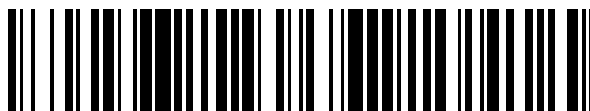


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 708**

51 Int. Cl.:  
**A01N 43/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04750118 .4**
- 96 Fecha de presentación: **09.04.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1615945**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2006**

54 Título: **MÉTODOS DE GLICOPEGILACIÓN Y PROTEÍNAS/PÉPTIDOS PRODUCIDOS POR LOS MÉTODOS.**

30 Prioridad:  
09.04.2003 US 411012 09.04.2003 US 411026  
09.04.2003 US 410962 09.04.2003 US 411049  
09.04.2003 US 410930 09.04.2003 US 410897  
09.04.2003 US 410997 09.04.2003 US 411044  
09.04.2003 US 410980 09.04.2003 US 410945  
09.04.2003 US 410913 09.04.2003 US 411037  
09.04.2003 US 411043

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.02.2012**

73 Titular/es:  
**BIOGENERIX AG  
JANDERSTRASSE 3  
68199 MANNHEIM, DE**

72 Inventor/es:  
**DE FREES, Shawn;  
ZOPF, David;  
BAYER, Robert;  
BOWE, Caryn;  
HAKES, David y  
CHEN, Xi**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 373 708 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 de glicopegilación y proteínas/péptidos producidos por los métodos

**Antecedentes de la invención**

5 La mayoría de péptidos de origen natural contienen restos de carbohidrato unidos al péptido mediante ligadores específicos con un número seleccionado de aminoácidos a lo largo de toda la cadena peptídica primaria. Por tanto, muchos péptidos de origen natural se denominan "glicopéptidos". La variabilidad del patrón de glicosilación en cualquier péptido dado tiene enormes implicaciones para la función de ese péptido. Por ejemplo, la estructura de los glicanos N-ligados en un péptido puede influir en diversas características del péptido, incluyendo susceptibilidad a proteasa, tráfico intracelular, secreción, orientación a tejido, semivida biológica y antigenicidad del péptido en una célula u organismo. La alteración de una o más de estas características afecta en gran medida a la eficacia de un péptido en su entorno natural, y afecta también a la eficacia del péptido como agente terapéutico en situaciones en que el péptido se ha generado con ese fin.

15 La estructura del carbohidrato unido a la cadena peptídica es conocida como una molécula de "glicano". La estructura de glicano específica presente en un péptido afecta a las características de solubilidad y agregación del péptido, al plegamiento de la cadena peptídica primaria y por lo tanto a su actividad funcional o enzimática, a la resistencia del péptido al ataque proteolítico y al control de la proteólisis que conduce a la conversión de formas inactivas del péptido en formas activas. De forma importante, los residuos de ácido siálico presentes en la molécula de glicano afectan a la duración de la semivida del péptido en el sistema circulatorio de mamíferos. Los péptidos cuyos glicanos no contienen residuos de ácido siálico terminales se eliminan rápidamente de la circulación por el hígado, un evento que anula cualquier beneficio terapéutico potencial del péptido.

20 Las estructuras de glicano encontradas en glicopéptidos de origen natural se dividen típicamente en dos clases, glicanos N-ligados y O-ligados.

25 Los péptidos expresados en células eucarióticas están típicamente N-glicosilados en los residuos de asparagina en sitios de la estructura primaria peptídica que contienen la secuencia asparagina-X-serina/treonina, en que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico. La porción de carbohidrato de dichos péptidos es conocida como un glicano N-ligado. Los eventos tempranos de N-glicosilación ocurren en el retículo endoplasmático (RE) y son idénticos en mamíferos, plantas, insectos y otros eucariotas superiores. En primer lugar, se construye una cadena oligosacárida que comprende 14 residuos de azúcar en una molécula portadora lipídica. A medida que el péptido naciente se traduce y traslada al RE, se transfiere toda la cadena oligosacárida al grupo amida del residuo de asparagina en una reacción catalizada por una enzima glicosiltransferasa unida a membrana. El glicano N-ligado se procesa adicionalmente tanto en el RE como en el aparato de Golgi. El procesamiento adicional conlleva generalmente la eliminación de algunos de los residuos de azúcar y la adición de otros residuos de azúcar en reacciones catalizadas por glicosidasas y glicosiltransferasas específicas de los residuos de azúcar eliminados y añadidos.

35 Típicamente, las estructuras finales de los glicanos N-ligados dependen del organismo en que se produce el péptido. Por ejemplo, en general, los péptidos producidos en bacterias están completamente no glicosilados. Los péptidos expresados en células de insecto contienen cadenas oligosacáridas N-ligadas ricas en manosa y paucimánosa, entre otras. Los péptidos producidos en cultivo de células de mamífero se glicosilan habitualmente de forma diferente dependiendo, por ejemplo, de la especie y de las condiciones del cultivo celular. Incluso en la misma especie y en las mismas condiciones, se encuentra a veces una cierta cantidad de heterogeneidad en las cadenas de glicosilo. Además, los péptidos producidos en células de planta comprenden estructuras de glicano que difieren significativamente de los producidos en células animales. El problema en la materia de la producción de péptidos recombinantes, particularmente cuando los péptidos se van a usar como agentes terapéuticos, es poder generar péptidos que estén correctamente glicosilados, concretamente, poder generar un péptido que tenga una estructura de glicano que se parezca, o sea idéntica, a la presente en la forma de origen natural del péptido. La mayoría de péptidos producidos por medios recombinantes comprenden estructuras de glicano que son diferentes de los glicanos de origen natural.

45 Se ha propuesto una variedad de métodos en la materia para personalizar el patrón de glicosilación de un péptido, incluyendo aquellos descritos en los documentos WO 99/22764, WO 98/58964, WO 99/54342 y la patente de EE.UU. nº 5.047.335, entre otros. Esencialmente, se han clonado y secuenciado muchas de las enzimas necesarias para la glicosilación *in vitro* de péptidos. En algunos casos, se han usado estas enzimas *in vitro* para añadir azúcares específicos a una molécula de glicano incompleta en un péptido. En otros casos, se han modificado por ingeniería genética células para expresar una combinación de enzimas y péptidos deseados de tal modo que ocurra en la célula la adición de un resto de azúcar deseado a un péptido expresado.

55 Los péptidos pueden modificarse también mediante la adición de glicanos N-ligados, también llamados glicanos de tipo mucina debido a su prevalencia en glicopéptidos mucinosos. Al contrario que los N-glicanos, que están ligados con residuos de asparagina y se forman por una transferencia en bloque de oligosacárido desde los intermedios unidos a lípido, los O-glicanos están ligados principalmente con residuos de serina y treonina y se forman mediante la adición por etapas de azúcares desde azúcares-nucleótidos (Tanner *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 906: 81-91 (1987) y Hounsell *et al.*, *Glycoconj. J.* 13:19-26 (1996)). La función peptídica puede verse afectada por la estructura de los glicanos O-ligados

presentes en el mismo. Por ejemplo, la actividad del ligando de P-selectina se ve afectada por la estructura de glicano O-ligado presente en el mismo. Para una revisión de las estructuras de glicano O-ligado, véase Schachter y Brockhausen, "The Biosynthesis of Branched O-Linked Glycans", 1989, Society for Experimental Biology, pág. 1-26 (Gran Bretaña). Se forman otros patrones de glicosilación ligando glicosilfosfatidilinositol con el grupo carboxilo carboxiterminal de la proteína (Takeda *et al.*, Trends Biochem. Sci. 20: 367-371 (1995) y Udenfriend *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 64:593-591 (1995).

Aunque existen actualmente diversas técnicas para modificar los glicanos N-ligados de péptidos, existe la necesidad en la materia de un método aplicable genéricamente de producción de péptidos que tengan un patrón de glicosilación deseado, concretamente personalizado. Hay una necesidad particular en la materia de una glicosilación *in vitro* personalizada de péptidos en que el péptido resultante pueda producirse a escala industrial. Esta y otras necesidades se satisfacen por la presente invención.

La administración de péptidos glicosilados y no glicosilados para generar una respuesta fisiológica particular es bien conocida en las técnicas médicas. Entre los péptidos mejor conocidos utilizados con este fin está la insulina, que se usa para tratar la diabetes. Las enzimas se han usado también por sus beneficios terapéuticos. Un factor importante que ha limitado el uso de péptidos terapéuticos es la naturaleza inmunogénica de la mayoría de los péptidos. En un paciente, una respuesta inmunogénica a un péptido administrado puede neutralizar el péptido y/o conducir al desarrollo de una respuesta alérgica en el paciente. Otras deficiencias de los péptidos terapéuticos incluyen una potencia subóptima y las rápidas velocidades de aclaramiento. Los problemas inherentes a la terapia peptídica están reconocidos en la materia, y se han investigado diversos métodos para eliminar los problemas. Para proporcionar una terapia de péptido soluble, se han unido polímeros sintéticos a la cadena principal peptídica.

El polietilenglicol ("PEG") es un polímero ejemplar que se ha conjugado con péptidos: el uso de PEG para derivatizar productos terapéuticos peptídicos se ha demostrado que reduce la inmunogenicidad de los péptidos y prolonga el tiempo de aclaramiento de la circulación. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.179.337 (Davis *et al.*) se refiere a péptidos no inmunogénicos tales como enzimas y hormonas peptídicas acoplados con polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol. Se usan entre 10 y 100 mol de polímero por mol de péptido y se mantiene al menos un 15% de la actividad fisiológica.

El documento WO 93/15189 (Veronese *et al.*) se refiere a un método para mantener la actividad de enzimas proteolíticas modificadas con polietilenglicol ligando la enzima proteolítica con un inhibidor macromolecularizado. Los conjugados se pretenden para aplicaciones médicas.

El modo principal de unión de PEG, y sus derivados, con péptidos es una unión no específica a través de un residuo aminoácido del péptido. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.088.38 da a conocer un conjugado de polímero enzimáticamente activo-enzima de una enzima ligada covalentemente con PEG. De forma similar, la patente de EE.UU. n° 4.496.689 da a conocer un complejo unido covalentemente del inhibidor de proteasa  $\alpha$ -1 con un polímero tal como PEG o metoxipolietilenglicol ("mPEG"). Abuchowski *et al.* (J. Biol. Chem. 252: 3578 (1977)) dan a conocer la unión covalente de mPEG con un grupo amino de seroalbúmina bovina. La patente de EE.UU. n° 4.414.147 da a conocer un método de volver al interferón menos hidrófobo conjugándolo con un anhídrido de ácido dicarboxílico tal como poli(anhídrido etilensuccínico). El documento PCT WO 87/00056 da a conocer la conjugación de PEG y polioles polioxetilados con proteínas tales como interferón  $\beta$ , interleucina 2 e inmunotoxinas. El documento EP 154.316 da a conocer y reivindica linfocinas modificadas químicamente tales como IL-2 que contienen PEG unido directamente a al menos un grupo amino primario de la linfocina. La patente de EE.UU. n° 4.055.635 da a conocer composiciones farmacéuticas de un complejo hidrosoluble de una enzima proteolítica ligada covalentemente con una sustancia polimérica tal como un polisacárido.

Otro modo de unir PEG con péptidos es mediante la oxidación no específica de residuos de glicosilo en un péptido. El azúcar oxidado se utiliza como lugar para unir un resto de PEG al péptido. Por ejemplo, M'Timkulu (documento WO 94/05332) da a conocer el uso de un hidrazino- o amino-PEG para añadir PEG a una glicoproteína. Los restos glicosilo se oxidan aleatoriamente hasta los correspondientes aldehídos, que se acoplan posteriormente con el amino-PEG. Véase también Bona *et al.* (documento WO 96/40731), en que se añade PEG a una molécula de inmunoglobulina oxidando enzimáticamente un glicano en la inmunoglobulina y poniendo en contacto entonces el glicano con una molécula de amino-PEG.

En cada uno de los métodos descritos anteriormente, se añade polietilenglicol de manera aleatoria no específica a los residuos reactivos en una cadena principal peptídica. Para la producción de péptidos terapéuticos, es claramente deseable utilizar una estrategia de derivatización que dé como resultado la formación de un producto marcado específicamente, fácilmente caracterizable y esencialmente homogéneo.

Se usan dos clases principales de enzimas en la síntesis de carbohidratos, las glicosiltransferasas (por ejemplo, sialiltransferasas, oligosacariltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas) y las glicosidasas. Las glicosidasas se clasifican adicionalmente como exoglicosidasas (por ejemplo,  $\beta$ -manosidasa,  $\beta$ -glucosidasa) y endoglicosidasas (por ejemplo, endo-A, endo-M). Cada una de estas clases de enzimas se ha usado exitosamente en síntesis para preparar carbohidratos. Para una revisión general, véase Crout *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 98-111 (1998).

Las glicosiltransferasas modifican la estructura oligosacárida de los péptidos. Las glicosiltransferasas son eficaces para producir productos específicos con buen control estereoquímico y regioquímico. Las glicosiltransferasas se han usado para preparar oligosacáridos y para modificar estructuras de carbohidrato N- y O-ligadas terminales, particularmente en péptidos producidos en células de mamífero. Por ejemplo, se han sialilado y/o fucosilado completamente los oligosacáridos terminales de glicopéptidos para proporcionar estructuras de azúcar más consistentes, lo que mejora la farmacodinámica del glicopéptido y una variedad de otras propiedades biológicas. Por ejemplo, la  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa se usa para sintetizar lactosamina, una ilustración de la utilidad de las glicosiltransferasas en la síntesis de carbohidratos (véase, por ejemplo, Wong *et al.*, J. Org. Chem. 47: 5416-5418 (1982)). Además, numerosos procedimientos sintéticos han hecho uso de  $\beta$ -sialiltransferasas para transferir ácido siálico desde ácido citidin-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico al 3-OH o 6-OH de la galactosa (véase, por ejemplo Kevin *et al.*, Chem. Eur. J. 2: 1359-1362 (1996)). Las fucosiltransferasas se usan en rutas sintéticas para transferir una unidad de fucosa desde guanosina-5'-difosfocucosa a un hidroxilo específico de un aceptor sacárido. Por ejemplo, Ichikawa preparó sialil-Lewis-X mediante un método que implica la fucosilación de lactosamina sialilada con una fucosiltransferasa clonada (Ichikawa *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 114: 9283-9298 (1992)). Para una discusión de los recientes avances de la síntesis de glicoconjugados para uso terapéutico, véase Koeller *et al.*, Nature Biotechnology 18: 835-841 (2000). Véanse también las patentes de EE.UU. nº 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554, 5.922.577 y WO/9831826.

Las glicosidasas pueden usarse también para preparar sacáridos. Las glicosidasas catalizan normalmente la hidrólisis de un enlace glicosídico. Sin embargo, en condiciones apropiadas, pueden usarse para formar este ligamiento. La mayoría de las glicosidasas usadas para la síntesis de carbohidratos son exoglicosidasas; la transferencia de glicosilo ocurre en el extremo no reductor del sustrato. La glicosidasa se une a un donante de glicosilo en un intermedio de glicosilo-enzima que se intercepta por agua, proporcionando el producto de hidrólisis, o por un aceptor, generando un nuevo glicósido u oligosacárido. Es una ruta ejemplar que usa una exoglicosidasa la síntesis del trisacárido de núcleo de todos los glicopéptidos N-ligados, incluyendo el ligamiento  $\beta$ -manósido, que se forma mediante la acción de  $\beta$ -manosidasa (Singh *et al.*, Chem. Commun. 993-994 (1996)).

En otra aplicación ejemplar del uso de una glicosidasa para formar un ligamiento glicosídico, se ha preparado una glicosidasa mutante en que el aminoácido nucleófilo normal en el sitio activo se cambia por un aminoácido no nucleófilo. La enzima mutante no hidroliza ligamientos glicosídicos, pero aún puede formarlos. Dicha glicosidasa mutante se usa para preparar oligosacáridos usando un donante de fluoruro de  $\alpha$ -glicosilo y una molécula aceptora de glicósido (Withers *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.716.812).

Aunque su uso es menos común que el de las exoglicosidasas, las endoglicosidasas se utilizan también para preparar carbohidratos. Los métodos basados en el uso de endoglicosidasas tienen la ventaja de que se transfiere un oligosacárido en lugar de un monosacárido. Los fragmentos de oligosacárido se han añadido a sustratos usando endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminas tales como endo-F y endo-M (Wang *et al.*, Tetrahedron Lett. 37: 1975-1978) y Haneda *et al.*, Carbohydr. Res. 292: 61-70 (1996)).

Además de su uso en la preparación de carbohidratos, las enzimas discutidas anteriormente se aplican a la síntesis de glicopéptidos también. Se ha publicado la síntesis de una glicofoma homogénea de ribonucleasas B (Witte K. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 119: 2114-2118 (1997)). Se escindió el núcleo rico en manosa de la ribonucleasa B tratando el glicopéptido con endoglicosidasa H. La escisión ocurrió específicamente entre los dos residuos de GlcNAc del núcleo. Se reconstruyó entonces enzimáticamente el tetrasacárido sialil-Lewis X en el sitio de anclaje de GlcNAc restante en la proteína ahora homogénea mediante el uso secuencial de  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa,  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa y  $\beta$ -1,3-fucosiltransferasa V. Sin embargo, aunque cada etapa catalizada enzimáticamente procedía con excelente rendimiento, dichos procedimientos no se han adaptado a la generación de glicopéptidos a escala industrial.

Los métodos que combinan elementos sintéticos tanto químicos como enzimáticos son también conocidos en la materia. Por ejemplo, Yamamoto y colaboradores (Carbohydr. Res. 305: 415-422 (1998)) notificaron la síntesis quimioenzimática del glicopéptido péptido T glicosilado usando una endoglicosidasa. El péptido N-acetilglucosaminilo se sintetizó por medios puramente químicos. Se elaboró enzimáticamente después el péptido con el oligosacárido de péptido de transferrina humana. Se añadió la porción sacárida al péptido tratándolo con una endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa. El péptido glicosilado resultante era altamente estable y resistente a la proteólisis cuando se comparaba con el péptido T y el N-acetilglucosaminil-péptido T.

Se ha explorado el uso de glicosiltransferasas para modificar la estructura peptídica con grupos informadores. Por ejemplo, Brossmer *et al.* (patente de EE.UU. nº 5.405.753) da a conocer la formación de un derivado de monofosfato de citidina ("CMP") de ácido siálico marcado fluorescentemente y el uso del glicósido fluorescente en un ensayo de actividad sialiltransferasa y de marcaje fluorescente de superficies celulares, glicoproteínas y péptidos. Gross *et al.* (Analyt. Biochem. 186: 127 (1990)) describen un ensayo similar. Bean *et al.* (patente de EE.UU. nº 5.432.059) dan a conocer un ensayo para trastornos de deficiencia de glicosilación que utiliza la reglicosilación de una proteína deficientemente glicosilada. La proteína deficiente se reglicosila con un glicósido de CMP marcado fluorescentemente. Cada uno de los derivados de ácido siálico fluorescentes se sustituye por el resto fluorescente en la posición 9 o en la amina que está normalmente acetilada en el ácido siálico. Los métodos que usan derivados de ácido siálico fluorescentes son ensayos de la presencia de glicosiltransferasas o glicoproteínas no glicosiladas o inapropiadamente glicosiladas. Los ensayos se realizan con pequeñas cantidades de enzima o glicoproteína en una muestra de origen

biológico. La derivatización enzimática de un péptido glicosilado o no glicosilado a escala preparativa o industrial usando un ácido siálico modificado no se han dado a conocer ni sugerido en la técnica anterior.

5 Se ha dirigido también un esfuerzo considerable hacia la modificación de las superficies celulares mediante la alteración de los residuos de glicosilo presentados por estas superficies. Por ejemplo, Fukuda y colaboradores han desarrollado un método para unir glucósidos de estructura definida sobre superficies celulares. El método explota la especificidad de sustrato relajada de una fucosiltransferasa que puede transferir fucosa y análogos de fucosa que portan diversos sustratos de glicosilo (Tsuboi *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 27213 (1996)).

10 Se han usado también métodos enzimáticos para activar residuos de glicosilo en un glicopéptido para una elaboración química posterior. Los residuos de glicosilo se activan típicamente usando galactosa oxidasa, que convierte un residuo de galactosa terminal en el correspondiente aldehído. El aldehído se acopla posteriormente con un grupo modificador que contiene amina. Por ejemplo, Casares *et al.* (Nature Biotech. 19: 142 (2001)) han unido doxorubicina con residuos de galactosa oxidados de una quimera de MHCII-péptido recombinante.

15 Se han modificado también residuos de glicosilo para contener grupos cetona. Por ejemplo, Mahal y colaboradores (Science 276: 1125 (1997)) han preparado N-levulinoilmanosamina ("ManLev"), que tiene una funcionalidad cetona en la posición ocupada normalmente por el grupo acetilo en el sustrato natural. Se trataron las células con ManLev, incorporando así un grupo cetona a la superficie celular. Véanse también Saxon *et al.*, Science 287: 2007 (2000); Hang *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 123: 1242 (2001); Yarema *et al.*, J. Biol. Chem. 273: 31168 (1998) y Charter *et al.*, Glycobiology 10: 1049 (2000).

20 Los métodos de modificación de superficies celulares no se han aplicado en ausencia de células para modificar un péptido glicosilado o no glicosilado. Además, los métodos de modificación de la superficie celular no se utilizan para la incorporación enzimática de un resto donante de glicosilo modificado preformado a un péptido. Además, ninguno de los métodos de modificación de la superficie celular son prácticos para producir péptidos modificados con glicosilo a escala industrial.

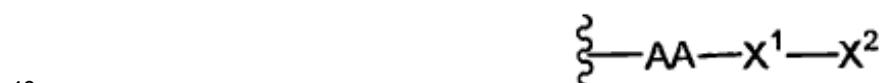
25 A pesar de los esfuerzos dirigidos hacia la elaboración enzimática de estructuras sacáridas, sigue habiendo la necesidad de un método práctico industrialmente para la modificación de péptidos glicosilados y no glicosilados con grupos modificadores tales como polímeros hidrosolubles, restos terapéuticos, biomoléculas y similares. Son de particular interés los métodos en que el péptido modificado tiene propiedades mejoradas que potencian su uso como agente terapéutico o de diagnóstico. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

### Sumario de la invención

30 La invención incluye una pluralidad de métodos de remodelación de un péptido para tener una estructura de glicano específica unida al mismo. Aunque se describen estructuras de glicano específicas en la presente memoria, no debería considerarse que la invención esté limitada a ninguna estructura particular. Además, aunque se describen péptidos específicos en la presente memoria, la invención no debería estar limitada por la naturaleza del péptido descrito, sino que más bien debería comprender todos y cada uno de los péptidos adecuados y variaciones de los mismos.

35 La descripción siguiente da a conocer las realizaciones preferidas de la invención y proporciona una descripción por escrito de las reivindicaciones adjuntas a la misma. La invención comprende todas y cada una de las variaciones de estas realizaciones que son o resultan evidentes después de la lectura de la presente memoria descriptiva.

La invención incluye un método *in vitro* exento de células de remodelación de un péptido que comprende polietilenglicol, teniendo el péptido la fórmula:



en la que

AA es un residuo aminoacídico terminal o interno del péptido;

X<sup>1</sup>-X<sup>2</sup> es un sacárido ligado covalentemente con AA, en el que

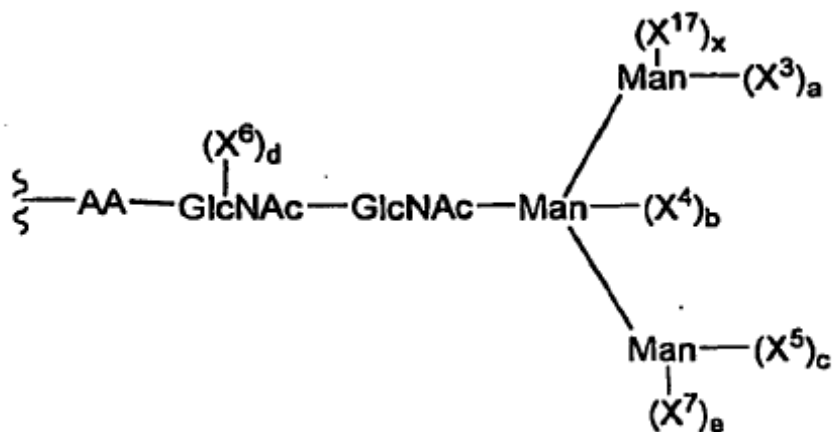
X<sup>1</sup> es un primer residuo de glicosilo; y

45 X<sup>2</sup> es un segundo residuo de glicosilo ligado covalentemente con X<sup>1</sup>, en el que X<sup>1</sup> y X<sub>2</sub> se seleccionan de residuos de monosacarilo y oligosacarilo, comprendiendo el método:

(a) eliminar X<sup>2</sup> o una subunidad de sacarilo del mismo del péptido, formando así un glicano truncado.

Se da a conocer también la formación de un glicano truncado mediante la eliminación de un residuo de Sia.

En una realización de la invención, el péptido tiene la fórmula:



en la que

$X^3$ ,  $X^4$ ,  $X^5$ ,  $X^6$ ,  $X^7$  y  $X^{17}$  se seleccionan independientemente de residuos de monosacárido u oligosacárido; y a, b, c, d, e y x se seleccionan independientemente de los enteros 0, 1 y 2.

- 5 En un aspecto de la invención, un residuo de oligosacárido es un miembro seleccionado de GlcNAc-Gal-Sia y GlcNAc-Gal. En otro aspecto, al menos un miembro oligosacárido se selecciona de a, b, c, d, e y x es 1 o 2. En aún otro aspecto, la eliminación de la etapa (a) produce un glicano truncado en el que el que menos uno de a, b, c, e y x es 0.

La invención incluye un método de remodelación de un péptido en el que  $X^3$ ,  $X^5$  y  $X^7$  son miembros independientemente seleccionados de  $(\text{manosa})_z$  y  $(\text{manosa})_z-(X^8)$

- 10 en las que

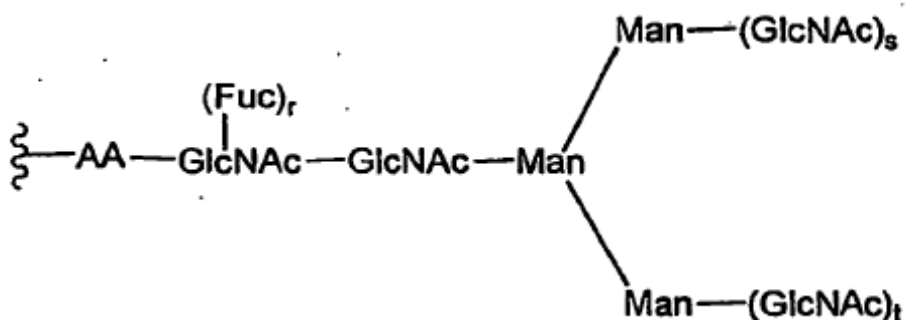
$X^8$  es un resto glicosilo seleccionado de mono- y oligosacáridos; y

z es un entero entre 1 y 20, en el que

cuando z es 3 o más, cada  $(\text{manosa})_z$  se selecciona independientemente de estructuras lineales y ramificadas.

- 15 En un aspecto,  $X^4$  se selecciona del grupo consistente en GlcNAc y xilosa. En otro aspecto,  $X^3$ ,  $X^5$  y  $X^7$  son  $(\text{manosa})_u$ , en la que u se selecciona de los enteros entre 1 y 20, y cuando u es 3 o más, cada  $(\text{manosa})_u$  se selecciona independientemente de estructuras lineales y ramificadas.

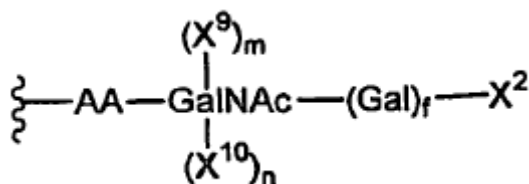
Se da a conocer también un método de remodelación de un péptido en el que el péptido tiene la fórmula:



en la que

- 20 r, s, y t son enteros independientemente seleccionados de 0 y 1.

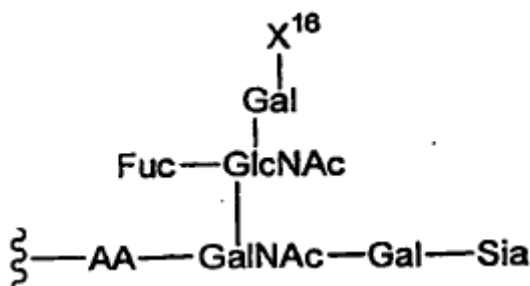
En una realización de la divulgación, un péptido tiene la fórmula:



en la que

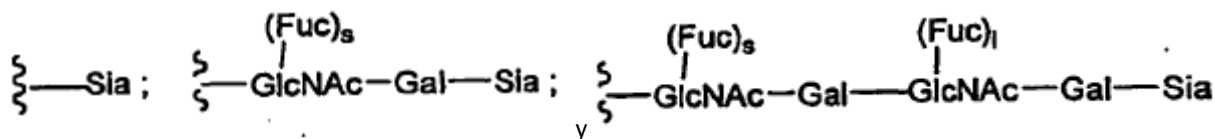
$X^9$  y  $X^{10}$  se seleccionan independientemente de residuos de monosacárido u oligosacárido y m, n y f son enteros independientemente seleccionados de 0 y 1.

- 5 Se da a conocer también un péptido que tiene la fórmula:



en la que

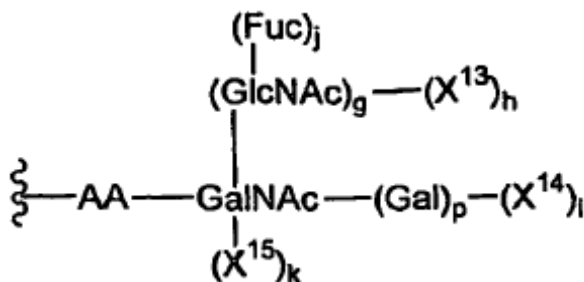
$X^{16}$  es un miembro seleccionado de:



- 10 en las que

s e i son enteros independientemente seleccionados de 0 y 1.

En otro aspecto, un péptido tiene la fórmula



en la que

- 15  $X^{13}$ ,  $X^{14}$  y  $X^{15}$  son residuos de glicosilo independientemente seleccionados; y

g, h, i, j, k y p se seleccionan independientemente de los enteros 0 y 1.

En aún otro aspecto, al menos uno de g, h, i, j, k y p es 1. En otro aspecto,  $X^{14}$  y  $X^{15}$  son miembros independientemente seleccionados de GlcNAc y Sia e i y k se seleccionan independientemente de los enteros 0 y 1. En aún otro aspecto, al menos uno de i y k es 1, y si k es 1, g, h y j son 0.

- 20 La invención incluye también un método de remodelación de un péptido en el que el método comprende poner en contacto el glicano truncado con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al glicano truncado, remodelando así el péptido que comprende polietilenglicol.

En un aspecto, un donante de glicosilo comprende un grupo modificador ligado covalentemente con el mismo.

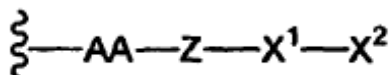
5 La invención incluye también un método de remodelación de un péptido, comprendiendo el método eliminar  $X^1$ , exponiendo así AA. En un aspecto, el método incluye poner en contacto AA con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir dicho al menos un donante de glicosilo a AA, remodelando así dicho péptido que comprende polietilenglicol.

En un aspecto, el al menos un donante de glicosilo comprende un grupo modificador ligado covalentemente con el mismo. En otro aspecto, es un grupo modificador el polietilenglicol. En una realización, el polietilenglicol tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersada.

10 La invención incluye un método de remodelación de un péptido en el que, antes de poner en contacto el glicano truncado con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al glicano truncado, remodelando así el péptido que comprende polietilenglicol, se elimina un grupo añadido al sacárido durante la modificación postraduccional.

En un aspecto, el grupo eliminado es un miembro seleccionado de fosfato, sulfato, carboxilato y ésteres de los mismos.

La invención incluye un método de remodelación de un péptido en el que el péptido tiene la fórmula:

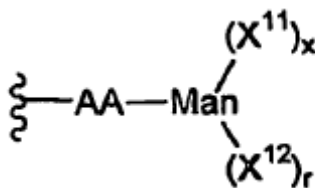


15

en la que

Z es un miembro seleccionado de O, S, NH y un reticularter.

Se da a conocer también un método de remodelación de un péptido en el que el péptido tiene la fórmula:



20

en la que

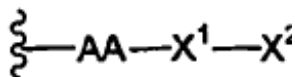
$X^{11}$  y  $X^{12}$  son restos glicosilo independientemente seleccionados; y

r y x son enteros independientemente seleccionados de 0 y 1.

En un aspecto de la divulgación,  $X^{11}$  y  $X^{12}$  son (manosa)<sub>q</sub>, en la que q se selecciona de los enteros entre 1 y 20, y cuando q es 3 o más, (manosa)<sub>q</sub> se selecciona de estructuras lineales y ramificadas.

25

La invención incluye una composición farmacéutica que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable y un péptido remodelado según un método *in vitro* exento de células de remodelación de un péptido que comprende polietilenglicol, teniendo el péptido la fórmula:



en la que

30

AA es un residuo aminoacídico terminal o interno del péptido;

$X^1$ - $X^2$  es un sacárido ligado covalentemente con AA, en el que

$X^1$  es un primer residuo de glicosilo; y

$X^2$  es un segundo residuo de glicosilo ligado covalentemente con  $X^1$ , en el que  $X^1$  y  $X^2$  se seleccionan de residuos de monosacarilo y oligosacarilo;

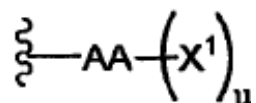
35

comprendiendo el método:

(a) eliminar  $X^2$  o una subunidad de sacarilo del mismo del péptido, formando así un glicano truncado.



La invención incluye también un método *in vitro* exento de células de remodelación de un péptido G-CSF que comprende polietilenglicol, teniendo el péptido la fórmula:



en la que

5 AA es un residuo aminoacídico terminal o interno del péptido;

X<sup>1</sup> es un residuo de monosacarilo ligado covalentemente con AA; y

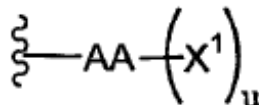
u es un entero seleccionado de 0 y 1,

comprendiendo el método:

10 poner en contacto el péptido con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo que comprende polietilenglicol que tiene un peso molecular de 20 kDa ligado covalentemente con el mismo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al péptido.

En un aspecto, el al menos un donante de glicosilo comprende un grupo modificador ligado covalentemente con el mismo. En otro aspecto, el grupo modificador es polietilenglicol. En aún otro aspecto, el polietilenglicol tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersada.

15 La invención incluye también una composición farmacéutica que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable y un péptido remodelado según un método *in vitro* exento de células de remodelación de un péptido que comprende polietilenglicol, teniendo el péptido la fórmula:



en la que

20 AA es un residuo aminoacídico terminal o interno del péptido;

X<sup>1</sup> es un residuo de glicosilo ligado covalentemente con AA, seleccionado de residuos de monosacarilo y oligosacarilo; y

u es un entero seleccionado de 0 y 1,

comprendiendo el método:

25 poner en contacto el péptido con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al glicano truncado, remodelando así el péptido.

### Breve descripción de los dibujos

Con el fin de ilustrar la invención, se representan en los dibujos ciertas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones e instrumentaciones precisas de las realizaciones representadas en los dibujos.

30 La Figura 1 es un esquema que representa un glicano de núcleo de trimanosilo (lado izquierdo) y el proceso enzimático para la generación de un glicano que tiene una GlcNAc bisectriz (lado derecho).

La Figura 2 es un esquema que representa una estructura de núcleo de trimanosilo elemental y cadenas complejas con diversos grados de terminación. Se muestra la generación enzimática *in vitro* de una estructura de núcleo de trimanosilo elemental a partir de una estructura de glicano carbohidratado complejo que no contiene un residuo de GlcNAc bisectriz, así como la generación de una estructura de glicano a partir de ella que contiene una GlcNAc bisectriz. Símbolos: 35 cuadrados: GlcNAc; círculos blancos: Man; círculos negros: Gal; triángulos: NeuAc.

La Figura 3 es un esquema de la generación enzimática de una estructura de glicano sialilada (lado derecho) que parte de un glicano que tiene un núcleo de trimanosilo y una GlcNAc bisectriz (lado izquierdo).

40 La Figura 4 es un esquema de una estructura de glicano rica en manosa típica (lado izquierdo) y el proceso enzimático para la reducción de esta estructura a una estructura de núcleo de trimanosilo elemental. En este esquema, X es manosa como monosacárido, oligosacárido o polisacárido.

- La Figura 5 es un diagrama de una estructura de glicano N-ligado que contiene fucosa y xilosa producida típicamente en células de planta.
- La Figura 6 es un diagrama de una estructura de glicano N-ligado que contiene fucosa producida típicamente en células de insecto. Obsérvese que el glicano puede no tener fucosa en el núcleo, puede tener una sola fucosa en el núcleo con cualquier ligamiento o puede tener una sola fucosa en el núcleo que tiene preponderancia de un ligamiento.
- La Figura 7 es un esquema que representa una variedad de rutas para el recorte de una estructura rica en manosa y la síntesis de cadenas de azúcar complejas a partir de ella. Símbolos: cuadrados: GlcNAc; círculos: Man; rombos: fucosa; pentágonos: xilosa.
- La Figura 8 es un esquema que representa estrategias *in vitro* para la síntesis de estructuras complejas a partir de una estructura de núcleo de trimanosilo elemental. Símbolos: cuadrados: GlcNAc; círculos blancos: Man; círculos negros: Gal; triángulos negros: NeuAc; GnT: N-acetilglucosaminiltransferasa; GalT: galactosiltransferasa; ST: sialiltransferasa.
- La Figura 9 es un esquema que representa dos estrategias *in vitro* para la síntesis de glicanos monoantennados y la glicoPEGilación opcional de los mismos. Cuadrados negros: GlcNAc; círculos negros: Man; círculos blancos: Gal; triángulos negros: ácido siálico.
- La Figura 10 es un esquema que representa dos estrategias *in vitro* para la síntesis de glicanos monoantennados y la glicoPEGilación opcional de los mismos. Cuadrados negros: GlcNAc; círculos negros: Man; círculos blancos: Gal; triángulos negros: ácido siálico.
- La Figura 11 es un esquema que representa diversas estructuras complejas que pueden sintetizarse a partir de una estructura de núcleo de trimanosilo elemental. Símbolos: cuadrados: GlcNAc; círculos blancos: Man; círculos negros: Gal; triángulos: NeuAc; rombos: fucosa; FT y FucT: fucosiltransferasa; GalT: galactosiltransferasa; ST: sialiltransferasa; Le: antígeno de Lewis; SLe: antígeno de Lewis sialilado.
- La Figura 12 es un esquema ejemplar para la preparación de glicopéptidos O-ligados originarios de serina o treonina. Opcionalmente, se añade un polímero hidrosoluble (WSP) tal como polietilenglicol a la estructura de glicano final.
- La Figura 13 es una serie de diagramas que representan los cuatro tipos de estructuras de O-glicano, denominadas núcleos 1 a 4. La estructura del núcleo se esboza en líneas de puntos.
- La Figura 14, que comprende la Figura 14A y la Figura 14B, es una serie de esquemas que muestran una realización ejemplar de la invención en que los residuos de carbohidrato que comprenden estructuras de carbohidrato complejas y/o estructuras ricas en manosa se recortan hasta la estructura biantennada de primera generación. Opcionalmente, se añade fucosa solo después de la reacción con GnT I. Se conjuga entonces un azúcar modificado que porta un polímero hidrosoluble (WSP) con uno o más residuos de azúcar expuestos por el proceso de recorte.
- La Figura 15 es un esquema similar al mostrado en la Figura 4, en que una estructura rica en manosa o compleja se "recorta" hasta el núcleo  $\beta$ -ligado de manosa y se conjuga entonces un azúcar modificado que porta un polímero hidrosoluble con uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el proceso de recorte. Los azúcares se añaden secuencialmente usando glicosiltransferasas.
- La Figura 16 es un esquema similar al mostrado en la Figura 4, en que se recorta una estructura rica en manosa o compleja hasta la GlcNAc a la que está unida la primera manosa, y se conjuga entonces un azúcar modificado que porta un polímero hidrosoluble con uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el proceso de recorte. Los azúcares se añaden secuencialmente usando glicosiltransferasas.
- La Figura 17 es un esquema similar al mostrado en la Figura 4, en que se recorta una estructura rica en manosa o compleja hasta la primera GlcNAc unida a la Asn del péptido, después de lo cual se conjuga un polímero hidrosoluble con uno o más residuos de azúcar que se han añadido posteriormente. Los azúcares se añaden secuencialmente usando glicosiltransferasas.
- La Figura 18, que comprende las Figuras 18A y 18B, es un esquema en que un carbohidrato N-ligado se recorta opcionalmente desde una estructura rica en manosa o compleja y posteriormente se derivatiza con un resto de azúcar modificado (Gal o GlcNAc) que porta un polímero hidrosoluble.
- La Figura 19, que comprende las Figuras 19A y 19B, es un esquema en que un carbohidrato N-ligado se recorta desde una estructura rica en manosa o compleja y posteriormente se derivatiza con un resto de ácido siálico que porta un polímero hidrosoluble. Los azúcares se añaden secuencialmente usando glicosiltransferasas.
- La Figura 20 es un esquema en que un carbohidrato N-ligado se recorta opcionalmente desde una estructura rica en manosa o compleja y posteriormente se derivatiza con uno o más restos de ácido siálico, y se termina con un ácido siálico derivatizado con un polímero hidrosoluble. Los azúcares se añaden secuencialmente usando glicosiltransferasas.

