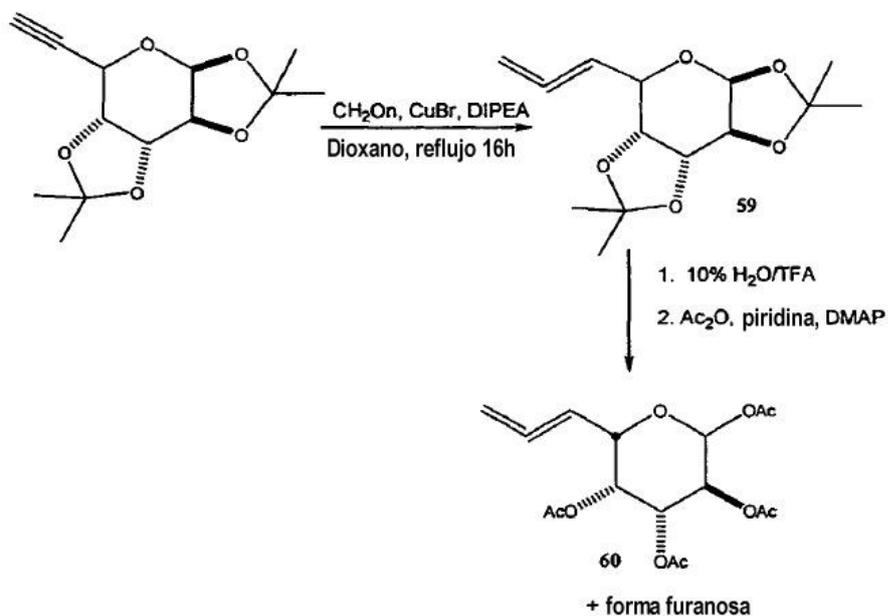


Los compuestos 56, 57 y 58 se prepararon de acuerdo a las siguientes referencias:

- 5
1. Oberthur, M.; Leimkuhler, C.; Kugler, R.G.; Lu, W.; Walsh, C.T.; Kahne, D. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 10747-10752
 2. a) Murray, B. W.; Wittmann, V.; Burkhart, M.D.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. Biochemistry, 1997, 36, 823-831. b) Korytnky, W.; Valentekovic-Horvath, S.; Petrie, C.R. Tetrahedron, 1982, 38(16), 2547-2550.

Ejemplo 31: Preparación de tetracetato de (3S,4R,5R,6S)-6-(propa-1,2-dienil)-tetrahidro-2H-pirano-2,3,4,5-tetrailo (60)

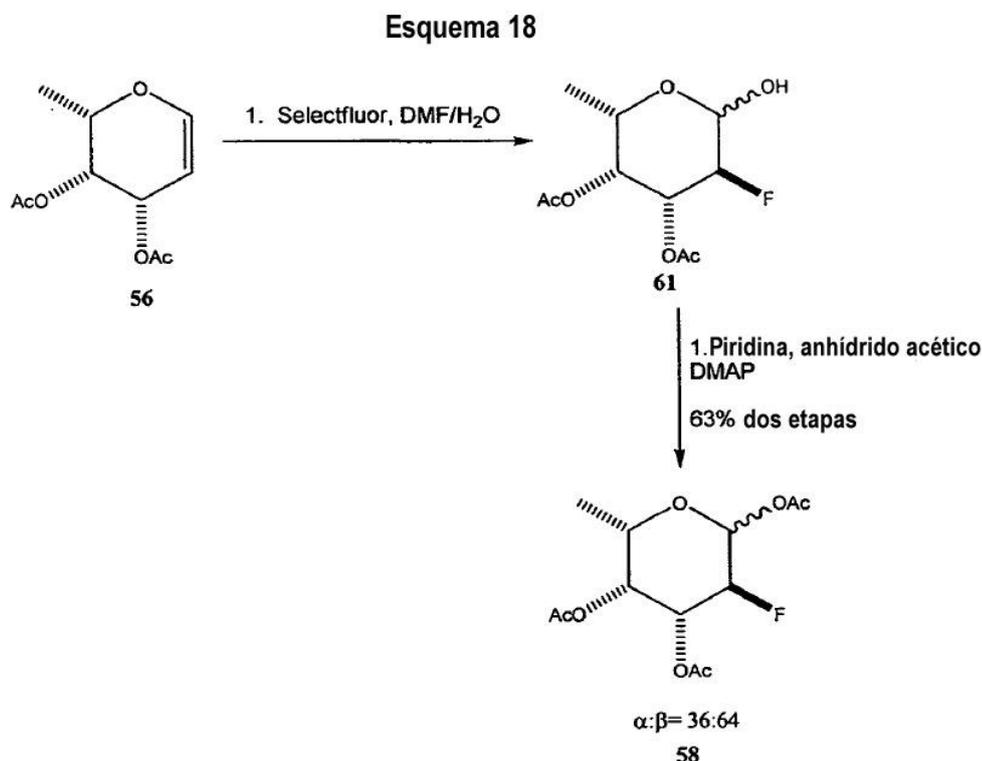
Esquema 17



5 Diacetónido de alenilo (59): A una suspensión de alquino (compuesto 5, 25 mg, 0,1 mmol), paraformaldehído (7 mg, 0,215 mmol), CuBr (5 mg, 0,035 mmol) y dioxano (0,5 mL) en un tubo de presión se añadió DIPEA (28 μ L, 0,223 mmol). El tubo de presión se selló y la mezcla marrón se calentó a reflujo durante 16 h, y a continuación se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El sólido se lavó con Et₂O, y los filtrados combinados se concentraron bajo presión reducida. La purificación mediante cromatografía flash (25% de acetato de etilo en hexanos) presentó el compuesto aleno deseado 59, 2,3 mg (9 %): ¹H RMN (CDCl₃; 400MHz) δ : 5.56 (d, *J* = 4.0Hz, 1H), 5.36 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.84 (m, 2H), 4.62 (dd, *J* = 7.8 Hz, 3.4 Hz, 1H), 4.37 (dd, *J* = 8.2 Hz, 1.7 Hz, 1H), 4.32 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, 1H), 1.54 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.34 (s, 3H).

10 Se añadió al acetónido (compuesto 59, 2,3 mg, 8,5 mmol), en un matraz de fondo redondo y enfriado en un baño de hielo, 10% de H₂O/TFA (4 mL) helada y la mezcla se agitó durante 1h. Después de la concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se trató con piridina (2 mL), DMAP (0,5 mg) y anhídrido acético (2 mL). La mezcla de reacción se agitó durante la noche y la mezcla se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía radial en una placa de 1mm eluyendo con 25% de acetato de etilo en hexanos. Una única banda se recogió y se concentró para obtener 4,1 mg del compuesto 60 como una mezcla de acetatos anoméricos: LRMS (ESI+) *m/z* 378.98 (M+Na+)

Ejemplo 32 preparación de peracetato de 2-fluoro-2-desoxifucosa

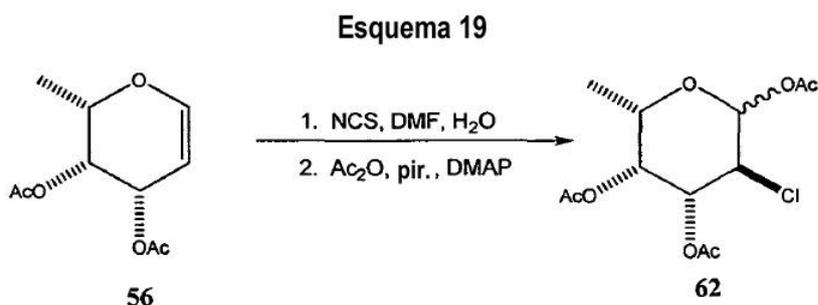


20 Preparación de 61: A una solución del compuesto 56 (500 mg, 2,3 mmol), en DMF/H₂O (30 mL de una mezcla 1:1), se añadió Selectfluor® (1,24 g, 3,5 mmol) y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla fue diluida con acetato de etilo (100 mL) y se lavó con agua (3 x 100 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida: LRMS (ESI+) *m/z* 273.04 (M+Na+). Ver procedimiento publicado: Burkart, M.D.; Zhang, Z.; Hung, S-C.; Wong, C-H. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 11743-11746.

25 Tetraacetato de (3S,4R,5R,6S)-3-fluoro-6-metil-tetrahidro-2H-pirano-2,4,5-triilo (58): A una mezcla del compuesto 61 en piridina (10 mL), se añadió anhídrido acético (10 mL) seguido por DMAP (10 mg) y la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentró bajo presión reducida, se disolvió en DCM (5 mL) y se aspiró en una placa de cromatografía radial de 2 mm; eluyendo con 25% de acetato de etilo en hexanos. Una única banda se recogió y se concentró para obtener 420 mg del compuesto 58 (1,44 mmol, 63%) como una mezcla inseparable de anómeros ($\alpha/\beta = 36:64$): ¹H RMN (CDCl₃; 400MHz) δ (anómero α): 6.43 (d, *J* = 4.11Hz, 1H), 5.41 (dt, *J* = 10.8, 3.72 Hz, 1H), 5.37 (m, 1H), 4.88 (ddd, *J* = 49.5, 10.2, 3.9 Hz, 1H), 4.25 (q, 1H, *J* = 6.7Hz, 1H), 2.9 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.15 (d, *J* = 6.5Hz, 3H); anómero β : 5.77 (dd, *J* = 8.02, 4.2 Hz, 1H), 5.3 (m, 1H), 5.17 (dq, *J* = 9.8, 3.5 Hz, 1H), 4.64

(ddd, $J = 51.8, 9.8, 8.0$ Hz, 1H), 3.98 (dq, $J = 6.4$ Hz, 1.0 Hz, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.22 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H); LRMS (ESI+) m/z 315.02 (M+Na+).

Ejemplo 33: Preparación de L-2-desoxi-2-clorofucopiranos-1,3,4-triacetato, 62



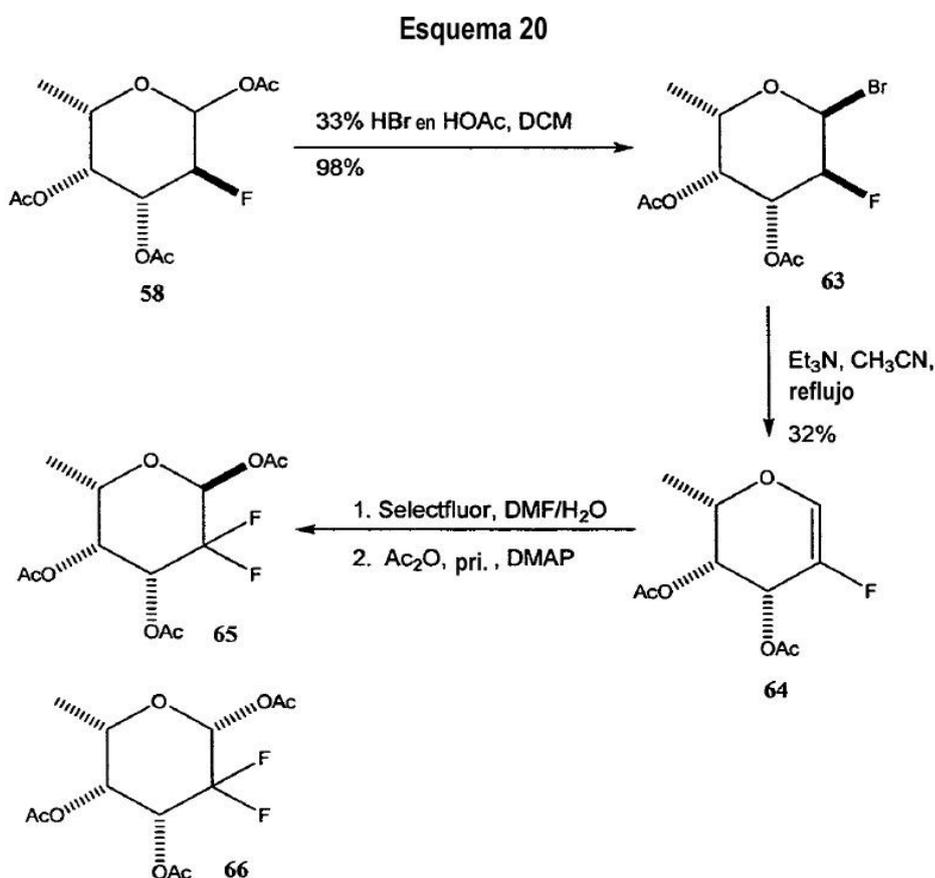
5

L-2-desoxi-2-clorofucopiranos-1,3,4-triacetato: A una mezcla del compuesto 56 (100mg, 0.47mmol) en DMF/H₂O (2 mL de una mezcla 1:1) se añadió N-clorosuccinimida (91 mg, 0.7mmol) y la mezcla fue agitada durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo (100 mL) y se lavó con agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. La mezcla fue recuperada en piridina (2 mL). Se añadió DMAP (2 mg) y anhídrido acético (2 mL). La mezcla se agitó durante 16h a temperatura ambiente antes de ser concentrada y purificada mediante cromatografía radial en una placa de 1 mm eluyendo con 25% de acetato de etilo en hexanos para obtener 98 mg (0,79 mmol, 79%) de triacetato de 2-desoxi-2-clorofucosa 62 como una mezcla de anómeros ($\alpha/\beta = 0,73/1,0$) tal como se determina por 1H NMR: LRMS (ESI+) m/z 330.98 (M+Na+).

10

Ejemplo 34: Preparación de triacetato de (2S,4R,5R,6S)-3,3-difluoro-6-metil-tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triilo (65) y triacetato de (2R,4R,5R,6S)-3,3-difluoro-6-metil-tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triilo (66)

15

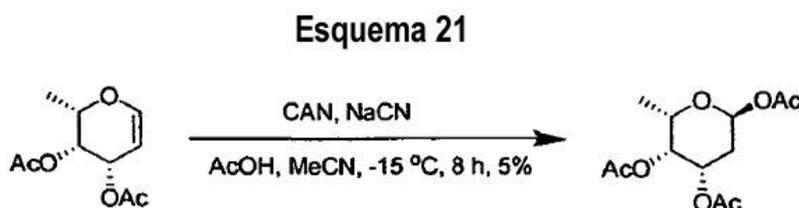


1- α -bromofucopiranos-3,4-diacetato (63): al triacetato de 2-fluorofucosa (compuesto 58, 300 mg, 1,027 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) se añadió 33% HBr en HOAc (0.25 mL). La mezcla se agitó durante 2 h y fue vertida en agua helada (100 mL) y extraída (3 X 50 mL) con DCM. Los extractos combinados se lavaron con agua y se secaron con MgSO_4 . La filtración y la concentración proporcionó 0,313 g (1,0 mmol, 98%) de 3,4-diacetato de L- α -bromofucopiranos (63). El material continuó sin purificación: ^1H RMN (CDCl_3 ; 400MHz) δ 6.60 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 5.48 (dt, $J = 10.0, 3.5$ Hz, 1H), 5.39 (m, 1H), 4.74 (ddd, $J = 50.5, 10.2, 4.3$ Hz, 1H), 4.44 (dq, $J = 5.9, 1.3$ Hz), 2.17 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.22 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H).

2-fluorofucal-3,4-diacetato, 64: A una mezcla del bromuro (63, 312 mg, 1 mmol) en acetronitrilo (10 mL) se añadió Et_3N (500 μL , 3mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo. La reacción fue monitorizada mediante TLC. Después de 2 h, la mezcla de reacción fue vertida en acetato de etilo (100 mL) y se lavó con 1N HCl, agua y salmuera y se secó sobre MgSO_4 . La filtración y concentración proporcionó un residuo que fue purificado mediante cromatografía radial en una placa de 2 mm eluyendo con 25% de hexanos de acetato de etilo para obtener 73 mg (32%): ^1H RMN (CDCl_3 ; 400MHz) δ : 6.74 (dd, $J = 4.9, 1.2$ Hz, 1H), 5.97 (dd, $J = 3.9, 1.2$ Hz, 1H), 5.3 (dt, $J = 5.3, 1.4$ Hz, 1H), 4.15 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.22 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

2-desoxi-2,2-difluorofucopiranos-1,3,4-triacetato (65 y 66): A una mezcla de fluorofucal (64, 50 mg, 0,216 mmol) in DMF/ H_2O (1 mL, mezcla 1:1) se añadió Selectfluor® y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue vertida en EtOAc (100 mL) y se lavó con agua (3 X 50 mL) y salmuera, se secó sobre NaSO_4 , se decantó y concentró. El residuo resultante fue acetilado con una mezcla de piridina (1 mL), DMAP (2 mg) y anhídrido acético (1 mL). La mezcla se agitó durante varias horas y se concentró bajo presión reducida y se purificó en una placa de cromatografía radial de 1 mm eluyendo con 10% de acetato de etilo en hexanos para obtener una mezcla de 2-desoxi-2, 2-difluorofucosa-1,3,4-diacetatos anoméricos. Anómero α (65): ^1H RMN (CDCl_3 ; 400MHz) δ 6.21 (d, $J = 7.2, 1$ H), 5.43 (m, 1H), 5.33 (m, 1H), 4.33 (dq, $J = 6.5, 0.9$ Hz), 2.19 (s, 6H), 2.12 (s, 3H), 1.22 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H); LRMS (ESI+) m/z 332.90 (M+Na+). Anómero β (66): ^1H RMN (CDCl_3 ; 400MHz) δ 5.78 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.3 (m, 1H), 5.24 (m, 1H), 4.06 (dq, $J = 6.5, 1.4$ Hz), 2.23 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 1.29 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H); LRMS (ESI+) m/z 332.99 (M+Na+).

Ejemplo 35: Preparación de triacetato de (2S,4S,5R,6S)-6-metil-tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triilo



Triacetato de (2S,4S,5R,6S)-6-metil-tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triilo: A un matraz secado con llama mantenido bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió fucal-3,4-diacetato (110 mg, 0,51 mmol), disuelto en 2,6 mL de acetronitrilo anhidro. Se añadió amonio cerio (IV) nitrato (727 mg, 1,33 mmol) y ácido acético glacial (290 mL, 5,1 mmol) y la mezcla de reacción se enfrió a continuación a -15°C . Se añadió entonces cianuro de sodio (33 mg, 0,66 mmol) y la reacción se agitó a 15°C bajo nitrógeno durante 8 h. La reacción se extinguió con 0,1 M de tiosulfato de sodio (50 mL). La capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 50 mL) y la capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice eluido con un hexano: mezcla de disolvente de acetato de etilo (90:10 a 75:25) para proporcionar el compuesto del título (8 mg, 5%). TLC (SiO_2 , 3:1 hexanos/acetato de etilo): $R_f = 0.20$. ^1H RMN (CDCl_3 ; 400MHz) δ : 6.29 (m, 1H), 5.29 (ddd, $J = 12.4, 4.8, 2.8$ Hz, 1H), 5.22 (m, 1H), 4.17 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 2.19 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.88 (ddt, $J = 13.6, 4.8, 1.2, 1$ H), 1.15 (d, $J = 6.8$ Hz).

Ejemplo 35: Actividad de los análogos de fucosa

Los efectos de los análogos de la fucosa en la fucosilación del núcleo en los anticuerpos se sometieron a ensayo en concentraciones de $50\mu\text{M}$ y 1 mM tal como sigue a continuación; una línea celular CHO DG44 que produce un anticuerpo monoclonal anti-CD70 de la IgG1 humanizada, h1F6 (ver la publicación de patente internacional WO 06/113909) se cultivó a $7,5 \times 10^5$ células por mL en 2 mLs de medios de cultivo CHO a 37°C , 5% CO_2 y con agitación a 100 RPM en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos. Los medios de cultivo se complementaron con factor de crecimiento insulínico (IGF), penicilina, estreptomina y 1 mM o $50\mu\text{M}$ del análogo de fucosa (preparado tal como se describe en *supra*). En el día 5 posterior a la inoculación, el cultivo fue centrifugado a 13000 RPM durante 5 minutos hasta granular las células; los anticuerpos fueron purificados a continuación a partir del sobrenadante.

5

La purificación de anticuerpos se realizó aplicando los medios acondicionados a resina de proteína A equilibrada previamente con 1X de tampón de fosfato salino (PBS), pH 7,4. Después de la lavar la resina con 20 volúmenes de lecho de resina de 1XPBS, los anticuerpos se eluyeron con 5 volúmenes de lecho de resina de tampón de elución de IgG Immunopure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se añadió un volumen del 10% de 1M tris pH 8,0 para neutralizar la fracción eluida. La cantidad de anticuerpo sin fucosilación del núcleo producido se determinó tal como se describe en el Ejemplo 7. Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 1

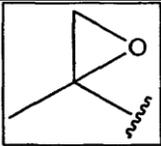
Nombre (nombre químico)	R ⁵	R ¹ -R ⁴	Inhibición a 50 µM	Inhibición a 1 mM
alquinil fucosa (5-etinilarabinosa)	-C≡CH	-OH	>80%	ND
Peracetato de alquinil fucosa Tetraacetato de alquinil fucosa (tetraacetato de 5-etinilarabinosa)	-C≡CH	-OAc	>80%	>80%
tetraacetato de 5-propinil fucosa (tetraacetato de 5-propinilarabinosa)	-C≡CCH ₃	-OAc	50%	>80%
tetraacetato de propargil fucosa (tetraacetato de (3S,4R,5R, 6S)-6-(prop-2-ynil)-tetrahydro-2H-pyran- 2,3,4,5-tetrailo)	-CH ₂ C≡CH	-OAc	~10%	~10-20%
Peracetil galactosa (pentaacetato de galactosa)	-OAc	-OAc	~0%	~0%
Tetraacetato de 5-vinil fucosa (tetraacetato de 5-etilenilarabinosa)	-CHCH ₂	-OAc	~0%	~4%
Tetraacetato de 6-ciano fucosa (6-cianofucosa tetraacetato)	-CHCH ₂	-OAc	30%	>80%
Tetraacetato de 5-ciano fucosa (forma piranosa) (tetraacetato de 5-cianoarabinopiranosa)	-CN	-OAc	20%	ND
Tetraacetato de 5-ciano fucosa (forma furanosa) (tetraacetato de 5-cianoarabinofuranosa)	-CN	-OAc	5-10%	ND
Tetraacetato de 5-metiléster fucosa (tetraacetato de 5-carboximetil arabinosa)	-C(O)OCH ₃	-OAc	~30%	>80%
5-(CH(OAc)CH ₃) peracetil fucosa (pentaacetato de 6-metilgalactosa)	-CH(OAc)CH ₃	-OAc	~0%	40%
Tetraacetato de 5-metiloxiranarabinosa (tetraacetato de (3S,4R,5S,6R)-6-((S)-2-metiloxiran-2-il)-tetrahydro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo)		-OAc	~0%	~35-40%
Tetraacetato de 6-yodo-fucosa (6-yodofucosa tetraacetato)	-CH ₂ I	-OAc	~20%	20-30%
Tetraacetato de 6-bromo-fucosa (6-bromofucosa tetraacetato)	-CH ₂ Br	-OAc	50%	80%

Tabla 1 (cont.)

Nombre (nombre químico)	R ⁵	R ¹ -R ⁴	Inhibición a 50 µM	Inhibición a 1 mM
Tetrapropanoato de alquiniil fucosa (5-etinilarabinosa tetrapropanoato)	-C≡CH	-OC(O)CH ₂ -CH ₃	>80%	>80%
Tetra-n-hexanoato de alquiniil fucosa (5-ethinilarabinosa tetrahexanoato)	-C≡CH	-OC(O)(CH ₂) ₄ -CH ₃	>80%	>80%
tetrakis(trimetilacetato) de alquiniil fucosa (5-etinilarabinosa tetra (trimetilacetato))	-C≡CH	-OC(O)C(CH ₃) ₃	20%	60%
tetrakis(trimetilacetato) de alquiniil fucosa (5-etinilarabinosa tetra (trimetilacetato))	-C≡CH	-OC(O)C(CH ₃) ₃	5%	10%
Alquiniil fucosa 1,2,3-(trimetilacetato) (5-etinilarabinosa 1,2,3-(trimetilacetato))	-C≡CH	-OC(O)C(CH ₃) ₃ y -OH	~0%	ND
Alquiniil fucosa di(trimetilacetato) (5-etinilarabinosa 1,3-(trimetilacetato))	-C≡CH	-OC(O)C(CH ₃) ₃ y -OH	>80%	ND
Pemicotinato de alquiniil fucosa	-C≡CH	-OC(O)-3-piridilo	>80%	>80%
Perisonicotinato de alquiniil fucosa	-C≡CH	OC(O)-4-piridilo	>80%	>80%
Éster Per-PEG de alquiniil fucosa	-C≡CH	-OC(O)-(CH ₂ CH ₂ O) ₂ -OCH ₃	>80%	>80%
1-metil-2,3,4-triacetil alquiniil fucosa	-C≡CH	R ¹ = OCH ₃ R ² , R ³ , R ⁴ = OAc	68%	>80%
Perisobutanoato de alquiniil fucosa	-C≡CH	-OC(O)CH(CH ₃) ₂	>80%	>80%

“ND” significa que no se detectó anticuerpos no fucosilados en el núcleo debido a la producción deficiente de anticuerpos o a la inhibición del crecimiento celular en presencia del análogo de fucosa.