La Figura 21 es un esquema en que un sacárido O-ligado se “recorta” y posteriormente se conjuga con un azúcar modificado que porta un polímero hidrosoluble. En el esquema ejemplar, el resto de carbohidrato se “recorta” hasta la primera generación de estructura biantenada.

5 La Figura 22 es un esquema ejemplar de recorte del resto de carbohidrato de un glicopéptido O-ligado para producir una manosa disponible para conjugación con un azúcar modificado que tiene un polímero hidrosoluble unido al mismo.

La Figura 23, que comprende de la Figura 23A a la Figura 23C, es una serie de esquemas ejemplares.

10 La Figura 23A es un esquema que ilustra la adición de un azúcar PEGilado, seguido de la adición de un azúcar no modificado. La Figura 23B es un esquema que ilustra la adición de más de una clase de azúcares modificados a un glicano. La Figura 23C es un esquema que ilustra la adición de diferentes azúcares modificados a glicanos O-ligados y glicanos N-ligados.

La Figura 24 es un diagrama de diversos métodos de mejora de la función terapéutico mediante remodelación de glicano, incluyendo conjugación.

La Figura 25 es un conjunto de esquemas de remodelación de glicano de un péptido terapéutico para tratar la enfermedad de Gaucher.

15 La Figura 26 es un esquema de remodelación de glicano para generar glicanos que tienen un resto manosa-6-fosfato terminal.

La Figura 27 es un diagrama que ilustra la matriz de estructuras de glicano encontradas en glucocerebrosidasa producida por CHO (Cerezyme™) después de sialilación.

20 La Figura 28, que comprende de la Figura 28A a la Figura 28Z y de la Figura 28AA a la Figura 28CC, es una lista de péptidos útiles en los métodos de la invención.

25 La Figura 29, que comprende las Figuras 29A a 29G, proporciona esquemas ejemplares de remodelación de estructuras de glicano en factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). La Figura 29A es un diagrama que representa el péptido G-CSF, indicando el residuo aminoacídico al que se une un glicano, y una fórmula de glicano ejemplar ligada al mismo. Las Figuras 29B a 29G son diagramas de las etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido de la Figura 29A basándose en el tipo de célula en que se expresa el péptido y en la estructura del glicano remodelado deseada.

La Figure 58, que comprende las Figuras 58A y 58B, es una secuencia nucleotídica y la correspondiente aminoacídica ejemplares de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente).

30 La Figura 181 es un esquema que representa la conversión de N-glicanos ricos en manosa en N-glicanos híbridos. La enzima 1 es  $\alpha$ 1,2-manosidasa de *Trichodoma reesei* o *Aspergillus saitoi*. La enzima 2 es GnT-I ( $\beta$ -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa I). La enzima 3 es GalT-I ( $\beta$ 1,4-galactosiltransferasa 1). La enzima 4 es  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa o  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa.

La Figura 188 es una serie de esquemas que representan la conversión de N-glicanos ricos en manosa en N-glicanos complejos.

35 La enzima 1 es  $\alpha$ 1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* o *Aspergillus saitoi*. La enzima 2 es GnT-I. La enzima 3 es GAIT 1. La enzima 4 es  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa o  $\alpha$ 2,6-sialiltransferasa. La enzima 5 es  $\alpha$ -manosidasa II. La enzima 6 es  $\alpha$ -manosidasa. La enzima 7 es GnT-II. La enzima 8 es  $\alpha$ 1,6-manosidasa. La enzima 9 es  $\alpha$ 1,3-manosidasa.

La Figura 189 es un diagrama del ligamiento catalizado por N-acetilglucosaminiltransferasa I a VI (GnT I-VI). R =GlcNAcV $\beta$ 1,4GlcNAc-Asn-X.

#### 40 Descripción detallada de la invención

La presente invención incluye métodos y composiciones para la adición y/o delección *in vitro* exenta de células de azúcares a o de una molécula peptídica de tal manera que se proporcione una molécula glicopeptídica que tenga un patrón de glicosilación personalizado o deseado específico, en los que el glicopéptido se produce a escala industrial. En una realización preferida de la invención, el glicopéptido así producido tiene unido al mismo un azúcar modificado que se ha añadido al péptido mediante una reacción enzimática. Un rasgo clave de la invención es tomar un péptido producido por cualquier tipo celular y generar una estructura de glicano de núcleo en el péptido, después de lo cual se remodela entonces la estructura de glicano *in vitro* para generar un glicopéptido que tiene un patrón de glicosilación adecuado para uso terapéutico en un mamífero. Más específicamente, es posible según la presente invención preparar una molécula glicopeptídica que tiene una molécula de azúcar modificada u otro compuesto conjugado con la misma, de tal modo que la molécula conjugada confiera una propiedad beneficiosa al péptido. Según la presente invención, la molécula conjugada se añade al péptido enzimáticamente porque la adición basada en enzimas de moléculas conjugadas a péptidos tiene la ventaja de regioselectividad y estereoselectividad. El glicoconjugado puede añadirse al glicano en un péptido antes o después de completar la glicosilación. En otras palabras, el orden de glicosilación con

respecto a la glicoconjugación puede variar como se describe en otro lugar de la presente memoria. Por lo tanto, es posible, usando los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria, remodelar un péptido para conferir al péptido una estructura de glicano deseada que tenga preferiblemente un azúcar modificado unido a la misma. También es posible, usando los métodos y composiciones de la invención, generar moléculas peptídicas que tienen estructuras de glicano deseadas y/o modificadas a escala industrial proporcionando así la materia, por primera vez, una solución práctica para la producción eficaz de péptidos terapéuticos mejorados.

### Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tienen generalmente el mismo significado entendido habitualmente por un especialista en la materia a la que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos son los bien conocidos y habitualmente empleados en la materia. Se usan técnicas estándares para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. Las técnicas y procedimientos se efectúan generalmente según los métodos convencionales de la materia y las diversas referencias generales (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), que se proporcionan a lo largo de este documento. La nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio usados en química analítica y síntesis orgánicas descritos a continuación son los bien conocidos y habitualmente empleados en la materia. Se usan técnicas estándares o modificaciones de las mismas para las síntesis químicas y análisis químicos.

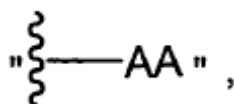
Los artículos "un" y "una" se usan en la presente memoria para designar uno o más de uno (concretamente al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, designa una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente con un epítipo específico en un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos de la presente invención pueden existir en una variedad de formas incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como anticuerpos monocatenarios y anticuerpos humanizados (Harlow *et al.*, 1999, "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow *et al.*, 1989, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; Bird *et al.*, 1988, Science 242: 423-426).

Se entiende por el término "anticuerpo sintético", como se usa en la presente memoria, un anticuerpo que se genera usando la tecnología de ADN recombinante tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago como se describe en la presente memoria. Debería considerarse también que el término significa un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y que dicha molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia aminoacídica específica del anticuerpo, en el que la secuencia de ADN o aminoacídica se ha obtenido usando la tecnología de secuenciación de ADN o aminoácidos sintéticos que está disponible y es bien conocida en la materia.

Como se usa en la presente memoria, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en que exhibe una propiedad por la que se caracteriza. Una enzima funcional, por ejemplo, es aquella que exhibe la actividad catalítica característica por la que se caracteriza la enzima.

Como se usa en la presente memoria, la estructura



es el punto de conexión entre un aminoácido o cadena lateral aminoacídica en la cadena peptídica y la estructura de glicano.

Los oligosacáridos "N-ligados" son aquellos oligosacáridos que están ligados con una cadena principal peptídica a través de asparagina, a modo de ligamiento asparagina-N-acetilglucosamina. Los oligosacáridos N-ligados se denominan también "N-glicanos". Todos los oligosacáridos N-ligados tienen un núcleo pentasacárido común de Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Difieren en la presencia y el número de ramificaciones (también denominadas antenas) de azúcares periféricos tales como N-acetilglucosamina, galactosa, N-acetilgalactosamina, fucosa y ácido siálico. Opcionalmente, esta estructura puede contener también una molécula de fucosa y/o una molécula de xilosa de núcleo.

Una "estructura de núcleo de trimanosilo elemental" designa un resto de glicano que comprende solamente una estructura de núcleo de trimanosilo sin azúcares adicionales unidos a la misma. Cuando no se incluye el término "elemental" en la descripción de la "estructura de núcleo de trimanosilo", entonces el glicano comprende la estructura de núcleo de trimanosilo con azúcares adicionales unidos al mismo. Opcionalmente, esta estructura puede contener también una molécula de fucosa y/o molécula de xilosa de núcleo.

El término “glicopéptido de núcleo de trimanosilo elemental” se usa en la presente memoria para designar un glicopéptido que tiene estructuras de glicano que comprenden principalmente una estructura de núcleo de trimanosilo elemental. Opcionalmente, esta estructura puede contener también una molécula de fucosa y/o molécula de xilosa de núcleo.

- 5 Los oligosacáridos “O-ligados” son aquellos oligosacáridos que están ligados con una cadena principal peptídica a través de treonina, serina, hidroxiprolina, tirosina u otros aminoácidos que contienen hidroxilo.

10 Todos los oligosacáridos descritos en la presente memoria se describen con el nombre o abreviatura del sacárido no reductor (concretamente Gal), seguido de la configuración del enlace glicosídico ( $\alpha$  o  $\beta$ ), el enlace de anillo (1 o 2), la posición de anillo del sacárido reductor implicado en el enlace (2, 3, 4, 6 u 8) y entonces el nombre o abreviatura del sacárido reductor (concretamente, GlcNAc). Cada sacárido es preferiblemente una piranosa. Para una revisión de la nomenclatura glicobiológica estándar, véase “Essentials of Glycobiology”, Varki *et al.* eds., 1999, CSHL Press.

15 El término “ácido siálico” designa cualquier miembro de la familia de azúcares carboxilados de 9 carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (ácido (2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico), a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA). Es un segundo miembro de la familia el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido 2-ceto-3-desoxinulosónico (KDN) (Nadano *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 11550-11557; Kanamori *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 21811-21819 (1990)). Se incluyen también ácidos siálicos 9-sustituidos tales como un 9-O-acil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para una revisión de la familia del ácido siálico, véase, por ejemplo, Varki, *Glycobiology* 2: 25-40 (1992); “Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function”, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, Nueva York (1992)). Se dan a conocer la síntesis y uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.

20 Un péptido que tiene la “glicosilación deseada”, como se usa en la presente memoria, es un péptido que comprende una o más moléculas de oligosacárido que son necesarias para la actividad biológica eficaz del péptido.

- 25 Una “enfermedad” es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis y en el que, si la enfermedad no mejora, entonces la salud del animal continúa deteriorándose.

El “área bajo la curva” o “AUC”, como se usa en la presente memoria en el contexto de la administración de un fármaco peptídico a un paciente, se define como el área total bajo la curva que describe la concentración de fármaco en circulación sistémica en el paciente en función del tiempo desde cero a infinito.

30 El término “semivida” o “t<sub>1/2</sub>”, como se usa en la presente memoria en el contexto de la administración de un fármaco peptídico a un paciente, se define como el tiempo necesario para que la concentración plasmática de un fármaco en un paciente se reduzca a la mitad. Puede haber más de una semivida asociada al fármaco peptídico dependiendo de múltiples mecanismos de aclaramiento, redistribución y otros mecanismos bien conocidos en la materia. Habitualmente, las semividas alfa y beta se definen de tal modo que la fase alfa está asociada con la redistribución, y la fase beta está asociada con el aclaramiento. Sin embargo, con fármacos proteicos que están, en su mayor parte, confinados a la corriente sanguínea, puede haber al menos dos semividas de aclaramiento. Para algunos péptidos glicosilados, el aclaramiento de fase beta rápido puede estar mediado por receptores en macrófagos o células endoteliales que reconocen galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa o fucosa terminales. El aclaramiento de fase beta más lento puede ocurrir mediante filtración glomerular renal para moléculas con un radio eficaz < 2 nm (aproximadamente 68 kDa) y/o captación específica o no específica y metabolismo en tejidos. La glicoPEGilación puede tapar los azúcares terminales (por ejemplo, galactosa o N-acetilgalactosamina) y bloquear así el aclaramiento de fase alfa rápido mediante receptores que reconocen estos azúcares. Puede conferir también un radio eficaz mayor y reducir así el volumen de distribución y captación en tejido, prolongando así la fase beta tardía. Por tanto, el impacto preciso de la glicoPEGilación sobre las semividas de fase alta y fase beta variará dependiendo del tamaño, estado de glicosilación y otros parámetros, como es bien conocido en la materia. Se encuentra una explicación adicional de “semivida” en “Pharmaceutical Biotechnology” (1997, DFA Crommelin and RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, pág. 101-120).

50 El término “tiempo de residencia”, como se usa en la presente memoria en el contexto de la administración de un fármaco peptídico a un paciente, se define como el tiempo medio que el fármaco permanece en el cuerpo del paciente después de la dosificación.

55 Un “ácido nucleico aislado” designa un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de las secuencias que lo flanquean en un estado de origen natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha despojado de las secuencias que están normalmente adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en que aparece naturalmente. El término se aplica también a ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente de otros componentes que acompañan naturalmente al ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN, o proteínas que lo acompañan naturalmente en la célula. El término incluye por lo tanto, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora a un vector, a un plásmido o virus de replicación autónoma, o a un ADN genómico de procarionota o eucariota, o que existe como molécula separada (por ejemplo, como ADNc o fragmento genómico o de

ADNc producido por PCR o digestión con enzima de restricción) independiente de otras secuencias. Incluye también un ADN recombinante que es parte de un ácido nucleico híbrido que codifica una secuencia peptídica adicional.

Un "polinucleótido" significa una sola hebra o hebras paralelas y antiparalelas de un ácido nucleico. Por tanto, un polinucleótido puede ser un ácido nucleico monocatenario o bicatenario.

- 5 El término "ácido nucleico" designa típicamente polinucleótidos grandes. El término "oligonucleótido" designa típicamente polinucleótidos cortos, generalmente no mayores de aproximadamente 50 nucleótidos.

10 Se usa en la presente memoria la notación convencional para describir secuencias polinucleotídicas: el extremo izquierdo de una secuencia polinucleotídica monocatenaria es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de una secuencia polinucleotídica bicatenaria se designa como la dirección 5'. La dirección de adición 5' a 3' de nucleótidos a transcritos de ARN nacientes se designa como la dirección de transcripción. La hebra de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se designa como la "hebra codificante"; las secuencias en la hebra de ADN que están localizadas 5' a un punto de referencia en el ADN se designan como "secuencias en dirección 5"; las secuencias en la hebra de ADN que están 3' de un punto de referencia en el ADN se designan como "secuencias en dirección 3".

15 "Codificar" designa la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, ADNc o ARNm, de servir como molde para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (concretamente, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de ello. Por tanto, una secuencia de ácido nucleico codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese ácido nucleico produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la hebra codificante, cuya secuencia nucleotídica es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona habitualmente en listaos de secuencias, como la hebra no codificante, usada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, pueden designarse como codificantes de la proteína u otro producto de ese ácido nucleico o ADNc.

20 A menos que se especifique otra cosa, una "secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica" incluye todas las secuencias nucleotídicas que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia aminoacídica. Las secuencias nucleotídicas que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

30 "Homólogo", como se usa en la presente memoria, designa la similitud de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas peptídicas. Cuando está ocupada una posición de subunidad en ambas de las dos moléculas por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición de cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogos en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de coincidencias o posiciones homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones de dos secuencias de compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias son un 50% homólogas, si un 90% de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten un 90% de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 3'ATTGCC5' y 3'TATGGC comparten un 50% de homología.

35 Como se usa en la presente memoria, "homología" se usa como sinónimo de "identidad".

La determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas puede lograrse usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, es un algoritmo matemático útil para comparar dos secuencias el algoritmo de Karlin y Altschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268), modificado como en Karlin y Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877). Este algoritmo se incorpora a los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.* (1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410), y puede accederse, por ejemplo, en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) que tiene el localizador de recursos universal "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov-BLAST/>". Las búsquedas nucleotídicas de BLAST pueden efectuarse con el programa NBLAST (designado "blastn" en el sitio web del NCBI), usando los siguientes parámetros: penalización por hueco= 5; penalización por extensión de hueco = 2; penalización por desapareamiento = 3; gratificación por coincidencia= 1; valor esperado = 10,0; y tamaño de palabra= 11 para obtener secuencias nucleotídicas homólogas de un ácido nucleico descrito en la presente memoria. Las búsquedas de proteína BLAST pueden efectuarse con el programa XBLAST (designado "blastp" en el sitio web del NCBI) o el programa "blastp" del NCBI, usando los siguientes parámetros: valor esperado= 10,0, matriz de puntuación BLOSUM62, para obtener las secuencias aminoacídicas homólogas de una molécula de proteína descrita en la presente memoria. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, puede utilizarse BLAST con huecos como se describe en Altschul *et al.* (1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Como alternativa, pueden usarse PSI-Blast o PHI-Blast para efectuar una búsqueda iterativa que detecte relaciones distantes entre moléculas (Id.) y relaciones entre moléculas que comparten un patrón común. Cuando se utilizan los programas BLAST, BLAST con huecos, PSI-Blast y PHI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase el <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

La identidad porcentual entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. Al calcular la identidad porcentual, se cuentan típicamente las coincidencias exactas.

Una "unidad de expresión de ácido nucleico heterólogo" que codifica un péptido se define como un ácido nucleico que tiene una secuencia de codificación de un péptido de interés ligada operativamente con una o más secuencias de control de la expresión tales como secuencias promotoras y/o represoras en el que al menos una de las secuencias es heteróloga, concretamente, no encontrada naturalmente en la célula hospedadora.

5 Al describir dos polinucleótidos como "ligados operativamente", se entiende que un resto de ácido nucleico monocatenario o bicatenario comprende los dos polinucleótidos dispuestos en el resto de ácido nucleico de tal manera que al menos uno de los dos polinucleótidos sea capaz de ejercer un efecto fisiológico mediante el que se caracteriza frente al otro. A modo de ejemplo, un promotor ligado operativamente con la región de codificación de un ácido nucleico es capaz de promover la transcripción de la región de codificación.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que es necesaria para la expresión de un producto génico ligado operativamente con la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora del núcleo y, en otros casos, esta secuencia puede incluir también una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que son necesarios para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, aquella que expresa el producto génico de manera específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es un promotor que conduce la expresión de un gen con el que está ligado operativamente de manera constante en una célula. A modo de ejemplo, los promotores que conducen la expresión de genes domésticos celulares se considera que son promotores constitutivos.

20 Un promotor "inducible" es una secuencia nucleotídica que, cuando está ligada operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, causa que el producto génico se produzca en una célula viva sustancialmente solo cuando está presente en la célula un inductor que corresponde con el promotor.

Un promotor "específico de tejido" es una secuencia nucleotídica que, cuando está ligada operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, causa que el producto génico se produzca en una célula viva sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

25 Un "vector" es una composición material que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para suministrar ácido nucleico aislado al interior de una célula. Son conocidos numerosos vectores en la materia incluyendo, pero sin limitación, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por tanto, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. Debería considerarse que el término incluye también compuestos no plasmídicos y no víricos que faciliten la transferencia de ácido nucleico a células tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, vectores retrovíricos y similares.

30 "Vector de expresión" designa un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión ligadas operativamente con la secuencia nucleotídica para expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción en cis para la expresión; pueden suministrarse otros elementos para expresión por la célula hospedadora o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos aquellos conocidos en la materia, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante.

40 Una célula "modificada por ingeniería genética" o "recombinante" es una célula que tiene una o más modificaciones en el material genético de la célula. Se observa que dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, inserciones de material genético, deleciones de material genético e inserciones de material genético que es extracromosómico, tanto si dicho material se mantiene establemente como si no.

Un "péptido" es un oligopéptido, polipéptido, péptido, proteína o glicoproteína. El uso del término "péptido" en la presente memoria incluye un péptido que tiene una molécula de azúcar unida al mismo cuando una molécula de azúcar está unida al mismo.

45 Como se usa en la presente memoria, "forma nativa" significa la forma del péptido cuando se produce por las células y/u organismos que se encuentra en la naturaleza. Cuando el péptido se produce por una pluralidad de células y/u organismos, el péptido puede tener una variedad de formas nativas.

50 "Péptido" designa un polímero en que los monómeros son aminoácidos y están unidos conjuntamente a través de enlaces amida, designado como alternativa como péptido. Adicionalmente, se incluyen también aminoácidos no naturales, por ejemplo,  $\beta$ -alanina, fenilglicina y homoarginina. Los aminoácidos que no están codificados por ácidos nucleicos pueden usarse también en la presente invención. Además, los aminoácidos que se han modificado para incluir grupos reactivos, sitios de glicosilación, polímeros, restos terapéuticos, biomoléculas y similares pueden usarse también en la invención. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser el isómero D o L de los mismos. El isómero L se prefiere generalmente. Además, son también útiles otros peptidomiméticos en la presente invención. Como se usa en la presente memoria, "péptido" designa tanto péptidos glicosilados como no glicosilados. Se incluyen también péptidos que están glicosilados incompletamente por un sistema que expresa el péptido. Para una revisión general,

véase Spatola, A. F., en "CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS", B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983).

El término "conjugado peptídico" designa la especie de la invención en que un péptido se conjuga con un azúcar modificado como se expone en la presente memoria.

- 5 El término "aminoácido" designa los aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como los análogos aminoacídicos y miméticos aminoacídicos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican después, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos aminoacídicos designan compuestos que tienen la misma estructura química básica que los aminoácidos de origen natural, concretamente, un  $\alpha$ -carbono que está ligado con un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, y metionina metilsulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que los aminoácidos de origen natural. Los miméticos aminoacídicos designan compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural.
- 10
- 15

Como se usa en la presente memoria, los aminoácidos se representan por el nombre completo de los mismos, por el código de tres letras correspondiente a los mismos o por el código de una letra correspondiente al los mismos como se indica en la siguiente Tabla 1:

**Tabla 1.** Aminoácidos y códigos de tres letras y una letra

Nombre completo	Código de tres letras	Código de una letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	Y
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W

- 20 La presente invención proporciona también análogos de proteínas o péptidos que comprenden una proteína como se identifica anteriormente. Los análogos pueden diferir de las proteínas o péptidos de origen natural por diferencias de secuencia aminoacídica conservativas o por modificaciones que no afectan a la secuencia, o por ambas. Por ejemplo, pueden hacerse cambios aminoacídicos conservativos que, aunque alteran la secuencia primaria de la proteína o



péptido, normalmente no alteran su función. Las sustituciones aminoacídicas conservativas incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos:

glicina, alanina;

valina, isoleucina, leucina;

5 ácido aspártico, ácido glutámico;

asparagina, glutamina;

serina, treonina;

lisina, arginina;

fenilalanina, tirosina.

10 Las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluyen la derivatización química *in vivo* o *in vitro* de péptidos, por ejemplo, acetilación o carboxilación. Se incluyen también las modificaciones de glicosilación, por ejemplo, aquellas realizadas modificando los patrones de glicosilación de un péptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento posteriores; por ejemplo, exponiendo el péptido a enzimas que afecten a la glicosilación, por ejemplo, enzimas glicosilantes o desglicosilantes de mamíferos. Se comprenden también las  
15 secuencias que tienen residuos aminoacídicos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

Se apreciará, por supuesto, que los péptidos pueden incorporar residuos aminoacídicos que se modifican sin afectar a la actividad. Por ejemplo, los extremos pueden derivatizarse para incluir grupos bloqueantes, concretamente  
20 sustituyentes químicos adecuados para proteger y/o estabilizar los extremos N y C de una "degradación indeseable", un término que pretende comprender cualquier tipo de degradación enzimática, química o bioquímica del compuesto en sus extremos que es probable que afecte a la función del compuesto, concretamente, la degradación secuencial del compuesto en un extremo terminal del mismo.

Los grupos bloqueantes incluyen grupos protectores usados convencionalmente en la materia de la química de péptidos que no afectarán adversamente a las actividades *in vivo* del péptido. Por ejemplo, pueden introducirse grupos  
25 bloqueantes N-terminales adecuados mediante alquilación o acilación del extremo N. Los ejemplos de grupos bloqueantes N-terminales adecuados incluyen grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> ramificados o no ramificados, grupos acilo tales como grupos formilo y acetilo, así como las formas sustituidas de los mismos, tales como los grupos acetamidometilo (Acm), Fmoc o Boc. Son también grupos bloqueantes N-terminales útiles los análogos desaminados de los aminoácidos, y pueden acoplarse con el extremo N del péptido o usarse en lugar del residuo N-terminal. Los grupos  
30 bloqueantes C-terminales adecuados, en los que el grupo carboxilo del extremo C se incorpora o no, incluyen ésteres, cetonas o amidas. Los grupos alquilo formadores de éster o cetona, particularmente grupos alquilo inferiores tales como metilo, etilo y propilo, y los grupos amino formadores de amida tales como aminas primarias (-NH<sub>2</sub>) y grupos mono- y dialquilamino tales como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino y similares, son ejemplos de grupos bloqueantes C-terminales. Los análogos aminoacídicos descarboxilados tales como agmatina son también  
35 grupos bloqueantes C-terminales útiles y pueden acoplarse con el residuo C-terminal del péptido o usarse en lugar del mismo. Además, se apreciará que los grupos amino y carboxilo libres en los extremos pueden eliminarse totalmente del péptido proporcionando las formas desaminada y descarboxilada del mismo sin afectar a la actividad peptídica.

Pueden incorporarse también otras modificaciones sin afectar adversamente a la actividad, y estas incluyen, pero sin limitación, la sustitución de uno o más de los aminoácidos en la forma isomérica L natural por aminoácidos en la forma  
40 isomérica D. Por tanto, el péptido puede incluir uno o más residuos de D-aminoácido, o puede comprender aminoácidos que están todos en forma D. Se contemplan también las formas retroinversas de los péptidos de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, péptidos invertidos en que todos los aminoácidos se sustituyen por formas de D-aminoácido.

Se contemplan también las sales de adición de ácido de la presente invención como equivalentes funcionales. Por tanto, un péptido de acuerdo con la presente invención tratado con un ácido inorgánico tal como ácido hidrocórico, hidrobromico, sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares, o un ácido orgánico tal como ácido acético, propiónico, glicólico, pirúvico, oxálico, málico, malónico, succínico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, cinámico, mandélico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico y similares, para proporcionar una sal hidrosoluble del  
45 péptido, es adecuado para uso en la invención.

Se incluyen también péptidos que se han modificado usando técnicas de biología molecular ordinarias para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para volverlos más adecuados como agente terapéutico. Los análogos de dichos péptidos incluyen aquellos que contienen residuos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos de origen no natural. Los péptidos de la invención no están limitados a productos de ninguno de los procesos ejemplares específicos enumerados en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, el término “MALDI” es una abreviatura de desorción/ionización láser asistida por matriz. Durante la ionización, puede eliminarse parcialmente el SA-PEG (ácido siálico-poli(etilenglicol)) de la estructura de N-glicano de la glicoproteína.

5 Como se usa en la presente memoria, el término “glicosiltransferasa” designa cualquier enzima/proteína que tenga la capacidad de transferir un azúcar donante a un resto aceptor.

10 Como se usa en la presente memoria, el término “azúcar modificado” designa un carbohidrato de origen natural o no natural que se añade enzimáticamente a un residuo aminoacídico o de glicosilo de un péptido en un proceso de la invención. El azúcar modificado se selecciona de una serie de sustratos enzimáticos incluyendo, pero sin limitación, azúcares-nucleótidos (mono-, di- y trifosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo) y azúcares que no están activados ni tienen nucleótidos.

El “azúcar modificado” se funcionaliza covalentemente con un “grupo modificador”. Los grupos modificadores útiles incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, biomoléculas y similares. El lugar de funcionalización con el grupo modificador se selecciona de tal modo que no evite que el “azúcar modificado” se añada enzimáticamente a un péptido.

15 El término “hidrosoluble” designa restos que tienen cierto grado detectable de solubilidad en agua. Los métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad acuosa son bien conocidos en la materia. Los polímeros hidrosolubles ejemplares incluyen péptidos, sacáridos, poliéteres, poliaminas, poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden secuencias mixtas o estar compuestos por un solo aminoácido, por ejemplo, polilisina. De forma similar, los sacáridos pueden ser de secuencia mixta o estar compuestos por una sola subunidad de sacárido, por ejemplo, dextrano, amilosa, quitosano y poli(ácido siálico). Es un poliéter ejemplar el polietilenglicol. La polietiliminina es una poliamina ejemplar, y el poli(ácido aspártico) es un poli(ácido carboxílico) representativo.

20 “Poli(óxido de alquileo)” designa un género de compuestos que tienen una cadena principal de poliéter. Las especies de poli(óxido de alquileo) de uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, especies de cadena lineal y ramificada. Además, las especies de poli(óxido de alquileo) ejemplares pueden terminar en uno o más grupos reactivos, activables o inertes. Por ejemplo, el polietilenglicol es un poli(óxido de alquileo) consistente en subunidades repetidas de óxido de etileno, que puede incluir o no restos adicionales reactivos, activables o inertes en cada extremo. Las especies de poli(óxido de alquileo) útiles incluyen aquellas en que un extremo está “tapado” por un grupo inerte, por ejemplo, monometoxipoli(óxido de alquileo). Cuando la molécula es una especie ramificada, puede incluir múltiples grupos reactivos, activables o inertes en los extremos de las cadenas de óxido de alquileo, y los grupos reactivos pueden ser iguales o diferentes. Son también conocidos en la materia derivados de especies de poli(óxido de alquileo) de cadena lineal que son heterobifuncionales.

25 El término “grupo ligante de glicosilo”, como se usa en la presente memoria, designa un residuo de glicosilo al que se une covalentemente un agente (por ejemplo, polímero hidrosoluble, resto terapéutico, biomolécula). En los métodos de la invención, el “grupo ligante de glicosilo” se une covalentemente a un péptido glicosilado o no glicosilado, ligando así el agente con un residuo de aminoácido y/o glicosilo del péptido. Un “grupo ligante de glicosilo” deriva generalmente de un “azúcar modificado” mediante la unión enzimática del “azúcar modificado” a un residuo aminoacídico y/o de glicosilo del péptido. Más específicamente, un “grupo ligante de glicosilo”, como se usa en la presente memoria, designa un resto que se une covalentemente a un “grupo modificador”, como se discute en la presente memoria, y a un residuo aminoacídico de un péptido. El aducto de grupo ligante de glicosilo-grupo modificador tiene una estructura que es un sustrato de una enzima. Las enzimas para las que el aducto de grupo ligante de glicosilo-grupo modificador es un sustrato son generalmente aquellas capaces de transferir un resto de sacarilo a un residuo aminoacídico de un péptido, por ejemplo, una glicosiltransferasa, amidasa, glicosidasa, trans-sialidasa, etc. El “grupo ligante de glicosilo” se intercala entre, y une covalentemente, un “grupo modificador” y un residuo aminoacídico de un péptido.

30 Un “grupo ligante de glicosilo intacto” designa un grupo ligante que deriva de un resto de glicosilo en que el monómero de sacárido individual que liga el conjugado no está degradado, por ejemplo oxidado, por ejemplo, por metaperyodato de sodio. Los “grupos ligantes de glicosilo intactos” de la invención pueden derivar de un oligosacárido de origen natural mediante la adición de unidad(es) de glicosilo o la eliminación de una o más unidades de glicosilo de la estructura de sacárido original. Un “grupo ligante de glicosilo intacto” ejemplar incluye al menos un resto de sacarilo intacto, por ejemplo no degradado, que está unido covalentemente con un residuo aminoacídico en un péptido. El resto del “grupo ligante” puede tener sustancialmente cualquier estructura. Por ejemplo, el grupo modificador está opcionalmente ligado directamente con el resto de sacarilo intacto. Como alternativa, el grupo modificador está ligado al resto de sacarilo intacto a través de un brazo ligador. El brazo ligador puede tener sustancialmente cualquier estructura que se haya determinado que es útil en la realización seleccionada. En una realización ejemplar, el brazo ligador es uno o más restos de sacarilo intactos, concretamente, el “grupo ligante de glicosilo intacto” se parece a un oligosacárido. Es otro grupo ligante de glicosilo intacto ejemplar aquel en que se degrada y derivatiza un resto de sacarilo unido, directa o indirectamente, al resto de sacarilo intacto (por ejemplo, oxidación con peroyodato seguida de aminación reductora). Otro brazo ligador más incluye el grupo modificador unido al resto de sacarilo intacto, directa o indirectamente, a través de un reticulante, tales como los descritos en la presente memoria o análogos de los mismos.

“Degradación”, como se usa en la presente memoria, designa la eliminación de uno o más átomos de carbono de un resto de sacarilo.

Los términos “resto orientador” y “agente orientador”, como se usan en la presente memoria, designan especies que localizarán selectivamente un tejido o región particular del cuerpo. La localización está mediada por el reconocimiento específico de determinantes moleculares, el tamaño molecular del agente orientador o conjugado, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y similares. Son conocidos por los especialistas en la materia otros mecanismos de orientación de un agente a un tejido o región particular.

Como se usa en la presente memoria, “resto terapéutico” significa cualquier agente útil para terapia incluyendo, pero sin limitación, antibióticos, agentes antiinflamatorios, fármacos antitumorales, citotoxinas y agentes radiactivos. “Resto terapéutico” incluye profármacos de agentes bioactivos, construcciones en que más de un resto terapéutico está ligado a un portador, por ejemplo, agentes multivalentes. El resto terapéutico incluye también péptidos y construcciones que incluyen péptidos. Los péptidos ejemplares incluyen aquellos dados a conocer en la Figura 28 y las Tablas 6 y 7 de la presente memoria. “Resto terapéutico” significa por tanto cualquier agente útil para terapia incluyendo, pero sin limitación, antibióticos, agentes antiinflamatorios, fármacos antitumorales, citotoxinas y agentes radiactivos. “Resto terapéutico” incluye profármacos de agentes bioactivos y construcciones en que más de un resto terapéutico está ligado con un portador, por ejemplo, agentes multivalentes.

Como se usa en la presente memoria, “fármaco antitumoral” significa cualquier agente útil para combatir el cáncer incluyendo, pero sin limitación, citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, agentes antimicóticos, procarbazona, hidroxurea, asparaginasa, corticosteroides, interferones y agentes radiactivos. Se comprenden también dentro del alcance del término “fármaco antitumoral” los conjugados de péptidos con actividad antitumoral, por ejemplo, TNF- $\alpha$ . Los conjugados incluyen, pero sin limitación, aquellos formados entre una proteína terapéutica y una glicoproteína de la invención. Es un conjugado representativo el formado entre PSGL-1 y TNF- $\alpha$ .

Como se usa en la presente memoria, “una citotoxina o agente citotóxico” significa cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Otras toxinas incluyen, por ejemplo, ricina, CC-1065 y análogos, las duocarmicinas. Aún otras toxinas incluyen toxina de la difteria y veneno de serpiente (por ejemplo, veneno de cobra).

Como se usa en la presente memoria, “un agente radiactivo” incluye cualquier radioisótopo que sea eficaz en el diagnóstico o destrucción de un tumor. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, indio 111, cobalto 60 y tecnecio. Adicionalmente, los elementos radiactivos de origen natural tales como uranio, radio y torio, que representan típicamente mezclas de radioisótopos, son ejemplos adecuados de agente radiactivo. Los iones metálicos se quelan típicamente con un resto quelante orgánico.

Son conocidos en la materia muchos grupos quelantes útiles, éteres corona, criptandos y similares y pueden incorporarse a los compuestos de la invención (por ejemplo, EDTA, DTPA, DOTA, NTA, HDTA, etc. y sus análogos de fosfonato tales como DTPP, EDTP, HDTP, NTP, etc). Véanse, por ejemplo, Pitt *et al.*, “The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload,” en “INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE”; Martell, Ed.; American Chemical Society, Washington, D.C., 1980, pág. 279-312; Lindoy, “THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES”; Cambridge University Press, Cambridge, 1989; Dugas, “BIOORGANIC CHEMISTRY”; Springer-Verlag, Nueva York, 1989 y las referencias contenidas en los mismos.

Adicionalmente, están disponibles para los especialistas en la materia una pluralidad de vías que permiten la unión de agentes quelantes, éteres corona y ciclodextrinas a otras moléculas. Véanse, por ejemplo, Meares *et al.*, “Properties of In Vivo Chelate-Tagged Proteins and Polypeptides” en “MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS”; Feeney, *et al.*, Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., 1982, pág. 370-387; Kasina *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 9: 108-117 (1998); Song *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 8: 249-255 (1997).

Como se usa en la presente memoria “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material que, cuando se combina con el conjugado, retiene la actividad del conjugado y no es reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándares tales como disolución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite en agua y diversos tipos de agentes humectantes. Otros portadores pueden incluir también disoluciones estériles, comprimidos que incluyen comprimidos recubiertos y cápsulas. Típicamente, dichos portadores contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales del mismo, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles u otros excipientes conocidos. Dichos portadores pueden incluir también aditivos aromatizantes y colorantes u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos portadores se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos.

Como se usa en la presente memoria, “administrar” significa administración oral, administración como supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal o subcutánea, administración intratecal o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, un minibomba osmótica, al sujeto.

- 5 El término “aislado” designa un material que está sustancial o esencialmente exento de los componentes que se usan para producir el material. Para los conjugados peptídicos de la invención, el término “aislado” designa el material que está sustancial o esencialmente exento de los componentes que normalmente acompañan al material en la mezcla usada para preparar el conjugado peptídico. “Aislado” y “puro” se usan intercambiamente. Típicamente, los conjugados peptídicos aislados de la invención tienen un nivel de pureza preferiblemente expresado como un intervalo.
- 10 El extremo inferior del intervalo de pureza para los conjugados peptídicos es de aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70% o aproximadamente un 80%, y el extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90% o más de aproximadamente un 90%.

- 15 Cuando los conjugados peptídicos son más de aproximadamente un 90% puros, sus purezas se expresan preferiblemente también como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza es de aproximadamente un 90%, aproximadamente un 92%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 96% o aproximadamente un 98%. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente un 92%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 96% o aproximadamente un 98%. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente un 92%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 98% o aproximadamente un 100% de pureza.

- 20 La pureza se determina mediante cualquier método de análisis reconocido en la materia (por ejemplo, intensidad de banda en un gel teñido con plata, electroforesis en gel de poliacrilamida, HPLC o medio similar).

“Escala comercial”, como se usa en la presente memoria, significa aproximadamente uno o más gramos de producto final producido en el método.

- 25 “Esencialmente cada miembro de la población”, como se usa en la presente memoria, describe una característica de una población de conjugados peptídicos de la invención en que un porcentaje seleccionado de los azúcares modificados añadidos al péptido se añaden a múltiples sitios aceptores idénticos en el péptido. “Esencialmente cada miembro de la población” habla de la “homogeneidad” de los sitios en el péptido conjugados con un azúcar modificado y designa los conjugados de la invención que son al menos aproximadamente un 80%, preferiblemente al menos aproximadamente un 90% y más preferiblemente al menos aproximadamente un 95% homogéneos.

- 30 “Homogeneidad” designa la consistencia estructural entre una población de restos aceptores con los que se conjugan los azúcares modificados. Por tanto, en un conjugado peptídico de la invención en que cada resto de azúcar modificado se conjuga con un sitio aceptor que tiene la misma estructura que el sitio aceptor con el que se conjuga cualquier otro azúcar modificado, se dice que el conjugado peptídico es aproximadamente un 100% homogéneo. La homogeneidad se expresa típicamente como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad para los conjugados peptídicos es de aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70% o aproximadamente un 80%, y el extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90% o más de aproximadamente un 90%.

- 35 Cuando los conjugados peptídicos son más o igual que un 90% homogéneos, su homogeneidad se expresa preferiblemente también como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad es de aproximadamente un 90%, aproximadamente un 92%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 96% o aproximadamente un 98%. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente un 92%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 98% o aproximadamente un 100% de homogeneidad. La pureza de los conjugados peptídicos se determina típicamente mediante uno o más métodos conocidos por los especialistas en la materia, por ejemplo, cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM), desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), electroforesis capilar y similares.

- 40 “Glicoforma sustancialmente uniforme” o un “patrón de glicosilación sustancialmente uniforme”, cuando designan una especie de glicopéptido, designa el porcentaje de restos aceptores que están glicosilados por la glicosiltransferasa de interés (por ejemplo, fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de la  $\alpha$ 1,2-fucosiltransferasa, existe un patrón de fucosilación sustancialmente uniforme si sustancialmente todo (como se define anteriormente) el Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc-R y análogos sialilados del mismo están fucosilados en un conjugado peptídico de la invención. Se entenderá por un especialista en la materia que el material de partida puede contener restos aceptores glicosilados (por ejemplo, restos de Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc-R fucosilados). Por tanto, el porcentaje de glicosilación calculado incluirá los restos aceptores se glicosilan mediante los métodos de la invención, así como aquellos restos aceptores ya glicosilados en el material de partida.

- 55 El término “sustancialmente” en las definiciones anteriores de “sustancialmente uniforme” significa generalmente que al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80% o más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% y aún más preferiblemente al menos aproximadamente un 95% de los restos aceptores para una glicosiltransferasa particular están glicosilados.