Tabla 2

Nombre (nombre químico)	R ⁵	R ¹	R ² /R ^{2a}	R ³ /R ^{3a}	Inhibición a 50 µM	Inhibición a 1 mM
Diacetato de 2-desoxi-2-fluorofucosa (R ⁴ = OAc)	-CH ₃	-OH	-F / -H	-OAc / -H	> 80%	> 80%
Triacetato de 2-dseoxi-2-clorofucosa (R ⁴ = OAc)	-CH ₃	-OAc	-Cl / -H	-OAc / -H	17%	> 80%
Aleno (R ⁴ = OAc)	-CH=C=CH ₂	-OAc	-OAc / -H	-OAc / -H	23%	34%
2-dseoxi-2-fluorofucosa (R ⁴ = OH)	-CH ₃	-OH	-F / -H	-OH / -H	> 80%	> 80%
Peracetato de 2-desoxi-2-fluorofucosa (R ⁴ = OAc)	-CH ₃	-OAc	-F / -H	-OAc / -H	> 80%	> 80%
Peracetato de 1,2-difluoro-1,2-didesoxi fucosa (R ⁴ = OAc)	-CH ₃	-F	-F / -H	OAc / -H	> 80%	> 80%

Tabla 2 (cont.)

Nombre (nombre químico)	R ^b	R ¹	R ² /R ^{2a}	R ³ /R ^{3a}	Inhibición a 50 μM	Inhibición a 1 mM
Tetraacetato de 6,6-difluorofucosa (R ⁴ = OAc)	-CHF ₂	-OAc	-OAc / -H	-OAc / -H	> 80%	> 80%
Triacetato de 2-desoxi-2,2-difluorofucopiranososa (alfa) (R ⁴ = OAc)	-CH ₃	-OAc	-F / -F	-OAc / -H	0	64%
Triacetato de 2-desoxi-2,2-difluorofucopiranososa (beta) (R ⁴ = OAc)	-CH ₃	-OAc	-F / -F	-OAc / -H	0	75%
Triacetato de 6-metil-tetrahidro-2H-piran-2,4,5-triilo (R ⁴ = OAc)	-CH ₃	-OAc	-H / -H	-OAc / -H	0	36%
Peracetato de 5-Benciloxi fucosa (R ⁴ = OAc)	-CH ₂ OCH ₂ Ph	-OAc	-OAc / -H	-OAc / -H	0	75%

"ND" significa que no se detectó anticuerpos no fucosilados en el núcleo debido a la producción deficiente de anticuerpos o a la inhibición del crecimiento celular en presencia del análogo de fucosa.

Ciertos análogos de fucosa distintos fueron sometidos a ensayo para su habilidad a incorporarse en anticuerpos. Estos análogos de fucosa se analizaron en concentraciones de 50 μM y 1 mM utilizando la metodología tal como se ha descrito anteriormente y en el Ejemplo 7. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

5

Tabla 3

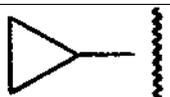
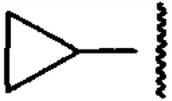
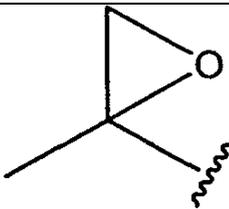
Nombre (nombre químico)	R ^b	R ¹	% Incorporación
Propargil fucosa o tetraacetato de (3S,4R,5R)-6-(prop-2-inil) tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo		-OAc	80% (1 mM)
Peracetato de 5-(Z)-propenil fucosa		-OAc	~30%
Isopropenil peracetil fucosa o tetraacetato de (3S,4R,5R,6S)-6-(prop-1-en-2-il)-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo		-OAc	> 80% (1 mM y 50 uM)
5-etil fucosa o (3S,4R,5S,6S)-6-etil-tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraol	-CH ₃ CH ₂	-OH	> 80% (1 mM y 50 uM)
Peracetato de 5-etil fucosa o tetraacetato de (3S,4R,5S,6S)-6-etiltetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo	-CH ₃ CH ₂	-OAc	> 90% (1 mM y 50 uM)
5-ciclopropil fucosa o (3S,4R,5S,6S)-6-ciclopropiltetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraol		-OAc	~80%

Tabla 3 (cont.)

Nombre (nombre químico)	R ⁵	R ¹	% Incorporación
Peracetato de 5-ciclopropil fucosa o tetraacetato de (3S,4R,5R,6S)-6-ciclopropiltetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo		-OAc	~80%
Tetraacetato de 5-propiloxiarabinosa o (3S,4R,5S,6R)-6-((S)-2-metiloxiran-2-il)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo		-OAc	~60%
Fluorometilén fucosa o tetraacetato de (3S,4R,5S)-6-(fluorometil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo	-CH ₂ F	-OAc	> 90% (1 mM y 50 uM)
5-clorometilén peracetil fucosa o tetraacetato de (3S,4R,5S)-6-(clorometil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo	-CH ₂ Cl	-OAc	~80%
5-bromometilén peracetil fucosa o (3S,4R,5S)-6-(bromometil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo	-CH ₂ Cl	-OAc	~30%
Azido peracetil fucosa o tetraacetato de (3S,4R,5R)-6-(azidometil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo	-CH ₂ N ₃	-OAc	60%
Tetraacetato de 5-(2-azidoetil) arabinosa o (3S,4R,5R, 6S)-6-(2-azidoetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo	-CH ₂ CH ₂ N ₃	-OAc	~20%
	-CH=C=CH ₂	-OAc	~30%
Tetraacetato de Isopropil peracetil fucosa o tetraacetato de (3S,4R,5R,6S)-6-isopropiltetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetrailo	Isopropilo	-OAc	No detectado

Ejemplo 36: Método de titulación para determinar niveles efectivos de los análogos de fucosa.

- Una línea celular CHO DG44 que produce un anticuerpo monoclonal anti-CD70 de la IgG1 humanizada, h1F6 (ver la publicación de patente internacional WO 06/113909) se cultivó a $3,0 \times 10^5$ células por mL en 30 mLs de medios de cultivo CHO a 37°C, 5% CO₂ y con agitación a 100 RPM en un matraz de 125 mL. Los medios de cultivo se complementaron con factor de crecimiento insulínico (IGF), penicilina, estreptomina y 100 µM, 50 µM, 5 µM, 500 nM, o 50 nM de peracetato de alquilil fucosa. Los cultivos se alimentaron en el día 3 con 2% de volumen de un medio de alimentación que contiene 5 mM, 2.5 mM, 250 µM, 25 µM, y 2.5 µM de peracetato de alquilil fucosa para los respectivos cultivos. En el día cuatro, el cultivo fue dividido 1:4 en medios de cultivo frescos. Los cultivos se alimentaron con un volumen al 6% de medios de alimentación de producción con contenido de 1,66 mM, 833 µM, 83 mM, 8.3 µM and 833 nM de peracetato de alquilil fucosa, respectivamente, en los días 5, 7, 9 y 10. La complementación de los medios de alimentación es opcional. Los medios acondicionados se recogieron en el día 13 pasando el cultivo a través de un filtro de 0,2 µm.
- La purificación del anticuerpo fue realizada aplicando los medios acondicionados a una columna de proteína A previamente equilibrada con 1X de tampón de fosfato salino (PBS), pH 7,4. Después de la lavar la columna con 20 volúmenes de columna de 1XPBS, los anticuerpos se eluyeron con 5 volúmenes de columna de tampón de elución de IgG Inmunopure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se añadió un volumen del 10% de 1M tris pH 8,0 a la fracción eluida. La muestra fue dializada durante la noche en 1X PBS. La composición de carbohidrato se determinó utilizando electroforesis capilar.

En referencia a la Figura 6, muestra los resultados de una titulación de peracetato de alquilil fucosa ("peracetato Alk Fuc") en un cultivo de células hospedadoras que expresan anticuerpos h1F6 y el efecto en la producción de Ab con fucosilación del núcleo (G0). A medida que la cantidad de anticuerpos G0 producidos disminuía, la cantidad de anticuerpos sin fucosilación del núcleo aumentó.

Ejemplo 37: producción de anticuerpos sin fucosilación del núcleo en diferentes medios de cultivo

- Para determinar el efecto de diferentes medios de cultivo en la producción de anticuerpos sin fucosilación del núcleo, una línea celular CHO DG44 que produce un anticuerpo monoclonal anti-CD70 de la IgG1 humanizada, h1F6 (ver la publicación de patente internacional WO 06/113909) se cultivó en diversos medios de cultivo. Las células ($7,5 \times 10^5$ células por mL en 2 mLs) se cultivaron en medios de cultivo CHO PowerCHO (Lonza Group Ltd., Basilea, Suiza) o OptiCHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37°C, 5% CO₂ y con agitación a 100 RPM en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos. Los medios se complementaron con factor de crecimiento insulínico (IGF), penicilina, estreptomycin y 50 µM de peracetato de alquilil fucosa. En el día 5 posterior a la inoculación, el cultivo fue centrifugado a 13000 RPM durante 5 minutos hasta granular las células; los anticuerpos fueron purificados a continuación a partir del sobrenadante.
- 5
- 10 La purificación de anticuerpos se realizó aplicando los medios acondicionados a resina de proteína A equilibrada previamente con 1X de tampón de fosfato salino (PBS), pH 7,4. Después de lavar la resina con 20 volúmenes de lecho de resina de 1XPBS, los anticuerpos se eluyeron con 5 volúmenes de lecho de resina de tampón de elución de IgG Immunopure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se añadió un volumen del 10% de 1M tris pH 8,0 para neutralizar la fracción eluida. La producción de anticuerpos sin fucosilación del núcleo se determinó tal como se describe en el Ejemplo 7. La proporción de anticuerpos con fucosilación del núcleo y sin fucosilación del núcleo
- 15 producidos a partir de cada medio fue similar.

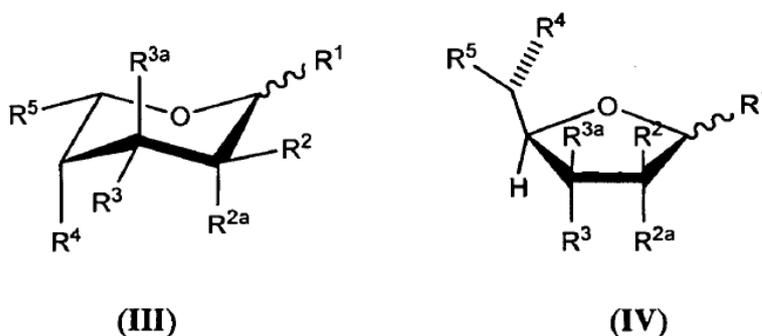
REIVINDICACIONES

1. Método para la elaboración de un anticuerpo o derivado de anticuerpo modificado que presenta fucosilación del núcleo reducida, que comprende:

5 cultivar una célula hospedadora en un medio de cultivo que comprende una cantidad efectiva de un análogo de fucosa bajo condiciones adecuadas de crecimiento, en donde la célula hospedadora expresa el anticuerpo o derivado de anticuerpo con un dominio Fc que tiene al menos un complejo de una cadena de azúcares enlazadas por N-glucósido unida al dominio Fc a través de una N-acetilglucosamina del extremo reductor de la cadena de azúcares, y

aislar el anticuerpo o derivados de anticuerpo de las células,

10 en donde el análogo de fucosa se selecciona del grupo que consiste en una de las siguientes fórmulas (III) o (IV):



o una sal o solvato biológicamente aceptable de los mismos, en donde cada fórmula (III) o (IV) puede ser el anómero alfa o beta o la correspondiente forma aldosa;

15 cada R^1 - R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en flúor, cloro, $-OH$, $-OC(O)H$, $-OC(O)$ alquilo C_1 - C_{10} , $-OC(O)$ alquenilo C_2 - C_{10} , $-OC(O)$ alquinilo C_2 - C_{10} , $-OC(O)$ arilo, $-OC(O)$ heterociclo, $-OC(O)$ alquilen(arilo) C_1 - C_{10} , $-OC(O)$ alquilen(arilo) C_2 - C_{10} , $-OC(O)$ alquinil(arilo) C_2 - C_{10} , $-OC(O)$ alquilen heterociclo C_1 - C_{10} , $-OC(O)$ alquenilen(heterociclo) C_2 - C_{10} , $-OC(O)$ alquinil heterociclo C_2 - C_{10} , $-OCH_2OC(O)$ alquilo, $-OCH_2OC(O)O$ alquilo; $-OCH_2OC(O)$ arilo, $-OCH_2OC(O)O$ arilo, $-OC(O)CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_3$, $-OC(O)CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_3$, $-O$ -tri-alquilsililo C_1 - C_3 y $-O$ alquilo C_1 - C_{10} , en donde cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0-5; y

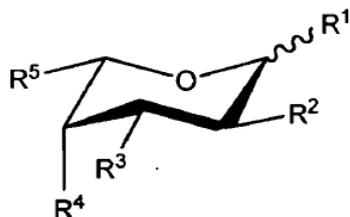
20 cada R^{2a} y R^{3a} se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F y Cl;

R^5 se selecciona del grupo que consiste en $-CH_3$, $-CHF_2$, $-CH=C=CH_2$, $-C=CH$, $-C\equiv CCH_3$, $-CH_2C\equiv CH$, $-C(O)OCH_3$, $-CH(OAc)CH_3$, $-CN$, $-CH_2CN$, $-CH_2X$ (en donde X es Br, Cl o I), y metoxiran;

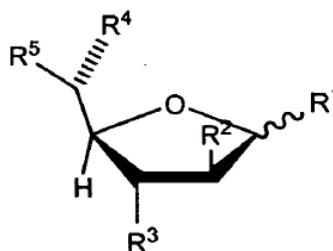
25 donde, cuando R^5 es distinto de $-CH=C=CH_2$ o $-CHF_2$, al menos uno de R^1 , R^2 , R^3 , R^{2a} y R^{3a} es flúor o cloro; y

donde el anticuerpo o derivado del anticuerpo presenta fucosilación del núcleo reducida en comparación con el anticuerpo o derivado de anticuerpo de la célula hospedadora cultivada en ausencia del análogo de fucosa;

30 o donde el análogo de fucosa se selecciona del grupo que consiste en una de las siguientes fórmulas (I) o (II):



(I)



(II)

o una sal o solvato biológicamente aceptables de los mismos, donde:

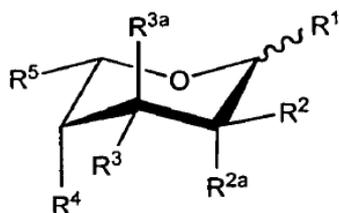
cada fórmula (I) o (II) puede ser el anómero alfa o beta o la forma aldosa correspondiente;

5 cada R^1 - R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH, -OC(O)H, -OC(O) alquilo C_1 - C_{10} , -OC(O) alqueno C_2 - C_{10} , -OC(O) alquino C_2 - C_{10} , -OC(O) arilo, -OC(O) heterociclo, -OC(O) alquilen(arilo) C_1 - C_{10} , -OC(O) alquilen(arilo) C_2 - C_{10} , -OC(O) alquilen(arilo) C_2 - C_{10} , -OC(O) alquilen heterociclo C_1 - C_{10} , -OC(O) alquilen(heterociclo) C_2 - C_{10} , -OC(O) alquilen heterociclo C_2 - C_{10} , -OCH₂OC(O) alquilo, -OCH₂OC(O) arilo, -OCH₂OC(O)O arilo, -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -OC(O)CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -O-tri-alquilsililo C_1 - C_3 , y -O alquilo C_1 - C_{10} en donde cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0-5; y

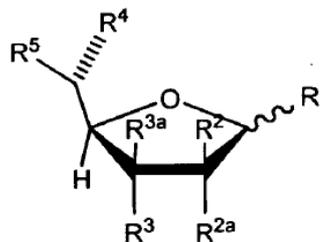
10 R^5 se selecciona del grupo que consiste en -C≡CH, -C≡CH₂C≡CH, -C(O)OCH₃, -CH(OAc)CH₃, -CN, -CH₂CN, -CH₂X (en donde X es Br, Cl o I), y metoxiran; y

15 donde el anticuerpo o derivado de anticuerpo presenta fucosilación del núcleo reducida en comparación con el anticuerpo o derivado de anticuerpo a partir de la célula hospedadora cultivada en ausencia del análogo de fucosa;

o en donde el análogo de fucosa se selecciona del grupo que consiste en una de las fórmulas (V) o (VI):



(V)



(VI)

o una sal o solvato biológicamente aceptables del mismo, en donde cada fórmula (V) o (VI) puede ser el anómero alfa o beta o la forma aldosa correspondiente;

20 cada R^1 , R^2 , R^{2a} , R^3 , R^{3a} y R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH, -OC(O)H, -OC(O) alquilo C_1 - C_{10} , -OC(O) alqueno C_2 - C_{10} , -OC(O) alquino C_2 - C_{10} , -OC(O) arilo, -OC(O) heterociclo, -OC(O) alquilen(arilo) C_1 - C_{10} , -OC(O) alquilen(arilo) C_2 - C_{10} , -OC(O) alquilen(arilo) C_2 - C_{10} , -OC(O) alquilen heterociclo C_1 - C_{10} , -OC(O) alquilen(heterociclo) C_2 - C_{10} , -OC(O) alquilen heterociclo C_2 - C_{10} , -OCH₂OC(O) alquilo, -OCH₂OC(O) arilo, -OCH₂OC(O)O arilo, -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -OC(O)CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -O-tri-alquilsililo C_1 - C_3 , -O alquilo C_1 - C_{10} , y un grupo sustractor de electrones pequeño, en donde cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0-5;

30 R^5 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en -CH₃, -CH₂X, -CH(X')-alquilo C_1 - C_4 sustituido o no sustituido con halógeno, -CH(X')-alqueno C_2 - C_4 sustituido o no sustituido con halógeno, -CH(X')-alquino C_2 - C_4 sustituido o no sustituido con halógeno, -CH=C(R¹⁰)(R¹¹), -C(CH₃)=C(R¹²)(R¹³), -C(R¹⁴)=C=C(R¹⁵)(R¹⁶), carbociclo - C_3 sustituido o no sustituido con metilo o halógeno, -CH(X')-carbociclo C_3 sustituido o no sustituido con metilo o halógeno, heterociclo C_3 sustituido o no sustituido con metilo o

halógeno, -CH(X')-heterociclo C₃ sustituido o no sustituido con metilo o halógeno, -CH₂N₃, -CH₂CH₂N₃, y benciloximetilo, o R⁵ es un grupo sustractor de electrones pequeño; en donde

R¹⁰ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃ sustituido o no sustituido con halógeno;

R¹¹ es alquilo C₁-C₃ sustituido o no sustituido con halógeno;

5 R¹² es hidrógeno, halógeno o alquilo C₁-C₃ sustituido o no sustituido con halógeno; y

R¹³ es hidrógeno, o alquilo C₁-C₃ sustituido o no sustituido con halógeno;

R¹⁴ es hidrógeno o metilo;

R¹⁵ y R¹⁶ se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo y halógeno;

X es halógeno; y

10 X' es halógeno o hidrógeno; y

adicionalmente, cada R¹, R², R^{2a}, R³ y R^{3a} son opcionalmente hidrógeno; opcionalmente dos R¹, R², R^{2a}, R³ y R^{3a} en átomos de carbono adyacentes se combinan para formar un doble enlace entre dichos átomos de carbono adyacentes; y

15 dado que al menos uno de R¹, R², R^{2a}, R³, R^{3a}, R⁴ y R⁵ es un pequeño grupo sustractor de electrones, o R⁵ comprende un halógeno, sitio de insaturación, carbociclo, heterociclo o azida, excepto cuando (i) R² y R^{2a} son ambos hidrógeno, (ii) R³ y R^{3a} son ambos hidrógeno, (iii) R¹ es hidrógeno, (iv) un doble enlace se encuentra presente entre dichos átomos de carbono adyacentes, o (v) R⁵ es benciloximetilo; y

en donde el anticuerpo o derivado de anticuerpo tiene fucosilación del núcleo reducida en comparación con el anticuerpo o derivado de anticuerpo a partir de la célula hospedadora cultivada en ausencia del análogo de fucosa.

20 2. Método según la reivindicación 1, en donde menos del 20% del análogo de fucosa se incorpora en las cadenas de azúcar ligadas al N-glucósido complejo del anticuerpo o derivado del anticuerpo.

3. Método según la reivindicación 1, en donde menos del 5% del análogo de fucosa está incorporado al complejo de cadenas de azúcares enlazadas por N-glucósido del anticuerpo o derivado del anticuerpo.

25 4. Método según la reivindicación 1, en donde el análogo de fucosa se selecciona del grupo que consiste en una de las fórmulas (III) o (IV).

5. Método según la reivindicación 4, en donde R² es F.

6. Método según la reivindicación 4, en donde cada R¹ y R² es F.

7. Método según la reivindicación 4, en donde cada R¹, R³, y R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -OH y -OAc, R² es F, cada R^{2a} y R^{3a} es H; y R⁵ es CH₃.

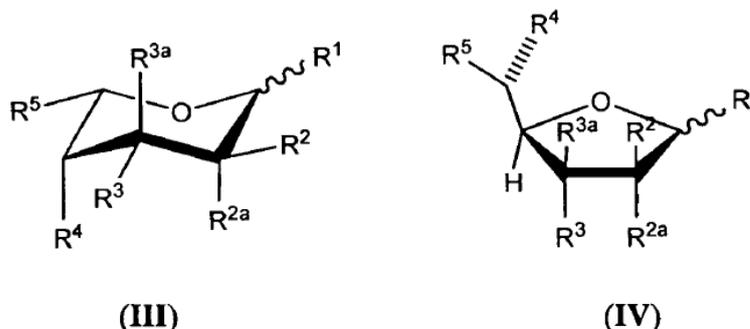
30 8. Método según la reivindicación 1, en donde el análogo de fucosa se selecciona del grupo que consiste en una de las fórmulas (I) o (II).