Descripción de la invenciónI. Método de remodelación de cadenas de glicano

5 La presente invención incluye métodos y composiciones para la adición y/o delección *in vitro* de azúcares a o de una molécula de glicopéptido de tal manera que se proporcione una molécula de péptido que tenga un patrón de glicosilación personalizado o deseado, preferiblemente incluyendo la adición de un azúcar modificado al mismo. Es por lo tanto un rasgo clave de la invención tomar un péptido producido por cualquier tipo celular y generar una estructura de glicano de núcleo en el péptido, después de lo cual se remodela entonces la estructura de glicano *in vitro* generando un péptido que tiene un patrón de glicosilación adecuado para uso terapéutico en un mamífero.

10 La importancia del patrón de glicosilación de un péptido es bien conocida en la materia, así como las limitaciones de los presentes métodos *in vivo* para la producción de péptidos apropiadamente glicosilados, particularmente cuando estos péptidos se producen usando metodología de ADN recombinante. Además, hasta la presente invención, no había sido posible generar glicopéptidos que tuvieran una estructura de glicano deseada en los mismos en los que el péptido pudiera producirse a escala industrial.

15 En la presente invención, se trata enzimáticamente *in vitro* un péptido producido por una célula mediante la adición sistemática de las enzimas apropiadas y sustratos de las mismas, de tal modo que se eliminen los restos de azúcar que no deberían estar presentes en el péptido, y se añaden los restos de azúcar, opcionalmente incluyendo azúcares modificados, que deberían añadirse al péptido de manera que proporcionen un glicopéptido que tenga la "glicosilación deseada" como se define en otro lugar de la presente memoria.

A. Método para remodelar glicanos N-ligados

20 En un aspecto, la presente invención aprovecha el hecho de que la mayoría de péptidos de interés comercial o farmacéutico comprenden una estructura de cinco azúcares común designada en la presente memoria como núcleo de trimanosilo, que está N-ligada a asparagina en la secuencia Asn-X-Ser/Thr de una cadena peptídica. El núcleo de trimanosilo elemental consiste esencialmente en dos residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y tres residuos de manosa (Man) unidos a un péptido, concretamente, comprende estos cinco residuos de azúcar y ningún azúcar adicional, excepto porque puede incluir opcionalmente un residuo de fucosa. La primera GlcNAc se une al grupo amida de la asparagina y la segunda GlcNAc se une a la primera a través de un ligamiento  $\beta$ 1,4. Se une un residuo de manosa a la segunda GlcNAc a través de un ligamiento  $\beta$ 1,4 y se unen dos residuos de manosa a esta manosa a través de un ligamiento  $\alpha$ 1,3 y  $\alpha$ 1,6, respectivamente. Se muestra una representación esquemática de la estructura de núcleo de trimanosilo en la Figura 1, lado izquierdo. Aunque sea el caso de que las estructuras de glicano de la mayoría de péptidos comprenden otros azúcares además del núcleo de trimanosilo, la estructura de núcleo de trimanosilo representa un rasgo esencial de los glicanos N-ligados en péptidos de mamíferos.

35 La presente invención incluye la generación de un péptido que tiene una estructura de núcleo de trimanosilo como elemento fundamental de la estructura de las moléculas de glicano contenidas en la misma. Dada la variedad de sistemas celulares usados para producir péptidos, tanto si los sistemas son de origen natural por sí mismos como si implican metodología de ADN recombinante, la presente invención proporciona métodos mediante los que una molécula de glicano en un péptido producido en cualquier tipo celular puede reducirse hasta una estructura de núcleo de trimanosilo elemental. Una vez se ha generado la estructura de núcleo de trimanosilo elemental, es entonces posible usar los métodos descritos en la presente memoria para generar *in vitro* una estructura de glicano deseada en el péptido que confiera al péptido una o más propiedades que potencien la eficacia terapéutica del péptido.

40 Debería ser evidente a partir de la discusión de la presente memoria que el término "núcleo de trimanosilo" se usa para describir la estructura de glicano mostrada en la figura 1, lado izquierdo. Los glicopéptidos que tienen una estructura de núcleo de trimanosilo pueden tener también azúcares adicionales añadidos a la misma, y para la mayoría, tienen estructuras adicionales añadidas a la misma independientemente de si los azúcares dan lugar a un péptido que tiene la estructura de glicano deseada. El término "estructura de núcleo de trimanosilo elemental" se define en otro lugar de la presente memoria. Cuando el término "elemental" no se incluye en la descripción de la "estructura de núcleo de trimanosilo", entonces el glicano comprende la estructura de núcleo de trimanosilo con azúcares adicionales unidos a los azúcares manosa.

45 El término "glicopéptido de núcleo de trimanosilo elemental" se usa en la presente memoria para designar un glicopéptido que tiene estructuras de glicano que comprenden principalmente una estructura de núcleo de trimanosilo elemental. Sin embargo, puede contener opcionalmente también un residuo de fucosa unido al mismo. Como se discute en la presente memoria, los glicopéptidos de núcleo de trimanosilo elemental son el material de partida óptimo, y por lo tanto preferido, para los procesos de remodelación de glicano de la invención.

55 Es otro material de partida óptimo para el proceso de remodelación de glicano de la invención una estructura de glicano que tiene un núcleo de trimanosilo en el que uno o dos residuos de GlcNAc adicionales se añaden a cada uno de los residuos de  $\alpha$ 1,3 y  $\alpha$ 1,6 manosa (véase, por ejemplo, la estructura de la segunda línea de la Figura 2, la segunda estructura a la izquierda de la figura). Esta estructura se designa en la presente memoria como "Man3GlcNAc4." Cuando la estructura es monoantenada, la estructura se designa en la presente memoria como "Man3GlcNAc3." Opcionalmente, esta estructura puede contener también una molécula de fucosa de núcleo. Una vez se ha generado la

estructura de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4, entonces es posible usar los métodos descritos en la presente memoria para generar *in vitro* una estructura de glicano deseada en el glicopéptido que confiera al glicopéptido una o más propiedades que potencien la eficacia terapéutica del péptido.

5 En su forma nativa, los glicopéptidos N-ligados de la invención, y particularmente los glicopéptidos de mamífero y humanos útiles en la presente invención, están glicosilados y N-ligados con una estructura de núcleo de trimanosilo y uno o más azúcares unidos a la misma.

10 Los términos "glicopéptido" y "glicopolipéptido" se usan como sinónimos en la presente memoria para designar cadenas peptídicas que tienen restos de azúcar unidos a las mismas. No se hace distinción en la presente memoria para diferenciar glicopolipéptidos o glicopéptidos pequeños de glicopolipéptidos o glicopéptidos grandes. Por tanto, se incluyen en los términos generales "glicopolipéptido" y "glicopéptido" moléculas hormonales que tienen muy pocos aminoácidos en su cadena peptídica (por ejemplo, a menudo del orden de tres aminoácidos) y otros péptidos mucho mayores, a condición de que tengan restos de azúcar unidos a los mismos. Sin embargo, el uso del término "péptido" no excluye que el péptido sea un glicopéptido.

15 Es un ejemplo de un glicopéptido N-ligado que tiene la glicosilación deseada un péptido que tiene un glicano N-ligado que tiene un núcleo de trimanosilo con al menos un residuo de GlcNAc unido al mismo. Este residuo se añade al núcleo de trimanosilo usando N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnT-1). Si se añade un segundo residuo de GlcNAc, se usa N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnT-II). Opcionalmente, pueden añadirse residuos de GlcNAc adicionales con GnT-IV y/o GnT-V, y puede unirse un tercer residuo de GlcNAc bisectriz a la  $\beta$ -1,4-manosa del núcleo de trimanosilo usando N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III). Opcionalmente, esta estructura puede extenderse mediante tratamiento con  $\beta$ 1,4-galactosiltransferasa para añadir un residuo de galactosa a cada GlcNAc no bisectriz, e incluso además opcionalmente, usando las enzimas  $\alpha$ 2,3- o  $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa, pueden añadirse residuos de ácido siálico a cada residuo de galactosa. La adición de una GlcNAc bisectriz al glicano no es necesaria para la posterior adición de residuos de galactosa y ácido siálico; sin embargo, con respecto a la afinidad de sustrato de las enzimas GnT-III de rata y humana, la presencia de uno o más de los residuos de galactosa en el glicano impide la adición de la GlcNAc bisectriz porque el glicano que contiene galactosa no es un sustrato para estas formas de GnT-III. Por tanto, en casos en que se desea la presencia de GlcNAc bisectriz y se usan estas formas de GnT-III, es importante en caso de que el glicano contenga residuos de galactosa y/o siálicos que se eliminen antes de la adición de la GlcNAc bisectriz. Otras formas de GnT-III pueden no requerir este orden específico de sustratos para su actividad. En la reacción más preferida, se añade una mezcla de GnT-I, GnT-II y GnT-III a la mezcla de reacción de modo que los residuos de GlcNAc puedan añadirse en cualquier orden.

25 Se muestran ejemplos de estructuras de glicano que representan los diversos aspectos de péptidos que tienen la "glicosilación deseada" en los dibujos proporcionados en la presente memoria. Los procedimientos precisos para la generación *in vitro* de un péptido que tiene la "glicosilación deseada" se describen en otro lugar de la presente memoria. Sin embargo, no debería considerarse en modo alguno la invención limitada solamente a cualquiera de las estructuras de glicano dadas a conocer en la presente memoria. En lugar de ello, debería considerarse que la invención incluye todas y cada una de las estructuras de glicano que pueden prepararse usando la metodología proporcionada en la presente memoria.

30 En algunos casos, un núcleo de trimanosilo elemental solo puede constituir la glicosilación deseada de un péptido. Por ejemplo, se ha mostrado que un péptido que tiene solo un núcleo de trimanosilo es un componente útil de una enzima empleada para tratar la enfermedad de Gaucher (Mistry *et al.*, 1966, Lancet 348: 1555-1559; Bijsterbosch *et al.*, 1996, Eur. J. Biochem. 237: 344-349).

Según la presente invención, resultarán evidentes los siguientes procedimientos para la generación de péptidos que tienen la glicosilación deseada.

45 a) Partiendo de un glicopéptido que tiene una o más moléculas de glicano que tienen como rasgo común una estructura de núcleo de trimanosilo y al menos uno o más de una mezcla heterogénea u homogénea de uno o más azúcares añadidos a la misma, es posible aumentar la proporción de glicopéptidos que tienen una estructura de núcleo de trimanosilo elemental como única estructura de glicano o que tienen Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4 como única estructura de glicano. Esto se logra *in vitro* mediante la adición sistemática al glicopéptido de un número apropiado de enzimas en una secuencia apropiada que escinde la mezcla heterogénea u homogénea de azúcares en la estructura de glicano hasta que se reduce a un núcleo de trimanosilo elemental o a una estructura de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4. Los ejemplos específicos de cómo se logra esto dependerán de una variedad de factores, incluyendo en gran medida el tipo de célula en que se produce el péptido y, por lo tanto, el grado de complejidad de la(s) estructura(s) de glicano presentes en el péptido producido inicialmente por la célula. Los ejemplos de cómo una estructura de glicano compleja puede reducirse a un núcleo de trimanosilo elemental o a una estructura de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4 se presentan en la Figura 2 o se describen con detalle en otro lugar de la presente memoria.

55 b) Es posible generar un péptido que tenga una estructura de núcleo de trimanosilo elemental como única estructura de glicano en el péptido aislando una célula de origen natural cuya maquinaria de glicosilación produzca dicho péptido. Se transfecta entonces ADN que codifica un péptido de elección en la célula, en la que el ADN se transcribe, traduce y glicosila de tal modo que el péptido de elección tenga una estructura de núcleo de trimanosilo elemental como única

estructura de glicano en el mismo. Por ejemplo, una célula carente de una enzima GnT-I funcional producirá varios tipos de glicopéptidos. En algunos casos, estos serán glicopéptidos que no tengan azúcares adicionales unidos al núcleo de trimanosilo. Sin embargo, en otros casos, los péptidos producidos pueden tener dos residuos de manosa adicionales unidos al núcleo de trimanosilo, dando como resultado un glicano Man5. Este es también un material de partida deseado para el proceso de remodelación de la presente invención. Se describen en la presente memoria ejemplos específicos de la generación de dichas estructuras de glicano.

c) Como alternativa, es posible modificar por ingeniería genética una célula para conferirle una maquinaria de glicosilación específica tal que produzca un péptido que tenga un núcleo de trimanosilo elemental o estructura de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4 como única estructura de glicano en el péptido. Se transfecta entonces ADN que codifica un péptido de elección a la célula, en la que el ADN se transcribe, traduce y glicosila de tal modo que el péptido de interés tenga un número aumentado de glicanos que comprenden únicamente una estructura de núcleo de trimanosilo. Por ejemplo, ciertos tipos de células que están modificadas por ingeniería genética para carecer de GnT-I pueden producir un glicano que tiene una estructura de núcleo de trimanosilo elemental o, dependiendo de la célula, pueden producir un glicano que tiene un núcleo de trimanosilo más dos residuos de manosa adicionales unidos al mismo (Man5). Cuando la célula produce una estructura de glicano Man5, la célula puede modificarse adicionalmente por ingeniería genética para expresar manosidasa 3, que escinde los dos residuos de manosa adicionales generando el núcleo de trimanosilo. Como alternativa, el glicano Man5 puede incubarse *in vitro* con manosidasa 3 para tener el mismo efecto.

d) Cuando un péptido se expresa en una célula de insecto, el glicano del péptido comprende una cadena parcialmente compleja. Las células de insecto expresan también hexosaminidasa en las células que recorta la cadena parcialmente compleja hasta una estructura de núcleo de trimanosilo que puede remodelarse entonces como se describe en la presente memoria.

e) Resulta fácilmente evidente a partir de la discusión de b), c) y d) que no es necesario que las células produzcan solo péptidos que tienen un núcleo de trimanosilo elemental o estructuras de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4 unidas al mismo. En lugar de ello, a menos que las células descritas en b) y c) produzcan péptidos que tengan un 100% de estructuras de núcleo de trimanosilo elemental (concretamente, que no tengan azúcares adicionales unidos a los mismos) o un 100% de estructuras de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4, las células producen de hecho una mezcla heterogénea de péptidos que tienen, en combinación estructuras de núcleo de trimanosilo elemental o estructuras de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4 como única estructura de glicano, además de que estas estructuras tienen azúcares adicionales unidos a las mismas. La proporción de péptidos que tienen un núcleo de trimanosilo o estructuras de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4 que tienen azúcares adicionales unidos a los mismos, en contraposición con aquellos que tienen una estructura, variará dependiendo de la célula que los produzca. La complejidad de los glicanos (concretamente, cuáles y cuántos azúcares se unen al núcleo de trimanosilo) variará también dependiendo de la célula que los produzca.

f) Una vez se produce un glicopéptido que tiene un núcleo de trimanosilo elemental o un núcleo de trimanosilo con uno o dos residuos de GlcNAc unidos al mismo siguiendo a), b) o c) anteriores, según la presente invención, se añaden moléculas de azúcar adicionales *in vitro* a la estructura de núcleo de trimanosilo para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada (concretamente un péptido que tiene una estructura de glicano personalizada *in vitro*).

g) Sin embargo, en el caso de producir un péptido que tiene un núcleo de trimanosilo elemental o estructura de Man3GlcNAc4 con algunos pero no todos los azúcares deseados unidos al mismo, entonces solo es necesario añadir cualquiera de los azúcares deseados restantes sin reducir la estructura de glicano hasta el núcleo de trimanosilo elemental o estructura de Man3GlcNAc4. Por lo tanto, en algunos casos, un péptido que tenga una estructura de glicano con estructura de núcleo de trimanosilo con azúcares adicionales unidos al mismo será un sustrato adecuado para remodelación.

#### 45 Aislamiento de un glicopéptido de núcleo de trimanosilo elemental

Los glicopéptidos de núcleo de trimanosilo elementales o glicopéptidos de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4 de la invención pueden aislarse y purificarse, si es necesario, usando técnicas bien conocidas en la materia de la purificación de péptidos. Las técnicas adecuadas incluyen técnicas cromatográficas, técnicas de enfoque isoelectrónico, técnicas de ultrafiltración y similares. Usando cualquiera de dichas técnicas, puede prepararse una composición de la invención en que los glicopéptidos de la invención se aíslan de otros péptidos y de otros componentes encontrados normalmente en el medio de cultivo celular. El grado de purificación puede ser, por ejemplo, de un 90% con respecto a los demás péptidos, o de un 95% o aún mayor, por ejemplo de un 98%. Véase, por ejemplo, Deutscher *et al.* (ed., 1990, "Guide to Protein Purification", Harcourt Brace Jovanovich, San Diego).

La heterogeneidad de los glicanos N-ligados presentes en los glicopéptidos producidos mediante la metodología de la técnica anterior permite generalmente solo el aislamiento de una pequeña porción de los glicopéptidos diana que pueden modificarse para producir los glicopéptidos deseados. En los presentes métodos, pueden producirse grandes cantidades de glicopéptidos de núcleo de trimanosilo elemental y otros glicopéptidos deseados, incluyendo los glicanos de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4, que pueden modificarse adicionalmente entonces generando grandes cantidades de péptidos que tienen la glicosilación deseada.

Puede lograrse el enriquecimiento específico de cualquier tipo particular de glicano ligado con un péptido usando lectinas que tienen afinidad por el glicano deseado. Dichas técnicas son bien conocidas en la materia de la glicobiología.

5 Un rasgo clave de la invención que se describe con más detalle a continuación es que, una vez se genera una estructura de glicano de núcleo en cualquier péptido, se remodela entonces la estructura de glicano *in vitro* para generar un péptido que tiene la glicosilación deseada y que tiene un uso terapéutico mejorado en un mamífero. El mamífero puede ser cualquier tipo de mamífero adecuado, y es preferiblemente un ser humano.

Las diversas situaciones y los métodos y composiciones precisos para generar péptidos con una glicosilación deseada resultarán evidentes a partir de la divulgación siguiente.

10 El objetivo último de la producción de péptidos para uso terapéutico en mamíferos es que los péptidos comprendan estructuras de glicano que faciliten en lugar de anular el beneficio terapéutico del péptido. Como se da a conocer a lo largo de la presente memoria descriptiva, los péptidos producidos en células pueden tratarse *in vitro* con una variedad de enzimas que catalizan la escisión de azúcares que no deberían estar presentes en el glicano y la adición de azúcares que deberían estar presentes en el glicano de tal modo que se genere un péptido que tenga la glicosilación deseada y por tanto sea adecuado para uso terapéutico en mamíferos. La generación de diferentes glicofomas de péptidos en células se describe anteriormente. Se describe ahora una variedad de mecanismos para la generación de péptidos que tengan la glicosilación deseada, en que el material de partida, concretamente el péptido producido por una célula, puede diferir de un tipo celular a otro. Como resultará evidente a partir de la presente divulgación, no es necesario que el material de partida sea uniforme con respecto a su composición de glicano. Sin embargo, es preferible que el material de partida esté enriquecido en ciertas glicofomas para producir grandes cantidades de producto final, concretamente péptidos correctamente glicosilados.

En una realización preferida según la presente invención, los eventos de degradación y síntesis que dan como resultado un péptido que tiene una glicosilación deseada implican en algún punto la generación de una estructura de núcleo de trimasosilo elemental o una estructura de Man3GlcNAc3 o Man3GlcNAc4 en el péptido.

25 La presente invención proporciona también medios para añadir uno o más residuos de glicosilo seleccionados a un péptido, después de lo cual se conjuga un azúcar modificado con al menos uno de los residuos de glicosilo seleccionados del péptido. La presente realización es útil, por ejemplo, cuando se desea conjugar el azúcar modificado con un residuo de glicosilo seleccionado que no está presente en un péptido o no está presente en la cantidad deseada. Por tanto, antes de acoplar un azúcar modificado con un péptido, se conjuga el residuo de glicosilo seleccionado con el péptido mediante acoplamiento enzimático o químico. En otra realización, el patrón de glicosilación de un péptido se altera antes de la conjugación del azúcar modificado mediante la eliminación de un residuo de carbohidrato del péptido. Véase por ejemplo el documento WO 98/31826.

35 Se logra la adición o eliminación química o enzimática de cualquier resto de carbohidrato presente en el péptido. La desglicosilación química se causa preferiblemente mediante la exposición de la variante peptídica al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar ligante (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacto el péptido. Se describe la desglicosilación química en Hakimuddin *et al.*, 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 y en Edge *et al.*, 1981, Anal. Biochem. 118: 131. Puede conseguirse la escisión enzimática de los restos de carbohidrato en las variantes peptídicas mediante el uso de una variedad de endo- y exoglicosidasas como se describen en Thotakura *et al.*, 1987, Meth. Enzymol. 138: 350.

40 La adición química de restos de glicosilo se lleva a cabo mediante cualquier método reconocido en la materia. La adición enzimática de restos de azúcar se consigue preferiblemente usando una modificación de los métodos expuestos en la presente memoria, sustituyendo unidades de glicosilo nativas por los azúcares modificados usados en la invención. Se dan a conocer otros métodos de adición de restos de azúcar en las patentes de EE.UU. n° 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554 y 5.922.577.

45 Los puntos de unión ejemplares para el residuo de glicosilo seleccionado incluyen, pero sin limitación: (a) sitios de N- y O-glicosilación; (b) restos de glicosilo terminales que son aceptores de glicosiltransferasa; (c) arginina, asparagina e histidina; (d) grupos carboxilo libres; (e) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (f) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (g) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (h) el grupo amida de glutamina. Los métodos ejemplares de uso en la presente invención se describen en el documento WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pág. 259-306 (1981).

55 Tratando específicamente con los ejemplos mostrados en varias de las figuras proporcionadas en la presente memoria, se presenta ahora una descripción de la secuencia de reacciones enzimáticas *in vitro* para la producción de estructuras de glicano deseadas en péptidos. Las condiciones de reacción precisas para cada una de las conversiones enzimáticas dadas a conocer a continuación son bien conocidas por los especialistas en la materia de la glicobiología y por lo tanto no se repiten aquí. Para una revisión de las condiciones de reacción para estos tipos de reacciones, véase Sadler *et al.*, 1982, Methods in Enzymology 83: 458-514 y las referencias citadas en el mismo.



En la Figura 1, se muestra la estructura de un glicano de núcleo de trimanosilo elemental en el lado izquierdo. Es posible convertir esta estructura en una estructura de glicano completa que tiene una GlcNAc bisectriz incubando la estructura de núcleo de trimanosilo elemental en presencia de GnT-I, seguido de GnT-II, y seguido adicionalmente de GnT-III, y un donante de azúcar que comprende UDP-GlcNAc, en el que se añade secuencialmente GlcNAc a la estructura de núcleo de trimanosilo elemental para generar un núcleo de trimanosilo que tiene una GlcNAc bisectriz. En algunos casos, por ejemplo cuando se remodelan glicanos de Fc como se describen en la presente memoria, el orden de adición de GnT-I, GnT-II y GnT-III puede ser el contrario al notificado en la bibliografía. La estructura de GlcNAc bisectriz puede producirse añadiendo una mezcla de GnT-I, GnT-II y GnT-III y UDP-GlcNAc a la mezcla de reacción.

En la Figura 3, se muestra la conversión de un glicano de núcleo de trimanosilo que contiene GlcNAc bisectriz en una estructura de glicano compleja que comprende galactosa y ácido N-acetilneuramínico. El glicano de núcleo de trimanosilo que contiene GlcNAc bisectriz se incuba en primer lugar con galactosiltransferasa y UDP-Gal como molécula donante, añadiéndose dos residuos de galactosa a los residuos de GlcNAc periféricos en la molécula. Se usa entonces la enzima NeuAc-transferasa para añadir dos residuos de NeuAc a cada uno de los residuos de galactosa.

En la Figura 4, se muestra la conversión de una estructura de glicano rico en manosa en un glicano de núcleo de trimanosilo elemental. El glicano rico en manosa (Man9) se incuba secuencialmente en presencia de manosidasa 1 generando una estructura de Man5 y entonces en presencia de manosidasa 3, retirándose todos menos tres residuos de manosa del glicano. Como alternativa, la incubación de la estructura de Man9 puede recortarse hasta la estructura de núcleo de trimanosilo solamente mediante incubación en presencia de manosidasa 3. Según los esquemas presentados en las Figuras 1 y 3 anteriores, es entonces posible la conversión de este glicano de núcleo de trimanosilo elemental en una molécula de glicano compleja.

En la Figura 5, se muestra una estructura de glicano N-ligado compleja típica producida en células de planta. Es importante observar que, cuando las células de planta son deficientes en actividad enzimática de GnT-I, no pueden añadirse xilosa y fucosa al glicano. Por tanto, el uso de células con desactivación génica de GnT-I proporciona una ventaja particular en la presente invención en que estas células producen péptidos que tienen un núcleo de trimanosilo elemental en el que pueden añadirse azúcares adicionales sin efectuar ninguna reacción de "recorte". De forma similar, en casos en que la estructura producida en una célula de planta puede ser de la variedad Man5 de glicano, si la GnT-I está ausente en estas células, no pueden añadirse xilosa y fucosa a la estructura. En este caso, la estructura Man5 puede recortarse hasta un núcleo de trimanosilo elemental (Man3) usando manosidasa 3. Según los métodos proporcionados en la presente memoria, es ahora posible añadir restos de azúcar deseados al núcleo de trimanosilo para generar la estructura de glicano deseada.

En la Figura 6, se muestra un complejo típico de estructura de glicano N-ligado compleja producido en células de insecto. Como es evidente, pueden estar presentes azúcares adicionales tales como, por ejemplo, fucosa. Adicionalmente, aunque no se muestra aquí, las células de insecto pueden producir glicanos ricos en manosa que tienen del orden de nueve residuos de manosa y pueden tener azúcares adicionales unidos a los mismos. Es también el caso en células de insecto que las células con desactivación génica de GnT-I evitan la adición de residuos de fucosa al glicano. Por tanto, la producción de un péptido en células de insecto puede lograrse preferiblemente en una célula con desactivación génica de GnT-I. El glicano así producido puede recortarse entonces *in vitro* si es necesario usando cualquiera de los métodos y esquemas descritos en la presente memoria, y pueden añadirse también azúcares adicionales *in vitro* al mismo usando los métodos y esquemas proporcionados en la presente memoria.

En la Figura 2, se muestran estructuras de glicano en diversas etapas de terminación. Específicamente, se muestra la generación enzimática *in vitro* de una estructura de núcleo de trimanosilo elemental a partir de una estructura de glicano de carbohidrato compleja que no contiene un residuo de GlcNAc bisectriz. Se muestra también la generación de una estructura de glicano a partir de ella que contiene una GlcNAc bisectriz. Se muestran varias estructuras de glicano intermedias que pueden producirse. Estas estructuras pueden producirse por células o pueden producirse en las reacciones de recorte *in vitro* descritas en la presente memoria. Los restos de azúcar pueden añadirse *in vitro* a la estructura de núcleo de trimanosilo elemental o a cualquier estructura intermedia adecuada para producir el glicano deseado.

En la Figura 7, se muestra una serie de posibles reacciones *in vitro* que pueden efectuarse para recortar y añadir a glicanos partiendo de una estructura rica en manosa. Por ejemplo, un glicano Man9 puede recortarse usando manosidasa 1 generando un glicano Man5, o puede recortarse hasta un núcleo de trimanosilo usando manosidasa 3 o una o más manosidasas microbianas. Pueden usarse entonces GnT-I y/o GnT-II para transferir residuos de GlcNAc adicionales al glicano. Además, se muestra que la situación no ocurriría cuando la molécula de glicano se produce en una célula que no tiene GnT-I (véase el cuadro sombreado). Por ejemplo, pueden añadirse fucosa y xilosa a un glicano solo cuando la GnT-I está activa y facilita la transferencia de una GlcNAc a la molécula.

La Figura 8 representa estrategias bien conocidas para la síntesis de estructuras de glicano biantenadas, triantenadas e incluso tetraantenadas partiendo de la estructura de núcleo de trimanosilo. Según los métodos de la invención, es posible sintetizar cada una de estas estructuras *in vitro* usando las enzimas apropiadas y condiciones de reacción bien conocidas en la materia de la glicobiología.

La Figura 9 representa dos métodos para la síntesis de una estructura de glicano monoantennada partiendo de estructuras de glicano ricas en manosa (6 a 9 restos de manosa). Puede añadirse un resto de ácido siálico-PEG terminal en lugar del resto de ácido siálico según la metodología de glicoPEGilación descrita en la presente memoria. En el primer método, se usa endo-H para escindir la estructura de glicano en el péptido hasta el primer residuo de GlcNAc. Se añade entonces galactosa usando galactosiltransferasa y PEG sialilado como se describe en otro lugar de la presente memoria. En el segundo método, se usa manosidasa I para escindir los residuos de manosa de la estructura de glicano del péptido. Se añade un residuo de galactosa a un brazo de los residuos de manosa restantes que se escindieron del glicano usando  $\alpha$ -manosidasa Jack Bean. Se añade entonces PEG sialilado a esta estructura como se indica.

La Figura 10 representa dos métodos adicionales para la síntesis de estructuras de glicano monoantennadas partiendo de una estructura de glicano rica en manosa (6 a 9 restos de manosa). Como en la Figura 9, puede añadirse un resto de ácido siálico-PEG terminal en lugar del resto de ácido siálico según la metodología de glicoPEGilación descrita en la presente memoria. En la situación descrita aquí, se eliminan algunos de los residuos de manosa del brazo al que no se añade PEG sialilado.

En la Figura 11, se muestra un esquema para la síntesis de estructuras de carbohidrato aún más complejas a partir de una estructura de núcleo de trimanosilo. Por ejemplo, se muestra un esquema para la producción *in vitro* de estructura de antígeno Lewis x y Lewis a, que pueden estar o no sialiladas. Dichas estructuras, cuando están presentes en un péptido, pueden conferir al péptido ventajas inmunitarias para regular positivamente o regular negativamente la respuesta inmunitaria. Además, dichas estructuras son útiles para orientar el péptido a células específicas, estando estos tipos de estructuras implicados en la unión a los péptidos de adhesión y similares.

La Figura 12 es un esquema ejemplar para la preparación de una matriz de péptidos O-ligados originarios de serina o treonina.

La Figura 13 es una serie de diagramas que representan los cuatro tipos de estructuras de glicano O-ligado denominados núcleos 1 a 4. La estructura de núcleo se esboza en líneas de puntos. Los azúcares que pueden incluirse también en esta estructura incluyen residuos de ácido siálico añadidos a los residuos de galactosa y residuos de fucosa añadidos a los residuos de GlcNAc.

Por tanto, en realizaciones preferidas, la presente invención proporciona un método de preparación de un glicopéptido glicosilado N-ligado proporcionando un glicopéptido aislado y purificado al que se une un núcleo de trimanosilo elemental o una estructura de Man3GlcNAc4, poniendo en contacto el glicopéptido con una enzima glicosiltransferasa y una molécula donante que tiene un resto glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el resto de glicosilo al glicopéptido. Se logra entonces la personalización de un glicopéptido de núcleo de trimanosilo o glicopéptido Man3GlcNAc4 para producir un péptido que tiene el patrón de glicosilación deseado mediante la adición secuencial de los restos de azúcar deseados, usando técnicas bien conocidas en la materia.

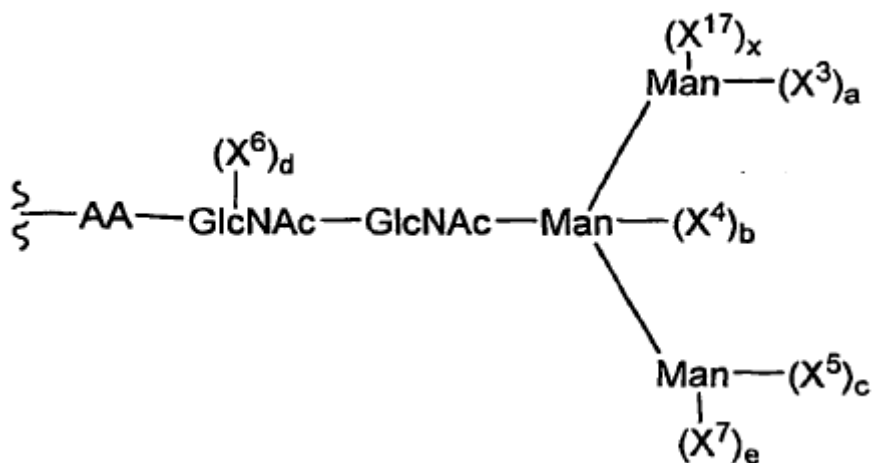
#### Determinación de la estructura primaria del glicano

Cuando se produce un glicopéptido N-ligado por una célula, como se observa en otro lugar de la presente memoria, puede comprender una mezcla heterogénea de estructuras de glicano que deben reducirse generalmente hasta un núcleo de trimanosilo elemental o estructura de Man3GlcNAc4 antes de añadir otros restos de azúcar al mismo. Para determinar exactamente cuáles azúcares deberían eliminarse de una estructura de glicano particular, a veces es necesario identificar la estructura primaria del glicano. Las técnicas para la determinación de la estructura primaria del glicano son bien conocidas en la materia y se describen con detalle, por ejemplo, en Montreuil, "Structure and Biosynthesis of Glycopeptides" en "Polysaccharides in Medicinal Applications", pág. 273-327, 1996, Eds. Severian Damitriu, Marcel Dekker, NY. Por lo tanto, es una cuestión sencilla para un especialista en la materia de la glicobiología aislar una población de péptidos producidos por una célula y determinar la(s) estructura(s) de los glicanos unidos a los mismos. Por ejemplo, están disponibles métodos eficaces para (i) la ruptura de los enlaces glicosídicos por escisión química tal como hidrólisis, acetólisis, hidrazinólisis o desaminación nitrosa; (ii) la metilación completa seguida de hidrólisis o metánólisis y por cromatografía gas-líquido y espectroscopia de masas de los monosacáridos parcialmente metilados; y (iii) la definición de ligamientos anoméricos entre monosacáridos usando exoglicosidasas, que proporcionan también la comprensión de la estructura primaria del glicano mediante degradación secuencial. En particular, las técnicas de espectroscopia de masas y espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), especialmente RMN de campo alto, se han usado exitosamente para determinar la estructura primaria del glicano.

Están también comercialmente disponibles kits y equipos para el análisis de carbohidratos. La electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE®) está disponible en Glyko, Inc. (Novato, CA). En el análisis de FACE, se liberan glicoconjugados del péptido con endo-H o N-glucanasa (PNGasa F) para los glicanos N-ligados, o hidrazina para los glicanos ligados por Ser/Thr. Se marca entonces el glicano en el extremo reductor con un fluoróforo de manera no discriminante de la estructura. Se separan entonces los glicanos marcados con fluoróforo en geles de poliacrilamida basándose en la relación carga/masa del sacárido así como en el volumen hidrodinámico. Se toman imágenes del gel con luz UV y se determina la composición de los glicanos mediante la distancia de migración en comparación con patrones. Los oligosacáridos pueden secuenciarse de esta manera analizando los desplazamientos de migración debidos a la eliminación secuencial de sacáridos por la digestión con exoglicosidasas.

Realización ejemplar

La remodelación de la glicosilación N-ligada se ilustra mejor con referencia a la fórmula 1:



5 en la que  $X^3$ ,  $X^4$ ,  $X^5$ ,  $X^6$ ,  $X^7$  y  $X^{17}$  son residuos monosacáridos u oligosacáridos (independientemente seleccionados); y a, b, c, d, e y x son 0, 1 o 2 (independientemente seleccionados), a condición de que al menos un miembro seleccionado de a, b, c, d, e y x sea 1 o 2.

10 La fórmula 1 describe una estructura de glicano que comprende el núcleo de trimanosilo, que está preferiblemente ligado covalentemente con un residuo de asparagina en la cadena principal peptídica. Los sistemas de expresión preferidos expresarán y secretarán péptidos exógenos con glicanos N-ligados que comprenden el núcleo de trimanosilo. Usando el método de remodelación de la invención, las estructuras de glicano de estos péptidos pueden remodelarse convenientemente hasta cualquier estructura de glicano deseada. Se encuentran las condiciones de reacción ejemplares a lo largo de los ejemplos y en la bibliografía.

15 En realizaciones preferidas, se remodelan las estructuras de glicano de modo que la estructura descrita en la fórmula 1 tenga determinantes específicos. La estructura del glicano puede elegirse para potenciar la actividad biológica del péptido, dar al péptido una nueva actividad biológica, eliminar la actividad biológica de péptido o aproximarse mejor al patrón de glicosilación del péptido nativo, entre otros.

En la primera realización preferida, se remodelan los glicanos N-ligados con péptido para aproximarse mejor al patrón de glicosilación de proteínas humanas nativas. En esta realización, se remodela la estructura de glicano descrita en la fórmula 1 para tener los siguientes restos:

20  $X^3$  y  $X^5$  = |-GlcNAc-Gal-SA;

a y c= 1;

d= 0 o 1;

b, e y x= 0.

25 Esta realización es particularmente ventajosa para péptidos humanos expresados en sistemas de expresión heterólogos. Al remodelar las estructuras de glicano N-ligado a esta configuración, el péptido puede hacerse menos inmunogénico en un paciente humano y/o más estable, entre otros.

En la segunda realización preferida, se remodelan los glicanos N-ligados con péptido para tener un residuo de GlcNAc bisectriz en el núcleo de trimanosilo. En esta realización, se remodela la estructura de glicano descrita en la fórmula 1 para tener los siguientes restos:

30  $X^3$  y  $X^5$  son |-GlcNAc-Gal-SA;

a y c= 1;

$X^4$  es GlcNAc;

b= 1;

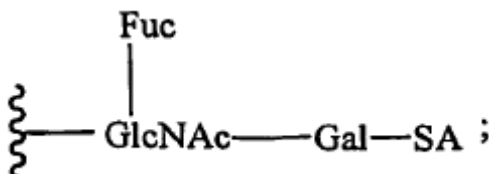
d= 0 o 1;

35 e y x= 0.

Esta realización es particularmente ventajosa para moléculas de anticuerpo recombinantes expresadas en sistemas celulares heterólogos. Cuando una molécula de anticuerpo incluye citotoxicidad celular mediada por Fc, es sabido que la presencia de oligosacáridos bisectores ligados con el dominio Fc aumentaba drásticamente la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

- 5 En una tercera realización preferida, se remodelan los glicanos N-ligados con péptido para tener un resto Lewis X sialilado. En esta realización, se remodela la estructura de glicano descrita en la fórmula 1 para tener los siguientes restos:

$X^3$  y  $X^5$  son



- 10 a, c, d = 1;  
b, e y x = 0;  
 $X^6$  = fucosa.

Esta realización es particularmente ventajosa cuando el péptido que se está remodelando se pretende orientar a moléculas de selectina y células que exhiban la misma.

- 15 En una cuarta realización preferida, se remodelan los glicanos N-ligados con péptido para tener un resto conjugado. El resto conjugado puede ser una molécula de PEG, otro péptido o una molécula pequeña tal como un fármaco entre otras. En esta realización, se remodela la estructura de glicano descrita en la fórmula 1 para tener los siguientes restos:

$X^3$  y  $X^5$  son  $|-GlcNAc-Gal-SA-R$ ;

a y c = 1 o 2;

- 20 d = 0 o 1;  
b, d, e y x = 0;

en que R = grupo conjugado.

El resto conjugado puede ser una molécula de PEG, otro péptido o una molécula pequeña tal como un fármaco, entre otras. Por lo tanto, esta realización es útil para conjugar el péptido con moléculas de PEG que retardarán el aclaramiento del péptido de la corriente sanguínea del paciente, con péptidos que orientarán a ambos péptidos a un tejido o célula específico o con otro péptido de uso terapéutico complementario.

25

Resultará evidente para un especialista en la materia que la invención no está limitada a las moléculas de glicano preferidas descritas anteriormente. Las realizaciones preferidas son solo unas pocas de las muchas moléculas de glicano útiles que pueden prepararse mediante el método de remodelación de la invención. Los especialistas en la materia sabrán cómo diseñar otros glicanos útiles.

30

En las primeras realizaciones ejemplares, el péptido se expresa en una CHO (estirpe celular de ovario de hámster chino) según métodos bien conocidos en la materia. Cuando se expresa un péptido con sitios de consenso de glicano N-ligado y se secreta de células CHO, los glicanos N-ligados tendrán las estructuras representadas en la fila superior de la figura 2, pero comprendiendo también una fucosa del núcleo. Aunque todas estas estructuras pueden estar presentes, las estructuras más comunes son de lejos las dos del lado derecho. En términos de la fórmula 1,

35

$X^3$  y  $X^5$  son  $|-GlcNAc-Gal-(SA)$ ;

a y c = 1;

b, e y x = 0, y

d = 0 o 1.

40

Por lo tanto, en una realización ejemplar, remodelan los glicanos N-ligados de péptidos expresados en células CHO hasta el glicano humanizado preferido poniendo en contacto los péptidos con una glicosiltransferasa que sea específica de una molécula aceptora de galactosa y una molécula donante de ácido siálico. Este proceso se ilustra en la Figura 2 y el Ejemplo 17. En otra realización ejemplar, se remodelan los glicanos N-ligados de un péptido expresado y secretado

por células CHO para ser estructuras PEGiladas preferidas. El péptido se pone en contacto primero con una glicosidasa específica de ácido siálico para eliminar el resto SA terminal, y se pone entonces en contacto con una glicosiltransferasa específica de un resto aceptor de galactosa y un resto aceptor de ácido siálico en presencia de moléculas donantes de ácido siálico-nucleótido para asegurar tapar completamente con SA todas las moléculas de glicano.

- 5 En otras realizaciones ejemplares, el péptido se expresa en células de insecto tales como la estirpe celular Sf9 según métodos bien conocidos en la materia. Cuando se expresa un péptido con sitios de consenso de glicano N-ligado y se secreta por células Sf9, los glicanos N-ligados tendrán a menudo las estructuras representadas en la fila superior de la figura 6. En términos de la fórmula 1:

$X^3$  y  $X^5$  son |- GlcNAc;

- 10 a y c=0 o 1;

b= 0;

$X^6$  es fucosa,

d= 0, 1 o 2; y

e y x=0.