9. Método según la reivindicación 8, en donde:

35 cada R¹-R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH, -OC(O)H, -OC(O) alquilo C₁-C₁₀, -OC(O) alqueno C₂-C₁₀, -OC(O) alqueno C₂-C₁₀, -OC(O)arilo, -OC(O)heterociclo, -OC(O) alquilen(arilo) C₁-C₁₀, -OC(O) alquilen(arilo) C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₁-C₁₀, -OC(O)alquilen(heterociclo) C₂-C₁₀, -OC(O)alquilen heterociclo C₂-C₁₀, -OCH₂OC(O) alquilo, -OCH₂OC(O)O alquilo, -OCH₂OC(O) arilo, -OCH₂OC(O)O arilo, -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, y -OC(O)CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃,

en donde cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0-5;

10. Método según la reivindicación 9, en donde cada R^1 - R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH y -OC(O) alquilo C_1 - C_{10} .
11. Método según la reivindicación 9, en donde R^5 se selecciona del grupo que consiste en $-C\equiv CH$ y $-C\equiv CCH_3$.
12. Método según la reivindicación 9, en donde R^5 es $-C(O)OCH_3$.
- 5 13. Método según la reivindicación 9, en donde R^5 es $-CH_2CN$.
14. Método según la reivindicación 9, en donde R^5 es $-CH_2X$ (en donde X es Br).
15. Método según la reivindicación 9, en donde R^5 es $-CH(OAc)CH_3$.
16. Método según la reivindicación 1, en donde el análogo de fucosa es alquinil fucosa, peracetato de alquinil fucosa, tetraacetato de alquinil fucosa, tetraacetato de 5-propinil fucosa, tetrapropanonato de alquinil fucosa, tetra-n-hexanoato de alquinil fucosa, di(trimetilacetato) de alquinil fucosa, pernicotinato de alquinil fucosa, perisonicotinato de alquinil fucosa, éster per-PEG de alquinil fucosa, 1-metil-2,3,4-triacetil alquinil fucosa, o perisobutanoato de alquinil fucosa.
- 10 17. Método según la reivindicación 1, en donde el análogo de fucosa es tetraacetato de 6-ciano fucosa, tetraacetato de 5-metiléster fucosa, o tetraacetato de 6-bromo-fucosa.
- 15 18. Método según la reivindicación 1, en donde el análogo de fucosa es diacetato de 2-desoxi-2-fluorofucosa, triacetato de 2-desoxi-2-clorofucosa, 2-desoxi-2-fluorofucosa, peracetato de 2-desoxi-2-fluorofucosa, peracetato de 1,2-difluoro-1,2-didesoxi fucosa, o tetraacetato de 6,6-difluorofucosa.
19. Método según la reivindicación 1, en donde el análogo de fucosa es 2-desoxi-2-fluorofucosa.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la cantidad efectiva es una cantidad del análogo que es suficiente para reducir la incorporación de fucosa al complejo de cadenas de azúcares enlazadas por N-glucósido del anticuerpo o derivado de anticuerpo en el menos un 80%.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 19 en donde menos del 5% del análogo de fucosa se incorpora al complejo de las cadenas de azúcares enlazadas por N-glucósido del anticuerpo o derivado de anticuerpo.
- 25 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de ovario de hámster chino.
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende purificar el anticuerpo o derivados de anticuerpo.
- 30 24. Medio de cultivo celular de mamíferos para la producción de anticuerpos o derivados de anticuerpos que presentan fucosilación del núcleo reducida, que comprende una cantidad efectiva de un análogo de fucosa, en donde el análogo de fucosa se selecciona del grupo que consiste en una de las siguientes fórmulas (III) o (IV):



o una sal o solvato biológicamente aceptables del mismo, en donde cada fórmula (III) o (IV) puede ser el anómero alfa o beta o la forma aldosa correspondiente;

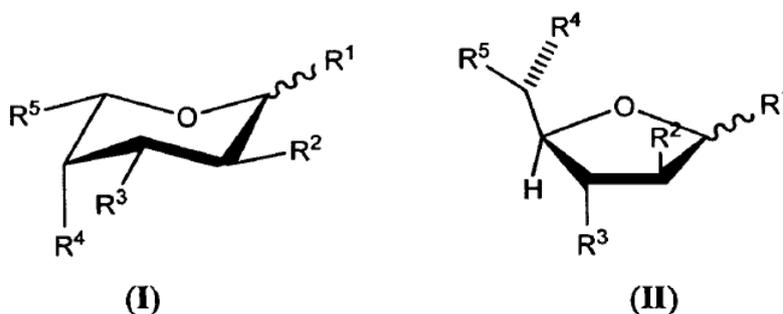
5 cada R¹-R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en flúor, cloro, -OH, -OC(O)H, -OC(O) alquilo C₁-C₁₀, -OC(O) alquenilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquinilo C₂-C₁₀, -OC(O)arilo, -OC(O)heterociclo, -OC(O) alquilen(arilo) C₁-C₁₀, -OC(O) alquilen(arilo) C₂-C₁₀, -OC(O) alquil(arilo) C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₁-C₁₀, -OC(O) alquilen(heterociclo) C₂-C₁₀, -OC(O) alquil heterociclo C₂-C₁₀, -OCH₂OC(O) alquilo, -OCH₂OC(O)O alquilo; -OCH₂OC(O) arilo, -OCH₂OC(O)O arilo, -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -OC(O)CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -O-tri-alquilsililo C₁-C₃ y -O alquilo C₁-C₁₀, en donde cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0-5; y

cada R^{2a} y R^{3a} se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, F y Cl;

10 R⁵ se selecciona del grupo que consiste en -CH₃, -CHF₂, -CH=C=CH₂, -C≡CH, -C≡CCH₃, -CH₂C≡CH, -C(O)OCH₃, -CH(OAc)CH₃, -CN, -CH₂CN, -CH₂X (en donde X es Br, Cl o I), y metoxiran;

en donde cuando R⁵ es distinto de -CH=C=CH₂ o -CHF₂, al menos uno de R¹, R², R³, R^{2a} y R^{3a} es flúor o cloro;

o en donde el análogo de fucosa se selecciona del grupo que consiste en una de las siguientes fórmulas (I) o (II):



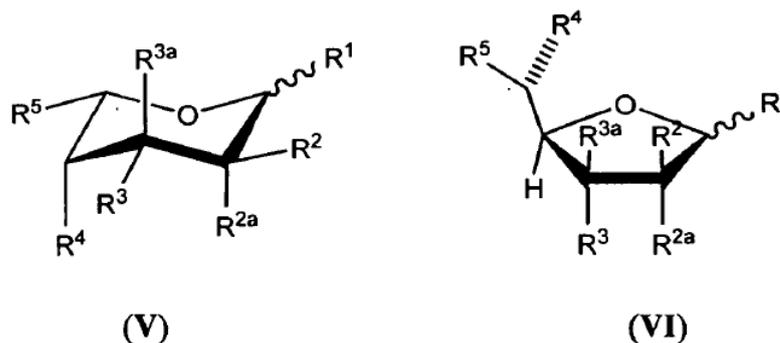
o una sal o solvato biológicamente aceptables del mismo, en donde:

cada fórmula (I) o (II) puede ser el anómero alfa o beta o la forma aldosa correspondiente;

20 cada R¹-R⁴ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH, -OC(O)H, -OC(O) alquilo C₁-C₁₀, -OC(O) alquenilo C₂-C₁₀, -OC(O) alquinilo C₂-C₁₀, -OC(O)arilo, -OC(O)heterociclo, -OC(O) alquilen(arilo) C₁-C₁₀, -OC(O) alquilen(arilo) C₂-C₁₀, -OC(O) alquil(arilo) C₂-C₁₀, -OC(O) alquilen heterociclo C₁-C₁₀, -OC(O)alquilen(heterociclo) C₂-C₁₀, -OC(O)alquil heterociclo C₂-C₁₀, -OCH₂OC(O) alquilo, -OCH₂OC(O)O alquilo, -OCH₂OC(O) arilo, -OCH₂OC(O)O arilo, -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -OC(O)CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -O-tri-alquilsililo C₁-C₃, y -O alquilo C₁-C₁₀ en donde cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0-5; y

25 R⁵ se selecciona del grupo que consiste en -C≡CH, -C≡CCH₃, -CH₂C≡CH, -C(O)OCH₃, -CH(OAc)CH₃, -CN, -CH₂CN, -CH₂X (en donde X es Br, Cl o I), y metoxiran.

o en donde el análogo de fucosa se selecciona del grupo que consiste en una de las siguientes fórmulas (V) o (VI):



o una sal o solvato biológicamente aceptables del mismo, en donde cada fórmula (V) o (VI) puede ser el anómero alfa o beta o la forma aldosa correspondiente;

5 cada R^1 , R^2 , R^{2a} , R^3 , R^{3a} y R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH, -OC(O)H, -OC(O) alquilo C_1-C_{10} , -OC(O) alquenilo C_2-C_{10} , -OC(O) alquinilo C_2-C_{10} , -OC(O) arilo, -OC(O)heterociclo, -OC(O) alquilen(arilo) C_1-C_{10} , -OC(O) alquilen(arilo) C_2-C_{10} , -OC(O) alquinil(arilo) C_2-C_{10} , -OC(O) alquilen heterociclo C_1-C_{10} , -OC(O) alquenilen(heterociclo) C_2-C_{10} , -OC(O) alquinil heterociclo C_2-C_{10} , -OCH₂OC(O) alquilo, -OCH₂OC(O)O alquilo, -OCH₂OC(O) arilo, -OCH₂OC(O)O arilo, -OC(O)CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -OC(O)CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₃, -O-tri-alquilsililo C_1-C_3 , -O alquilo C_1-C_{10} , y un grupo sustractor de electrones pequeño, en donde cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0-5;

10 R^5 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en -CH₃, -CH₂X, -CH(X')-alquilo C_1-C_4 sustituido o no sustituido con halógeno, -CH(X)- alqueno C_2-C_4 sustituido o no sustituido con halógeno, -CH(X')- alquino C_2-C_4 sustituido o no sustituido con halógeno, -CH=C(R¹⁰)(R¹¹), -C(CH₃)=C(R¹²)(R¹³), -C(R¹⁴)=C=C(R¹⁵)(R¹⁶), carbociclo -C₃ sustituido o no sustituido con metilo o halógeno, -CH(X')-carbociclo C₃ sustituido o no sustituido con metilo o halógeno, heterociclo C₃ sustituido o no sustituido con metilo o halógeno, -CH(X')-heterociclo C₃ sustituido o no sustituido con metilo o halógeno, -CH₂N₃, -CH₂CH₂N₃, y benciloximetilo, o R^5 es un grupo sustractor de electrones pequeño; en donde

R^{10} es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 sustituido o no sustituido con halógeno;

R^{11} es alquilo C_1-C_3 sustituido o no sustituido con halógeno;

R^{12} es hidrógeno, halógeno o alquilo C_1-C_3 sustituido o no sustituido con halógeno; y

20 R^{13} es hidrógeno, o alquilo C_1-C_3 sustituido o no sustituido con halógeno;

R^{14} es hidrógeno o metilo;

R^{15} y R^{16} se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo y halógeno;

X es halógeno; y

X' es halógeno o hidrógeno; y

25 adicionalmente, cada R^1 , R^2 , R^{2a} , R^3 y R^{3a} son opcionalmente hidrógeno; opcionalmente dos R^1 , R^2 , R^{2a} , R^3 y R^{3a} en átomos de carbono adyacentes se combinan para formar un doble enlace entre dichos átomos de carbono adyacentes; y

30 dado que al menos uno de R^1 , R^2 , R^{2a} , R^3 , R^{3a} , R^4 y R^5 es un pequeño grupo sustractor de electrones, o R^5 comprende un halógeno, sitio de insaturación, carbociclo, heterociclo o azida, excepto cuando (i) R^2 y R^{2a} son ambos hidrógeno, (ii) R^3 y R^{3a} son ambos hidrógeno, (iii) R^1 es hidrógeno, (iv) un doble enlace se encuentra presente entre dichos átomos de carbono adyacentes, o (v) R^5 es benciloximetilo.

25. Medio de cultivo según la reivindicación 24, en donde el análogo de fucosa se selecciona del grupo que consiste en una de las fórmulas (III) o (IV).

35 26. Medio de cultivo según la reivindicación 24, en donde el análogo de fucosa se selecciona del grupo que consiste en una de las fórmulas (I) o (II).

27. Medio de cultivo según la reivindicación 26, en donde R^5 se selecciona del grupo que consiste en -C≡CH y -C≡CCH₃.

28. Medio de cultivo según la reivindicación 25, en donde cada uno de R^2 , R^3 y R^4 se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH y -OAc, R^2 es F, cada uno de R^{2a} y R^{3a} es H; y R^5 es CH₃.

40 29. Medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28 en donde la cantidad efectiva es una cantidad de análogo que es suficiente para reducir la incorporación de la fucosa al complejo de cadenas de azúcares enlazadas por N-glucósido del anticuerpo o derivado de anticuerpo en al menos un 80%.

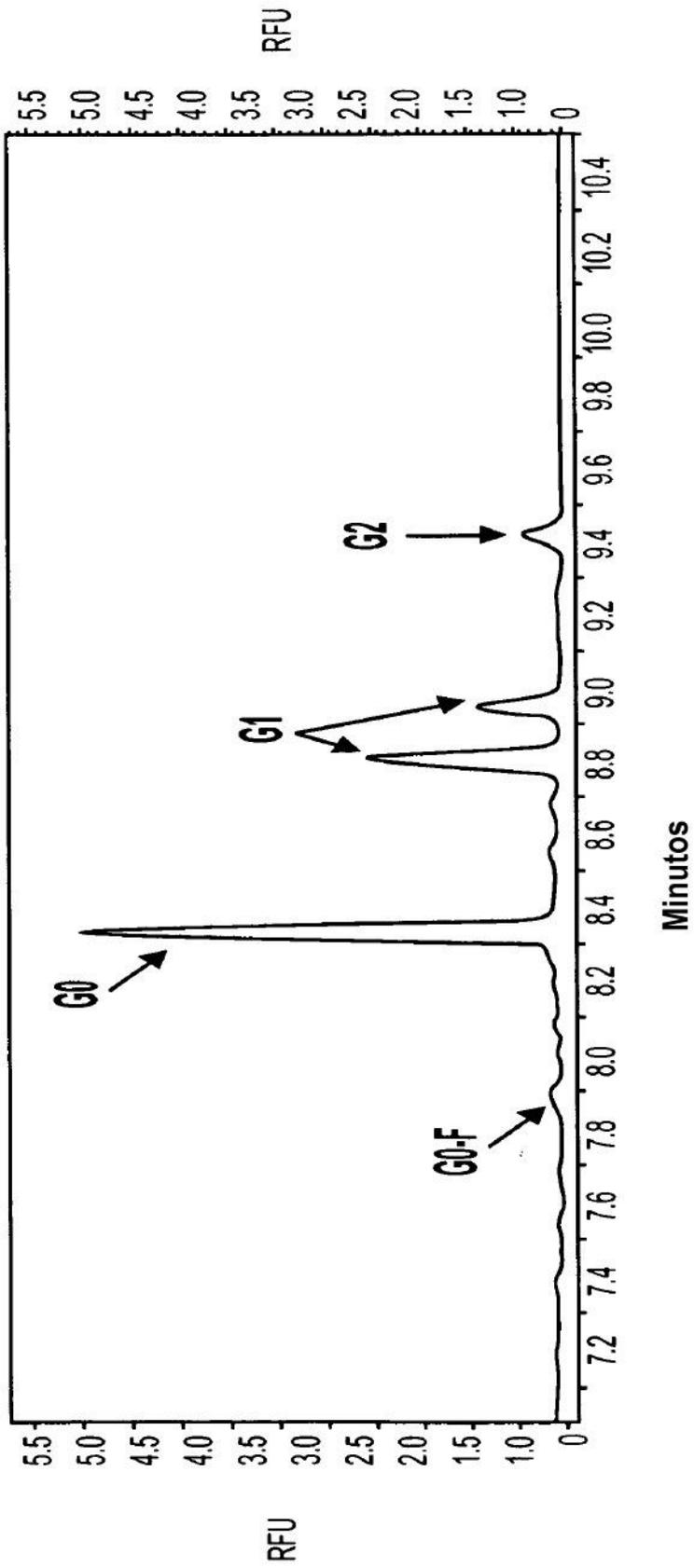


FIG. 1A

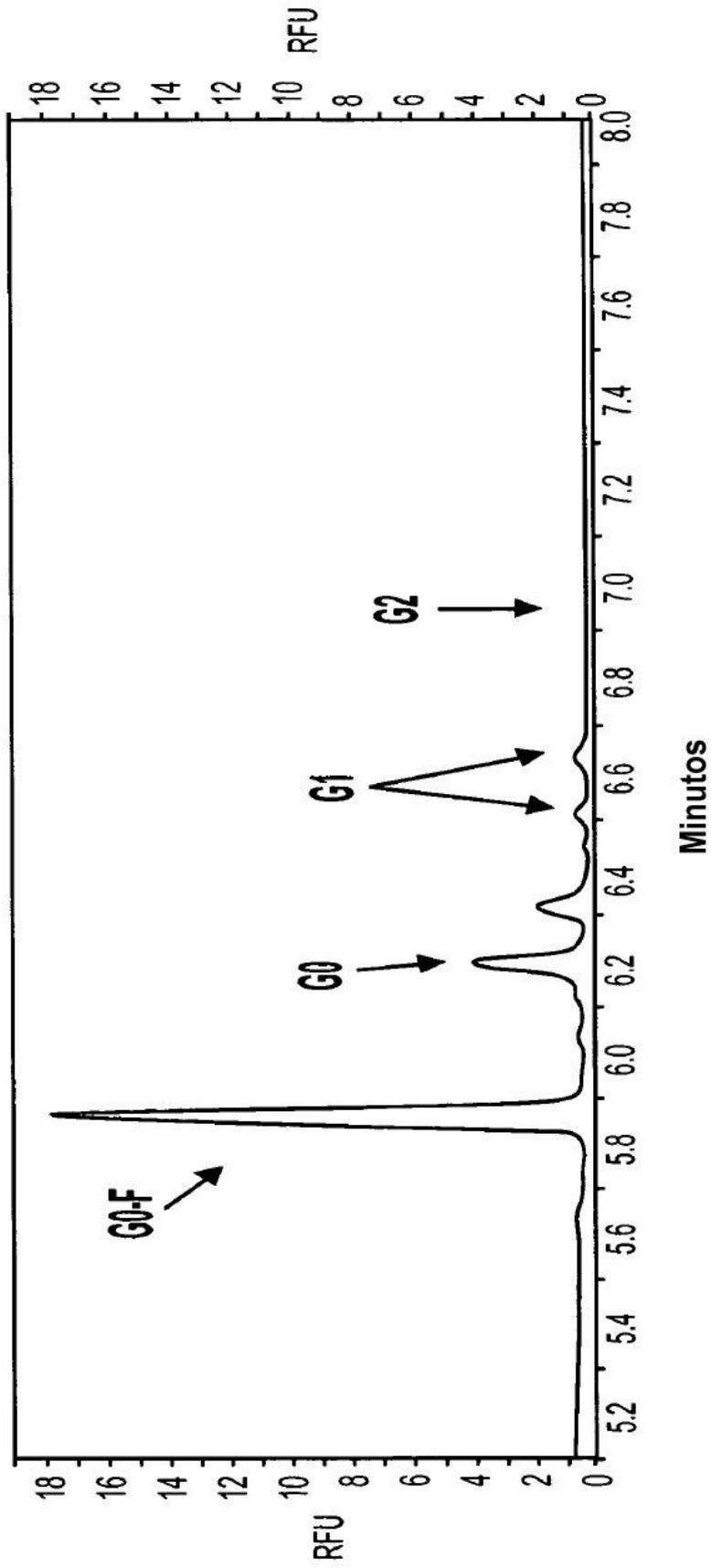


FIG. 1B

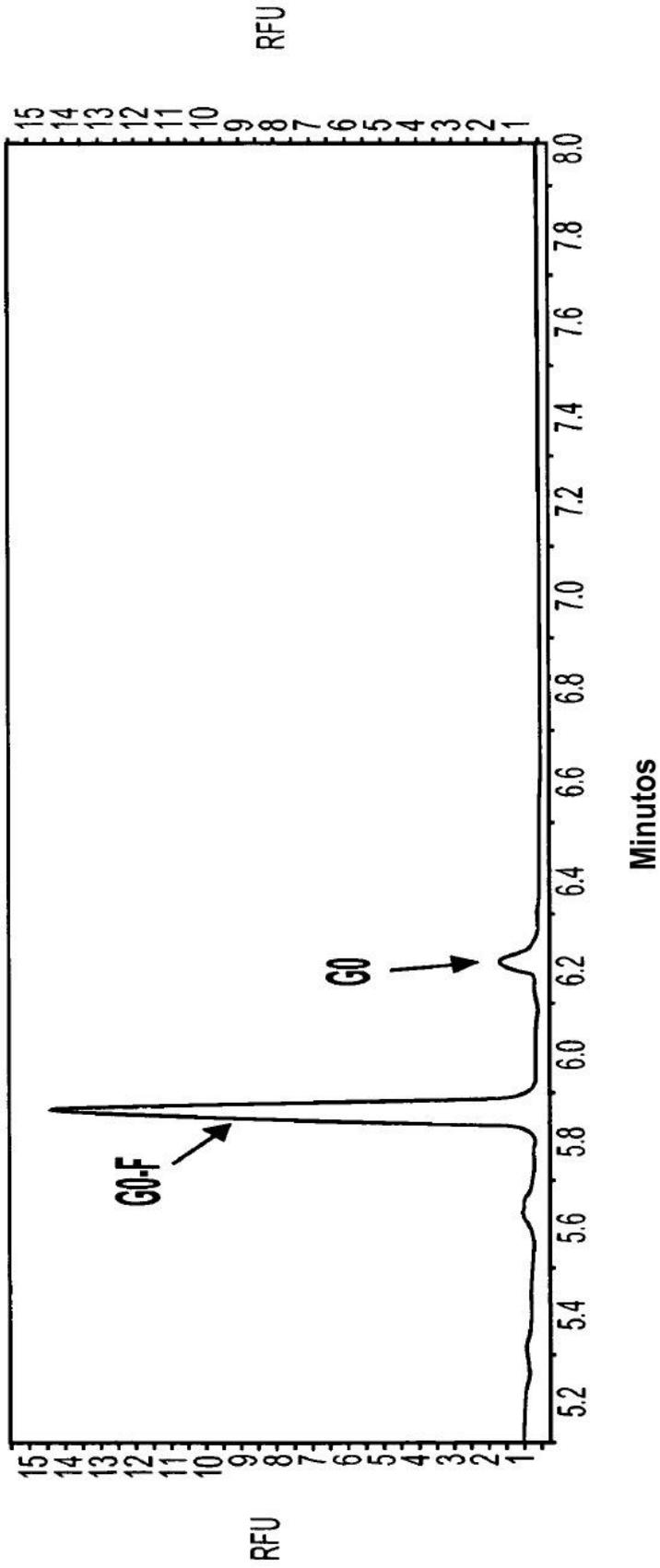


FIG. 1C

FIG. 2

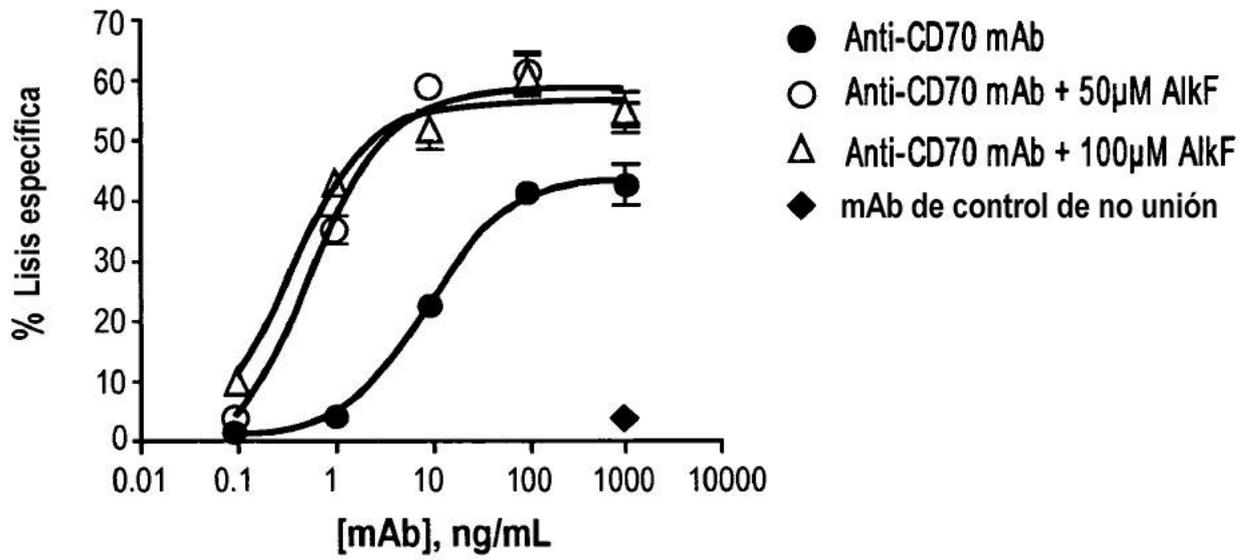


FIG. 3A

Competición de unión de anti-CD70 mAbs a células que expresan Cho hCD16

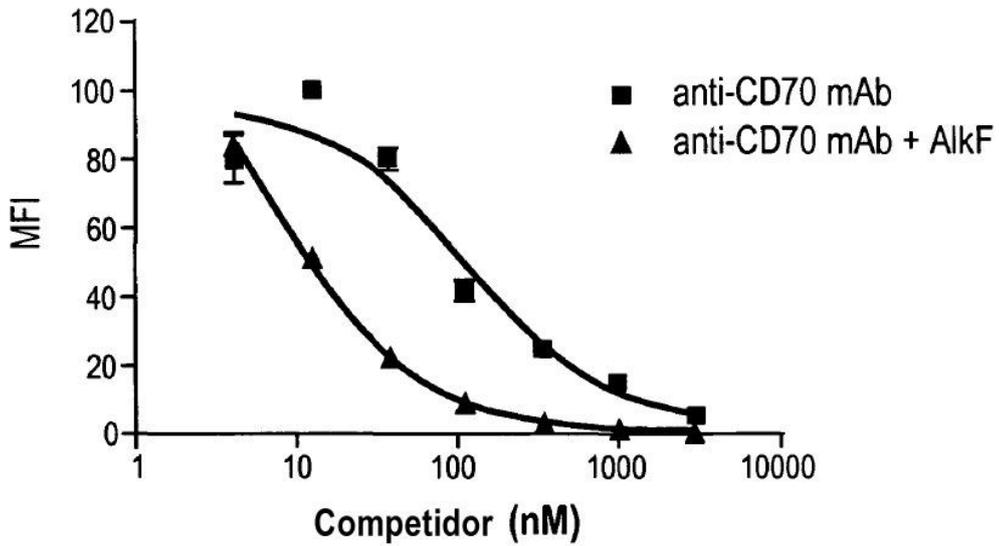