- 15 El núcleo de trimanosa está presente en la gran mayoría de los glicanos N-ligados preparados por células de insecto, y a veces están presentes también residuo(s) de GlcNAc y/o fucosa antenados. Obsérvese que el glicano puede no tener una fucosa de núcleo, puede tener una sola fucosa de núcleo con cualquier ligamiento o puede tener una sola fucosa de núcleo con preponderancia de un solo ligamiento. En una realización ejemplar, se remodelan los glicanos N-ligados de un péptido expresado y secretado por células de insecto hasta el glicano humanizado preferido poniendo en contacto primero los glicanos con una glicosidasa específica de moléculas de fucosa, poniendo entonces en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de la molécula aceptor de manosa en cada antena del núcleo de trimanosa y una molécula donante de GlcNAc en presencia de moléculas de GlcNAc-nucleótido; poniendo entonces en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de GlcNAc y una molécula donante de Gal en presencia de moléculas de Gal-nucleótido y poniendo entonces en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de galactosa y una molécula donante de ácido siálico en presencia de moléculas de SA-nucleótido. Un especialista en la materia apreciará que las moléculas de fucosa, si las hubiera, pueden eliminarse en cualquier momento durante el procedimiento, y si la fucosa de núcleo es del mismo ligamiento  $\alpha$ 1,6 que se encuentra en glicanos humanos, puede dejarse intacta. En otra realización ejemplar, se remodela el glicano humanizado del ejemplo anterior adicionalmente hasta glicano de Lewis X sialilado poniendo en contacto adicionalmente el glicano con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de GlcNAc y una molécula donante de fucosa en presencia de moléculas de fucosa-nucleótido. Este proceso se ilustra en la Figura 11 y el Ejemplo 39.

- En aún otras realizaciones ejemplares, el péptido se expresa en levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, según métodos bien conocidos en la materia. Cuando se expresa un péptido con sitios de consenso de glicano N-ligado y se secreta por células de *S. cerevisiae*, los glicanos N-ligados tendrán las estructuras representadas a la izquierda en la Figura 4. Los glicanos N-ligados tendrán siempre el núcleo de trimanosilo, que a menudo se elaborará con manosa o polisacáridos relacionados de hasta 1000 residuos. En términos de la fórmula 1:

$X^3$  y  $X^5$  = |-Man-Man-(Man)<sub>0-1000</sub>;

a y c =1 o 2;

b, d, e y x= 0.

- 40 En una realización ejemplar, se remodelan los glicanos N-ligados de un péptido expresado y secretado por células de levadura hasta el núcleo de trimanosa elemental poniendo en contacto primero los glicanos con una glicosidasa específica de moléculas de  $\alpha$ 2-manosa y poniendo entonces en contacto los glicanos con una glicosidasa específica de moléculas de  $\alpha$ 6-manosa. Este proceso se ilustra en la Figura 4 y el Ejemplo 38.

- 45 En otra realización ejemplar, se remodelan adicionalmente los glicanos N-ligados para preparar un glicano adecuado para un anticuerpo recombinante con función de toxicidad celular mediada por Fc poniendo en contacto los glicanos de núcleo de trimanosa elemental con una glicosiltransferasa específica de la molécula aceptor de manos en cada antena del núcleo de trimanosa y una molécula donante de GlcNAc en presencia de moléculas de GlcNAc-nucleótido. Se ponen entonces en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de la molécula de manosa aceptor en medio del núcleo de trimanosa y una molécula donante de GlcNAc en presencia de moléculas de GlcNAc-nucleótido y se ponen adicionalmente en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de GlcNAc y una molécula donante de Gal en presencia de moléculas de Gal-nucleótido; y se ponen entonces opcionalmente en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de galactosa y además opcionalmente una molécula donante de ácido siálico en presencia de moléculas de SA-nucleótido. Este proceso se ilustra en las Figuras 1, 2 y 3.

En otra realización ejemplar, el péptido se expresa en células bacterianas, en particular células de *E. coli*, según métodos bien conocidos en la materia. Cuando un péptido con sitios de consenso de glicanos N-ligados se expresa en células de *E. coli*, los sitios de consenso N-ligados no estarán glicosilados. En una realización ejemplar, se construye una molécula de glicano humanizada a partir de la cadena principal peptídica poniendo en contacto los péptidos con una glicosiltransferasa específica de un sitio de consenso N-ligado y una molécula donante de GlcNAc en presencia de GlcNAc- nucleótido; y poniendo en contacto adicionalmente los glicanos crecientes con glicosiltransferasas específicas de los restos aceptor y donante en presencia del resto donante necesario hasta que se completa la estructura de glicano deseada. Cuando un péptido con glicanos N-ligados se expresa en células eucarióticas, pero sin las secuencias líder apropiadas que dirigen el péptido naciente al aparato de Golgi, el péptido maduro es probable que no esté glicosilado. En este caso también, puede proporcionarse al péptido glicosilación N-ligada construyendo a partir del sitio de consenso N-ligado del péptido como se menciona anteriormente. Cuando se modifica químicamente una proteína con un resto de azúcar, puede construirse como se menciona anteriormente.

Estos ejemplos se pretende que ilustren la invención, y no que la limiten. Un especialista en la materia apreciará que las etapas realizadas en cada ejemplo pueden efectuarse en algunas circunstancias en un orden diferente para obtener el mismo resultado. Un especialista en la materia entenderá también que un conjunto diferente de etapas puede producir también el mismo glicano resultante. El glicano remodelado preferido no es en modo alguno específico del sistema de expresión en que se expresa el péptido. Los glicanos remodelados son solo ilustrativos y un especialista en la materia sabrá cómo tomar los principios de estos ejemplos y aplicarlos a péptidos producidos en diferentes sistemas de expresión para preparar glicanos no descritos específicamente en la presente memoria.

## 20 B. Método para remodelar glicanos O-ligados

La O-glicosilación se caracteriza por la unión de una variedad de monosacáridos con un ligamiento O-glicosídido a hidroxiaminoácidos. La O-glicosilación es una modificación postraducciona extendida en los reinos animal y vegetal. La complejidad estructural de los glicanos O-ligados con proteínas supera en gran medida la de los glicanos N-ligados. Los residuos de serina o treonina de un péptido recién traducido se modifican en virtud de una peptidil-GalNAc transferasa en los compartimentos cis a trans del aparato de Golgi. El sitio de O-glicosilación se determina no solo por la especificidad de secuencia de la glicosiltransferasa, sino también por regulación epigenética mediada por la competición entre diferentes sitios de sustrato y la competición con otras glicosiltransferasas responsables de la formación del glicano.

El glicano O-ligado se ha definido arbitrariamente que tiene tres regiones: el núcleo, la región de cadena principal y la región periférica. La región de "núcleo" de un glicano O-ligado es los dos o tres azúcares más internos de la cadena de glicano proximal al péptido. La región de cadena principal contribuye principalmente a la longitud de la cadena de glicano formada mediante elongación uniforme. La región periférica exhibe un alto grado de complejidad estructural. La complejidad estructural de los glicanos O-ligados empieza con la estructura del núcleo. En la mayoría de casos, el primer residuo de azúcar añadido al sitio de consenso de glicano O-ligado es GalNAc; sin embargo, el azúcar puede ser también GlcNAc, glucosa, manosa, galactosa o fucosa, entre otros. La Figura 12 es un diagrama de algunas de las estructuras de núcleo de glicano O-ligado conocidas y las enzimas responsables de su síntesis *in vivo*.

En células de mamífero, se encuentran al menos 8 diferentes estructuras de núcleo O-ligado, todas basadas en el núcleo a- residuo de GalNAc. Las cuatro estructuras de núcleo representadas en la Figura 13 son las más comunes. El núcleo 1 y el núcleo 2 son las estructuras más abundantes en células de mamífero, y el núcleo 4 se encuentran en sistemas de expresión más restringidos característicos de órgano. Los glicanos O-ligados se revisan en Montreuil, "Structure and Synthesis of Glycopeptides", en "Polysaccharides in Medicinal Applications", pág. 273-327, 1996, Eds. Severian Damitriu, Marcel Dekker, NY y en Schachter y Brockhausen, "The Biosynthesis of Branched O-Linked Glycans, 1989", Society for Experimental Biology, pág. 1-26 (Gran Bretaña).

Resultará evidente a partir de la presente divulgación que la estructura de glicano de péptidos O-glicosilados puede remodelarse usando técnicas similares a las descritas para glicanos N-ligados. Los O-glicanos difieren de los N-glicanos en que están ligados con un residuo de serina o treonina en lugar de un residuo de asparagina. Como se describe en la presente memoria con respecto a la remodelación de N-glicanos, pueden usarse enzimas hidrolíticas para escindir los restos de azúcar indeseados en un glicano O-ligado y pueden añadirse entonces azúcares adicionales deseados al mismo para construir una estructura de O-glicano personalizada en el péptido (véanse las Figuras 12 y 13).

La etapa inicial de la O-glicosilación en células de mamífero es la unión de N-acetilgalactosamina (GalNAc) usando cualquiera de una familia de al menos 11  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminiltransferasas conocidas, cada una de las cuales tiene una especificidad de péptido aceptor restringida. Generalmente, el péptido aceptor reconocido por cada enzima constituye una secuencia de al menos 10 aminoácidos. Los péptidos que contienen la secuencia aminoácida reconocida por una GalNAc-transferasa particular se vuelven O-glicosilados en el sitio aceptor si se expresan en una célula que expresa la enzima y si están apropiadamente localizados en el aparato de Golgi, donde está también presente UDP-GalNAc.

Sin embargo, en el caso de proteínas recombinantes, la unión inicial de GalNAc puede no tener lugar. La enzima  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminiltransferasa nativa de la célula de expresión puede tener una especificidad de secuencia consenso que difiera de la del péptido recombinante que se está expresando.

El péptido recombinante deseado puede expresarse en una célula bacteriana, tal como *E. coli*, que no sintetice cadenas de glicano. En estos casos, es ventajoso añadir el resto de GalNAc inicial *in vitro*. El resto de GalNAc puede introducirse *in vitro* en el péptido una vez se ha recuperado el péptido recombinante en forma soluble, poniendo en contacto el péptido con la GalNAc transferasa apropiada en presencia de UDP-GalNAc.

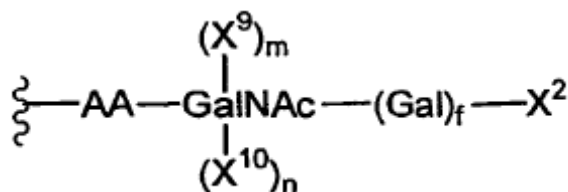
5 En una realización, puede estar presente una secuencia aminoacídica adicional que constituye un aceptor eficaz para la transferencia de un azúcar O-ligado. Dicha secuencia aminoacídica está codificada por una secuencia de ADN fusionada en fase con la secuencia de codificación del péptido o, como alternativa, puede introducirse por medios químicos. El péptido puede carecer de otro modo de cadenas de glicano. Como alternativa, el péptido puede tener cadenas de glicano N- y/o O-ligado pero requerir un sitio de glicosilación adicional, por ejemplo, cuando se desea un sustituyente de glicano adicional.

En una realización ejemplar, se añade como marcaje de fusión la secuencia aminoacídica PTTTK-COOH, que es la secuencia aceptora de GalNAc natural en la mucina humana MUC-1. Se expresa entonces la proteína de fusión en *E. coli* y se purifica. Se pone en contacto entonces el péptido con las GalNAc transferasas humanas recombinantes T3 o T6 en presencia de UDP-GalNAc para transferir un residuo de GalNAc al péptido *in vitro*.

15 La cadena de glicano del péptido puede elongarse entonces adicionalmente usando los métodos descritos con referencia a los glicanos N-ligados u O-ligados en la presente memoria. Como alternativa, la reacción de GalNAc transferasa puede llevarse a cabo en presencia de UDP-GalNAc en la que el PEG está covalentemente sustituido en las posiciones O-3, 4 o 6 o en la posición N-2. La glicoconjugación se describe con detalle en otro lugar de la presente memoria. Cualquier antigenicidad introducida en el péptido por la nueva secuencia peptídica puede enmascarse convenientemente mediante la PEGilación del glicano asociado. La técnica de fusión del sitio aceptor puede usarse para introducir no solo un resto de PEG, sino para introducir otros restos de glicano y no glicano incluyendo, pero sin limitación, toxinas, antiinfecciosos, agentes citotóxicos, quelantes de radionucleótidos y glicanos con otras funcionalidades, tales como orientación a tejido.

#### Realizaciones ejemplares

25 La remodelación de la glicosilación O-ligada se ilustra mejor con referencia a la fórmula 2:



La Fórmula 2 describe una estructura de glicano que comprende una GalNAc que está covalentemente ligada preferiblemente con un residuo de serina o treonina en una cadena principal peptídica. Aunque esta estructura se usa para ilustrar las formas más comunes de glicanos O-ligados, no debería considerarse que limita la invención solamente a estos glicanos O-ligados. Se ilustran en la Figura 12 otras formas de glicanos O-ligados. Los sistemas de expresión preferidos útiles en la presente invención expresan y secretan péptidos exógenos que tienen glicanos O-ligados que comprenden el residuo de GalNAc. Usando los métodos de remodelación de la invención, las estructuras de glicano de estos péptidos pueden remodelarse convenientemente para generar cualquier estructura de glicano deseada. Un especialista en la materia apreciará que los glicanos O-ligados pueden remodelarse usando los mismos principios, enzimas y condiciones de reacción que los disponibles en la materia una vez provisto de la presente divulgación. Las condiciones de reacción ejemplares se encuentran a lo largo de los ejemplos.

En realizaciones preferidas, se remodelan las estructuras de glicano de modo que la estructura descrita en la Fórmula 2 tenga restos específicos. La estructura del glicano puede elegirse para potenciar la actividad biológica del péptido, conferir al péptido una nueva actividad biológica, eliminar o alterar una actividad biológica del péptido o aproximarse mejor al patrón de glicosilación del péptido nativo, entre otros.

En la primera realización preferida, se remodelan los glicanos O-ligados con péptido para aproximarse mejor al patrón de glicosilación de proteínas humanas nativas. En esta realización, se remodela la estructura de glicano descrita en la Fórmula 2 para tener los siguientes restos:

$\text{X}^2$  es |-SA; o |-SA-SA;

45 f y n=0 o 1;

$\text{X}^{10}$  es SA;

m= 0.

Esta realización es particularmente ventajosa para péptidos humanos expresados en sistemas de expresión celular heterólogos. Al remodelar las estructuras de glicano O-ligado para tener esta configuración, el péptido puede volverse menos inmunogénico en un paciente humano y/o más estable.

5 En otra realización preferida, se remodelan los glicanos O-ligados con péptido para exhibir un antígeno de Lewis X sialilado. En esta realización, se remodela la estructura de glicano descrita en la Fórmula 2 para tener los siguientes restos:

$X^2$  es  $\beta$ -SA;

$X^{10}$  es Fuc o  $\beta$ -GlcNAc(Fuc)Gal-SA;

fandn= 1;

10 m= 0.

Esta realización es particularmente ventajosa cuando el péptido que se está remodelando es más eficaz cuando se orienta a una molécula de selectina y a células que exhiben la misma.

15 En aún otra realización preferida, se remodelan los glicanos O-ligados con péptido para contener un resto conjugado. El resto conjugado puede ser una molécula de PEG, otro péptido o una molécula pequeña tal como un fármaco, entre otras. En esta realización, se remodela la estructura de glicano descrita en la fórmula 2 para tener los siguientes restos:

$X^2$  es  $\beta$ -SA-R,

f= 1;

nandm= 0;

en que R es el grupo conjugado.

20 Esta realización es útil para conjugar el péptido con moléculas de PEG que retardarán el aclaramiento del péptido de la corriente sanguínea del paciente, con péptidos que orientarán ambos péptidos a un tejido o célula específico o con otro péptido de uso terapéutico complementario.

25 Resultará evidente para un especialista en la materia que la invención no está limitada a las moléculas de glicano preferidas anteriormente. Las realizaciones preferidas son solo unas pocas de las muchas moléculas de glicano útiles que pueden prepararse usando los métodos de remodelación de la invención. Los especialistas en la materia sabrán cómo diseñar otros glicanos útiles una vez provistos de la presente invención.

En la primera realización ejemplar, el péptido se expresa en CHO (estirpe celular de hámster chino) según métodos bien conocidos en la materia. Cuando un péptido con sitios de consenso de glicano O-ligado se expresa y secreta por células de CHO, la mayoría de los glicanos O-ligados tendrán a menudo la estructura, en términos de la fórmula 2,

30  $X^2 = \beta$ - SA;

f= 1;

m y n= 0.

35 Por lo tanto, la mayoría de los glicanos en células de CHO no requieren remodelación para ser aceptables para uso en un paciente humano. En una realización ejemplar, remodelan los glicanos O-ligados de un péptido expresado y secretado por una célula de CHO para contener una estructura de Lewis X sialilado poniendo en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica del resto aceptor de GalNAc y el resto donante de fucosa en presencia de fucosa-nucleótido. Este proceso se ilustra en glicanos N-ligados en la Figura 11 y el Ejemplo 39.

40 En otras realizaciones ejemplares, el péptido se expresa en células e insecto tales como Sf9 según métodos bien conocidos en la materia. Cuando se expresa un péptido que tiene sitios de consenso de glicano O-ligado y se secreta por la mayoría de células Sf9, la mayoría de los glicanos O-ligados tiene la estructura, en términos de la fórmula 2:

$X^2 = H$ ;

f= 0 o 1;

n y m= 0.

45 Véase, por ejemplo, Marchal *et al.*, (2001, Biol. Chem. 382: 151-159). En una realización ejemplar, se remodela el glicano O-ligado en un péptido expresado en una célula de insecto poniendo en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de GalNAc y una molécula donante de galactosa en presencia de Gal-nucleótido; y poniendo entonces en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula



aceptora de Gal y una molécula donante de SA en presencia de SA-nucleótido. En otra realización ejemplar, se remodelan los glicanos O-ligados adicionalmente a partir de la forma humanizada de Lewis X sialilado poniendo en contacto adicionalmente los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptora de GalNAc y una molécula donante de fucosa en presencia de fucosa-nucleótido.

- 5 En aún otra realización ejemplar, el péptido se expresa en células fúngicas, en particular células de *S. cerevisiae*, según métodos bien conocidos en la materia. Cuando un péptido con sitios de consenso de glicanos O-ligados se expresa y secreta por células de *S. cerevisiae*, la mayoría de los glicanos O-ligados tiene la estructura:

| - AA-Man-Man<sub>1-2</sub>.

- 10 Véase Gemmill y Trimble (1999, *Biochim. Biophys. Acta* 1426: 227-237). Para remodelar estos glicanos O-ligados para uso en seres humanos, es preferible que el glicano se escinda a nivel aminoacídico y se reconstruya a partir de ahí.

- 15 En una realización ejemplar, el glicano es el glicano O-ligado en un péptido expresado en una célula fúngica y se remodela hasta un glicano humanizado poniendo en contacto el glicano con una endoglicosilasa específica de un enlace aminoácido-GalNAc; y poniendo entonces en contacto el glicano con una glicosiltransferasa específica de un sitio de consenso O-ligado y una molécula donante de GalNAc en presencia de GalNAc- nucleótido; poniendo en contacto el glicano con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptora de GalNAc y una molécula donante de galactosa en presencia de Gal-nucleótido; y poniendo entonces en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptora de Gal y una molécula donante de SA en presencia de SA-nucleótido.

- 20 Como alternativa, en otra realización ejemplar, el glicano es el glicano O-ligado en un péptido expresado en una célula fúngica y se remodela hasta un glicano humanizado poniendo en contacto el glicano con una proteína O-manosa  $\beta$ -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (POMGnTI) en presencia de GlcNAc-nucleótido; poniendo entonces en contacto el glicano con una galactosiltransferasa en presencia de Gal-nucleótido y poniendo entonces en contacto el glicano con una sialiltransferasa en presencia de SA-nucleótido.

- 25 En otra realización ejemplar, el péptido se expresa en células bacterianas, en particular células de *E. coli*, según métodos bien conocidos en la materia. Cuando se expresa en células de *E. coli* un péptido con un sitio de consenso de glicano O-ligado, el sitio de consenso O-ligado no estará glicosilado. En este caso, la molécula de glicano deseada debe construirse a partir de la cadena peptídica de manera similar a la que se describe para la expresión de *S. cerevisiae* anteriormente. Además, cuando se expresa un péptido que tiene un glicano O-ligado en una célula eucariótica sin las secuencias líder apropiadas para dirigir el péptido naciente al aparato de Golgi, el péptido maduro es probable que no esté glicosilado. En este caso también, puede añadirse una estructura de glicosilo O-ligado al péptido construyendo el glicano directamente a partir del sitio de consenso O-ligado con el péptido. Además, cuando se modifica químicamente una proteína con un resto de azúcar, puede remodelarse también como se describe en la presente memoria.

- 30 Estos ejemplos se pretende que ilustren la invención, y no que la limiten en modo alguno. Un especialista en la materia apreciará que las etapas realizadas en cada ejemplo pueden efectuarse en algunas circunstancias en un orden diferente para conseguir el mismo resultado. Un especialista en la materia entenderá también que un conjunto diferente de etapas puede producir también el mismo glicano resultante. Además, el glicano remodelado preferido no es en modo alguno específico del sistema de expresión en que se expresa el péptido. Los glicanos remodelados son solo ilustrativos y un especialista en la materia sabrá cómo tomar los principios de estos ejemplos y aplicarlos a péptidos producidos en diferentes sistemas de expresión para generar glicanos no descritos específicamente en la presente memoria.

### C. Glicoconjugación en general

- 40 La invención proporciona métodos de preparación de un conjugado de un péptido glicosilado o no glicosilado. Los conjugados de la invención se forman entre péptidos y diversas especies tales como polímeros hidrosolubles, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, restos orientadores y similares. Se proporcionan también conjugados que incluyen dos o más péptidos ligados conjuntamente a través de un brazo ligador, concretamente, conjugados multifuncionales. Los conjugados multifuncionales de la invención pueden incluir dos o más copias del mismo péptido o una colección de diversos péptidos con diferentes estructuras y/o propiedades.

- 45 Los conjugados de la invención se forman mediante la unión enzimática de un azúcar modificado al péptido glicosilado o no glicosilado. El azúcar modificado, cuando se intercala entre el péptido y el grupo modificador del azúcar, se convierte en lo que se designa en la presente memoria como "un grupo ligante de glicosilo intacto". Usando la exquisita selectividad de enzimas tales como las glicosiltransferasas, el presente método proporciona péptidos que portan un grupo deseado en una o más localizaciones específicas. Por tanto, según la presente invención, se une directamente un azúcar modificado a un lugar seleccionado de la cadena peptídica o, como alternativa, se adjunta el azúcar modificado a un resto de carbohidrato de un péptido. Los péptidos en que se ligan azúcares modificados tanto con un carbohidrato de péptido como directamente con un residuo aminoacídico de la cadena principal peptídica están también dentro del alcance de la presente invención.

- 55 En contraposición con las estrategias de elaboración de péptidos químicas y enzimáticas conocidas, los métodos de la invención hacen posible ensamblar péptidos y glicopéptidos que tienen un patrón de derivatización sustancialmente homogéneo; las enzimas usadas en la invención son generalmente selectivas de un residuo aminoacídico particular o

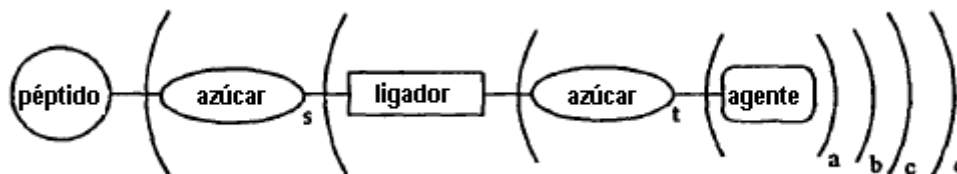
una combinación de residuos aminoacídicos del péptido o estructura de glicano particular. Los métodos son también prácticos para la producción a gran escala de péptidos modificados y glicopéptidos. Por tanto, los métodos de la invención proporcionan un medio práctico para la preparación a gran escala de péptidos que tienen patrones de derivatización sustancialmente uniformes preseleccionados. Los métodos son particularmente bien adecuados para la modificación de péptidos terapéuticos incluyendo, pero sin limitación, péptidos que se glicosilan incompletamente durante la producción en células de cultivo celular (por ejemplo, células de mamífero, células de insecto, células de planta, célula fúngicas, células de levadura o células procarióticas) o plantas o animales transgénicos.

Los métodos de la invención proporcionan también conjugados de péptidos glicosilados y no glicosilados con péptidos de semivida terapéutica aumentada debido, por ejemplo, a una tasa de aclaramiento reducida o a una tasa de captación reducida por el sistema inmunitario o reticuloendotelial (SRE). Además, los métodos de la invención proporcionan un medio para enmascarar determinantes antigénicos en péptidos, reduciendo o eliminando así la respuesta inmunitaria de un hospedador ante el péptido. Puede usarse también la unión selectiva de agentes orientadores para orientar un péptido a un receptor de tejido o superficie celular particular que es específico del agente orientador particular. Además, se proporciona una clase de péptidos que se modifican específicamente con un resto terapéutico.

### 1. Conjugados

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un péptido y un resto seleccionado. El nexo entre el péptido y el resto seleccionado incluye un grupo ligante de glicosilo intacto intercalado entre el péptido y el resto seleccionado. Como se discute en la presente memoria, el resto seleccionado es esencialmente cualquier especie que pueda unirse a una unidad de sacárido, dando como resultado un "azúcar modificado" que se reconoce por una enzima transferasa apropiada, que adjunta el azúcar modificado al péptido. El componente sacárido del azúcar modificado, cuando se intercala entre el péptido y un resto seleccionado, se vuelve un "grupo ligante de glicosilo intacto". El grupo ligante de glicosilo se forma a partir de cualquier mono- u oligosacárido que, después de la modificación con un resto seleccionado, sea un sustrato de una transferasa apropiada.

Los conjugados de la invención corresponderán típicamente a la estructura general:



en que los símbolos a, b, c, d y s representan un entero positivo no nulo y t es 0 o un entero positivo. El "agente" es un agente terapéutico, un agente bioactivo, un marcador detectable, un resto hidrosoluble o similar. El "agente" puede ser un péptido, por ejemplo, enzima, anticuerpo, antígeno, etc. El ligador puede ser cualquiera de una amplia gama de grupos ligantes a continuación. Como alternativa, el ligador puede ser un enlace sencillo o "ligador de orden cero". La identidad del péptido no tiene límites. Se proporcionan péptidos ejemplares en la Figura 28.

En una realización ejemplar, el resto seleccionado es un polímero hidrosoluble. El polímero hidrosoluble está unido covalentemente con el péptido a través de un grupo ligante de glicosilo intacto. El grupo ligante de glicosilo está unido covalentemente con un residuo aminoacídico o un residuo de glicosilo del péptido. Como alternativa, el grupo ligante de glicosilo está unido a una o más unidades de glicosilo de un glicopéptido. La invención proporciona también conjugados en que el grupo ligante de glicosilo está unido tanto a un residuo aminoacídico como a un residuo de glicosilo.

Además de proporcionar conjugados que se forman mediante un grupo ligante de glicosilo intacto añadido enzimáticamente, la presente invención proporciona conjugados que son altamente homogéneos en sus patrones de sustitución. Usando los métodos de la invención, es posible formar conjugados peptídicos en que esencialmente todos los restos de azúcar modificado de una población de conjugados de la invención estén unidos a múltiples copias de un residuo aminoacídico o de glicosilo estructuralmente idéntico. Por tanto, en un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos poliméricos hidrosolubles que están ligados covalentemente con el péptido a través de un grupo ligante de glicosilo intacto. En un conjugado preferido de la invención, esencialmente cada miembro de la población está ligado a través del grupo ligante de glicosilo con un residuo de glicosilo de péptido, y cada residuo de glicosilo del péptido al que está unido el grupo ligante de glicosilo tiene la misma estructura.

Se proporciona también un conjugado peptídico que tiene una población de restos poliméricos hidrosolubles ligados covalentemente con el mismo a través de un grupo ligante de glicosilo intacto. En una realización preferida, esencialmente cada miembro de la población de restos poliméricos hidrosolubles está ligado con un residuo aminoacídico del péptido a través de un grupo ligante de glicosilo intacto, y cada residuo aminoacídico que tiene unido un grupo ligante de glicosilo intacto al mismo tiene la misma estructura.

La presente invención proporciona también conjugados análogos a los descritos anteriormente en que el péptido se conjuga con un resto terapéutico, resto de diagnóstico, resto orientador, resto de toxina o similar a través de un grupo ligante de glicosilo intacto. Cada uno de los restos anteriormente enumerados puede ser una molécula pequeña, polímero natural (por ejemplo, péptido) o polímero sintético.

5 Como se expone en las Figuras adjuntas a la presente memoria, los conjugados de la invención pueden incluir grupos ligantes de glicosilo intactos que son mono- o multivalentes (por ejemplo, estructuras antenadas), véanse las Figuras 14-22. Los conjugados de la invención incluyen también grupos ligantes de glicosilo que son glicanos O-ligados originarios de serina o treonina (Figura 11). Por tanto, los conjugados de la invención incluyen ambas especies en que un resto seleccionado se une a un péptido a través de un grupo ligante de glicosilo monovalente. Se incluyen también  
10 en la invención conjugados en que se une más de un resto seleccionado a un péptido a través de un grupo ligante multivalente. Pueden conjugarse conjuntamente una o más proteínas para aprovechar sus propiedades biofísicas y biológicas.

En una realización adicional más, la invención proporciona conjugados que se localizan selectivamente en un tejido particular debido a la presencia de un agente orientador como componente del conjugado. En una realización ejemplar,  
15 el agente orientador es en particular una proteína.

Además de los conjugados discutidos anteriormente, la presente invención proporciona métodos para preparar estos y otros conjugados. Por tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método de formación de un conjugado covalente entre un resto seleccionado y un péptido. Adicionalmente, la invención proporciona métodos para orientar conjugados de la invención a un tejido o región particular del cuerpo.

20 En realizaciones ejemplares, se forma el conjugado entre un polímero hidrosoluble, un resto terapéutico, resto orientador o biomolécula y un péptido glicosilado o no glicosilado. El polímero, resto terapéutico o biomolécula se conjuga con el péptido a través de un grupo ligante de glicosilo intacto, que se intercala entre y está ligado covalentemente tanto con el péptido como con el grupo modificador (por ejemplo, polímero hidrosoluble). El método incluye poner en contacto el péptido con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una glicosiltransferasa para la  
25 que el azúcar modificado sea un sustrato. La reacción se realiza en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido. El resto de azúcar del azúcar modificado se selecciona preferiblemente de azúcares-nucleótidos, azúcares activados y azúcares que no tienen nucleótidos ni están activados.

En una realización, la invención proporciona un método para ligar dos o más péptidos a través de un grupo ligante. El grupo ligante es de cualquier estructura útil y puede seleccionarse de estructuras de cadena lineal y de cadena  
30 ramificada. Preferiblemente, cada extremo del ligador que está unido a un péptido incluye un azúcar modificado (concretamente, un grupo ligante de glicosilo intacto naciente).

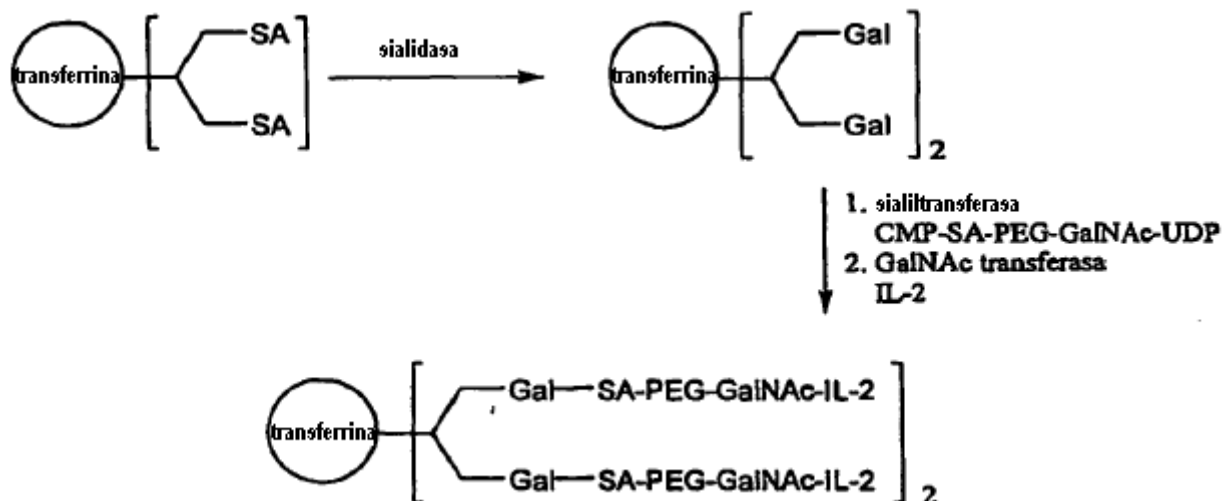
En un método ejemplar de la invención, se ligan dos péptidos conjuntamente a través de un resto ligador que incluye un ligador de PEG. La construcción se ajusta a la estructura general expuesta en el dibujo anterior. Como se describe en la presente memoria, la construcción de la invención incluye dos grupos ligantes de glicosilo intactos (concretamente, s +  
35 t= 1). Centrarse en un ligador de PEG que incluye dos grupos glicosilo es por razones de claridad y no debería interpretarse como limitante de la identidad de los brazos ligadores de uso en esta realización de la invención.

Por tanto, se funcionaliza un resto de PEG en un primer extremo con una primera unidad de glicosilo y en un segundo extremo con una segunda unidad de glicosilo. Las primera y segunda unidades de glicosilo son preferiblemente sustratos de diferentes transferasas, que permiten una unión ortogonal del primer y segundo péptidos con la primera y  
40 segunda unidades de glicosilo, respectivamente. En la práctica, se pone en contacto el ligador de (glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup> con el primer péptido y una primera transferasa para la que la primera unidad de glicosilo es un sustrato, formando así (péptido)<sup>1</sup>-(glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup>. Se elimina opcionalmente entonces la primera transferasa y/o el péptido no reaccionado de la mezcla de reacción. Se añaden el segundo péptido y una segunda transferasa para la que la segunda unidad de glicosilo es un sustrato al conjugado de (péptido)<sup>1</sup>-(glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup>, formando un  
45 (péptido)<sup>1</sup>-(glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup>-(péptido)<sup>2</sup>. Los expertos en la materia apreciarán que el método esbozado anteriormente es también aplicable para formar conjugados entre más de dos péptidos, por ejemplo, mediante el uso de un PEG ramificado, dendrímero, poliaminoácido, polisacárido o similar.

Como ejemplo de referencia, se conjuga interleucina 2 (IL-2) con transferrina a través de un ligador bifuncional que incluye un grupo ligante de glicosilo intacto en cada extremo del resto de PEG (Esquema 1). El conjugado de IL-2 tiene una semivida *in vivo* que está aumentada frente a la de la IL-2 sola en virtud del mayor tamaño molecular del conjugado.  
50 Además, la conjugación de IL-2 con transferrina sirve para orientar selectivamente el conjugado al cerebro. Por ejemplo, un extremo del ligador de PEG está funcionalizado con un CMP-ácido siálico y el otro está funcionalizado con un UDP-GalNAc. El ligador se combina con IL-2 en presencia de una GalNAc transferasa, dando como resultado la unión de la GalNAc del brazo ligador con un residuo de serina y/o treonina en IL-2.

55

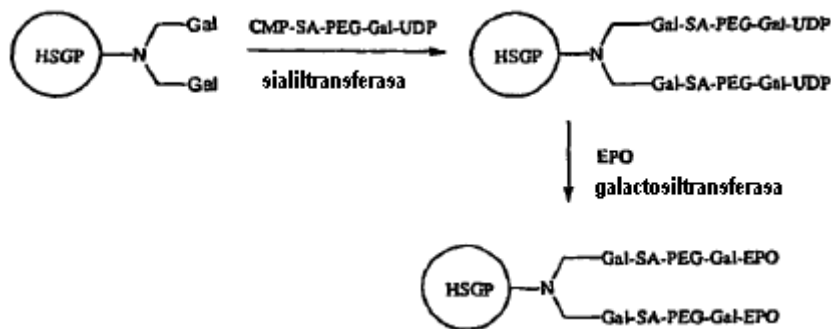
Esquema 1



5 Los procesos descritos anteriormente pueden ponerse en práctica durante todos los ciclos deseados, y no están limitados a formar un conjugado entre dos péptidos con un solo ligador. Además, los especialistas en la materia apreciarán que las reacciones que funcionalizan los grupos ligantes de glicosilo intactos en los extremos del ligador de PEG (u otro) con el péptido pueden ocurrir simultáneamente en el mismo recipiente de reacción, o pueden llevarse a cabo por etapas. Cuando las reacciones se llevan a cabo por etapas, el conjugado producido en cada etapa se purifica opcionalmente de uno o más componentes de reacción (por ejemplo, enzimas, péptidos).

10 Se expone una realización ejemplar más en el Esquema 2. El Esquema 2 muestra un método de preparación de un conjugado que orienta una proteína seleccionada a hueso y que aumenta la semivida en circulación de la proteína seleccionada.

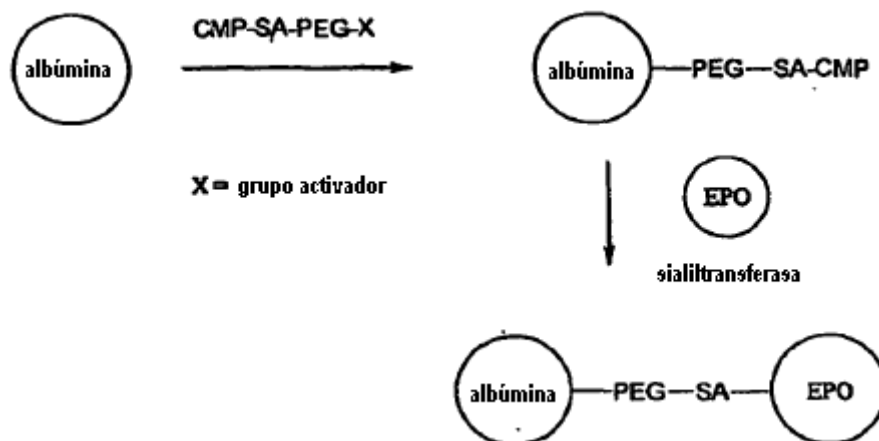
Esquema 2



15 El uso de derivados reactivos de PEG (u otros ligadores) para unir uno o más restos peptídicos con el ligador está dentro del alcance de la presente invención. La invención no está limitada a la identidad del análogo de PEG reactivo. Muchos derivados activados de polietilenglicol están disponibles comercialmente y en la bibliografía. Está dentro de las habilidades de un especialista en la materia elegir, y sintetizar si es necesario, un derivado de PEG activado apropiado con el que preparar un sustrato útil en la presente invención. Véanse Abuchowski *et al.* Cancer Biochem. Biophys., 7: 175-186 (1984); Abuchowski *et al.*, J. Biol. Chem., 252: 3582-3586 (1977); Jackson *et al.*, Anal. Biochem., 165: 114-127 (1987); Koide *et al.*, Biochem Biophys. Res. Common., 111: 659-667 (1983), tresilato (Nilsson *et al.*, Methods Enzymol., 104: 56-69 (1984); Delgado *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem., 12: 119-128 (1990)); ésteres activos derivados de N-hidroxisuccinimida (Buckmann *et al.*, Makromol. Chem., 182: 1379-1384 (1981); Joppich *et al.*, Makromol. Chem., 180: 1381-1384 (1979); Abuchowski *et al.*, Cancer Biochem. Biophys., 7: 175-186 (1984); Katre *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 1487-1491 (1987); Kitamura *et al.*, Cancer Res., 51: 4310-4315 (1991); Boccu *et al.*, Z. Naturforsch., 38C: 94-99 (1983), carbonatos (Zalipsky *et al.*, "POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS", Harris, Ed., Plenum Press, Nueva York, 1992, pág. 347-370; Zalipsky *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem., 15: 100-114 (1992); Veronese *et al.*, Appl. Biochem. Biotech., 11: 141-152 (1985)), formiatos de imidazolilo (Beauchamp *et al.*, Anal. Biochem., 131: 25-33 (1983); Berger *et al.*, Blood, 71: 1641-1647 (1988)), 4-ditiopiridinas (Woghiren *et al.*, Bioconjugate Chem., 4: 314-318 (1993)), isocianatos (Byun *et al.*, ASAIO Journal, M649-M-653 (1992)) y epóxidos (patente de EE.UU. n° 4.806.595, expedida a Noishiki *et al.*, (1989). Otros grupos ligantes incluyen el ligamiento de uretano entre grupos amino y PEG activado. Véase Veronese, *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol., 11: 141-152 (1985).

En otro ejemplo de referencia en que se utiliza un derivado de PEG reactivo, la invención proporciona un método para prolongar la semivida en circulación sanguínea de un péptido seleccionado, en esencia orientando el péptido al conjunto de la sangre, conjugando el péptido con un polímero sintético o natural de un tamaño suficiente para retardar la filtración de la proteína por los glomérulos (por ejemplo, albúmina). Esta realización de la invención se ilustra en el Esquema 3, en que se conjuga eritropoyetina (EPO) con albúmina a través de un ligador de PEG usando una combinación de modificación química y enzimática.