FIG. 3B

Competición de unión de anti-CD70 mAbs a mCD16-2 que expresan células Cho

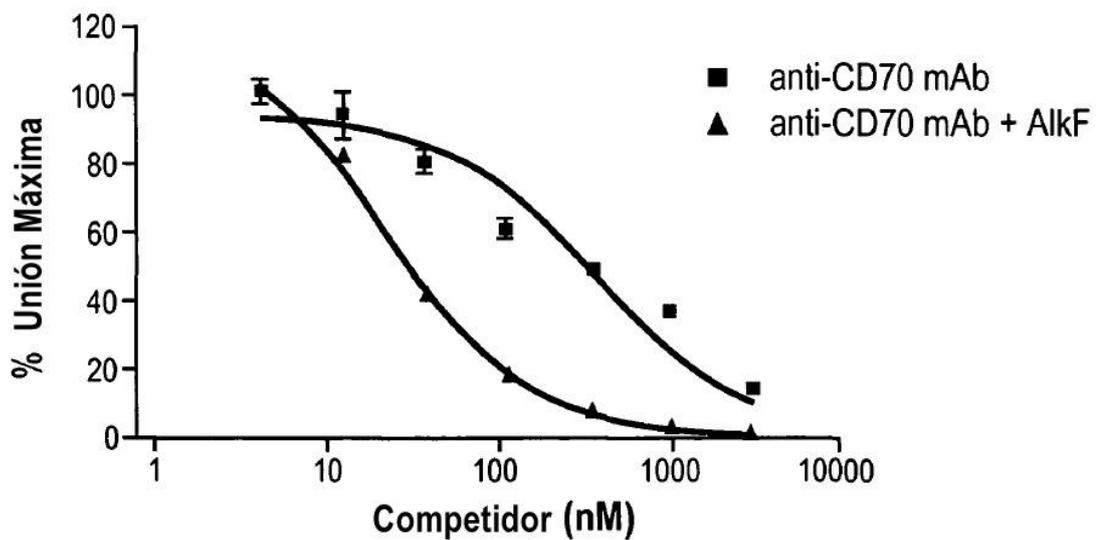


FIG. 4A

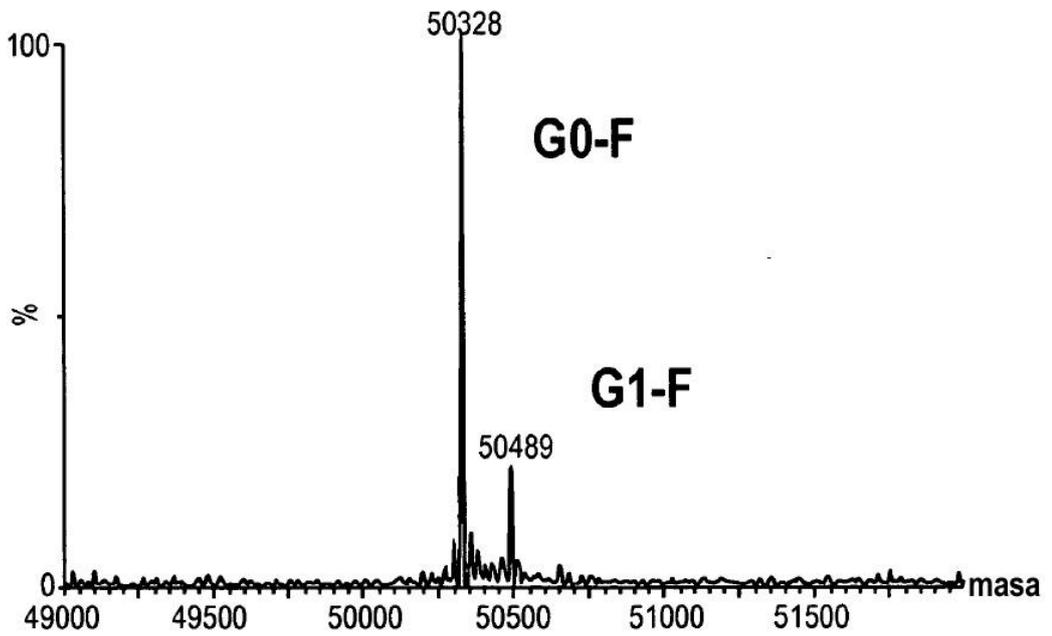
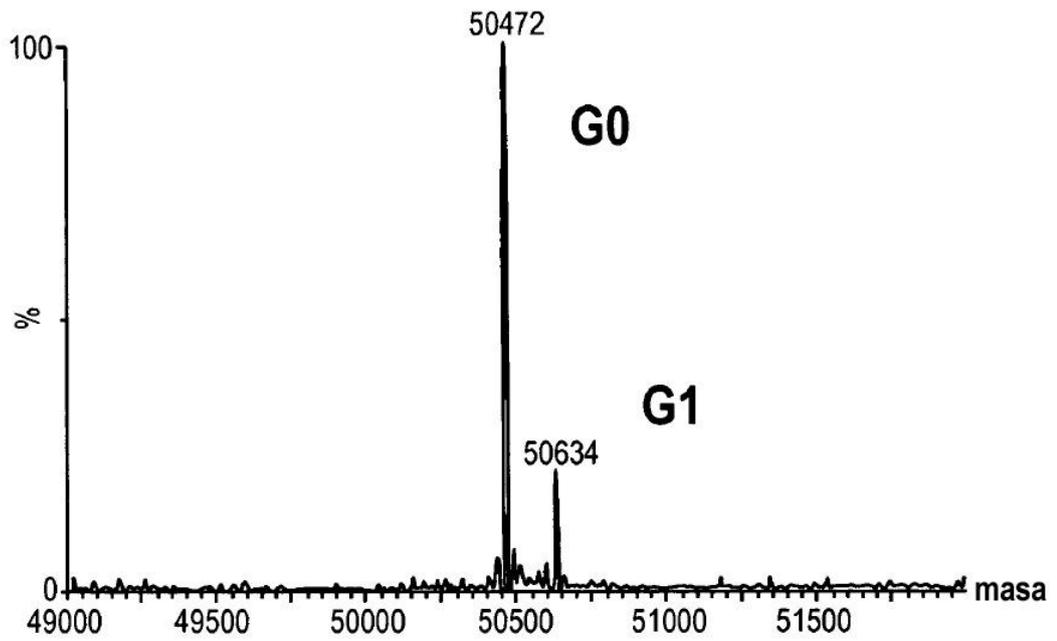


FIG. 4B

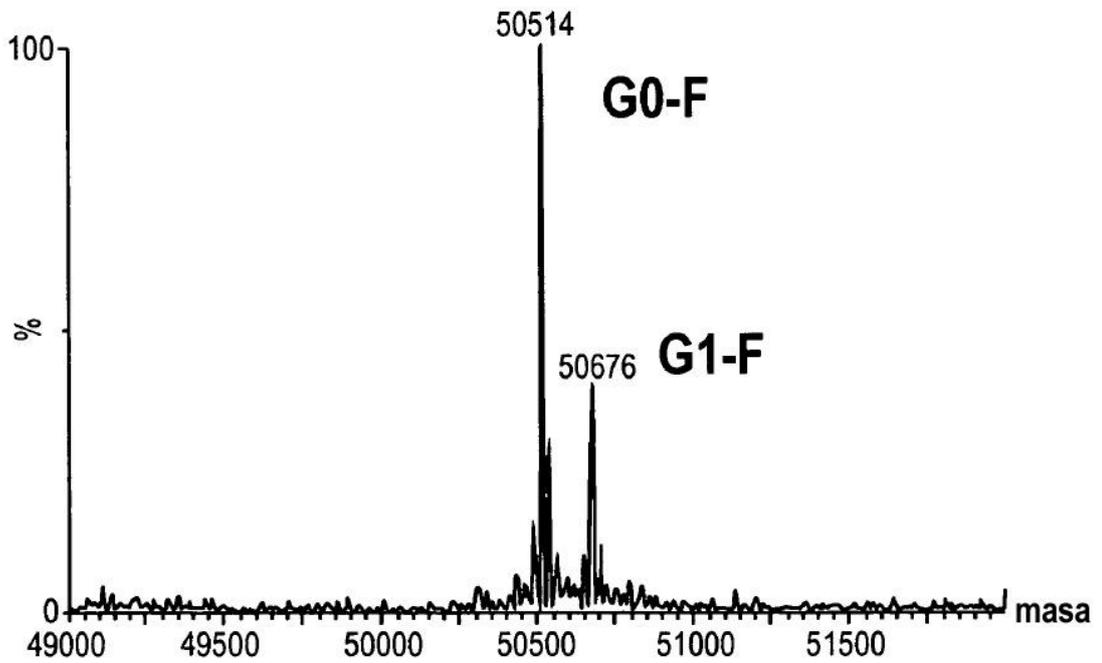
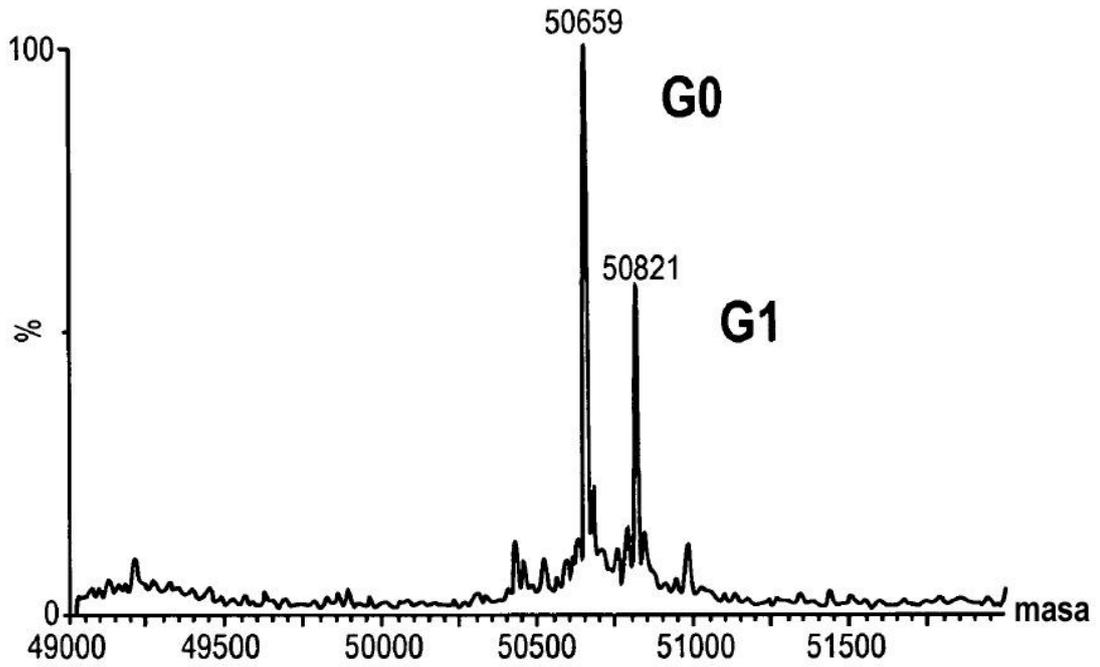