Esquema 3



Por tanto, como se muestra en el Esquema 3, se modifica un residuo aminoacídico de albúmina con un derivado de PEG reactivo, tal como X-PEG-(CMP-ácido siálico), en que X es un grupo activador (por ejemplo, éster activo, isotiocianato, etc.). El derivado de PEG y la EPO se combinan y se ponen en contacto con una transferasa para la que el CMP-ácido siálico sea un sustrato. En una realización ilustrativa adicional, se hace reaccionar una  $\epsilon$ -amina de lisina con el éster de N-hidroxisuccinimida del ligador de PEG, formando el conjugado de albúmina. El CMP-ácido siálico del ligador se conjuga enzimáticamente con un residuo apropiado de la EPO, por ejemplo Gal, formando así el conjugado. Los especialistas apreciarán que el método anteriormente descrito no está limitado a las parejas de reacción expuestas. Además, el método puede practicarse para formar conjugados que incluyen más de dos restos proteicos, por ejemplo, utilizando un ligador ramificado que tenga más de dos extremos.

## 2. Azúcares modificados

Las especies donantes de glicosilo modificadas ("azúcares modificados") se seleccionan preferiblemente de azúcares-nucleótidos modificados, azúcares modificados activados y azúcares modificados que son sacáridos sencillos que no están unidos a nucleótidos ni activados. Puede añadirse cualquier estructura de carbohidrato deseada a un péptido usando los métodos de la invención. Típicamente, la estructura será un monosacárido, pero la presente invención no está limitada al uso de azúcares monosacáridos modificados; los oligosacáridos y polisacáridos son también útiles.

El grupo modificador se une a un resto de azúcar por medios enzimáticos, medios químicos o una combinación de los mismos, produciendo así un azúcar modificado. Los azúcares se sustituyen en cualquier posición que permita la unión del resto modificador, pero que siga permitiendo al azúcar funcionar como sustrato de la enzima usada para ligar el azúcar modificado con el péptido. En una realización preferida, cuando el azúcar es ácido siálico, el ácido siálico se sustituye con el grupo modificador en posición 9 de la cadena lateral de piruvilo o en posición 5 del resto amino que está normalmente acetilado en el ácido siálico.

En ciertas realizaciones de la presente invención, se utiliza un azúcar-nucleótido modificado para añadir el azúcar modificado al péptido. Los azúcares-nucleótidos ejemplares que se usan en la presente invención en su forma modificada incluyen mono-, di- o trifosfatos nucleotídicos o análogos de los mismos. En una realización preferida, el azúcar-nucleótido modificado se selecciona de UDP-glicósido, CMP-glicósido o GDP-glicósido. Aún más preferiblemente, el azúcar-nucleótido modificado se selecciona de UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, GDP-manosa, GDP-fucosa, CMP-ácido siálico o CMP-NeuAc. Los derivados de N-acetilamina de los azúcares-nucleótidos son también de uso en el método de la invención.

La invención proporciona también métodos para sintetizar un péptido modificado usando un azúcar modificado, por ejemplo, galactosa, fucosa y ácido siálico modificados. Cuando se usa un ácido siálico modificado, puede usarse una sialiltransferasa o una trans-sialidasa (para ácido siálico  $\alpha$ 2,3-ligado solo) en estos métodos.

En otras realizaciones, el azúcar modificado es un azúcar activado. Los azúcares modificados activados que son útiles en la presente invención son típicamente glicósidos que se han alterado sintéticamente para incluir un grupo saliente activado. Como se usa en la presente memoria, el término "grupo saliente activado" designa aquellos restos que se desplazan fácilmente en reacciones de sustitución nucleófila reguladas enzimáticamente. Son conocidos en la materia

muchos azúcares activados. Véanse, por ejemplo, Vocadlo *et al.* en "CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOLOGY", Vol. 2, Ernst *et al.* Ed., Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Alemania, 2000; Kodama *et al.*, Tetrahedron Lett. 34: 6419 (1993); Loughheed *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 37717 (1999)).

5 Los ejemplos de grupos activadores (grupos salientes) incluyen fluoro, cloro, bromo, éster tosilato, éster mesilato, éster triflato y similares. Los grupos salientes activados preferidos para uso en la presente invención son aquellos que no estorban estéricamente de forma significativa la transferencia enzimática del glicósido al aceptor. En consecuencia, las realizaciones preferidas de derivados de glicósido activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, prefiriéndose particularmente los fluoruros de glicosilo. Entre los fluoruros de glicosilo, son más preferidos fluoruro de  $\alpha$ -galactosilo, fluoruro de  $\alpha$ -manosilo, fluoruro de  $\alpha$ -glucosilo, fluoruro de  $\alpha$ -fucosilo, fluoruro de  $\alpha$ -xilosilo, fluoruro de  $\alpha$ -sialilo, fluoruro de  $\alpha$ -N-acetilglucosaminilo, fluoruro de  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminilo, fluoruro de  $\beta$ -galactosilo, fluoruro de  $\beta$ -manosilo, fluoruro de  $\beta$ -glucosilo, fluoruro de  $\beta$ -fucosilo, fluoruro de  $\beta$ -xilosilo, fluoruro de  $\beta$ -sialilo, fluoruro de  $\beta$ -N-acetilglucosaminilo y fluoruro de  $\beta$ -N-acetilgalactosaminilo.

15 A modo de ilustración, pueden prepararse fluoruros de glicosilo a partir del azúcar libre acetilando en primer lugar el azúcar y tratándolo entonces con HF/piridina. Esto genera el anómero termodinámicamente más estable del fluoruro de glicosilo protegido (acetilado) (concretamente, el fluoruro de  $\alpha$ -glicosilo). Si se desea el anómero menos estable (concretamente, el fluoruro de  $\beta$ -glicosilo), puede prepararse convirtiendo el azúcar peracetilado con HBr/AcOH o con HCl para generar el bromuro de cloruro anomérico. Este intermedio se hace reaccionar con una sal de fluoruro tal como fluoruro de plata para generar el fluoruro de glicosilo. Los fluoruros de glicosilo acetilados pueden desprotegerse mediante reacción con una base débil (catalítica) en metanol (por ejemplo, NaOMe/MeOH). Además, están comercialmente disponibles muchos fluoruros de glicosilo.

Pueden prepararse otros derivados de glicosilo activados usando métodos convencionales conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, pueden prepararse mesilatos de glicosilo mediante el tratamiento de la forma de hemiacetal totalmente bencilado del azúcar con cloruro de mesilo, seguido de hidrogenación catalítica para eliminar los grupos bencilo.

25 En una realización ejemplar adicional, el azúcar modificado es un oligosacárido que tiene una estructura antenada. En una realización preferida, uno o más de los extremos de las antenas portan el resto modificador. Cuando está unido más de un resto modificador a un oligosacárido que tiene estructura antenada, el oligosacárido es útil para "amplificar" el resto modificador; cada unidad oligosacárida conjugada con el péptido une múltiples copias del grupo modificador al péptido. La estructura general de un quelato típico de la invención como se expone en el dibujo anterior comprende especies multivalentes resultantes de preparar un conjugado de la invención utilizando una estructura antenada. Son conocidas en la materia muchas estructuras sacáridas antenadas, y el presente método puede practicarse con ellas sin limitación.

35 Se discuten a continuación grupos modificadores ejemplares. Los grupos modificadores pueden seleccionarse por una o más propiedades deseables. Las propiedades ejemplares incluyen, pero sin limitación, farmacocinética potenciada, farmacodinámica potenciada, biodistribución mejorada, proporcionar una especie polivalente, solubilidad acuosa mejorada, lipofiliencia potenciada o reducida y orientación a tejido.

#### D. Conjugados peptídicos

##### a) Polímeros hidrosolubles

40 Se potencia la hidrofiliencia de un péptido seleccionado mediante conjugación con moléculas polares tales como moléculas que contienen amina, éster, hidroxilo y polihidroxilo. Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, polilisina, polietiliminina, polietilenglicol y polipropilenglicol. Los polímeros hidrosolubles preferidos son esencialmente no fluorescentes, o emiten una cantidad tan mínima de fluorescencia que son inapropiados para uso como marcador fluorescente en un ensayo. Pueden usarse polímeros que no son azúcares de origen natural. Además, está también contemplado el uso de un azúcar de origen natural por lo demás que está modificado mediante unión covalente de otra entidad (por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, poliaspartato, biomolécula, resto terapéutico, resto de diagnóstico, etc.). En otra realización ejemplar, se conjuga un resto de azúcar terapéutico con un brazo ligador y se conjuga posteriormente el azúcar-brazo ligador con un péptido mediante un método de la invención.

50 Se describen en la bibliografía métodos y químicas para la activación de polímeros hidrosolubles y sacáridos así como métodos para conjugar sacáridos y polímeros con diversas especies. Los métodos usados habitualmente para la activación de polímeros incluyen la activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepoóxidos, epiclorhidrina, divinilsulfona, carbodiimida, haluros de sulfonilo, triclorotriazina, etc. (véanse R. F. Taylor, (1991), "PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS", Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), "CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING", CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson *et al.*, (1993), "IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES", Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L., *et al.*, 55 Eds. "POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS", ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

Son conocidas en la materia rutas para preparar moléculas de PEG reactivas y formar conjugados usando las moléculas reactivas. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.672.662 da a conocer un conjugado hidrosoluble y aislable de un éster

activo de un ácido polimérico seleccionado de poli(óxidos de alquieno) lineales o ramificados, poli(polioles oxietilados), poli(alcoholes olefínicos) y poli(acrilmorfolinas), en el que el polímero tiene aproximadamente 44 o más unidades repetidas.

5 La patente de EE.UU. n° 6.376.604 expone un método para preparar un éster carbonato de 1-benzotriazol hidrosoluble de un polímero hidrosoluble y no peptídico haciendo reaccionar un hidroxilo terminal con carbonato de di-(1-benzotriazol) en un disolvente orgánico. Se usa el éster activo para formar conjugados con un agente biológicamente activo tal como una proteína o péptido.

10 El documento WO 99/45964 describe un conjugado que comprende un agente biológicamente activo y un éster hidrosoluble activado que comprende una cadena principal polimérica que tiene al menos un extremo ligado con la cadena principal polimérica a través de un ligador estable, en el que al menos un extremo comprende un resto ramificador que tiene grupos reactivos proximales ligados con el resto ramificador, en el que el agente biológicamente activo está ligado con al menos uno de los grupos reactivos proximales. Se describen en el documento WO 96/21469 otros polietilenglicoles ramificados. La patente de EE.UU. n° 5.932.462 describe un conjugado formado con una molécula de PEG ramificada que incluye un extremo ramificado que incluye grupos funcionales reactivos. Los grupos reactivos libres están disponibles para reaccionar con una especie biológicamente activa, tal como una proteína o péptido, formando conjugados entre el polietilenglicol y la especie biológicamente activa. La patente de EE.UU. n° 5.446.090 describe un ligador de PEG bifuncional y su uso en la formación de conjugados que tienen un péptido en cada uno de los extremos del ligador de PEG.

20 Se describen conjugados que incluyen ligamientos de PEG degradables en el documento WO 99/34833 y WO 99/14259, así como en la patente de EE.UU. n° 6.348.558. Dichos ligamientos degradables son aplicables en la presente invención.

Aunque son conocidos en la materia tanto derivados de PEG reactivos como conjugados formados usando los derivados, hasta la presente invención, no se había reconocido que podría formarse un conjugado entre PEG (u otro polímero) y otra especie, tal como un péptido o glicopéptido, a través de un grupo ligante de glicosilo intacto.

25 Son conocidos por los especialistas en la materia muchos polímeros hidrosolubles y son útiles para practicar la presente invención. El término polímero hidrosoluble comprende especies tales como sacáridos (por ejemplo, dextrano amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poliaminoácidos, por ejemplo, poli(ácido glutámico); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido acrílico); poliéteres, por ejemplo polietilenglicol; péptidos; proteínas y similares. La presente invención puede practicarse con cualquier polímero hidrosoluble con la única limitación de que el polímero debe incluir un punto en el que se pueda unirse el resto del conjugado.

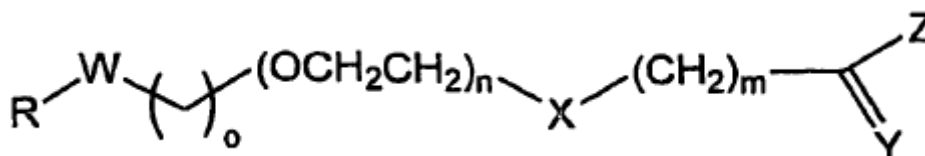
30 Pueden encontrarse también métodos para la activación de polímeros en los documentos WO 94/17039, patente de EE.UU. n° 5.324.844, WO 94/18247, WO 94/04193, patente de EE.UU. n° 5.219.564, patente de EE.UU. n° 5.122.614, WO 90/13540, patente de EE.UU. n° 5.281.698 y además WO 93/15189, y para la conjugación entre polímeros activados y péptidos, por ejemplo factor de coagulación VIII (documento WO 94/15625), hemoglobina (documento WO 94/09027), molécula portadora de oxígeno (patente de EE.UU. n° 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese *et al.*, App. Biochem. Biotech. 11: 141-45 (1985)).

Son polímeros hidrosolubles preferidos aquellos en que una proporción sustancial de las moléculas poliméricas en una muestra de polímero son de aproximadamente el mismo peso molecular; dichos polímeros están "homodispersados".

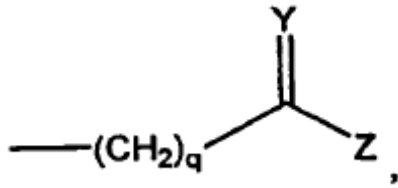
40 La presente invención se ilustra adicionalmente por referencia a un conjugado de polietilenglicol. Están disponibles varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG. Véanse, por ejemplo, Harris, Macromol. Chem. Phys. C25: 325-373 (1985); Scouten, Methods in Enzymology 135: 30-65 (1987); Wong *et al.*, Enzyme Microb. Technol. 14: 866-874 (1992); Delgado *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249-304 (1992); Zalipsky, Bioconjugate Chem. 6: 150-165 (1995) y Barda *et al.*, Pharmazie, 57: 5-29 (2002).

45 Las moléculas de polietilenglicol adecuadas para uso en la invención incluyen, pero sin limitación, aquellas descritas por la siguiente fórmula 3:

**Fórmula 3**



R= H, alquilo, bencilo, arilo, acetal, OHC-, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, HS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,



- azúcar-nucleótido, proteína, metilo, etilo;

X, Y, W, U (independientemente seleccionados)= O, S, NH, N-R';

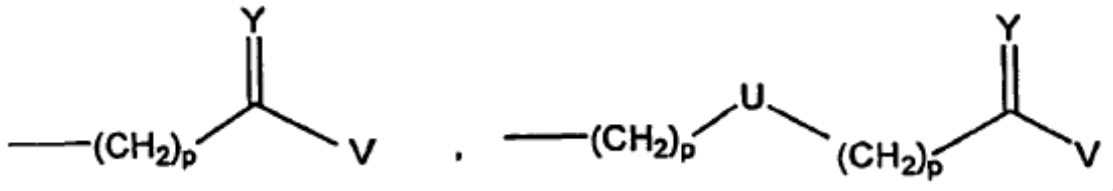
R', R'' (independientemente seleccionados)= alquilo, bencilo, arilo, alquilarilo, piridilo, arilo sustituido, arilalquilo, acilarilo;

5 n = 1 a 2000;

m, q, p (independientemente seleccionados)= 0 a 20

o = 0 a 20;

Z= HO, NH<sub>2</sub>, halógeno, S-R''', ésteres activados,

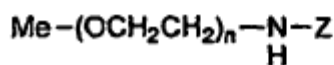
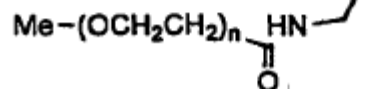
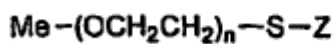
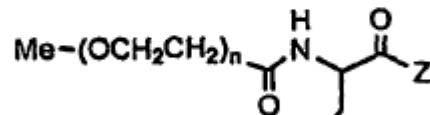
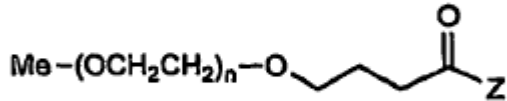
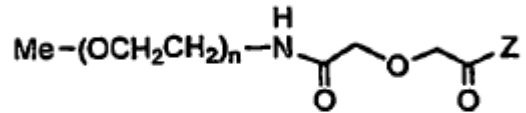
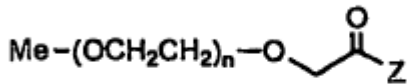
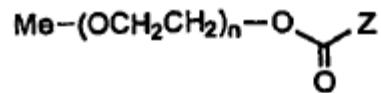
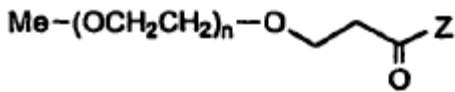


10 - azúcar-nucleótido, proteína, imidazol, HOBT, tetrazol, haluro; y

V = HO, NH<sub>2</sub>, halógeno, S-R''', ésteres activados, amidas activadas,

- azúcar-nucleótido, proteína.

En realizaciones preferidas, la molécula de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 20 kDa se selecciona de las siguientes:



15

que tienen un peso molecular de 20 kDa.





b) Polímeros no hidrosolubles

Los conjugados de la invención pueden incluir también uno o más polímeros no hidrosolubles. Esta realización de la invención se ilustra mediante el uso del conjugado como vehículo con el que suministrar un péptido terapéutico de manera controlada. Los sistemas de suministro de fármacos poliméricos son conocidos en la materia. Véanse, por ejemplo, Dunn *et al.*, Eds. "POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS", ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Los especialistas en la materia apreciarán que es aplicable a los conjugados de la presente invención sustancialmente cualquier sistema de suministro de fármaco conocido.

Los polímeros no hidrosolubles representativos incluyen, pero sin limitación, polifosfazinas, poli(alcoholes vinílicos), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poli(acrilamidas), polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquilenos), poli(tereftalatos de alquilenos), poliviniléteres, polivinilésteres, poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), poliestireno, polivinilpirrolidona, Pluronic y polivinilfenol y copolímeros de los mismos.

Los polímeros naturales modificados sintéticamente de uso en conjugados de la invención incluyen, pero sin limitación, alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa y nitrocelulosas. Los miembros particularmente preferidos de las amplias clases de polímeros naturales modificados sintéticamente incluyen, pero sin limitación, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, celulosa acetato, celulosa propionato, celulosa acetato butirato, celulosa acetato ftalato, carboximetilcelulosa, celulosa triacetato, sal de sodio de celulosa sulfato y polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos y ácido alginico.

Estos y otros polímeros discutidos en la presente memoria pueden obtenerse fácilmente a partir de fuentes comerciales tales como Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.), Polysciences (Warrenton, PA.), Aldrich (Milwaukee, WI.), Fluka (Ronkonkoma, NY) y BioRad (Richmond, CA), o si no sintetizarse a partir de monómeros obtenidos de estos proveedores usando técnicas estándares.

Los polímeros biodegradables representativos de uso en los conjugados de la invención incluyen, pero sin limitación, polilactidas, poliglicolidas y copolímeros de los mismos, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), poli(lactida-co-glicolida), polianhídridos, poliortoésteres, combinaciones y copolímeros de los mismos. Son de uso particular composiciones que forman geles, tales como aquellas que incluyen colágeno, Pluronic y similares.

Los polímeros de uso en la invención incluyen polímeros "híbridos" que incluyen materiales no hidrosolubles que tienen en al menos una porción de su estructura una molécula bioabsorbible. Es un ejemplo de dicho polímero aquel que incluye un copolímero no hidrosoluble que tiene una región bioabsorbible, una región hidrófila y una pluralidad de grupos funcionales reticulables por cadena polimérica.

Con los fines de la presente invención, "materiales no hidrosolubles" incluye materiales que son sustancialmente insolubles en agua o entornos que contienen agua. Por tanto, aunque ciertas regiones o segmentos del copolímero pueden ser hidrófilos o incluso hidrosolubles, la molécula polimérica en conjunto no se disuelve sustancialmente en agua.

Con fines de la presente invención, el término "molécula bioabsorbible" incluye una región que puede metabolizarse o degradarse y absorberse y/o eliminarse mediante rutas excretoras normales por el cuerpo. Dichos metabolitos o productos de degradación son preferiblemente no tóxicos para el cuerpo.

La región bioabsorbible puede ser hidrófoba o hidrófila, a condición de que la composición polimérica en conjunto no se vuelva hidrosoluble. Por tanto, la región bioabsorbible se selecciona basándose en la preferencia de que el polímero, en conjunto, permanezca no hidrosoluble. En consecuencia, las propiedades relativas, concretamente las clases de grupos funcionales contenidos y las proporciones relativas de la región bioabsorbible y la región hidrófila se seleccionan para asegurar que las composiciones bioabsorbibles útiles permanecen no hidrosolubles.

Los polímeros absorbibles ejemplares incluyen, por ejemplo, copolímeros de bloque de poli(ácido  $\alpha$ -hidroxicarboxílico)/polioxilalquilenos producidos sintéticamente (véase Cohn *et al.*, patente de EE.UU. n° 4.826.945). Estos copolímeros no están reticulados y son hidrosolubles, de modo que el cuerpo puede excretar las composiciones de copolímero de bloque degradado. Véanse Younes *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 21: 1301-1316 (1987) y Cohn *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 22: 993-1009 (1988).

Los polímeros bioabsorbibles actualmente preferidos incluyen uno o más componentes seleccionados de poliésteres, polihidroxiácidos, polilactonas, poliamidas, poliesteramidas, poliaminoácidos, polianhídridos, poliortoésteres, policarbonatos, polifosfazinas, polifosfoésteres, politioésteres, polisacáridos y mezclas de los mismos. Más preferiblemente aún, el polímero bioabsorbible incluye un componente polihidroxiácido. De los polihidroxiácidos, se prefieren poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido caproico), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico) y copolímeros y mezclas de los mismos.

Además de formar fragmentos que se absorben *in vivo* ("bioabsorbidos"), los recubrimientos poliméricos preferidos para uso en los métodos de la invención pueden formar también un fragmento excretable y/o metabolizable.

5 Pueden usarse también copolímeros de orden superior en la presente invención. Por ejemplo, Casey *et al.*, patente de EE.UU. n° 4.438.253, expedida el 20 de marzo de 1984, dan a conocer copolímeros de tribloque producidos a partir de la transesterificación de poli(ácido glicólico) y un polialquilenglicol con extremo hidroxilo. Dichas composiciones se dan a conocer para uso como suturas monofilamentosas absorbibles. La flexibilidad de dichas composiciones se controla mediante la incorporación de un ortocarbonato aromático tal como ortocarbonato de tetra-p-tolilo en la estructura copolimérica.

10 Pueden utilizarse también otros recubrimientos basados en ácido láctico y/o glicólico. Por ejemplo, Spinu, patente de EE.UU. n° 5.202.413, expedida el 13 de abril de 1993, da a conocer copolímeros de multibloque biodegradables que tienen bloques ordenados secuencialmente de polilactida y/o poliglicolida producidos mediante polimerización con apertura de anillo de lactida y/o glicolida en un diol oligomérico o un residuo de diamina, seguido de extensión de cadena con un compuesto difuncional tal como un diisocianato, cloruro de diacilo o diclorosilano.

15 Las regiones bioabsorbibles de recubrimientos útiles en la presente invención pueden diseñarse para ser hidrolítica y/o enzimáticamente escindibles. Con fines de la presente invención, "hidrolíticamente escindible" designa la susceptibilidad del copolímero, especialmente la región bioabsorbible, a la hidrólisis con agua o un entorno que contiene agua. De forma similar, "enzimáticamente escindible", como se usa en la presente memoria, designa la susceptibilidad del copolímero, especialmente la región bioabsorbible, a escisión por enzimas endógenas o exógenas.

20 Cuando se dispone en el cuerpo, la región hidrófila puede procesarse hasta fragmentos excretables y/o metabolizables. Por tanto, la región hidrófila puede incluir, por ejemplo, poliéteres, poli(óxidos de alquileo), polioles, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), polialquiloxazolinas, polisacáridos, carbohidratos, péptidos, proteínas y copolímeros y mezclas de los mismos. Además, la región hidrófila puede ser también, por ejemplo, un poli(óxido de alquileo). Dichos poli(óxidos de alquileo) pueden incluir, por ejemplo, poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno) y mezclas y copolímeros de los mismos.

25 Los polímeros que son componentes de hidrogeles son también útiles en la presente invención. Los hidrogeles son materiales poliméricos que son capaces de absorber cantidades relativamente grandes de agua. Los ejemplos de compuestos formadores de hidrogel incluyen, pero sin limitación, poli(ácidos acrílicos), carboximetilcelulosa de sodio, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, gelatina, carragenano y otros polisacáridos, ácido hidroxietilmetacrílico (HEMA), así como derivados del mismo y similares. Pueden producirse hidrogeles que son estables, biodegradables y bioabsorbibles. Además, las composiciones de hidrogel pueden incluir subunidades que exhiben una o más de estas propiedades.

30 Las composiciones de hidrogel biocompatibles cuya integridad puede controlarse mediante reticulación son conocidas y se prefieren actualmente para uso en los métodos de la invención. Por ejemplo, Hubbell *et al.*, patente de EE.UU. n° 5.410.016, expedida el 25 de abril de 1995, y 5.529.914, expedida el 25 de junio de 1996, dan a conocer sistemas hidrosolubles que son copolímeros de bloque reticulados que tienen un segmento de bloque central hidrosoluble intercalado entre dos extensiones hidrolíticamente lábiles. Dichos copolímeros están adicionalmente tapados en el extremo con funcionalidades acrilato fotopolimerizables. Cuando se reticulan, estos sistemas de vuelven hidrogeles. El bloque central hidrosoluble de dichos copolímeros puede incluir polietilenglicol, mientras que las extensiones hidrolíticamente lábiles pueden ser un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), tal como poli(ácido glicólico) o poli(ácido láctico). Véase Sawhney *et al.*, *Macromolecules* 26: 581-587 (1993).

35 En otra realización preferida, el gel es un gel termoreversible. Se prefieren actualmente geles termoreversibles que incluyen componentes tales como Pluronic, colágeno, gelatina, ácido hialurónico, polisacáridos, hidrogel de poliuretano, hidrogel de poliuretano y combinaciones de los mismos.

45 Se da a conocer también un conjugado que incluye un componente de liposoma. Los liposomas pueden prepararse según métodos conocidos por los especialistas en la materia, por ejemplo, como se describe en Eppstein *et al.*, patente de EE.UU. n° 4.522.811, expedida el 11 de junio de 1985. Por ejemplo, las formulaciones de liposoma pueden prepararse disolviendo lípido(s) apropiado(s) (tales como esteroilfosfatidiletanolamina, esteroilfosfatidilcolina, araquidilfosfatidilcolina y colesterol) en un disolvente orgánico, que entonces se evapora, dejando detrás una fina película de lípido secado sobre la superficie del recipiente. Se introduce entonces una disolución acuosa del compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable en el recipiente. Se agita entonces el recipiente a mano para liberar el material lipídico de los lados del recipiente y para dispersar los agregados lipídicos, formando así la suspensión liposómica.

50 Las micropartículas y métodos de preparación de micropartículas anteriormente indicados se ofrecen a modo de ejemplo y no se pretende que definan el alcance de las micropartículas de uso en la presente invención. Resultará evidente para los especialistas en la materia que son de uso en la presente invención una serie de micropartículas fabricadas por métodos diferentes.

c) Biomoléculas

Se da a conocer también un azúcar modificado que porta una biomolécula. La biomolécula puede ser una proteína funcional, enzima, antígeno, anticuerpo, péptido, ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos o nucleósidos individuales, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos monocatenarios y multicatenarios), lectina, receptor o una combinación de los mismos.

5 Algunas biomoléculas preferidas son esencialmente no fluorescentes, o emiten una cantidad tan mínima de fluorescencia que son inapropiadas para uso como marcador fluorescente en un ensayo. Otras biomoléculas pueden ser fluorescentes. Es apropiado el uso de un azúcar por lo demás de origen natural que se modifica por unión covalente de otra entidad (por ejemplo, PEG, biomolécula, resto terapéutico, resto de diagnóstico, etc.). Se da a conocer también un  
10 resto de azúcar que es una biomolécula conjugada con un brazo ligador y el módulo de azúcar-brazo ligador se conjuga posteriormente con un péptido mediante un método de la invención.

Las biomoléculas útiles en la práctica de la presente invención pueden derivar de cualquier fuente. Las biomoléculas pueden aislarse de fuentes naturales o pueden producirse mediante métodos sintéticos. Los péptidos pueden ser péptidos naturales o péptidos mutados. Las mutaciones pueden efectuarse mediante mutagénesis química, mutagénesis dirigida a sitio u otros medios de inducción de mutaciones conocidos por los especialistas en la materia.  
15 Los péptidos útiles en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, enzimas, antígenos, anticuerpos y receptores. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, intactos o fragmentos. Los péptidos son opcionalmente los productos de un programa de evolución dirigida.

Tanto los péptidos como los ácidos nucleicos derivados naturalmente y sintéticos son de uso junto con la presente invención; estas moléculas pueden unirse a un componente de residuo de azúcar o agente reticulante mediante un  
20 grupo reactivo disponible. Por ejemplo, los péptidos pueden unirse a través de un grupo amina, carboxilo, sulfhidrilo o hidroxilo reactivo. El grupo reactivo puede residir en un extremo peptídico o en un sitio interno de la cadena peptídica. Los ácidos nucleicos pueden unirse a través de un grupo reactivo en una base (por ejemplo, amina exocíclica) o un grupo hidroxilo disponible en un resto de azúcar (por ejemplo, 3'- o 5'-hidroxilo). Las cadenas de péptido y ácido nucleico pueden derivatizarse adicionalmente en uno o más sitios para permitir la unión de grupos reactivos apropiados  
25 en la cadena. Véase Chrisey *et al.* Nucleic Acids Res. 24: 3031-3039 (1996).

Se da a conocer también una biomolécula que se selecciona para dirigir el péptido modificado mediante los métodos de la invención a un tejido específico, potenciando así el suministro del péptido a ese tejido respecto a la cantidad de péptido no derivatizado que se suministra al tejido. Además, la cantidad de péptido derivatizado suministrada a un tejido  
30 específico en un periodo de tiempo seleccionado puede potenciarse mediante derivatización al menos aproximadamente un 20%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 40% y aún más preferiblemente al menos aproximadamente un 100%. Actualmente, las biomoléculas preferidas para aplicaciones de orientación incluyen anticuerpos, hormonas y ligandos de receptores de superficie celular. Las biomoléculas orientadoras ejemplares incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo específico del receptor de transferrina para el suministro de la molécula al cerebro (Penichet *et al.*, 1999, J. Immunol. 163: 4421-44.26; Partridge, 2002, Adv. Exp. Med. Biol. 513: 397-430), un  
35 péptido que reconoce los vasos de la próstata (Arap *et al.*, 2002, PNAS 99:1527-1531) y un anticuerpo específico de caveolas pulmonares (McIntosh *et al.*, 2002, PNAS 99: 1996-2001).

El grupo modificador puede ser una proteína tal como un interferón. Los interferones son glicoproteínas antivíricas que, en seres humanos, se secretan por fibroblastos primarios humanos después de la inducción con virus o ARN bicatenario. Los interferones son de interés como productos terapéuticos, por ejemplo antivíricos, y en el tratamiento de  
40 esclerosis múltiple. Para referencias que discuten sobre el interferón  $\beta$  véanse, por ejemplo, Yu, *et al.*, J. Neuroimmunol., 64(1): 91-100 (1996); Schmidt, J., J. Neurosci. Res., 65(1): 59-67 (2001); Wender *et al.*, Folia Neuropathol., 39(2):91-93 (2001); Martin *et al.*, Springer Semin. Immunopathol., 18(1): 1-24 (1996); Takane *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 294(2): 746-752 (2000); Sburlati *et al.*, Biotechnol. Prog., 14: 189-192 (1998); Dodd *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta, 787: 183-187 (1984); Edelbaum *et al.*, J. Interferon Res., 12: 449-453 (1992); Conrad *et al.*, J. Biol. Chem., 262(30): 14600-14605 (1987); Civas *et al.*, Eur. J. Biochem., 173: 311-316 (1988); Demolder *et al.*, J. Biotechnol., 32: 179-189 (1994); Sedmak *et al.*, J. Interferon Res., 9(Supl. 1):S61-S65 (1989); Kagawa *et al.*, J. Biol. Chem., 263(33): 17508-17515 (1988); Hershenson *et al.*, patente de EE.UU. n° 4.894.330; Jayaram *et al.*, J. Interferon Res., 3(2): 177-180 (1983); Menge *et al.*, Develop. Biol. Standard, 66: 391-401 (1987); Vonk *et al.*, J. Interferon Res., 3(2): 169-175 (1983) y Adolf *et al.*, J. Interferon Res., 10: 255-267 (1990). Para referencias relevantes del interferón  $\alpha$  véanse Asano *et al.*, Eur. J. Cancer, 27(Supl. 4): 521-S25 (1991); Nagy *et al.*, Anticancer Research, 8(3): 467-470 (1988); Dron *et al.*, J. Biol. Regul. Homeost. Agents, 3(1): 13-19 (1989); Habib *et al.*, Am. Surg., 67(3): 257-260 (3/2001) y Sugiyama *et al.*, Eur. J. Biochem., 217:921-927 (1993).

En un conjugado de interfeferón ejemplar, se conjuga el interferón P con un segundo péptido mediante un brazo ligador. El brazo ligador incluye un grupo ligante de glicosilo intacto a través del cual se une al segundo péptido mediante un  
55 método de la invención. El brazo ligador incluye opcionalmente también un segundo grupo ligante de glicosilo intacto a través del cual se une al interfeferón.

En una realización ejemplar adicional, la invención proporciona un conjugado de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). El G-CSF es una glicoproteína que estimula la proliferación, diferenciación y activación de células progenitoras neutropoyéticas a neutrófilos funcionalmente maduros. El G-CSF inyectado es conocido por aclararse rápidamente del cuerpo. Véanse, por ejemplo, Nohynek *et al.*, Cancer Chemother. Pharmacol., 39: 259-266 (1997); Lord

*et al.*, Clinical Cancer Research, 7(7): 2085-2090 (07/2001); Rotondaro *et al.*, Molecular Biotechnology, 11(2): 117-128 (1999) y Bönig *et al.*, Bone Marrow Transplantation, 28: 259-264 (2001). Se prepara un conjugado ejemplar de G-CSF como se discute anteriormente para el conjugado de interferones. Un especialista en la materia apreciará que pueden conjugarse muchas otras proteínas con interferón usando los métodos y composiciones de la invención incluyendo, pero sin limitación, los péptidos listados en las Tablas 7 y 8 (presentadas en otro lugar de la presente memoria) y la Figura 28 y las Figuras 29-57, en que se presentan esquemas de modificación individuales.

Los ligamientos contemplados incluyen, pero sin limitación, proteína-azúcar-ligador-azúcar-proteína, proteína-azúcar-ligador-proteína y formas multivalentes de los mismos y proteína-azúcar-ligador-fármaco, en que el fármaco incluye moléculas pequeñas, péptidos y lípidos entre otros.

10 El suministro específico de sitio y orientado a diana de agentes terapéuticos es deseable con el fin de tratar una amplia variedad de enfermedades humanas, tales como diferentes tipos de malignidades y ciertos trastornos neurológicos. Dichos proedimientos están acompañados de menos efectos secundarios y una mayor eficacia del fármaco. Se ha basado en diversos principios el diseño de estos sistemas de suministro. Para una revisión, véase Garnett, Advanced Drug Delivery Reviews 53: 171-216 (2001).

15 El concepto de suministro específico de tejido de agentes terapéuticos va más allá de la interacción entre transferrina y receptor de transferrina o sus proteínas relacionadas. Por ejemplo, se ha descrito un sistema de suministro específico de hueso en que las proteínas se conjugan con un aminobisfosfonato orientado a hueso para un suministro mejorado de proteínas a tejido mineralizado. Uludag y Yang, Biotechnol. Prog. 18: 604-611 (2002). Para una revisión sobre este tema, véase Vyas *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System 18: 1-76 (2001).

20 Puede usarse una variedad de ligadores en el proceso de generación de bioconjugados con el fin de un suministro específico de agentes terapéuticos. Los ligadores adecuados incluyen reactivos de reticulación homo- y heterobifuncionales que pueden ser escindibles, por ejemplo, por disociación catalizada por ácido, o no escindibles (véanse, por ejemplo, Srinivasachar y Neville, Biochemistry 28: 2501-2509 (1989); Wellhoner *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 266: 4309-4314 (1991)). Puede usarse también la interacción entre muchas parejas de unión conocidas, tales como biotina y avidina/estreptavidina, como medio para unir un agente terapéutico y una pareja conjugada que asegure el suministro específico y eficaz del agente terapéutico. Usando los métodos de la invención, pueden usarse proteínas para suministrar moléculas a compartimentos intracelulares en forma de conjugados. Las proteínas, péptidos, hormonas, citocinas, moléculas pequeñas o similares que se unen a receptores de superficie celular específicos que se internalizan después de la unión del ligando pueden usarse para la orientación intracelular de compuestos terapéuticos conjugados. Típicamente, el complejo receptor-ligando se internaliza en vesículas intracelulares que se suministran a compartimentos celulares específicos incluyendo, pero sin limitación, núcleo, mitocondria, aparato de Golgi, RE, lisosoma y endosoma, dependiendo de la localización intracelular orientada por el receptor. Al conjugar el ligando de receptor con la molécula deseada, el fármaco se portará en el complejo de receptor-ligando y se suministrará a los compartimentos intracelulares orientados normalmente por el receptor. Por lo tanto, el fármaco puede suministrarse a una localización intracelular específica en la célula donde sea necesario para tratar una enfermedad.

Pueden usarse muchas proteínas para orientar agentes terapéuticos a tejidos y órganos específicos. Las proteínas orientadoras incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento (EPO, HGH, EGF, factor de crecimiento nervioso, FGF, entre otros), citocinas (GM-CSF, G-CSF, la familia del interferón e interleucinas entre otros), hormonas (FSH, LH, la familia de los esteroides, estrógeno, corticosteroides e insulina entre otros), proteínas séricas (albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, proteínas séricas humanas; anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, entre otros) y vitaminas (folato, vitamina C, vitamina A entre otras). Están disponibles agentes orientadores que son específicos de receptores en la mayoría de tipos celulares.

45 Las configuraciones de ligamiento contempladas incluyen, pero sin limitación, proteína-azúcar-ligador-azúcar-proteína y formas multivalentes de la misma, proteína-azúcar-ligador-proteína y formas multivalentes de la misma, proteína-azúcar-ligador-agente terapéutico, en que el agente terapéutico incluye, pero sin limitación, moléculas pequeñas, péptidos y lípidos. En algunas realizaciones, se usa un ligador hidrolizable que puede hidrolizarse una vez internalizado. Puede usarse un ligador lábil por ácido ventajosamente cuando el conjugado proteico se internaliza en los endosomas o lisosomas que tienen un pH ácido. Una vez internalizado en el endosoma o lisosoma, se hidroliza el ligador y se libera el agente terapéutico del agente orientador.

#### E. Restos terapéuticos

En otra realización preferida, el azúcar modificado incluye un resto terapéutico. Los especialistas en la materia apreciarán que hay una superposición entre la categoría de restos terapéuticos y biomoléculas; muchas biomoléculas tienen propiedades o potencial terapéutico.

55 Los restos terapéuticos pueden ser agentes ya aceptados para uso clínico o pueden ser fármacos cuyo uso es experimental, o cuya actividad o mecanismo de acción está bajo investigación. Los restos terapéuticos pueden tener una acción probada en un estado patológico dado o puede haberse teorizado solo que muestran una acción deseable en un estado patológico dado. En una realización preferida, los restos terapéuticos son compuestos en que se está

5 examinando su capacidad de interactuar con un tejido de elección. Los restos terapéuticos que son útiles en la práctica de la presente invención incluyen fármacos de un amplio intervalo de clases de fármaco que tienen una variedad de actividades farmacológicas. En algunas realizaciones, se prefiere usar restos terapéuticos que no sean azúcares. Es una excepción de esta preferencia el uso de un azúcar que se modifica por unión covalente de otra entidad, tal como un PEG, biomolécula, resto terapéutico, resto de diagnóstico y similares. Se da a conocer también un resto de ácido nucleico anticodificante que se conjuga con un brazo ligador que se une al resto orientador. Un resto de azúcar terapéutico puede conjugarse también con un brazo ligador y conjugarse posteriormente el módulo de azúcar-brazo ligador con un péptido mediante un método de la invención.

10 Son bien conocidos por los especialistas en la materia los métodos de conjugación de agentes terapéuticos y de diagnóstico con diversas otras especies. Véanse, por ejemplo, Hermanson, "BIOCONJUGATE TECHNIQUES", Academic Press, San Diego, 1996 y Dunn *et al.*, Eds. "POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS", ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991.

15 Se da a conocer también un resto terapéutico unido al azúcar modificado mediante un ligamiento que se escinde en condiciones seleccionadas. Las condiciones ejemplares incluyen, pero sin limitación, un pH seleccionado (por ejemplo, estómago, intestino, vacuola endocítica), la presencia de una enzima activa (por ejemplo, esterasa, proteasa, reductasa, oxidasa), luz, calor y similares. Son conocidos en la materia muchos grupos escindibles. Véanse, por ejemplo, Jung *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 761: 152-162 (1983); Joshi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265: 14518-14525 (1990); Zarling *et al.*, *J. Immunol.*, 124: 913-920 (1980); Bouizar *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 155: 141-147 (1986); Park *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 261: 205-210 (1986); Browning *et al.*, *J. Immunol.*, 143: 1859-1867 (1989).

20 Las clases de restos terapéuticos útiles incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los AINE pueden seleccionarse, por ejemplo, de las siguientes categorías: (por ejemplo, derivados de ácido propiónico, derivados de ácido acético, derivados de ácido fenámico, derivados de ácido bifenilcarboxílico y oxicamos); fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyendo hidrocortisona y similares; coadyuvantes; fármacos antihistamínicos (por ejemplo, clorfeniramina, triprolidina); fármacos antitusivos (por ejemplo, dextrometorfano, codeína, caramifeno y carbetapentano); fármacos antipruríticos (por ejemplo, metildilazina y trimeprazina); fármacos anticolinérgicos (por ejemplo, escopolamina, atropina, homatropina, levodopa); fármacos antieméticos y antinaúseas (por ejemplo, ciclizina, meclizina, clorpromazina, buclizina); fármacos anorexígenos (por ejemplo, benzofetamina, fentermina, clorfentermina, fenfluramina); fármacos estimulantes centrales (por ejemplo, anfetamina, metanfetamina, dextroanfetamina y metilfenidato); fármacos antiarrítmicos (por ejemplo, propanolol, procainamida, disopiramide, quinidina, encainida); fármacos bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos (por ejemplo, metoprolol, acebutolol, betaxolol, labetalol y timolol); fármacos cardiotónicos (por ejemplo, milrinona, amrinona y dobutamina); fármacos antihipertensivos (por ejemplo, enalapril, clonidina, hidralazina, minoxidil, guanadrel y guanetidina); fármacos diuréticos (por ejemplo, amilorida e hidroclorotiazida); fármacos vasodilatadores (por ejemplo, diltiazem, amiodarona, isoxsuprina, nilidrina, tolazolina y verapamilo); fármacos vasoconstrictores (por ejemplo, dihidroergotamina, ergotamina y metilsergida); fármacos antiulcerosos (por ejemplo, ranitidina y cimetidina); fármacos anestésicos (por ejemplo, lidocaína, bupivacaína, clorprocaína, dibucaína); fármacos antidepresivos (por ejemplo, imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina); fármacos tranquilizantes y sedantes (por ejemplo, clordiazepóxido, benacitizina, benzoquinamida, flurazepam, hidroxizina, loxapina y promazina); fármacos antipsicóticos (por ejemplo, clorprotixeno, flufenazina, haloperidol, molindona, tioridazina y trifluoperazina) y fármacos antimicrobianos (fármacos antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoarios y antivíricos).

45 Las clases de restos terapéuticos útiles incluyen coadyuvantes. Los coadyuvantes pueden seleccionarse, por ejemplo, de conjugados de hemocianina de lapa de bocallave, monofosforil-lípido A, MALP-2 lipopeptídico derivado de micoplasma, subunidad B de toxina del cólera, toxina termolábil de *Escherichia coli*, epítipo auxiliar T universal de toxoide del tétanos, interleucina 12, oligodesoxinucleótidos CpG, bromuro de dimetildiodecilaamónio, ciclodextrina, escualeno, sales de aluminio, vesícula de membrana exterior meningocócica (OMV), Montanide ISA, TiterMax™ (disponible en Sigma, St. Louis MO), absorción en nitrocelulosa, complejos inmunoestimulantes tales como Quil A, coadyuvante Gerbu™ (Gerbu Biotechnik, Kirchwald, Alemania), dipéptido de treonilmuramilo, timosina alfa, bupivacaína, GM-CSF, coadyuvante incompleto de Freund, MTP-PE/MF59 (Ciba/Geigy, Basilea, Suiza), polifosfazeno, saponina derivada del árbol quillay *Quillaja saponaria* y la formulación coadyuvante Syntex (Biocine, Emeryville, CA), entre otros bien conocidos por los especialistas en la materia.

55 Los fármacos antimicrobianos que se prefieren para incorporación a la presente composición incluyen, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de fármacos de  $\beta$ -lactama, fármacos de quinolona, ciprofloxacina, norfloxacina, tetraciclina, eritromicina, ampicilina, triclosán, doxiciclina, capreomicina, clorhexidina, clortetraciclina, oxitetraciclina, clindamicina, etanbutol, isotonato de hexamidina, metronidazol, pentamidina, gentamicina, kanamicina, lineomicina, metaciclina, metenamina, minociclina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomina, tobramicina, miconazol y amantadina.

60 Otros restos farmacológicos para uso en la práctica de la presente invención incluyen fármacos antineoplásicos, (por ejemplo, antiandrógenos (por ejemplo, leuprolida o flutamida), agentes citocidas (por ejemplo, adriamicina, doxorubicina, taxol, ciclofosfamida, busulfano, cisplatino,  $\beta$ -2-interferón), antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno), antimetabolitos (por ejemplo, fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina). Se incluyen también en esta clase los agentes basados en radioisótopos tanto para diagnóstico como para terapia y las toxinas conjugadas tales como ricina,

geldanamicina, mitansina, CC-1065, C-1027, duocarmicinas, caliqueamicina y estructuras relacionadas y análogos de los mismos, y las toxinas enumeradas en la Tabla 2.

5 El resto terapéutico puede ser también una hormona (por ejemplo, medroxiprogesterona, estradiol, leuprolida, megestrol, octreotida o somatostatina); fármacos relajantes musculares (por ejemplo, cinamedrina, ciclobenzaprina, flavoxato, orfenadrina, papaverina, mebeverina, idaverina, ritodrina, difenoxilato, dantroleno y azumoleno); fármacos antiespasmódicos; fármacos activos en hueso (por ejemplo, compuestos farmacológicos de difosfonato y fosfonoalquilfosfinato); fármacos moduladores endocrinos (por ejemplo, anticonceptivos (por ejemplo, etinodiol, etinilestradiol, noretindrona, mestranol, desogestrel, medroxiprogesterona), moduladores de la diabetes (por ejemplo, gliburida o clorpropamida), anabolizantes tales como testolactona o estanozolol, andrógenos (por ejemplo, metiltestosterona, testosterona o fluoximesterona), antiidiuréticos (por ejemplo, desmopresina) y calcitoninas).

10 Son también de uso en la presente invención los estrógenos (por ejemplo, dietilestilbestrol), glucocorticoides (por ejemplo, triamcinolona, betametasona, etc.), y pueden emplearse también progesteronas tales como noretindrona, etinodiol, noretindrona, levonorgestrel; agentes tiroideos (por ejemplo, liotironina o levotiroxina) o agentes antitiroideos (por ejemplo, metimazol); fármacos antihiperprolactinémicos (por ejemplo, cabergolina); supresores hormonales (por ejemplo, danazol o goserelina), oxitócicos (por ejemplo, metilergonovina u oxitocina) y prostaglandinas tales como mioprostol, alprostadiil o dinoprostona.

15 Otros grupos modificadores útiles incluyen fármacos inmunomoduladores (por ejemplo, antihistaminas, estabilizadores de mastocitos tales como lodoxamida y/o cromolina, esteroides (por ejemplo, triamcinolona, beclometazona, cortisona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, beclometazona o clobetasol), antagonistas de histamina H2 (por ejemplo, famotidina, cimetidina, ranitidina), inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, ciclosporina), etc. Son también de uso grupos con actividad antiinflamatoria tales como sulindaco, etodolaco, ketoprofeno y ketorolac. Resultarán evidentes para los especialistas en la materia otros fármacos de uso junto con la presente invención.

20 Las clases de restos terapéuticos útiles incluyen, por ejemplo, fármacos anticodificantes y también ADN desnudo. Los fármacos anticodificantes pueden seleccionarse, por ejemplo, de Affinitak (ISIS, Carlsbad, CA) y Genasense™ (de Genta, Berkeley Heights, NJ). El ADN desnudo puede suministrarse como un producto terapéutico de terapia génica, por ejemplo, con ADN que codifica, por ejemplo, los factores VIII y IX para el tratamiento de trastornos hemofílicos.

#### F. Reparación de azúcares modificados

25 Se discuten en la presente memoria los azúcares modificados útiles en la formación de los conjugados de la invención. La discusión se centra en la preparación de un azúcar modificado con un polímero hidrosoluble por razones de claridad de ilustración. En particular, la discusión se centra en la preparación de azúcares modificados que incluyen un resto de polietilenglicol. Los especialistas apreciarán que los métodos expuestos en la presente memoria son ampliamente aplicables para la preparación de azúcares modificados, por lo tanto, la discusión no debería interpretarse como limitante del alcance de la invención.

30 En general, el resto de azúcar y el grupo modificador están ligados conjuntamente mediante el uso de grupos reactivos, que se transforman típicamente mediante el proceso de ligamiento en un nuevo grupo orgánico funcional o especie no reactiva. El(los) grupo(s) funcional(es) reactivo(s) con azúcar está(n) localizado(s) en cualquier posición del resto de azúcar. Los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente aquellos bien conocidos en la materia de la química de los bioconjugados. Las clases actualmente favorecidas de reacciones disponibles con restos de azúcar reactivos son aquellas que proceden en condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, pero sin limitación, sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo y ésteres activos), sustituciones electrófilas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Se discuten estas y otras reacciones útiles, por ejemplo, en Smith y March, "ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY", 5ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 2001; Hermanson, "BIOCONJUGATE TECHNIQUES", Academic Press, San Diego, 1996 y Feeney *et al.*, "MODIFICATION OF PROTEINS"; "Advances in Chemistry Series", Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

35 Los grupos funcionales reactivos útiles pendientes de un núcleo de azúcar o grupo modificador incluyen, pero sin limitación:

40 (a) grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos incluyendo, pero sin limitación, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, acilimidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres alquílicos, alquenílicos, alquinílicos y aromáticos;

(b) grupos hidroxilo que pueden convertirse, por ejemplo, en ésteres, éteres, aldehídos, etc.;

45 (c) grupos haloalquilo, en los que el haluro puede desplazarse después por un grupo nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión o un ión alcóxido, dando así como resultado la unión covalente de un nuevo grupo en el grupo funcional del átomo de halógeno;

(d) grupos dienófilos que pueden participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos maleimido;

(e) grupos aldehído o cetona tales que sea posible la posterior derivatización mediante la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o mediante mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquil-litio;

(f) grupos haluro de sulfonilo para la posterior reacción con aminas, por ejemplo, formando sulfonamidas;

5 (g) grupos tiol que pueden convertirse, por ejemplo, en disulfuros o hacerse reaccionar con haluros de alquilo y acilo;

(h) grupos amina o sulfhidrilo que pueden estar, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados;

(i) alquenos que pueden experimentar, por ejemplo, cicloadiciones, acilación, adición de Michael, etc.; y

(j) epóxidos que pueden reaccionar, por ejemplo, con compuestos de amina e hidroxilo.

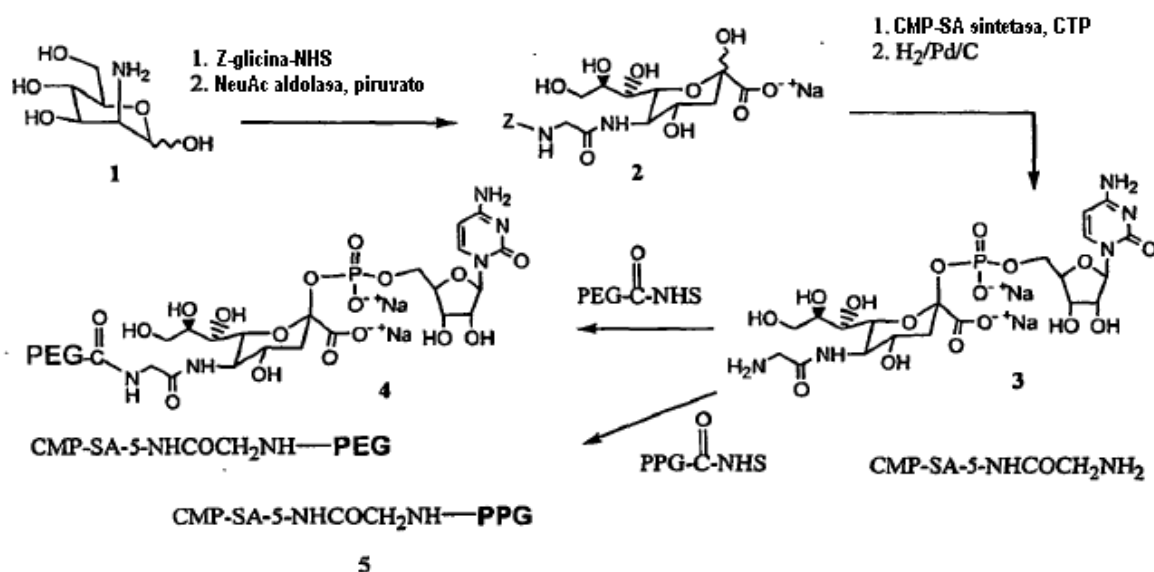
10 Los grupos funcionales reactivos pueden elegirse de tal modo que no participen en, ni interfieran con, las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o grupo modificador. Como alternativa, un grupo funcional reactivo puede protegerse de participar en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los especialistas en la materia entienden cómo proteger un grupo funcional particular de tal modo que no interfiera con un conjunto elegido de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles véase, por ejemplo, Greene *et al.*, "PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS", John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

15 En la discusión siguiente, se exponen una serie de ejemplos específicos de azúcares modificados que son útiles en la práctica de la presente invención. En las realizaciones ejemplares, se utiliza un derivado de ácido siálico como núcleo de azúcar al que se une el grupo modificador. Centrar la discusión en derivados de ácido siálico es por razones de claridad de ilustración solo, y no debería considerarse que limita el alcance de la invención. Los especialistas en la materia apreciarán que pueden activarse una variedad de otros restos de azúcar y derivatizarse de manera análoga a la  
20 expuesta usando ácido siálico como ejemplo. Por ejemplo, están disponibles numerosos métodos para modificar galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y fucosa por nombrar unos pocos sustratos de azúcar, que se modifican fácilmente mediante métodos reconocidos en la materia. Véanse, por ejemplo, Elhalabi *et al.*, *Curr. Med Chem.* 6: 93 (1999) y Schafer *et al.*, *J. Org. Chem.* 65: 24 (2000).

25 Se da a conocer también un péptido que se modifica mediante un método de la invención, que es un péptido que se produce en células de mamífero (por ejemplo, células de CHO) o en un animal transgénico y, por tanto, contiene cadenas oligosacáridas N- y/u O-ligadas que están incompletamente sialiladas. Las cadenas oligosacáridas de un glicopéptido que carece de ácido siálico y contiene un residuo de galactosa terminal pueden estar PEGiladas, PPGiladas o modificadas de otro modo con un ácido siálico modificado.

30 En el Esquema 4, se trata el glucósido de manosamina **1** con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (por ejemplo glicina), convirtiendo el residuo amina del azúcar en el correspondiente aducto de amida de aminoácido protegido. El aducto se trata con una aldolasa formando el ácido siálico **2**. El compuesto **2** se convierte en el correspondiente derivado de CMP por la acción de la CMP-SA sintetasa, seguido de hidrogenación catalítica del derivado de CMP, produciendo el compuesto **3**. La amina introducida mediante la formación del aducto de glicina se utiliza como lugar para la unión de PEG o PPG mediante reacción del compuesto **3** con un derivado de PEG o PPG  
35 activado (por ejemplo, PEG-C(O)NHS, PPG-C(O)NHS), que produce **4** o **5**, respectivamente.

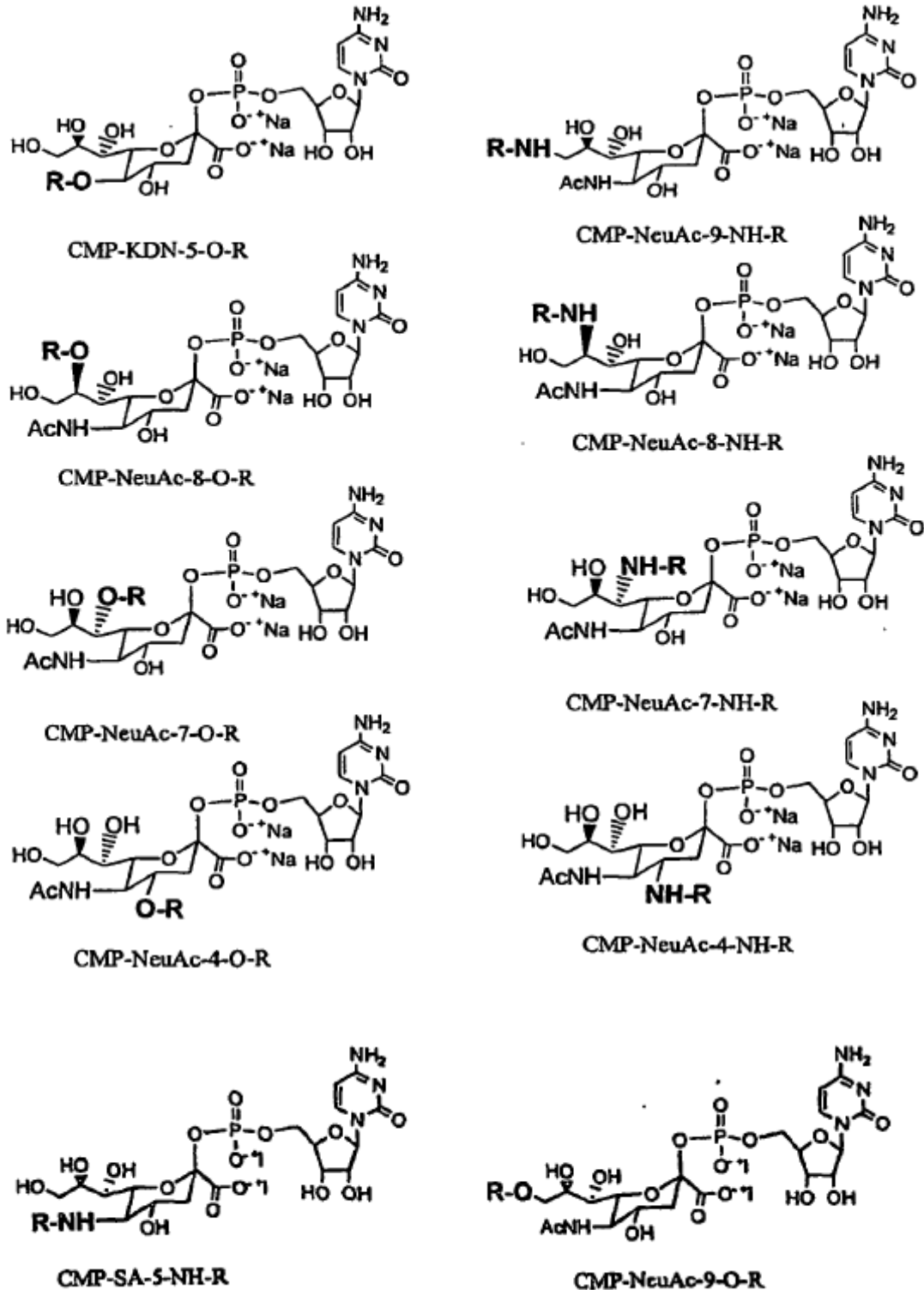
Esquema 4





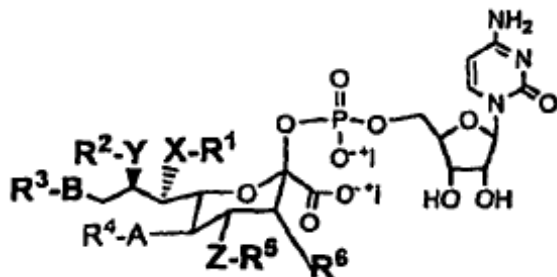
La Tabla 3 expone ejemplos representativos de monofosfatos de azúcar que están derivatizados con un resto de PEG o PPG. Algunos de los compuestos de la Tabla 3 se preparan mediante el método del Esquema 1. Otros derivados se preparan mediante métodos reconocidos en la materia. Véanse, por ejemplo, Keppler *et al.*, *Glycobiology* 11: 11R (2001) y Charter *et al.*, *Glycobiology* 10: 1049 (2000)). Están disponibles comercialmente otros análogos de PEG y PPG reactivos con amina, o pueden prepararse mediante métodos fácilmente accesibles para los especialistas en la materia.

**Tabla 3.** Ejemplos de monofosfatos de azúcar que están derivatizados con un resto PEG o PPG



Los fosfatos de azúcar modificados de uso en la práctica de la presente invención pueden sustituirse en otras posiciones así como en aquellas expuestas anteriormente. "i" puede ser Na u otra sal e "j" puede ser intercambiable con Na. Las sustituciones actualmente preferidas del ácido siálico se exponen en la Fórmula 5

**Fórmula 5:**



(I)

5

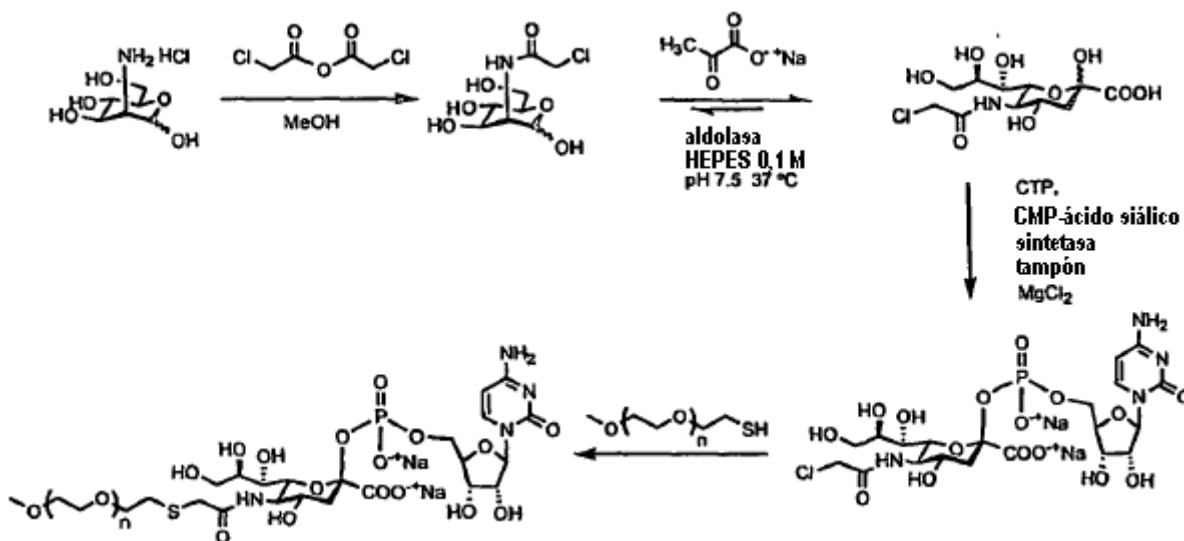
en la que X es un grupo ligante que se selecciona preferiblemente de -O-, -N(H)-, -S, CH<sub>2</sub>- y N(R)<sub>2</sub>, en que cada R es un miembro independientemente seleccionado de R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup>. "i" puede ser Na u otra sal y Na puede ser intercambiable con "j". Los símbolos Y, Z, A y B representan cada uno un grupo que se selecciona del grupo expuesto anteriormente para la identidad de X. X, Y, Z, A y B se seleccionan cada uno independientemente, y por lo tanto pueden ser iguales o diferentes. Los símbolos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> representan H, polímeros, un polímero hidrosoluble, resto terapéutico, biomolécula u otro resto. El símbolo R<sup>6</sup> representa H, OH o un polímero. Como alternativa, estos símbolos representan un ligador que está ligado a un polímero, polímero hidrosoluble, resto terapéutico, biomolécula u otro resto.

10

Se da a conocer también una manosamina que simultáneamente se acila y activa para sustitución nucleófila mediante el uso de anhídrido cloroacético como se expone en el Esquema 5. En cada uno de los esquemas presentados en esta sección, i<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup> pueden ser intercambiables, en los que la sal puede ser sodio o puede ser cualquier otra sal adecuada.

15

**Esquema 5**



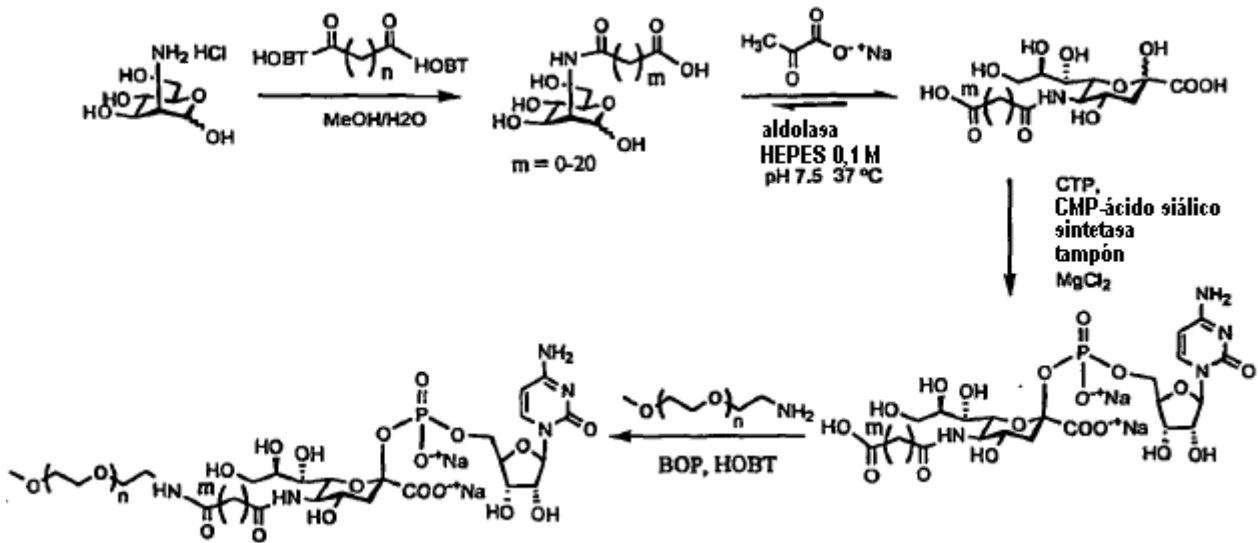
20

El glicano derivatizado con cloro resultante se pone en contacto con piruvato en presencia de una aldolasa, formando un ácido siálico derivatizado con cloro. El correspondiente azúcar-nucleótido se prepara poniendo en contacto el derivado de ácido siálico con un trifosfato de nucleótido apropiado y una sintetasa. El grupo cloro del resto de ácido siálico se desplaza entonces con un derivado de PEG nucleófilo, tal como tio-PEG.

25

En una realización ejemplar adicional, como se muestra en el Esquema 6, se acila una manosamina con un dicarboxilato de bis-HOBT, produciendo el correspondiente ácido amidoalquilcarboxílico, que se convierte posteriormente en un derivado de ácido siálico. El derivado de ácido siálico se convierte en un azúcar-nucleótido, y el ácido carboxílico se activa y se hace reaccionar con un derivado de PEG nucleófilo, tal como amino-PEG.

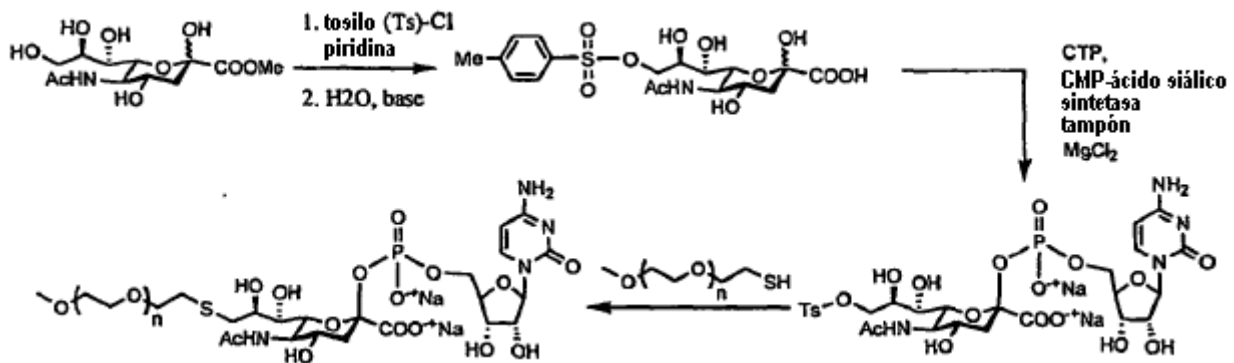
Esquema 6



En otra realización ejemplar, expuesta en el Esquema 7, se activa ácido neuramínico protegido en amina y carboxilo convirtiendo el grupo hidroxilo primario en el correspondiente éster p-toluenosulfonato, y escindiendo el éster metílico. Se convierte el ácido neuramínico activado en el correspondiente azúcar-nucleótido y se desplaza el grupo activador por una especie de PEG nucleófila, tal como tio-PEG.

5

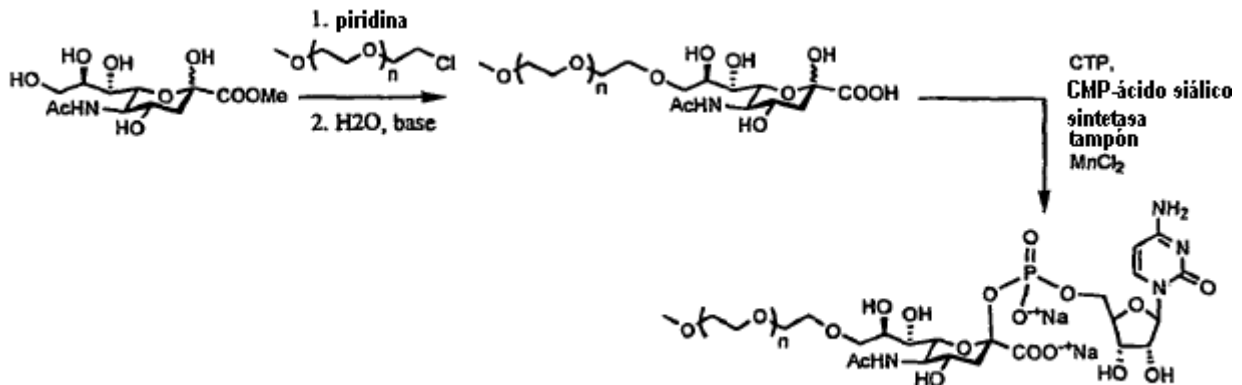
Esquema 7



En una realización ejemplar adicional más, como se expone en el Esquema 8, se alquila el resto hidroxilo primario de un derivado de ácido neuramínico protegido en amina y carboxilo usando un PEG electrófilo, tal como cloro-PEG. A continuación se escinde el éster metílico y se convierte el PEG-azúcar en un azúcar-nucleótido.

10

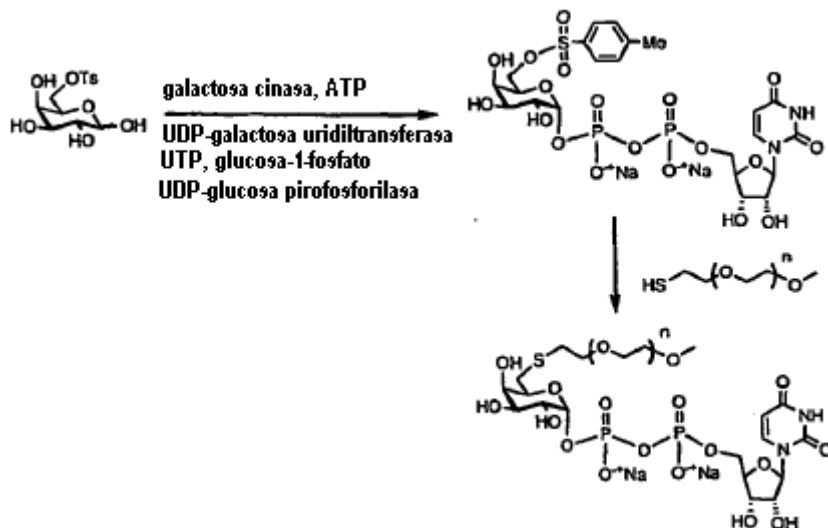
Esquema 8



Pueden derivatizarse glicanos distintos del ácido siálico con PEG usando los métodos expuestos en la presente memoria. Los glicanos derivatizados están también dentro del alcance de la invención por sí mismos. Por tanto, el Esquema 9 proporciona una ruta sintética ejemplar para un azúcar-nucleótido de galactosa PEGilado. El grupo hidroxilo primario de la galactosa se activa al correspondiente éster toluenosulfonato, que se convierte posteriormente en un azúcar-nucleótido.

5

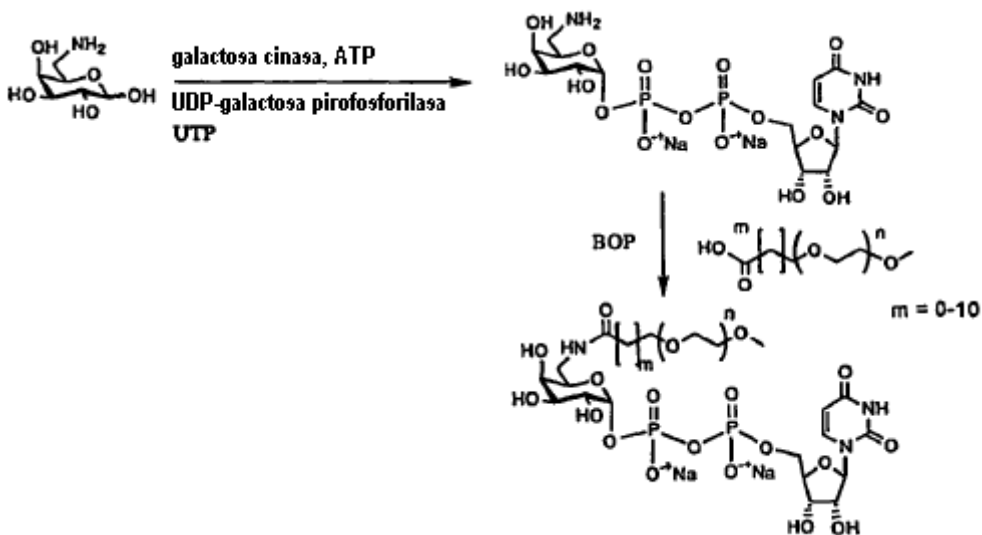
Esquema 9



El Esquema 10 expone una ruta ejemplar para preparar un derivado de galactosa-PEG que está basado en un resto de galactosa-6-amina. Por tanto, se convierte la galactosamina en un azúcar-nucleótido y se funcionaliza el resto amina de la galactosamina con un derivado de PEG activo.

10

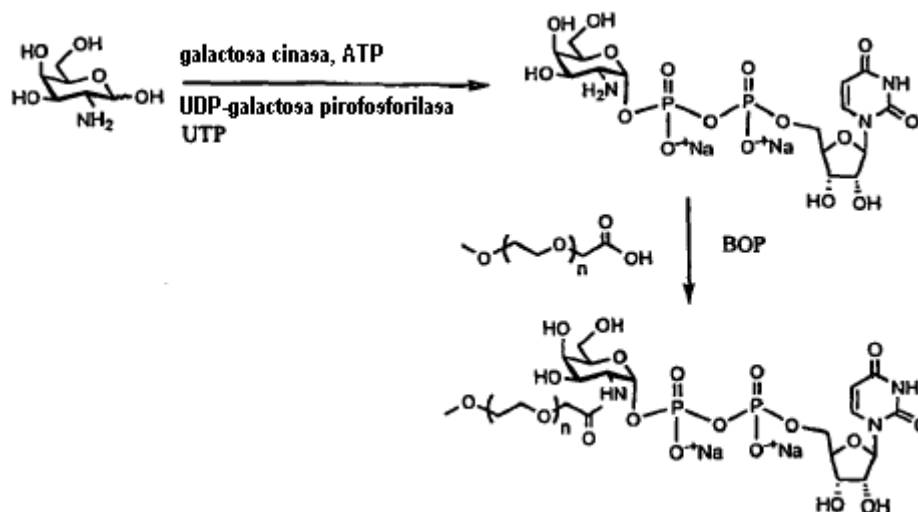
Esquema 10



El Esquema 11 proporciona otra ruta ejemplar para derivados de galactosa. El punto de partida para el Esquema 11 es la galactosa-2-amina, que se convierte en un azúcar-nucleótido. El resto amina del azúcar-nucleótido es el lugar de unión de un derivado de PEG, tal como el ácido carboxílico de metoxi-PEG (mPEG).

15

Esquema 11



Los restos ejemplares unidos a los conjugados dados a conocer en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, derivados de PEG (por ejemplo, acil-PEG, acilalquil-PEG, alquilalquil-PEG, carbamoil-PEG, aril-PEG, alquil-PEG),  
 5 derivados de PPG (por ejemplo, acil-PPG, acilalquil-PPG, alquilalquil-PPG, carbamoil-PPG, aril-PPG), poli(ácido aspártico), poliglutamato, polilisina, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, manosa-6-fosfato, heparina, heparano, SLex, manosa, manosa-6-fosfato, silalil-Lewis X, FGF, VFGF, proteínas (por ejemplo, transferrina), condroitina, queratano, dermatano, dextrano, dextrano modificado, amilosa, bisfosfato, poli-SA, ácido hialurónico, queratano, albúmina, integrinas, oligosacáridos antenados, péptidos y similares. Los métodos de conjugación de los diversos grupos modificadores con un resto sacárido están fácilmente accesibles para los especialistas en la materia  
 10 ("POLY(ETHYLENE GLYCOL CHEMISTRY : BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS", J. Milton Harris, Ed., Plenum Pub. Corp., 1992; "POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMICAL AND BIOLOGICAL APPLICATIONS", J. Milton Harris, Ed., ACS Symposium Series N° 680, American Chemical Society, 1997; Hermanson, "BIOCONJUGATE TECHNIQUES", Academic Press, San Diego, 1996 y Dunn *et al.*, Eds. "POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS2, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

#### Purificación de azúcares, azúcares-nucleótidos y derivados

Los azúcares-nucleótidos y derivados producidos mediante los procesos anteriores pueden usarse sin purificación. Sin embargo, se prefiere habitualmente recuperar el producto. Pueden usarse técnicas estándares bien conocidas para la recuperación de sacáridos glicosilados tales como cromatografía en capa fina o gruesa, cromatografía en columna,  
 20 cromatografía de intercambio iónico o filtración por membrana. Se prefiere usar filtración por membrana, más preferiblemente utilizando una membrana osmótica inversa o una o más técnicas cromatográficas en columna para la recuperación como se discute a continuación en la presente memoria y en la bibliografía citada en la presente memoria. Por ejemplo, puede usarse una filtración por membrana en la que las membranas tienen un corte de peso molecular de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 10.000 para eliminar de las proteínas los reactivos que tienen un peso molecular de menos de 10.000 Da. La filtración por membrana u ósmosis inversa pueden usarse entonces para eliminar sales y/o purificar los sacáridos producto (véase, por ejemplo, el documento WO 98/15581). Las membranas de nanofiltro son una clase de membranas de ósmosis inversa que dejan pasar sales monovalentes pero que retienen sales polivalentes y solutos no cargados mayores de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Da, dependiendo de la membrana usada. Por tanto, en una aplicación típica, los sacáridos preparados mediante los métodos de la  
 30 presente invención se retendrán en la membrana y las sales contaminantes pasarán a su través.

#### G. Grupos reticulantes

La preparación del azúcar modificado para uso en los métodos de la presente invención incluye la unión de un grupo modificador a un residuo de azúcar y la formación de un aducto estable que es un sustrato de una glicosiltransferasa. Por tanto, a menudo se prefiere usar un agente reticulante para conjugar el grupo modificador y el azúcar. Los  
 35 compuestos bifuncionales ejemplares que pueden usarse para unir grupos modificadores con restos de carbohidrato incluyen, pero sin limitación, polietilenglicoles, poliamidas, poliéteres, poliésteres y similares bifuncionales. Los enfoques generales para ligar carbohidratos con otras moléculas son conocidos en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Lee *et al.*, *Biochemistry* 28: 1856 (1989); Bhatia *et al.*, *Anal. Biochem.* 178: 408 (1989); Janda *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 8886 (1990) y Bednarski *et al.*, documento WO 92/18135. En la discusión siguiente, se tratan los grupos reactivos que están en el resto de azúcar del azúcar modificado naciente. Centrar la discusión es por razones de claridad de ilustración. Los  
 40 especialistas en la materia apreciarán que la discusión es relevante para los grupos reactivos en el grupo modificador también.

Una estrategia ejemplar implica la incorporación de un sulfhidrilo protegido al azúcar usando el reticulante heterobifuncional SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo) y desprotegiendo entonces el sulfhidrilo para la formación de un enlace disulfuro con otro sulfhidrilo en el grupo modificador.

5 Si el SPDP afecta negativamente la capacidad del azúcar modificado de actuar como sustrato de glicosiltransferasa, se usa uno de una serie de otros reticulantes tales como 2-iminotiolano o S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) para formar un enlace disulfuro. El 2-iminotiolano reacciona con aminas primarias, incorporando instantáneamente un sulfhidrilo no protegido a la molécula que contiene amina. El SATA reacciona también con aminas primarias, pero incorpora un sulfhidrilo protegido que se desacila después usando hidroxilamina produciendo un sulfhidrilo libre. En cada caso, el sulfhidrilo incorporado es libre de reaccionar con otros sulfhidrilos o sulfhidrilos protegidos como SPDP, formando el enlace disulfuro necesario.