FIG. 4C

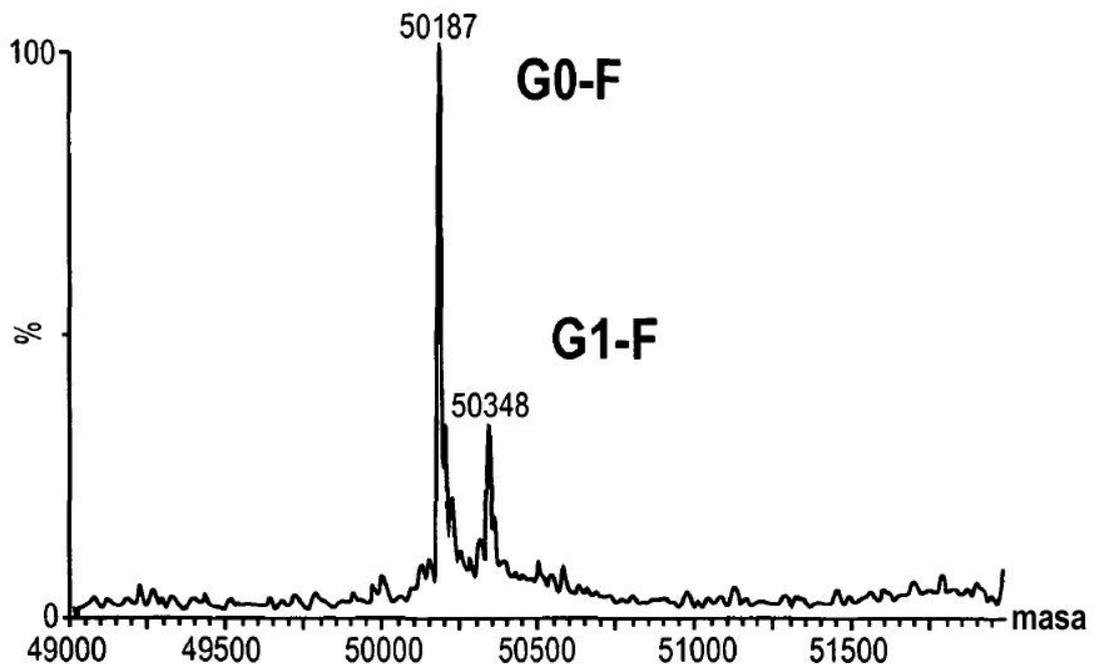
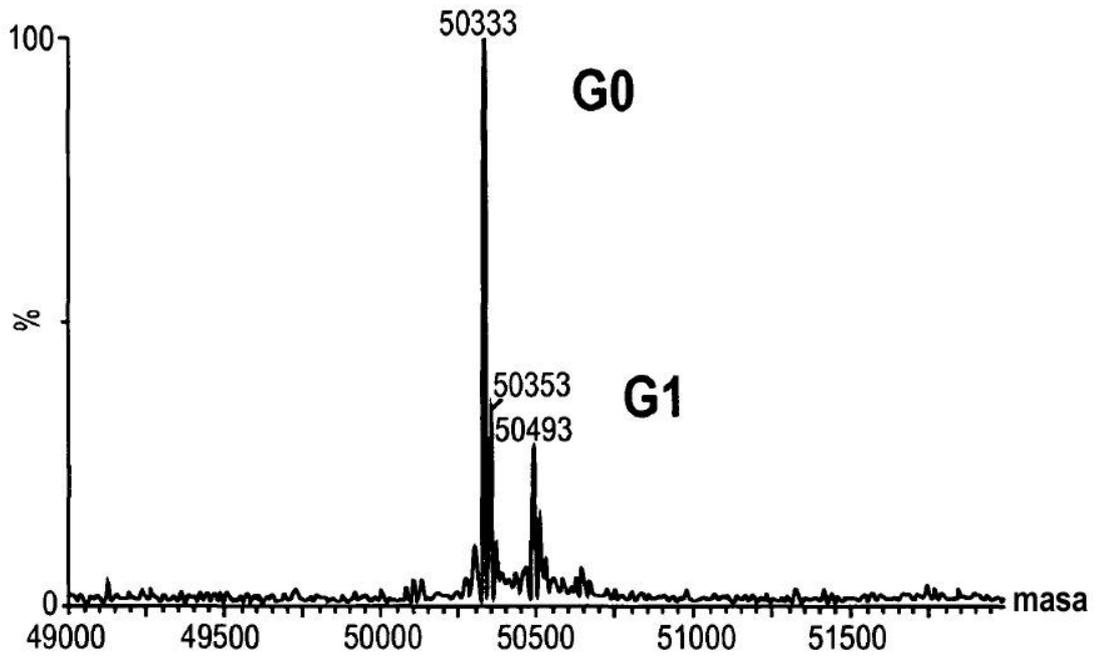


FIG. 4D

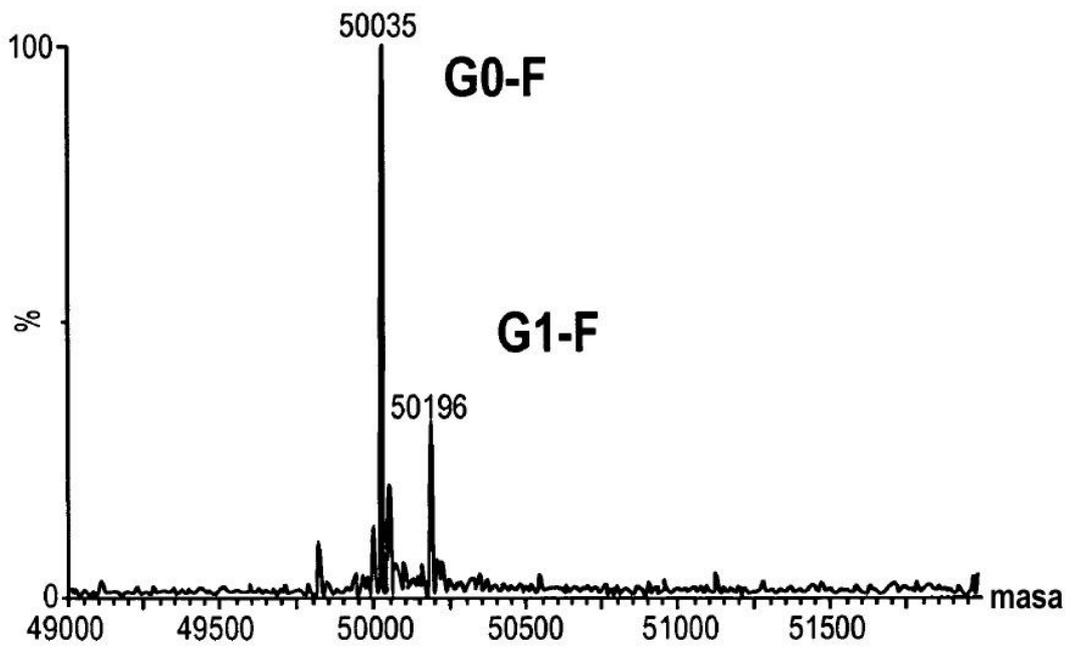
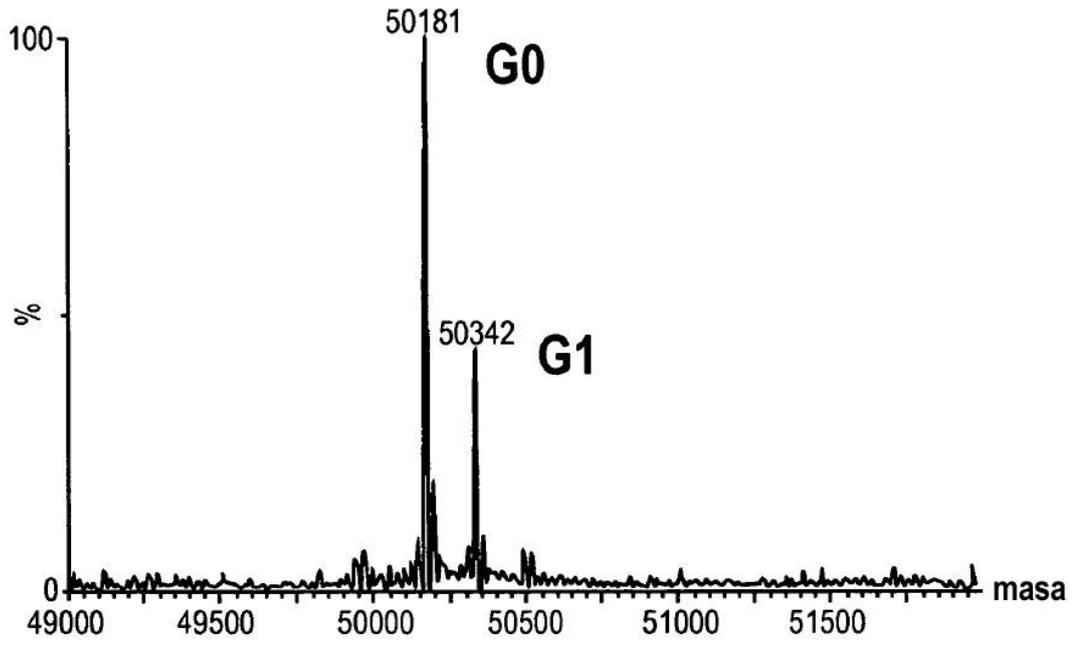


FIG. 5A

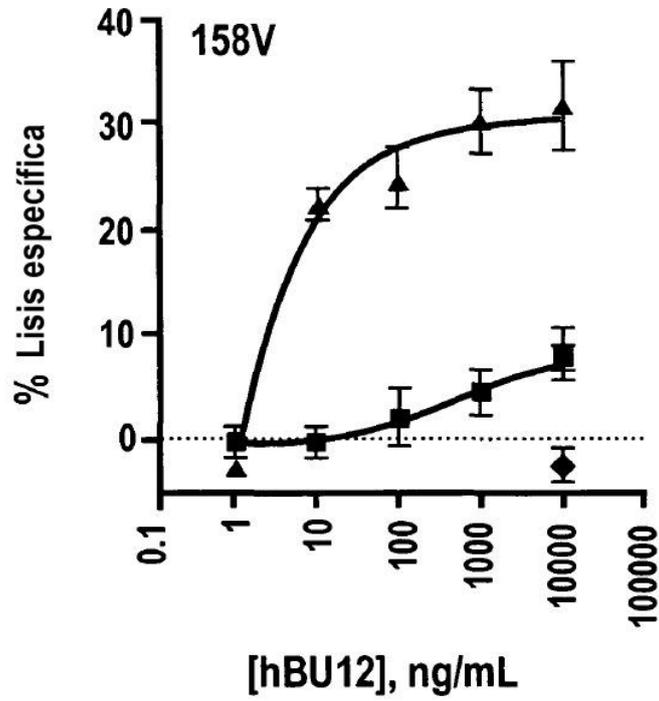


FIG. 5B

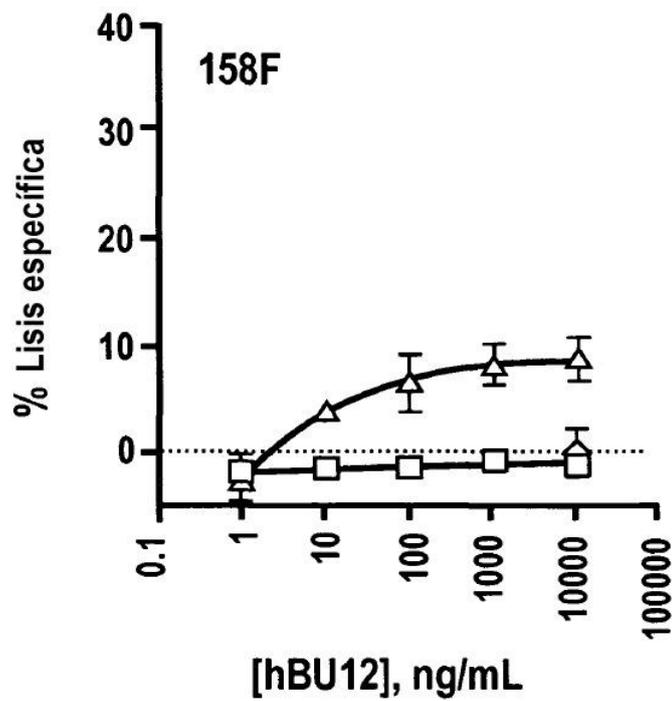


FIG. 6

h1F6 fucosilado (múltiples alimentaciones de AlkF)