10 La estrategia anteriormente descrita es ejemplar, y no limitante, de los ligadores de uso en la invención. Están disponibles otros reticulantes que pueden usarse en diferentes estrategias para reticular el grupo modificador con el péptido. Por ejemplo, TPCH (S-(2-tiopiridil)-L-cisteinhidrazida y TPMPH ((S-(2-tiopiridil)mercaptopropionohidrazida) reaccionan con restos de carbohidrato que se han oxidado anteriormente por tratamiento con peryodato suave, formando por tanto un enlace de hidrazona entre la porción de hidrazida del reticulante y los aldehídos generados por peryodato. TPCH y TPMPH introducen un grupo sulfhidrilo protegido con 2-piridiltiona en el azúcar, que puede desprotegerse con DTT y usarse posteriormente para conjugación, tal como formando enlaces disulfuro entre componentes.

15 Si el enlace disulfuro se encuentra inadecuado para producir azúcares modificados estables, pueden usarse otros reticulantes que incorporen enlaces más estables entre componentes. Los reticulantes heterobifuncionales GMBS (N-gamma-malimidobutirilo)succinimida) y SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano) reaccionan con aminas primarias, introduciendo por tanto un grupo maleimida en el componente. El grupo maleimida puede hacerse reaccionar posteriormente con sulfhidrilos del otro componente, que pueden introducirse por los reticulantes anteriormente mencionados, formando por tanto un enlace tioéter estable entre los componentes. Si el impedimento estérico entre los componentes interfiere con la actividad del componente o la capacidad del azúcar modificado de actuar como sustrato de una glicosiltransferasa, pueden usarse reticulantes que introduzcan brazos espaciadores largos entre los componentes, e incluyen derivados de algunos de los reticulantes anteriormente mencionados (concretamente, SPDP). Por tanto, hay abundancia de reticulantes adecuados que sean útiles, cada uno de los cuales se selecciona dependiendo de los efectos que tiene sobre el conjugado peptídico óptimo y la producción de azúcar modificado.

20 Se usa una variedad de reactivos para modificar los componentes del azúcar modificado con reticulaciones químicas intramoleculares (para revisiones de los reactivos reticulantes y procedimientos de reticulación, véanse: Wold, F., Meth. Enzymol. 25: 623-651, 1972; Weetall, H. H. y Cooney, D. A., en: "ENZYMES AS DRUGS". (Holcenberg, and Roberts, eds.) pág. 395-442, Wiley, Nueva York, 1981; Ji, T. H., Meth. Enzymol. 91: 580-609, 1983; Mattson *et al.*, Mol. Biol. Rep. 17: 167-183, 1993, todos los cuales se incorporan a la presente memoria como referencia). Los reactivos reticulantes preferidos derivan de diversos reactivos reticulantes de longitud cero homobifuncionales y heterobifuncionales. Los reactivos reticulantes de longitud cero incluyen la conjugación directa de dos grupos químicos intrínsecos sin introducción de material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de un enlace disulfuro pertenecen a esta categoría. Es otro ejemplo los reactivos que inducen la condensación de un carboxilo y un grupo amino primario formando un enlace amida, tales como carbodiimidias, cloroformiato de etilo, reactivo de Woodward K (3'-sulfonato de 2-etil-5-fenilisoxazolio) y carbonildiimidazol. Además de estos reactivos químicos, puede usarse la enzima transglutaminasa (glutamilpéptido  $\gamma$ -glutamilttransferasa; EC 2.3.2.13) como reactivo reticulante de longitud cero. Esta enzima cataliza las reacciones de transferencia de acilo a grupos carboxamida desde residuos de glutaminilo ligados con proteína, habitualmente con un grupo amino primario como sustrato. Los reactivos homo- y heterobifuncionales preferidos contienen dos sitios idénticos o distintos, respectivamente, que pueden ser reactivos con grupos amino, sulfhidrilo, guanidino, indol o no específicos.

## 2. Sitios específicos preferidos en reactivos de reticulación

### a. Grupos reactivos con amino

50 En una realización preferida, los sitios en el reticulante son grupos reactivos con amino. Los ejemplos no limitantes útiles de grupos reactivos con amino incluyen ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), imidoésteres, isocianato, haluros de acilo, arilazidas, ésteres de p-nitrofenilo, aldehídos y cloruros de sulfonilo.

Los ésteres de NHS reaccionan preferiblemente con los grupos amino primarios (incluyendo aromáticos) de un componente de azúcar modificado. Los grupos imidazol de las histidinas son conocidos por competir con las aminas primarias por la reacción, pero los productos de reacción son inestables y fácilmente hidrolizados. La reacción implica el ataque nucleófilo de una amina al carboxilo ácido de un éster de NHS formando una amida y liberando la N-hidroxisuccinimida. Por tanto, se pierde la carga positiva del grupo amino original.

Los imidoésteres son los reactivos acilantes más específicos para la reacción con grupos amino de los componentes de azúcar modificado. A un pH de entre 7 y 10, los imidoésteres reaccionan solo con aminas primarias. Las aminas primarias atacan los imidatos nucleófilamente produciendo un intermedio que se degrada a amidina a pH alto o a un

nuevo imidato a pH bajo. El nuevo imidato puede reaccionar con otra amina primaria, reticulando así dos grupos amino, un caso de imidato supuestamente monofuncional que reacciona de forma bifuncional. El producto principal de la reacción con aminas primarias es una amidina que es una base más fuerte que la amina original. Por lo tanto, se retiene la carga positiva del grupo amino original.

- 5 Los isocianatos (e isotiocianatos) reaccionan con las aminas primarias de los componentes de azúcar modificado formando enlaces estables. Sus reacciones con grupos sulfhidrilo, imidazol y tirosilo dan productos relativamente inestables.

Las acilazidas se usan también como reactivos específicos de amino en que las aminas nucleófilas del componente de afinidad atacan a grupos carboxilo ácidos en condiciones ligeramente alcalinas, por ejemplo a pH 8,5.

- 10 Los haluros de arilo tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno reaccionan preferiblemente con los grupos amino y grupos fenólicos de tirosina de los componentes de azúcar modificado, pero también con los grupos sulfhidrilo e imidazol.

Los ésteres de p-nitrofenilo de ácidos mono- y dicarboxílicos son también grupos reactivos con amino útiles. Aunque la especificidad de reactivo no es muy alta, los grupos  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -amino parecen reaccionar más rápidamente.

- 15 Los aldehídos tales como glutaraldehído reaccionan con aminas primarias del azúcar modificado. Aunque se forman bases de Schiff inestables tras la reacción de los grupos amino con los aldehídos de los aldehídos, el glutaraldehído puede modificar el azúcar modificado con reticulaciones estables. A pH 6-8, el pH de las condiciones de reticulación típicas, los polímeros cíclicos experimentan una deshidratación formando polímeros de aldehído insaturado  $\alpha$ - $\beta$ . Sin embargo, las bases de Schiff son estables cuando se conjugan con otro doble enlace. La interacción resonante de ambos dobles enlaces evita la hidrólisis del ligamiento de Schiff. Además, las aminas a concentraciones locales altas pueden atacar el doble enlace etilénico formando un producto de adición de Michael estable.

Los cloruros de sulfonilo aromáticos reaccionan con una variedad de sitios de los componentes de azúcar modificado, pero la reacción con los grupos amino es la más importante, dando como resultado un ligador sulfonamida estable.

#### b. Grupos reactivos con sulfhidrilo

- 25 En otra realización preferida, los sitios son grupos reactivos con sulfhidrilo. Los ejemplos útiles no limitantes de grupos reactivos con sulfhidrilo incluyen maleimidias, haluros de alquilo, disulfuros de piridilo y tioftalimidias.

Las maleimidias reaccionan preferiblemente con el grupo sulfhidrilo de los componentes de azúcar modificados formando enlaces tioéter estables. Reaccionan también a una velocidad mucho más lenta con grupos amino primarios y los grupos imidazol de histidinas. Sin embargo, a pH 7, el grupo maleimida puede considerarse un grupo específico de sulfhidrilo, puesto que a este pH la velocidad de reacción de los tioles simples es 1000 veces mayor que la de la correspondiente amina.

- 30 Los haluros de alquilo reaccionan con grupos sulfhidrilo, sulfuros, imidazoles y grupos amino. A pH neutro a ligeramente alcalino, sin embargo, los haluros de alquilo reaccionan principalmente con grupos sulfhidrilo formando enlaces tioéter estables. A un pH mayor, se favorece la reacción con grupos amino.

- 35 Los disulfuros de piridilo reaccionan con sulfhidrilos libres mediante intercambio de disulfuro, dando disulfuros mixtos. Como resultado, los disulfuros de piridilo son los grupos reactivos con sulfhidrilo más específicos.

Las tioftalimidias reaccionan con grupos sulfhidrilo libres formando disulfuros.

#### c. Residuo reactivo con carboxilo

- 40 En otra realización, se usan carbodiimidias solubles tanto en agua como en disolvente orgánico como reactivos que reaccionan con carboxilo. Estos compuestos reaccionan con grupos carboxilo libres formando una pseudourea que puede acoplarse entonces con las aminas disponibles proporcionando un ligamiento amida. Los procedimientos para modificar un grupo carboxilo con carbodiimida son bien conocidos en la materia (véase Yamada *et al.*, *Biochemistry* 20: 4836-4842, 1981).

#### 3. Sitios no específicos preferidos en reactivos reticulantes

- 45 Además del uso de restos reactivos específicos de sitio, la presente invención contempla el uso de grupos reactivos no específicos para ligar el azúcar con el grupo modificador.

Los reticulantes no específicos ejemplares incluyen grupos fotoactivables, completamente inertes en la oscuridad, que se convierten en especies reactivas tras la absorción de un fotón de la energía apropiada. En una realización preferida, los grupos fotoactivables se seleccionan de precursores de nitreno generados tras el calentamiento o fotólisis de azidas.

- 50 Los nitrenos deficientes en electrones son extremadamente reactivos y pueden reaccionar con una variedad de enlaces químicos, incluyendo N-H, O-H, C-H y C=C. Aunque pueden emplearse tres tipos de azida (derivados de arilo, alquilo y acilo), se prefieren actualmente las arilazidas. La reactividad de las arilazidas tras la fotólisis es mejor con enlaces N-H y

O-H que C-H. Los arilnitrenos deficientes en electrones expanden rápidamente el anillo formando deshidroazepinas, que tienden a reaccionar con nucleófilos en lugar de formar productos de inserción de C-H. La reactividad de las arilazidas puede aumentarse por la presencia de sustituyentes atractores de electrones tales como grupos nitro o hidroxilo en el anillo. Dichos sustituyentes desplazan el máximo de absorción de las arilazidas a una longitud de onda mayor. Las arilazidas no sustituidas tienen máximo de absorción en el intervalo de 260-280 nm, mientras que las hidroxi- y nitroarilazidas absorben luz significativamente más allá de los 305 nm. Por lo tanto, las hidroxi- y nitroarilazidas son más preferibles puesto que permiten emplear condiciones de fotólisis menos dañinas para el componente de afinidad que las arilazidas no sustituidas.

En otra realización preferida, los grupos fotoactivables se seleccionan de arilazidas fluoradas. Los productos de fotólisis de arilazidas fluoradas son los arilnitrenos, todos los cuales experimentan las reacciones características de este grupo, incluyendo la inserción de enlace C-H, con alta eficacia (Keana *et al.*, J. Org. Chem. 55: 3640-3647, 1990).

En otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan de residuos de benzofenona. Los reactivos de benzofenona tienen generalmente mayores rendimientos de reticulación que los reactivos de arilazida.

En otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan de compuestos diazoicos, que forman un carbeno deficiente de electrones tras la fotólisis. Estos carbenos experimentan una variedad de reacciones, incluyendo la inserción en enlaces C-H, la adición a dobles enlaces (incluyendo sistemas aromáticos), la atracción de hidrógeno y la coordinación con centros nucleófilos dando iones carbónicos.

En aún otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan de diazopiruvatos. Por ejemplo, el éster de p-nitrofenilo de diazopiruvato de p-nitrofenilo reacciona con aminas alifáticas dando amidas de ácido diazopirúvico que experimentan fotólisis ultravioleta formando aldehídos. El componente de afinidad modificado por diazopiruvato fotolizado reaccionará como formaldehído o glutaraldehído, formando reticulaciones.

#### 4. Reactivos homobifuncionales

##### a. Reticulantes homobifuncionales reactivos con aminas primarias

La síntesis, propiedades y aplicaciones de los reticulantes reactivos con amina se describen comercialmente en la bibliografía (para revisiones de los procedimientos y reactivos de reticulación, véase anteriormente). Están disponibles muchos reactivos (por ejemplo, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.).

Los ejemplos preferidos no limitantes de ésteres de NHS homobifuncionales incluyen glutarato de disuccinimidilo (DSG), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis-2-(succinimidoxicarboniloxi)etilsulfona (BSOCOES), bis-2-(sulfosuccinimidoxicarboniloxi)etilsulfona (sulfo-BSOCOES), bis(succinimidilsuccinato) de etilenglicol (EGS), bis(sulfosuccinimidilsuccinato) de etilenglicol (sulfo-EGS), propionato de ditiobis(succinimidilo) (DSP) y propionato de ditiobis(sulfosuccinimidilo) (sulfo-DSP). Los ejemplos preferidos no limitantes de imidoésteres homobifuncionales incluyen malonimidato de dimetilo (DMM), succinimidato de dimetilo (DMSC), adipimidato de dimetilo (DMA), pimelimidato de dimetilo (DMP), suberimidato de dimetilo (DMS), 3,3'-oxidipropionimidato de dimetilo (DODP), 3,3'-(metilendioxi)dipropionimidato de dimetilo (DMDP), 3'-(dimetilendioxi)dipropionimidato de dimetilo (DDDP), 3,3'-(tetrametilendioxi)dipropionimidato de dimetilo (DTDP) y 3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo (DTBP).

Los ejemplos preferidos no limitantes de isotiocianatos homobifuncionales incluyen: p-fenilendiisotiocianato (DITC) y estilbeno de ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico (DIDS).

Los ejemplos preferidos no limitantes de isocianatos homobifuncionales incluyen xilenodiisocianato, tolueno-2,4-diisocianato, tolueno-2-isocianato-4-isotiocianato, 3-metoxidifenilmetano-4,4'-diisocianato, 2,2'-dicarboxi-4,4'-azofenildiisocianato y hexametildiisocianato.

Los ejemplos preferidos no limitantes de haluros de arilo homobifuncionales incluyen 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFD-NB) y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona.

Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos de aldehído alifáticos homobifuncionales incluyen glioxal, malondialdehído y glutaraldehído.

Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos acilantes homobifuncionales incluyen ésteres de nitrofenilo de ácidos dicarboxílicos.

Los ejemplos preferidos no limitantes de cloruros de sulfonilo aromáticos homobifuncionales incluyen cloruro de fenol-2,4-sulfonilo y cloruro de  $\alpha$ -naftol-2,4-disulfonilo.

Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos homobifuncionales reactivos con amino adicionales incluyen bicarbonato de eritritol, que reacciona con aminas dando biscarbamatos.

##### b. Reticulantes homobifuncionales reactivos con grupos sulfhidrilo libres



La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía (para revisiones de los procedimientos y reactivos de reticulación, véase anteriormente). Muchos de los reactivos están comercialmente disponibles (por ejemplo, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

- 5 Los ejemplos preferidos no limitantes de maleimidias homobifuncionales incluyen bismaleimidohexano (BMH), N,N'-(1,3-fenilen)bismaleimida, N,N'-(1,2-fenilen)bismaleimida, azofenildmaleimida y bis-(N-maleimidometil)éter.

Los ejemplos preferidos no limitantes de disulfuros de piridilo homobifuncionales incluyen 1,4-di-3'-(2'-piridilditio)propionamidobutano (DPDPB).

- 10 Los ejemplos preferidos no limitantes de haluros de alquilo homobifuncionales incluyen 2,2'-dicarboxi-4,4'-diyodoacetamidoazobenceno, ácido  $\alpha,\alpha'$ -diyodo-p-xilenosulfónico, ácido  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-p-xilenosulfónico, N,N'-bis(bromoetil)benzilamina, N,N'-di(bromoacetil)fenilhidrazina y 1,2-di(bromoacetil)amino-3-fenilpropano.

### c. Reticulantes fotoactivables homobifuncionales

- 15 La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía (para revisiones de los procedimientos y reactivos de reticulación, véase anteriormente). Algunos de los reactivos están comercialmente disponibles (por ejemplo, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Los ejemplos preferidos no limitantes de reticulante fotoactivable homobifuncional incluyen disulfuro de bis- $\beta$ -(4-azidosalicilamido)etilo (BASED), S,S-dióxido de di-N-(2-nitro-4-azidofenil)cistamina (DNCO) y 4,4'-ditiobisfenilazida.

## 5. Reactivos heterobifuncionales

- 20 a. Reactivos heterobifuncionales reactivos con amino con un resto de disulfuro de piridilo

La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía (para revisiones de los procedimientos y reactivos de reticulación, véase anteriormente). Muchos de los reactivos están comercialmente disponibles (por ejemplo, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

- 25 Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos heterobifuncionales con un resto de disulfuro de piridilo y un éster NHS reactivo con amino incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 6-3-(2-piridilditio)propionamidohexanoato de succinimidilo (LC-SPDP), 6-3-(2-piridilditio)propionamidohexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LCSPDP), 4-succinimidiloxicarbonil- $\alpha$ -metil- $\alpha$ -(2-piridilditio)tolueno (SMPT) y 6- $\alpha$ -metil- $\alpha$ -(2-piridilditio)toluamidohexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT).

- 30 b. Reactivos heterobifuncionales reactivos con amino con un resto de maleimida

La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía. Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos heterobifuncionales con un resto de maleimida y un éster NHS reactivo con amino incluyen maleimidilacetato de succinimidilo (AMAS), 3-maleimidilpropionato de succinimidilo (BMPS), éster de N- $\gamma$ -maleimidobutiriloxisuccinimida (GMBS), éster de N- $\gamma$ -maleimidobutiriloxisulfosuccinimida (sulfo-GMBS), 6-maleimidilhexanoato de succinimidilo (EMCS), 3-maleimidilbenzoato de succinimidilo (SMB), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (sulfo-SMCC), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB) y 4-(p-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SNTB).

- 40 c. Reactivos heterobifuncionales reactivos con amino con un resto de haluro de alquilo

La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía. Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos heterobifuncionales con un resto de haluro de alquilo y un éster NHS reactivo con amino incluyen (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), (4-yodoacetil)aminobenzoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SIAB), 6-(yodoacetil)aminohexanoato de succinimidilo (SIAX), 6-(6-((yodoacetil)amino)hexanoilamino)hexanoato de succinimidilo (SIAXX), 6-(((4-(yodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carbonil)aminohexanoato de succinimidilo (SIACX) y 4-((yodoacetil)amino)metilciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SIAC).

- 50 Es un ejemplo preferido de un reactivo heterobifuncional con un éster NHS reactivo con amino y un resto de dihaluro de alquilo el 2,3-dibromopropionato de N-hidroxisuccinimidilo (SDBP). El SDBP introduce reticulaciones intramoleculares en el componente de afinidad mediante conjugación de sus grupos amino. La reactividad del resto de dibromopropionilo hacia los grupos amina primarios se controla por la temperatura de reacción (McKenzie *et al.*, *Protein Chem.* 7: 581-592 (1988)).

Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos heterobifuncionales con un resto de haluro de alquilo y un resto de éster p-nitrofenilo reactivo con amino incluyen el yodoacetato de p-nitrofenilo (NPIA).

Son conocidos otros agentes reticulantes por los especialistas en la materia. Véase, por ejemplo, Pomato *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.965.106. Está dentro de las habilidades de un especialista en la materia elegir el agente de reticulación apropiado para una aplicación particular.

#### d. Grupos ligadores escindibles

5 En una realización adicional más, el grupo ligador se proporciona con un grupo que puede escindirse para liberar el grupo modificador del residuo de azúcar. Son conocidos en la materia muchos grupos escindibles. Véanse, por ejemplo, Jung *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 761: 152-162 (1983); Joshi *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 14518-14525 (1990); Zarlring *et al.*, J. Immunol. 124: 913-920 (1980); Bouizar *et al.*, Eur. J. Biochem. 155: 141-147 (1986); Park *et al.*, J. Biol. Chem. 261: 205-210 (1986); Browning *et al.*, J. Immunol. 143: 1859-1867 (1989). Además, está comercialmente disponible un amplio intervalo de grupos ligadores escindibles bifuncionales (tanto homo- como heterobifuncionales) en proveedores tales como Pierce.

10 Los restos escindibles ejemplares pueden escindirse usando luz, calor o reactivos tales como tioles, hidroxilamina, bases, peryodato y similares. Además, ciertos grupos preferidos se escinden *in vivo* en respuesta a la endocitosis (por ejemplo, cis-aconitilo; véase Shen *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 1048 (1991)). Los grupos escindibles preferidos comprenden un resto escindible que es un miembro seleccionado del grupo consistente en grupos disulfuro, éster, imida, carbonato, nitrobenzilo, fenacilo y benzoína.

#### e. Conjugación de azúcares modificados con péptidos

20 Los azúcares modificados se conjugan con un péptido glicosilado o no glicosilado usando una enzima apropiada para mediar la conjugación. Preferiblemente, las concentraciones del(de los) azúcar(es) donante(s) modificado(s), enzima(s) y péptido(s) aceptor(es) se seleccionan de tal modo que la glicosilación proceda hasta consumir el aceptor. Las consideraciones discutidas a continuación, aunque expuestas en el contexto de una sialiltransferasa, son generalmente aplicables a otras reacciones de glicosiltransferasa.

25 Son conocidos una serie de métodos de uso de glicosiltransferasas para sintetizar estructuras de oligosacárido deseadas, y son generalmente aplicables a la presente invención. Se describen métodos ejemplares, por ejemplo, en el documento WO 96/32491, Ito *et al.*, Pure Appl. Chem. 65: 753 (1993) y en las patentes de EE.UU. nº 5.352.670, 5.374.541 y 5.545.553.

30 La presente invención se practica usando una sola glicosiltransferasa o una combinación de glicosiltransferasas. Por ejemplo, puede usarse una combinación de una sialiltransferasa y una galactosiltransferasa. En aquellas realizaciones que usan más de una enzima, las enzimas y sustratos se combinan preferiblemente en una mezcla de reacción inicial, o se añaden las enzimas y reactivos de una segunda reacción enzimática al medio de reacción una vez se completa o casi completa la primera reacción enzimática. Al realizar dos reacciones enzimáticas secuencialmente en un solo recipiente, los rendimientos globales mejoran respecto a los procedimientos en que se aísla una especie intermedia. Además, se reduce la limpieza y desecho de disolventes extra y subproductos.

35 En una realización preferida, cada de una las primera y segunda enzimas es una glicosiltransferasa. En otra realización preferida, una enzima es una endoglicosidasa. En otra realización preferida, una enzima es una exoglicosidasa. En una realización preferida adicional, se usan más de dos enzimas para ensamblar la glicoproteína modificada de la invención. Las enzimas se usan para alterar una estructura de sacárido del péptido en cualquier punto antes o después de la adición del azúcar modificado al péptido.

40 En otra realización, al menos dos de las enzimas son glicosiltransferasas y el último azúcar añadido a la estructura de sacárido del péptido es un azúcar no modificado. En lugar de ello, el azúcar modificado es interno a la estructura de glicano y por lo tanto no tiene que ser el último azúcar del glicano. En una realización ejemplar, la galactosiltransferasa puede catalizar la transferencia de Gal-PEG desde UDP-Gal-PEG al glicano, seguido de incubación en presencia de ST3Gal3 y CMP-SA, que sirve para añadir un ácido siálico no modificado "de tapa" al glicano (Figura 23A).

45 En otra realización, al menos dos de las enzimas usadas son glicosiltransferasas, y se añaden al menos dos azúcares modificados a las estructuras de glicano en el péptido. De esta manera, pueden añadirse dos o más glicoconjugados diferentes a uno o más glicanos en un péptido. Este proceso genera estructuras de glicano que tienen dos o más azúcares modificados funcionalmente diferentes. En una realización ejemplar, la incubación del péptido con GnT-1, II y UDP-GlcNAc-PEG sirve para añadir una molécula de GlcNAc-PEG al glicano; la incubación con galactosiltransferasa y UDP-Gal sirve entonces para añadir un residuo de Gal al mismo, y la incubación con ST3Gal3 y CMP-SA-Man-6-fosfato sirve para añadir una molécula de SA-manosa-6-fosfato al glicano. Esta serie de reacciones da como resultado una cadena de glicano que tiene las características funcionales de un glicano PEGilado así como una actividad orientadora de manosa-6-fosfato (Figura 23B).

55 En otra realización, al menos dos de las enzimas usadas en la reacción son glicosiltransferasas y, de nuevo, se añaden azúcares modificados diferentes a los glicanos N-ligados y O-ligados en el péptido. Esta realización es útil cuando van a añadirse dos azúcares modificados diferentes a los glicanos de un péptido, pero cuando es importante separar espacialmente los azúcares modificados en el péptido entre sí. Por ejemplo, si los azúcares modificados comprenden moléculas voluminosas incluyendo, pero sin limitación, PEG y otras moléculas tales como una molécula de ligador,

puede ser preferible este método. Los azúcares modificados pueden añadirse simultáneamente a las estructuras de glicano en un péptido, o pueden añadirse secuencialmente. En una realización ejemplar, la incubación con ST3Gal3 y CMP-SA-PEG sirve para añadir ácido siálico-PEG a los glicanos N-ligados, mientras que la incubación con ST3Gal1 y CMP-SA-bisfosfonato sirve para añadir ácido siálico-bisfosfonato a los glicanos O-ligados (Figura 23C).

- 5 En otra realización, el método hace uso de una o más exo- o endoglicosidasas. La glicosidasa es típicamente un mutante que se modifica por ingeniería genética para formar enlaces glicosilo en lugar de romperlos. La glicanasa mutante, a veces denominada glicosintasa, incluye típicamente una sustitución de un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico ácido de sitio activo. Por ejemplo, cuando la endoglicanasa es endo-H, los residuos de sitio activo sustituidos serán típicamente Asp en posición 130, Glu en posición 132 o una combinación de los mismos. Los aminoácidos se reemplazan generalmente por serina, alanina, asparagina o glutamina. Son también útiles exoglicosidasas tales como trans-sialidasa.

- 10 La enzima mutante cataliza la reacción, habitualmente mediante una etapa de síntesis que es análoga a la reacción inversa de la etapa de hidrólisis de endoglicanasa. En estas realizaciones, la molécula donante de glicosilo (por ejemplo, una estructura de oligo- o monosacárido deseada) contiene un grupo saliente y la reacción procede con la adición de la molécula donante a un residuo de GlcNAc en la proteína. Por ejemplo, el grupo saliente puede ser un halógeno tal como fluoruro. En otras realizaciones, el grupo saliente es una Asn, o un resto de Asn-péptido. En aún otras realizaciones, el residuo de GlcNAc en la molécula donante de glicosilo está modificado. Por ejemplo, el residuo de GlcNAc puede comprender un resto de 1,2-oxazolina.

- 15 En una realización preferida, cada una de las enzimas utilizadas para producir un conjugado de la invención está presentes en una cantidad catalítica. La cantidad catalítica de una enzima particular varía según la concentración del sustrato de esa enzima así como las condiciones de reacción tales como temperatura, tiempo y valor de pH. Los medios para determinar la cantidad catalítica de una enzima dada a concentraciones de sustrato y condiciones de reacción preseleccionadas son bien conocidos por los especialistas en la materia.

- 20 La temperatura a la que se lleva a cabo el proceso anteriormente descrito puede estar en el intervalo desde justo por encima de la congelación a la temperatura a la que la enzima más sensible se desnaturaliza. Los intervalos de temperatura preferidos son de aproximadamente 0°C a aproximadamente 55°C, y más preferiblemente de aproximadamente 20°C a aproximadamente 37°C. En otra realización ejemplar, uno o más componentes del presente método se realizan a una temperatura elevada usando una enzima termófila.

- 25 La mezcla de reacción se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para que el aceptor se glicosile, formando por tanto el conjugado deseado. Puede detectarse a menudo algo del conjugado después de unas pocas horas, obteniéndose cantidades recuperables habitualmente al cabo de 24 horas o menos. Los especialistas en la materia comprenderán que la velocidad de reacción depende de una serie de factores variables (por ejemplo, concentración de enzima, concentración de donante, concentración de aceptor, temperatura, volumen de disolvente), que se optimizan para un sistema seleccionado.

- 30 La presente invención proporciona también la producción a escala industrial de péptidos modificados. Como se usa en la presente memoria, una escala industrial produce generalmente al menos un gramo de conjugado acabado purificado.

- 35 En la discusión siguiente, la invención se ejemplifica mediante la conjugación de restos de ácido siálico modificado con un péptido glicosilado. El ácido siálico modificado ejemplar se marca con PEG. Centrar la siguiente discusión en el uso de PEG-ácido siálico modificado y péptidos glicosilados es por razones de claridad de ilustración y no se pretende implicar que la invención esté limitada a la conjugación de estas dos parejas. Un especialista entenderá que la discusión es generalmente aplicable a las adiciones de restos de glicosilo modificado distintos de ácido siálico. Además, la discusión es igualmente aplicable a la modificación de una unidad de glicosilo con agentes distintos de PEG incluyendo otros polímeros hidrosolubles, restos terapéuticos y biomoléculas.

- 40 Puede usarse un enfoque enzimático para la introducción selectiva de carbohidratos PEGilados o PPGilados en un péptido o glicopéptido. El método utiliza azúcares modificados que contienen PEG, PPG o un grupo funcional reactivo enmascarado, y se combina con la glicosiltransferasa o glicosilsintasa apropiada. Al seleccionar la glicosiltransferasa que preparará el ligamiento de carbohidrato deseado y utilizar el azúcar modificado como sustrato donante, puede introducirse PEG o PPG directamente en la cadena principal peptídica, en residuos de azúcar existentes de un glicopéptido o en residuos de azúcar que se han añadido a un péptido.

- 45 Está presente un aceptor de sialiltransferasa en el péptido a modificar mediante los métodos de la presente invención, en forma de una estructura de origen natural o una dispuesta allí de forma recombinante, enzimática o química. Los aceptores adecuados incluyen, por ejemplo, aceptores de galactosilo tales como Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc, Gal $\beta$ 1,4GalNAc, Gal $\beta$ 1,3GalNAc, lacto-N-tetraosa, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc, Gal $\beta$ 1,3Ara, Gal $\beta$ 1,6GlcNAc, Gal $\beta$ 1,4Glc (lactosa) y otros aceptores conocidos por los especialistas en la materia (véase, por ejemplo, Paulson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253: 5617-5624 (1978)).

- 50 En una realización, está presente un aceptor de sialiltransferasa en el péptido a modificar tras la síntesis *in vivo* del péptido. Dichos péptidos pueden sialilarse usando los métodos reivindicados sin modificación anterior del patrón de glicosilación del péptido. Como alternativa, los métodos de la invención pueden usarse para sialilar un péptido que no incluye un aceptor adecuado; se modifica primero el péptido para incluir un aceptor mediante métodos conocidos por los

especialistas en la materia. En una realización ejemplar, se añade un residuo de GalNAc mediante la acción de una GalNAc transferasa.

5 En una realización ejemplar, se ensambla el aceptor de galactosilo uniendo un residuo de galactosa a un aceptor apropiado ligado con el péptido, por ejemplo, GlcNAc. El método incluye incubar el péptido a modificar con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de galactosiltransferasa (por ejemplo, gal $\beta$ 1,3 o gal $\beta$ 1,4), y un donante de galactosilo adecuado (por ejemplo, UDP-galactosa). La reacción se permite proceder sustancialmente hasta su terminación o, como alternativa, se termina la reacción cuando se añade una cantidad preseleccionada del residuo de galactosa. Otros métodos de ensamblaje de un aceptor de sacárido seleccionado resultarán evidentes para los especialistas en la materia.

10 En aún otra realización, los oligosacáridos ligados con péptidos se “recortan” primero, total o parcialmente, para exponer un aceptor de sialiltransferasa o un resto al que puedan añadirse uno o más residuos apropiados para obtener un aceptor adecuado. Las enzimas tales como glicosiltransferasas y endoglicosidasas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.716.812) son útiles para las reacciones de unión y recorte. Se proporciona una discusión detallada del “recorte” y remodelación de glicanos N-ligados y O-ligados en otro lugar de la presente invención.

15 En la discusión siguiente, el método de la invención se ejemplifica mediante el uso de azúcares modificados que tienen un polímero hidrosoluble unido a los mismos. Se centra la discusión por razones de claridad de ilustración. Los especialistas apreciarán que la discusión es igualmente relevante para aquellas realizaciones en que el azúcar modificado porta un resto terapéutico, biomolécula o similar.

20 Se expone en la Figura 14 una realización ejemplar de la invención en que un residuo de carbohidrato se “recorta” antes de la adición del azúcar modificado, que expone un esquema en que se recorta una estructura rica en manosa hasta la estructura biantenada de primera generación. Se conjuga un azúcar modificado que porta un polímero hidrosoluble con uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el “recorte”. En un ejemplo, se añade un polímero hidrosoluble mediante un resto de GlcNAc conjugado con el polímero hidrosoluble. La GlcNAc modificada se une a uno o ambos de los residuos de manosa terminales de la estructura biantenada. Como alternativa, puede añadirse una GlcNAc no modificada a uno o ambos extremos de la especie ramificada.

25 En otra realización ejemplar, se añade un polímero hidrosoluble a uno o ambos de los residuos de manosa terminales de la estructura biantenada mediante un azúcar modificado que tiene un residuo de galactosa, que se conjuga con un residuo de GlcNAc añadido a los residuos de manosa terminales. Como alternativa, puede añadirse una Gal no modificada a uno o ambos residuos de GalNAc terminales.

30 En un ejemplo adicional más, se añade un polímero hidrosoluble a un residuo de Gal usando un ácido siálico modificado.

35 Se expone otra realización ejemplar en la Figura 15, que exhibe un esquema similar al mostrado en la Figura 14 en que la estructura rica en manosa se “recorta” hasta la manosa desde la que se ramifica la estructura biantenada. En un ejemplo, se añade un polímero hidrosoluble mediante una GlcNAc modificada con el polímero. Como alternativa, se añade una GlcNAc no modificada a la manosa, seguido de una Gal con un polímero hidrosoluble unido. En aún otra realización, se añaden secuencialmente residuos de GlcNAc y Gal no modificadas a la manosa, seguido de un resto de ácido siálico modificado con un polímero hidrosoluble.

40 La Figura 16 expone una realización ejemplar adicional que usa un esquema similar al mostrado en la Figura 14, en que una estructura rica en manosa se “recorta” hasta la GlcNAc a la que está unida la primera manosa. La GlcNAc está conjugada con un residuo de Gal que porta un polímero hidrosoluble. Como alternativa, se añade una Gal no modificada a la GlcNAc, seguido de la adición de un ácido siálico modificado con un azúcar hidrosoluble. En un ejemplo adicional más, se conjuga la GlcNAc terminal con Gal y se fucosila la GlcNAc posteriormente con una fucosa modificada que porta un polímero hidrosoluble.

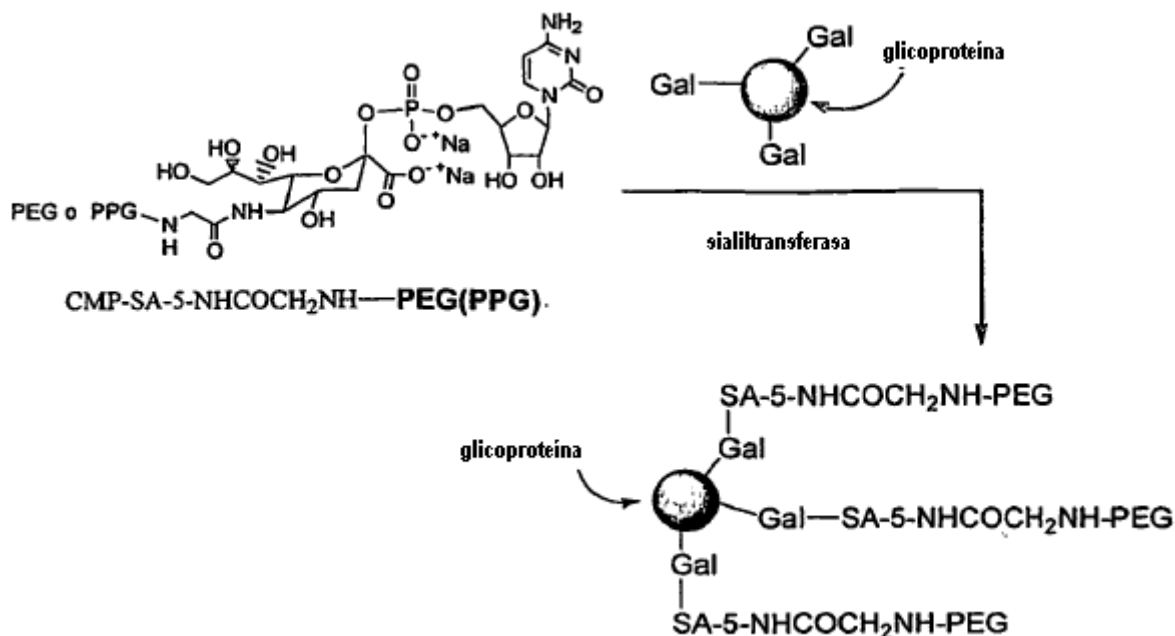
45 La Figura 17 es un esquema similar al mostrado en la Figura 14, en que se recorta una estructura rica en manosa hasta la primera GlcNAc unida a la Asn del péptido. En un ejemplo, se conjuga la GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc)<sub>a</sub> con una GlcNAc que porta un polímero hidrosoluble. En otro ejemplo, se modifica la GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc)<sub>a</sub> con Gal que porta un polímero hidrosoluble. En aún otra realización, se modifica la GlcNAc con Gal, seguido de conjugación con la Gal de un ácido siálico modificado con un polímero hidrosoluble.

50 Se exponen otras realizaciones ejemplares en las Figuras 18-22. Se proporciona una ilustración del conjunto de tipos de reacción con que puede practicarse la presente invención en cada una de las figuras anteriormente mencionadas.

55 Los ejemplos expuestos anteriormente proporcionan una ilustración de la potencia de los métodos expuestos en la presente memoria. Usando los métodos de la invención, es posible “recortar” y construir un residuo de carbohidrato sustancialmente de cualquier estructura deseada. El azúcar modificado puede añadirse a los extremos del resto de carbohidrato como se expone anteriormente, o puede intercalarse entre el núcleo peptídico y el extremo del carbohidrato.

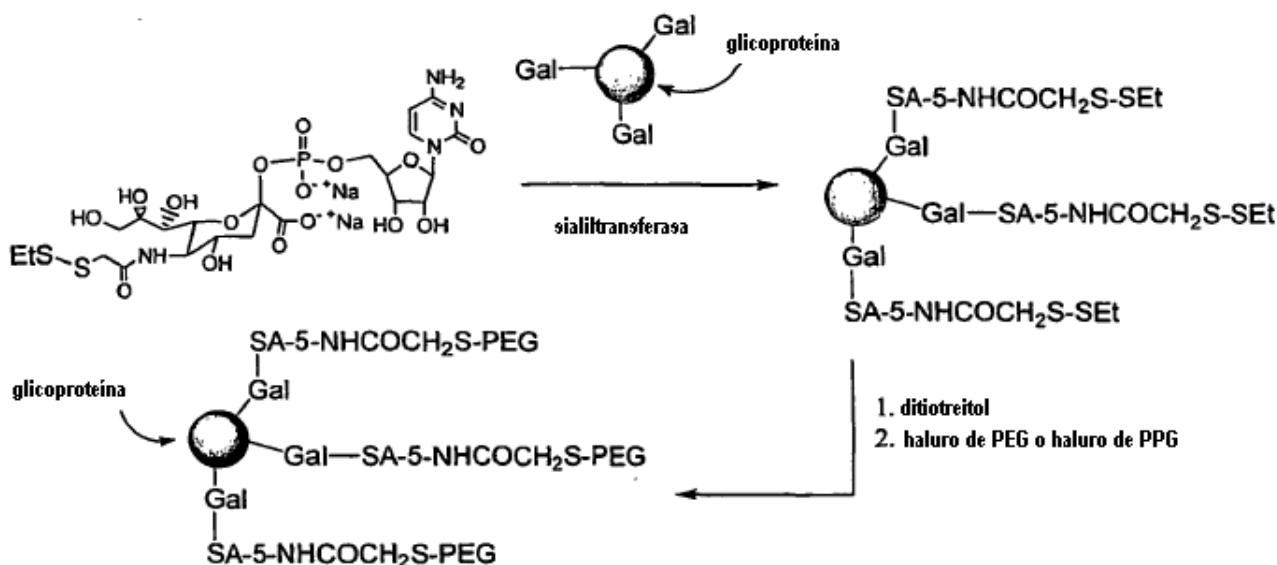
En una realización ejemplar, se elimina un ácido siálico existente de un glicopéptido usando una sialidasa, desenmascarando por tanto todos o la mayoría de los residuos de galactosilo subyacentes. Como alternativa, se marca un péptido o glicopéptido con residuos de galactosa, o un residuo oligosacárido que termina en una unidad de galactosa. Después de la exposición a, o la adición de, los residuos de galactosa, se usa una sialiltransferasa apropiada para añadir un ácido siálico modificado. El enfoque se resume en el Esquema 12.

Esquema 12



En un enfoque adicional más, resumido en el Esquema 13, está presente una funcionalidad reactiva enmascarada en el ácido siálico. El grupo reactivo enmascarado no está preferiblemente afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al péptido. Después de la unión covalente del ácido siálico modificado al péptido, se elimina el enmascaramiento y se conjuga el péptido con un agente tal como PEG, PPG, un resto terapéutico, biomolécula u otro agente. El agente se conjuga con el péptido de manera específica mediante su reacción con el grupo reactivo no enmascarado en el residuo de azúcar modificado.

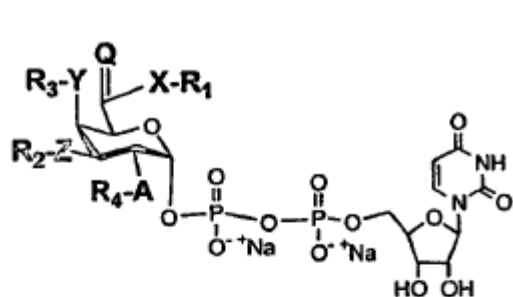
Esquema 13



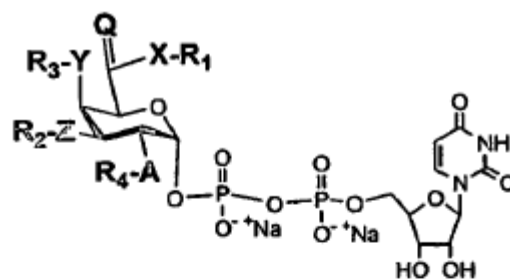
Puede usarse cualquier azúcar modificado con su glicosiltransferasa apropiada, dependiendo de los azúcares terminales de las cadenas laterales de oligosacárido del glicopéptido (Tabla 4). Como se discute anteriormente, el azúcar terminal del glicopéptido necesario para la introducción de la estructura PEGilada o PPGilada puede introducirse

naturalmente durante la expresión o puede producirse después de la expresión usando la(s) glicosidasa(s), glicosiltransferasa(s) o mezcla de glicosidasa(s) y glicosiltransferasa(s) apropiadas.

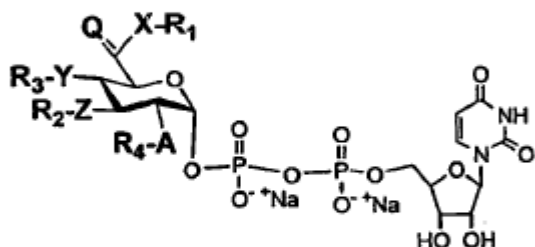
**Tabla 4.** Azúcares modificados



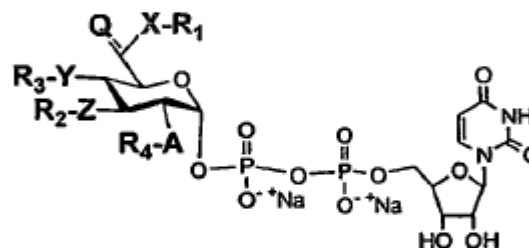
derivados de UDP-galactosa



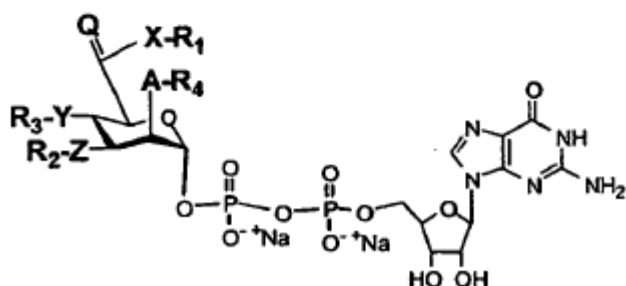
derivados de UDP-galactosamina  
(cuando A = NH, R<sub>4</sub> puede ser acetilo)



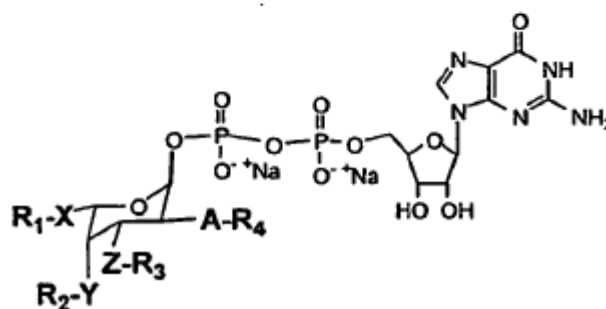
derivados de UDP-glucosa



derivados de UDP-glucosamina  
(cuando A = NH, R<sub>4</sub> puede ser acetilo)



derivados de GDP-manosa



derivados de GDP-fucosa

X= O, NH, S, CH<sub>2</sub>, N-(R<sub>1-5</sub>)<sub>2</sub>

Y= X; Z= X; A= X; B= X

Q= H<sub>2</sub>, O, S, NH, N-R

R, R<sub>1-4</sub>= H, ligador-M, M

M= ligando de interés

Ligando de interés= acil-PEG, acil-PPG, alquil-PEG, acilalquil-PEG, acilalquil-PPG, carbamoil-PEG, carbamoil-PPG, PEG, PPG, acilarilPEG, acilaril-PPG, aril-PEG, aril-PPG, manosa-6-fosfato, heparina, heparano, SLex, manosa, FGF, VFGF, proteína, condroitina, queratano, dermatano, albúmina, integrinas, péptidos, etc.

5

En una realización ejemplar adicional, se hace reaccionar UDP-galactosa-PEG con β1,4-galactosiltransferasa de leche bovina, transfiriendo por tanto la galactosa modificada a la estructura de N-acetilglucosamina terminal apropiada. Los residuos de GlcNAc terminales en el glicopéptido pueden producirse durante la expresión, como puede ocurrir en aquellos sistemas de expresión como mamíferos, insectos, plantas u hongos, pero pueden producirse también tratando el glicopéptido con una sialidasa y/o glicosidasa y/o glicosiltransferasa, según sea necesario.

10

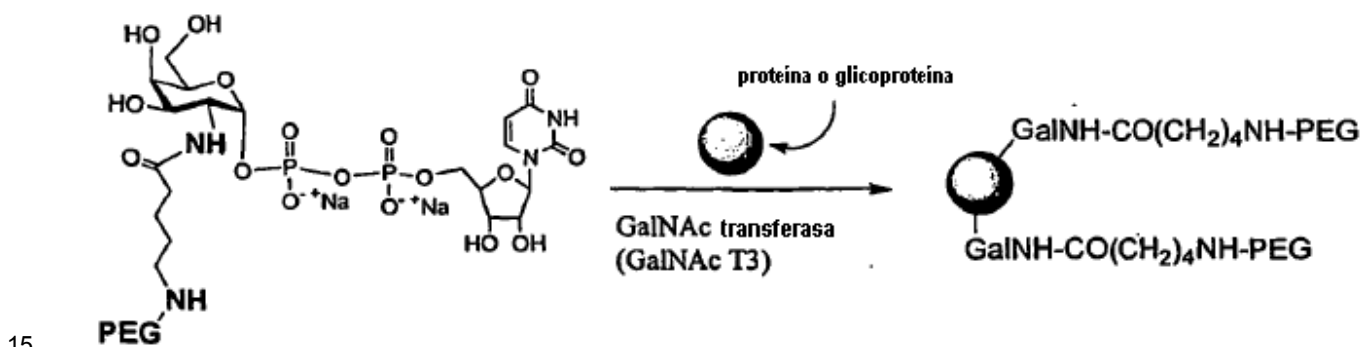
En otra realización ejemplar, se utiliza una GlcNAc transferasa, tal como GnT-I-IV, para transferir GlcNAc PEGilada a un residuo de manosa en un glicopéptido. En aún otra realización ejemplar, se retiran enzimáticamente las estructuras de glicano N- y/o O-ligados de un glicopéptido para exponer un aminoácido o un residuo de glicosilo terminal, que se conjuga posteriormente con el azúcar modificado. Por ejemplo, se usa una endoglicanasa para eliminar las estructuras N-ligadas de un glicopéptido y para exponer una GlcNAc terminal en forma de GlcNAc ligada con Asn en el glicopéptido.

15

Se usa UDP-Gal-PEG y la galactosiltransferasa apropiada para introducir la funcionalidad PEG- o PPG-galactosa en la GlcNAc expuesta.

En una realización alternativa, se añade el azúcar modificado directamente a la cadena principal peptídica usando una glicosiltransferasa conocida por transferir residuos de azúcar a la cadena principal peptídica. Esta realización ejemplar se expone en el Esquema 14. Las glicosiltransferasas ejemplares útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, GalNAc transferasas (GalNAc T1-14), GlcNAc transferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, xilosiltransferasas, manosiltransferasas y similares. El uso de este enfoque permite la adición directa de azúcares modificados a péptidos que carecen de cualquier carbohidrato o, como alternativa, a glicopéptidos existentes. En ambos casos, la adición del azúcar modificado ocurre en posiciones en la cadena principal peptídica como se definen por la especificidad de sustrato de la glicosiltransferasa, y no de manera aleatoria como ocurre durante la modificación de una cadena principal peptídica de proteína usando métodos químicos. Puede introducirse un conjunto de agentes en proteínas o glicopéptidos que carecen de la secuencia peptídica del sustrato de glicosiltransferasa mediante la introducción por ingeniería genética de la secuencia aminoacídica apropiada en la cadena peptídica.

Esquema 14



En cada una de las realizaciones ejemplares expuestas anteriormente, puede utilizarse una o más etapas de modificación química o enzimática después de la conjugación del azúcar modificado con el péptido. En una realización ejemplar, se usa una enzima (por ejemplo, fucosiltransferasa) para adjuntar una unidad de glicosilo (por ejemplo, fucosa) al azúcar modificado terminal unido al péptido. En otro ejemplo, se utiliza una reacción enzimática para “tapar” sitios con que el azúcar modificado no conseguía conjugarse. Como alternativa, se utiliza una reacción química para alterar la estructura del azúcar modificado conjugado. Por ejemplo, el azúcar modificado conjugado se hace reaccionar con agentes que estabilizan o desestabilizan su ligamiento con el componente peptídico con el que está unido el azúcar modificado. En otro ejemplo, se desprotege un componente del azúcar modificado después de su conjugación con el péptido. Un especialista apreciará que hay un conjunto de procedimientos enzimáticos y químicos que son útiles en los métodos de la invención en una etapa después de conjugar el azúcar modificado con el péptido. La elaboración posterior del conjugado de azúcar modificado-péptido está dentro del alcance de la invención.

Orientación peptídica con manosa-6-fosfato

Se da a conocer también un péptido que está derivatizado con al menos un resto manosa-6-fosfato. El resto manosa-6-fosfato orienta el péptido a un lisosoma de una célula y es útil, por ejemplo, para orientar proteínas terapéuticas a lisosomas para la terapia de enfermedades de almacenamiento lisosómico.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son un grupo de más de 40 trastornos que son el resultado de defectos en los genes que codifican las enzimas que degradan los productos de desecho de glicolípidos o polisacáridos en los lisosomas de las células. Los productos enzimáticos, por ejemplo azúcares y lípidos, se reciclan entonces a nuevos productos. Cada uno de estos trastornos es el resultado de un rasgo recesivo heredado autosómico o ligado a X que afecta a los niveles de enzimas en el lisosoma. Generalmente, no hay actividad biológica ni funcional de las enzimas afectadas en las células y tejidos de los individuos afectados. La Tabla 5 proporciona una lista de las enfermedades de almacenamiento representativas y del defecto enzimático asociado con las enfermedades. En dichas enfermedades, la deficiencia en la función enzimática crea una deposición sistémica progresiva de sustrato de lípido o carbohidrato en lisosomas de células del cuerpo, causando eventualmente la pérdida de la función del órgano y la muerte. Se detallan la etiología genética, manifestaciones clínicas, biología molecular y posibilidades de las enfermedades de almacenamiento lisosómico en Scriver *et al.*, eds., “THE METABOLIC AND MOLECULAR BASIS OF INHERITED DISEASE”, 7ª Ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995).

**Tabla 5.** Enfermedades de almacenamiento lisosómico y defectos enzimáticos asociados

Enfermedad	Defecto enzimático
Enfermedad de Pompe	α-glucosidasa ácida (maltasa ácida)

Enfermedad	Defecto enzimático
MOPSI* (enfermedad de Hurler)	$\alpha$ -L-iduronidasa
MPSII (enfermedad de Hunter)	iduronato sulfatasa
MPSIII (Sanfilippo)	heparano N-sulfatasa
MPSIV (Morquio A)	galactosa-6-sulfatasa
MPSIV (Morquio B)	$\beta$ -galactosidasa ácida
MPSVII (enfermedad de Sly)	$\beta$ -glucuronidasa
Mucopolidosis II	N-acetilglucosamina 1-fosfotransferasa
Enfermedad de Schindler	$\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa ( $\alpha$ -galactosidasa B)
Enfermedad de Wolman	lipasa ácida
Enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol	lipasa ácida
Enfermedad de Farber	ceramidasa ácida lisosómica
Enfermedad de Niemann-Pick	esfingomielinasa ácida
Enfermedad de Gaucher	glucocerebrosidasa
Enfermedad de Krabbe	galactosilceramidasa
Enfermedad de Fabry	$\alpha$ -galactosidasa A
Gangliosidosis GM1	$\beta$ -galactosidasa ácida
Galactosialidosis	$\beta$ -galactosidasa y neuraminidasa
Enfermedad de Tay-Sach	hexosaminidasa A
Leucodistrofia megacariótica	arilsulfatasa A
Enfermedad de Sandhoff	hexosaminidasa A y B

\*MPS= mucopolisacaridosis

De Duve sugirió por primera vez que la sustitución de la enzima lisosómica faltante por una enzima exógena biológicamente activa podría ser un enfoque viable para el tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico (De Duve, *Fed. Proc.* 23: 1045 (1964)). Desde esa fecha, diversos estudios han sugerido que la terapia de sustitución enzimática puede ser beneficiosa para tratar diversas enfermedades de almacenamiento lisosómico. El mayor éxito se ha mostrado con individuos con enfermedad de Gaucher de tipo I, que se han tratado con la enzima exógena  $\beta$ -glucocerebrosidasa preparada a partir de placenta (Ceredase™) o, más recientemente, recombinante (Cerezyme™). Se ha sugerido que la sustitución enzimática puede ser también beneficiosa para tratar la enfermedad de Fabry, así como otras enfermedades de almacenamiento lisosómico. Véase, por ejemplo, Dawson *et al.*, *Ped. Res.* 7(8): 684-690 (1973) (*in vitro*) y Mapes *et al.*, *Science* 169: 987 (1970) (*in vivo*). Se han notificado ensayos clínicos de terapia de sustitución enzimática para pacientes de Fabry usando infusiones de plasma normal (Mapes *et al.*, *Science* 169: 987-989 (1970)),  $\alpha$ -galactosidasa A purificada de placenta (Brady *et al.*, *N. Eng. J. Med.* 279: 1163 (1973)); o  $\alpha$ -galactosidasa A purificada de bazo o plasma (Desnick *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 76: 5326-5330 (1979)), y han demostrado la eficacia bioquímica de la sustitución enzimática directa para la enfermedad de Fabry. Estos estudios indican el potencial de eliminación, o reducción significativa, del almacenamiento patológico de glicolípidos mediante sustitución enzimática repetida. Por ejemplo, en un estudio (Desnick *et al.*, *supra*), la inyección intravenosa de enzima purificada dio como resultado una reducción transitoria de los niveles plasmáticos del sustrato lipídico almacenado, la globotriasilceramida.

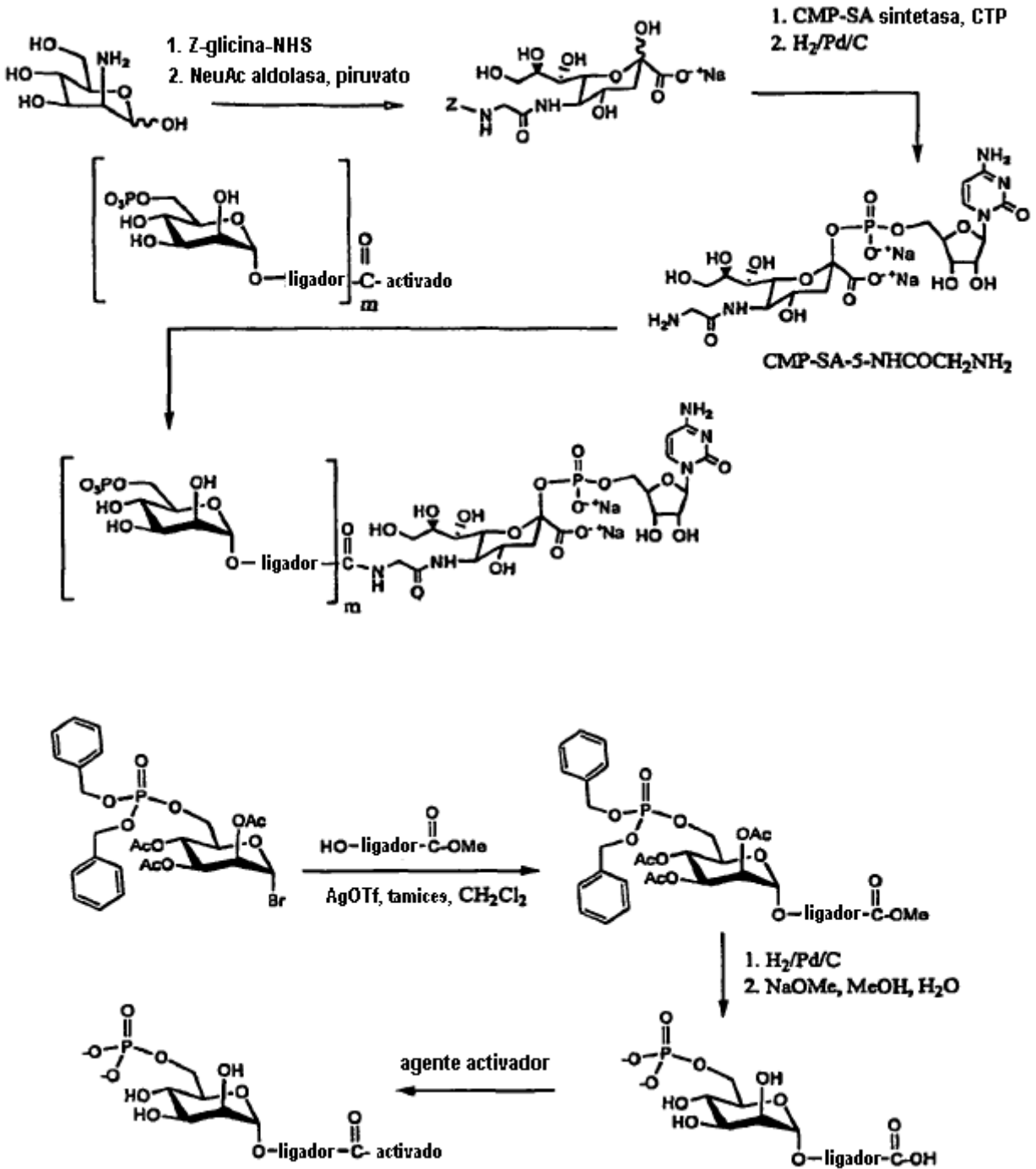
En consecuencia, existe la necesidad en la materia de métodos para proporcionar suficientes cantidades de enzimas lisosómicas biológicamente activas tales como  $\alpha$ -galactosidasa A a células deficientes. Recientemente, enfoques recombinantes han intentado enfrentarse a estas necesidades, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.658.567; 5.580.757; Bishop *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 83: 4859-4863 (1986); Medin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93: 7917-7922 (1996); Novo, F. J., *Gene Therapy* 4: 488-492 (1997); Ohshima *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94: 2540-2544 (1997) y Sugimoto *et al.*, *Human Gene Therapy* 6: 905-915, (1995). Mediante la orientación mediada por



manosa-6-fosfato de péptidos terapéuticos a lisosomas, la presente invención proporciona composiciones y métodos para suministrar cantidades suficientes de péptidos lisosómicos biológicamente activos a células deficientes.

- 5 Por tanto, se da a conocer también un péptido según la Tabla 7 que se derivatiza con manosa-6-fosfato (Figura 24 y Figura 25). El péptido puede prepararse de forma recombinante o química. Además, el péptido puede ser la secuencia natural completa o puede estar modificado, por ejemplo, por truncamiento o extensión, o puede incluir sustituciones o deleciones. Las proteínas ejemplares que se remodelan usando un método de la presente invención incluyen glucocerebrosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa A y  $\alpha$ -glucosidasa ácida (maltasa ácida). Los péptidos modificados representativos que son de uso clínico incluyen, pero sin limitación, Ceredase™, Cerezyme™ y Fabryzym™. Un grupo glicosilo en péptidos modificados y clínicamente relevantes puede alterarse también utilizando un método de la invención. La manosa-6-fosfato se une al péptido mediante un grupo ligante de glicosilo. En una realización ejemplar, el grupo ligante de glicosilo deriva de ácido siálico. Se exponen grupos ligantes de glicosilo derivados de ácido siálico ejemplares en la Tabla 3, en que uno o más de los restos "R" es manosa-6-fosfato o un grupo espaciador que tiene uno o más restos manosa-6-fosfato unidos al mismo. El resto de ácido siálico modificado es preferiblemente el residuo terminal de un oligosacárido ligado a la superficie del péptido (Figura 26).
- 10
- 15 Además de manosa-6-fosfato, los péptidos de la divulgación pueden derivatizarse adicionalmente con un resto tal como un polímero hidrosoluble, un resto terapéutico o un resto orientador adicional. Los métodos para unir estos y otros grupos se exponen en la presente memoria. Se da a conocer también un grupo distinto de la manosa-6-fosfato que está unido al péptido mediante un derivado de ácido siálico derivatizado según la Tabla 3, en que uno o más de los restos "R" es un grupo distinto de manosa-6-fosfato.
- 20
- Se da a conocer también un resto de ácido siálico modificado con un brazo ligador basado en glicina protegido con Cbz. Se prepara el correspondiente azúcar-nucleótido y se elimina el grupo Cbz mediante hidrogenación catalítica. El azúcar-nucleótido resultante tiene una amina reactiva disponible que se pone en contacto con un derivado de manosa-6-fosfato activado, proporcionando un azúcar-nucleótido derivatizado con manosa-6-fosfato que es útil en la práctica de los métodos de la invención.
- 25
- Como se muestra en el esquema siguiente (Esquema 15), se forma un derivado de manosa-6-fosfato ejemplar convirtiendo un fosfotriéster protegido con 2-bromobencilo en el correspondiente triflato *in situ*, y haciendo reaccionar el triflato con un ligador que tiene un resto que contiene oxígeno reactivo, formando un ligamiento éter entre el azúcar y el ligador. Los grupos protectores bencilo se retiran mediante hidrogenación catalítica, y se hidroliza el éster metílico del ligador, proporcionando el correspondiente ácido carboxílico. Se activa el ácido carboxílico mediante cualquier método conocido en la materia. Un procedimiento de activación ejemplar se basa en la conversión del ácido carboxílico en éster N-hidroxisuccinimida.
- 30

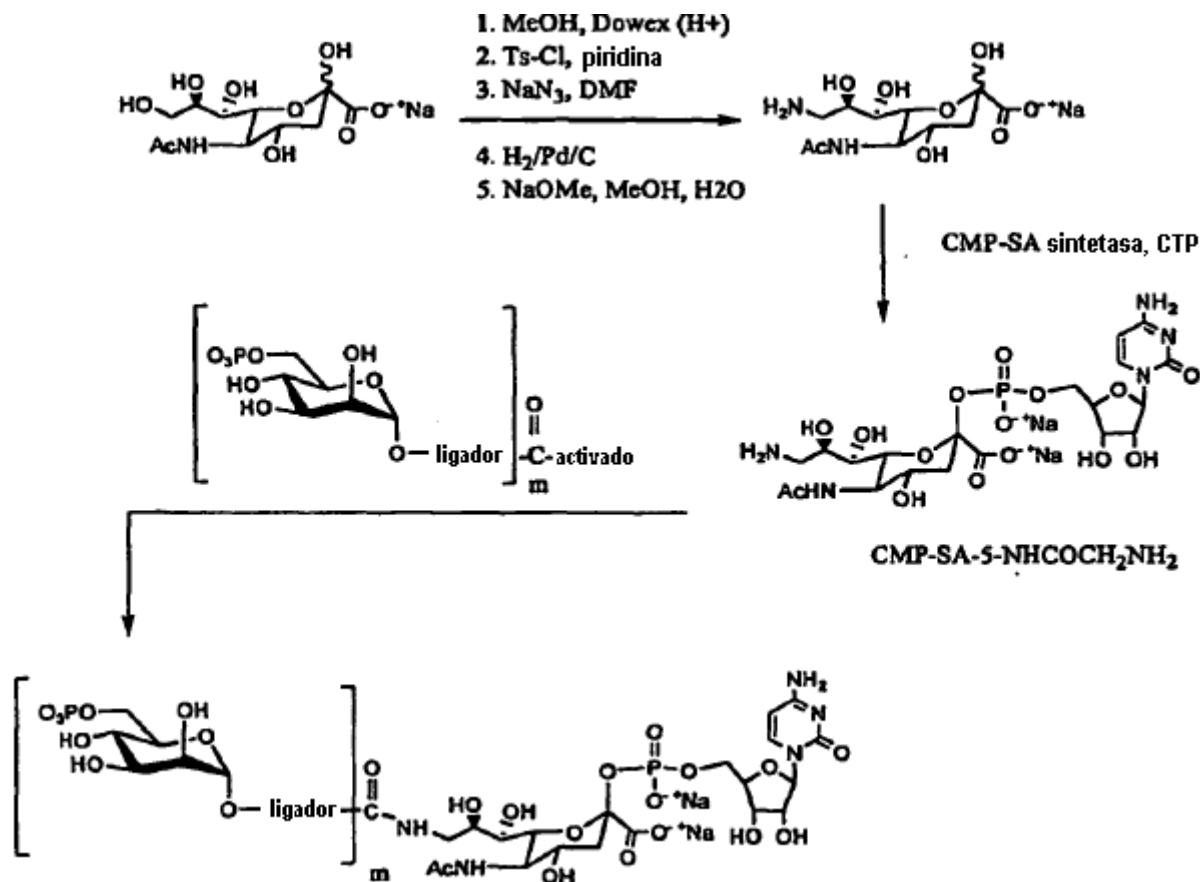
Esquema 15



Se da a conocer también en el esquema siguiente (Esquema 16) un ácido siálico N-acetilado que se convierte en una amina mediante manipulación del resto de piruvilo. Por tanto, se convierte el hidroxilo primario en un éster sulfonato y se hace reaccionar con azida de sodio. La azida se reduce catalíticamente a la correspondiente amina. El azúcar se convierte posteriormente en su análogo nucleotídico y se acopla, a través del grupo amino, con el brazo ligador derivatizado con manosa-6-fosfato preparado como se discute anteriormente.

5

Esquema 16



Los péptidos útiles para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico pueden derivatizarse con otros restos orientadores incluyendo, pero sin limitación, transferrina (para suministrar el péptido a través de la barrera hematoencefálica y a endosomas), carnitina (para suministrar el péptido a células musculares) y fosfonatos, por ejemplo bisfosfonatos (para orientar el péptido a hueso y otros tejidos calcíferos). El resto orientador y el péptido terapéutico se conjugan mediante cualquier método discutido en la presente memoria o conocido de otro modo en la materia.

5

En un ejemplo de referencia, el agente orientador y el péptido terapéutico se acoplan a través de un resto ligador. En este ejemplo, al menos uno del péptido terapéutico o el agente orientador se acopla con el resto ligador a través de un grupo ligante de glicosilo intacto según un método de la invención. En una realización, el resto ligador incluye un poliéter tal como polietilenglicol. En otra realización ejemplar, el resto ligador incluye al menos un enlace que se degrada *in vivo*, liberando el péptido terapéutico del agente orientador después del suministro del conjugado al tejido o región diana del cuerpo.

10

En aún otro ejemplo de referencia, se altera la distribución *in vivo* del resto terapéutico mediante la alteración de una glicofoma en el resto terapéutico sin conjugar el péptido terapéutico con un resto orientador. Por ejemplo, el péptido terapéutico puede desviarse de la captación por el sistema reticuloendotelial tapando un resto de galactosa terminal de un grupo glicosilo con un ácido siálico (o un derivado del mismo) (Figuras 24 y 27). La sialilación para cubrir la Gal terminal evita la captación del péptido por receptores de asialoglicoproteína hepática (ASGP), y puede extender la semivida del péptido en comparación con péptidos que tienen solo cadenas de glicano complejas en ausencia de sialilación.

20

## II. Péptidos/glicopéptidos de la invención

Se da a conocer también una composición que comprende múltiples copias de un solo péptido que tiene un núcleo de trimanosilo elemental como estructura de glicano primaria unida al mismo. El péptido puede ser una molécula terapéutica. La forma natural del péptido puede comprender glicanos N-ligados complejos o puede ser un glicano rico en manosa. El péptido puede ser un péptido de mamífero y es preferiblemente un péptido humano. El péptido puede seleccionarse del grupo consistente en una inmunoglobulina, eritropoyetina, péptido activador de tipo de tejido y otros (véase la Figura 28).

25

Se exponen en la Figura 28 los péptidos ejemplares cuyos glicanos pueden remodelarse usando los métodos de la invención.

**Tabla 6.** Péptidos preferidos para la remodelación de glicano

<u>Hormonas y factores de crecimiento</u>	<u>Receptores y receptores quiméricos</u>
G-CSF	CD4
GM-CSF	Receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R)
TPO	Fusión de TNF-R:Fc de IgG
EPO	Alfa-CD20
Variantes de EPO	PSGL-1
FSH	Complemento
HGH	GlyCAM o su quimera
Insulina	N-CAM o su quimera
Alfa-TNF	<u>Anticuerpos monoclonales (inmunoglobulinas)</u>
Leptina	mAb anti-RSV
Gonadotropina coriónica humana	mAb anti-receptor de IL-2
<u>Enzimas e inhibidores</u>	mAb anti-CEA
TPA	mAb anti-glicoproteína IIb/IIIa
Variantes de TPA	mAb anti-EGF
Urocinasa	mAb anti-Her2
Factores VII, VIII, IX, X	mAb de CD20
ADNasa	mAb de alfa-CD3
Glucocerebrosidasa	mAb de TNF $\alpha$
Hirudina	mAb de CD4
Antitripsina $\alpha$ 1 (inhibidor de proteasa $\alpha$ 1)	mAb de PSGL-1
Antitrombina III	mAb anti-proteína F del virus respiratorio sincitial
$\alpha$ -glucosidasa ácida (maltasa ácida)	<u>Células</u>
$\alpha$ -galactosidasa A	Eritrocitos
$\alpha$ -L-iduronidasa	Leucocitos (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos, células NK, neutrófilos, monocitos y similares)
Urocinasa	Citoblastos
<u>Citocinas y citocinas quiméricas</u>	Otras
Interleucina 1 (IL-1), 1B, 2, 3, 4	Antígeno de superficie de hepatitis B (HbsAg)
Interferón alfa (IFN- $\alpha$ )	
IFN- $\alpha$ -2b	
IFN- $\beta$	
IFN- $\gamma$	
IFN- $\omega$	
Toxina de difteria-IL-2 quimérica	

**Tabla 7.** Péptidos más preferidos para la remodelación de glicanos

Alfa-galactosidasa A	Interleucina 2 (IL-2)
Alfa-L-iduronidasa	Factor VIII
Antitrombina III	ADNasa hr
Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)	Insulina
Interferón $\alpha$	Proteína de superficie de hepatitis B (HbsAg)
Interferón $\beta$	Hormona de crecimiento humana (HGH)
Interferón $\omega$	Gonadotropina coriónica humana
Factor VII de coagulación	Urocinasa
Factor IX de coagulación	Fusión de receptor de TNF-Fc de IgG (Enbrel™)
Hormona estimulante de folículo (FSH)	mAb de Her-2 (Herceptin™)
Eritropoyetina (EPO)	mAb de proteína F del virus respiratorio sincitial (Synagis™)
Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)	mAb de CD20 (Rituxan™)
Interferón $\gamma$	mAb de TNF $\alpha$ (Remicade™)
Inhibidor de proteasa $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1-antitripsina)	mAb de glicoproteína IIb/IIIa (Reopro™)
Activador de plasminógeno de tipo tisular (TPA)	
Glucocerebrosidasa (Cerezyme™)	

Se proporciona en la Figura 28 una lista más detallada de los péptidos útiles en la invención y su fuente.

5 Otros péptidos ejemplares que se modifican mediante los métodos de la invención incluyen los miembros de la familia de inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos, moléculas de MHC, receptores de linfocitos T y similares), receptores intercelulares (por ejemplo, integrinas, receptores de hormonas o factores de crecimiento y similares), lectinas y citocinas (por ejemplo, interleucinas). Los ejemplos adicionales incluyen activador de plasminógeno de tipo tisular (TPA), renina, factores de coagulación tales como factor VIII y factor IX, bombesina, trombina, factor de crecimiento hematopoyético, factores estimulantes de colonias, antígenos víricos, péptidos de complemento,  $\alpha$ 1-antitripsina, eritropoyetina, ligando 1 del glicopéptido selectina P (PSGL-1), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, antitrombina III, interleucinas, interferones, péptidos A y C, fibrinógeno, Herceptin™, leptina, glicosidasas, entre muchos otros. Esta lista de péptidos es ejemplar y no debería considerarse que sea exclusiva. En lugar de ello, como resulta evidente a partir de la divulgación proporcionada en la presente memoria, los métodos de la invención son aplicables a cualquier péptido en que pueda adaptarse una estructura de glicano deseada.

15 Los métodos de la invención son también útiles para modificar péptidos quiméricos incluyendo, pero sin limitación, péptidos quiméricos que incluyen un resto derivado de una inmunoglobulina tal como IgG.

Los péptidos modificados mediante los métodos de la invención pueden ser péptidos sintéticos o de tipo silvestre o pueden ser péptidos mutados, producidos mediante métodos conocidos en la materia tales como mutagénesis dirigida a sitio. La glicosilación de los péptidos está típicamente N-ligada u O-ligada. Es un N-ligamiento ejemplar la unión del azúcar modificado a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento de la unión enzimática de un resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un péptido crea un sitio de glicosilación potencial. Como se describe en otro lugar de la presente memoria, la glicosilación O-ligada designa la unión de un azúcar (por ejemplo, N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa) a una cadena lateral de hidroxilo de un hidroxiaminoácido, preferiblemente serina o treonina, aunque pueden usarse también 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Se discuten a continuación varias realizaciones ejemplares de la invención. Aunque varias de estas realizaciones usan péptidos que tienen nombres que son marcas comerciales y otros péptidos específicos como péptido ejemplar, estos ejemplos no están limitados a ningún péptido específico. Las siguientes realizaciones ejemplares se contempla que incluyen todos los equivalentes peptídicos y variantes de cualquier péptido. Dichas variantes incluyen, pero sin

limitación, añadir y eliminar sitios de glicosilación N-ligados y O-ligados, y proteínas de fusión con sitios de glicosilación añadidos. Un especialista en la materia apreciará que las siguientes realizaciones y los métodos básicos dados a conocer en la presente memoria pueden aplicarse a muchos péptidos con igual éxito.

5 En una realización ejemplar, la presente invención proporciona métodos para modificar el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Las Figuras 29A a 29G exponen algunos ejemplos de cómo se logra esto usando la metodología dada a conocer en la presente memoria. En la Figura 29B, se recorta usando una sialidasa un péptido G-CSF que se expresa en un sistema celular de mamífero. Los residuos así expuestos se modifican mediante la adición de un resto de ácido siálico-polietilenglicol (resto de PEG) usando un donante apropiado para ello y ST3Gal1. La Figura 29C expone un esquema ejemplar para la modificación de un péptido G-CSF que se expresa en una célula de insecto. 10 El péptido se modifica añadiendo un resto de galactosa usando un donante apropiado para ello y una galactosiltransferasa. Los residuos de galactosa se funcionalizan con PEG mediante un derivado de ácido siálico-PEG, por la acción de ST3Gal1. En la Figura 29D, se pone en contacto G-CSF expresado en bacterias con un donante de N-acetilgalactosamina y N-acetilgalactosamina transferasa. El péptido se funcionaliza con PEG usando un donante de ácido siálico PEGilado y una sialiltransferasa. En la Figura 29E, se pone en contacto el G-CSF expresado por células de mamífero con un donante de ácido siálico que está modificado con ácido levulínico, añadiendo una cetona reactiva al donante de ácido siálico. Después de la adición a un residuo de glicosilo en el glicano del péptido, se derivatiza la cetona con un resto tal como un hidrazino- o amino-PEG. En la Figura 29F, se remodela el G-CSF expresado en bacterias poniendo en contacto el péptido con una enzima endo-GalNAc en condiciones en que funciona de manera sintética en lugar de hidrolítica, añadiendo así una molécula de PEG-Gal-GalNAc desde un derivado activado del mismo. La Figura 29G proporciona otra ruta para remodelar G-CSF expresado en bacterias. El polipéptido se derivatiza con un residuo de N-acetilgalactosamina PEGilado poniendo en contacto el polipéptido con una N-acetilgalactosamina transferasa y un donante apropiado de N-acetilgalactosamina PEGilado. 20

#### A. Creación o eliminación de sitios de glicosilación N-ligados

25 La presente invención contempla el uso de péptidos en que el sitio de la(s) cadena(s) de glicano en el péptido se ha alterado respecto al del péptido nativo. Típicamente, se ligan las cadenas de glicano N-ligado con la estructura peptídica primaria en los residuos de asparagina, estando el residuo de asparagina dentro de una secuencia aminoacídica que se reconoce por una glicosiltransferasa unida a membrana en el retículo endoplasmático (RE). Típicamente, el sitio de reconocimiento en la estructura peptídica primaria es la secuencia asparagina-X-serina/treonina, en que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico. Aunque este sitio de reconocimiento es típico, la invención comprende adicionalmente péptidos que tienen cadenas de glicano N-ligadas en otros sitios de reconocimiento en que se añaden las cadenas N-ligadas usando glicosiltransferasas naturales o recombinantes. 30

Puesto que el sitio de reconocimiento para la glicosilación N-ligada de un péptido es conocido, está dentro de las habilidades de los especialistas en la materia crear secuencias peptídicas primarias mutadas en que se elimina un sitio de reconocimiento de glicosilación N-ligado nativo o, como alternativa o además, se crean uno o más sitios de reconocimiento de N-glicosilación adicionales. Más sencillamente, puede eliminarse un residuo de asparagina de la secuencia primaria del péptido, eliminando así el sitio de unión de un glicano, eliminando por tanto un glicano del péptido maduro. Por ejemplo, un sitio de reconocimiento nativo con la secuencia asparagina-serina-serina puede modificarse por ingeniería genética para tener la secuencia leucina-serina-serina, eliminando por tanto un sitio de glicosilación N-ligado en esta posición. 35

40 Además, puede eliminarse un sitio de glicosilación N-ligado alterando los residuos en el sitio de reconocimiento de modo que, aunque esté presente el residuo de asparagina, estén ausentes uno o más de los residuos de reconocimiento adicionales. Por ejemplo, una secuencia nativa de asparagina-serina-serina puede mutarse a asparagina-serina-lisina, eliminando por tanto un sitio de N-glicosilación en esa posición. En el caso de sitios de glicosilación N-ligados que comprenden residuos distintos de los sitios de reconocimiento típicos descritos anteriormente, el especialista puede determinar la secuencia y los residuos necesarios para el reconocimiento por la glicosiltransferasa apropiada, y mutar entonces al menos un residuo de modo que la glicosiltransferasa apropiada no reconozca ya el sitio. En otras palabras, está dentro de las habilidades del especialista manipular la secuencia primaria de un péptido de tal modo que se creen o eliminen sitios de glicosilación, o ambas cosas, generando así un péptido que tiene un patrón de glicosilación alterado. 45 No debería considerarse por tanto que la invención esté limitada a ninguna secuencia peptídica primaria proporcionada en la presente memoria como única secuencia para la remodelación de glicano, sino que en lugar de ello debería considerarse que incluye todas y cada una de las secuencias peptídicas adecuadas para la remodelación de glicano. 50

Para crear un péptido mutante, se altera la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia primaria del péptido de modo que se muten los codones nativos que codifican residuos aminoacídicos nativos para generar un codón que codifica otro residuo aminoacídico. Las técnicas para alterar la secuencia de ácido nucleico son comunes en la materia y se describen, por ejemplo, en cualquier manual de biología molecular bien conocido. 55

Además, el ácido nucleico que codifica una estructura peptídica primaria puede sintetizarse *in vitro* usando técnicas estándares. Por ejemplo, puede sintetizarse una molécula de ácido nucleico en una "maquinaria génica" usando protocolos tales como el método de la fosforamidita. Si se requiere un ADN bicatenario sintetizado químicamente para una aplicación tal como la síntesis de un ácido nucleico o fragmento del mismo, entonces se sintetiza cada hebra complementaria separadamente. La producción de ácidos nucleicos cortos (de 60 a 80 pares de bases) es técnicamente 60

sencilla y puede lograrse sintetizando las hebras complementarias y asociándolas entonces. Para la producción de ácidos nucleicos más largos (>300 pares de bases), pueden requerirse estrategias especiales, porque la eficacia de acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis química de ADN raramente es de un 100%. Para superar este problema, se ensamblan genes sintéticos (bicatenarios) en forma modular a partir de fragmentos monocatenarios que son de 20 a 100 nucleótidos de longitud. Para revisiones de la síntesis de polinucleótidos véanse, por ejemplo, Glick y Pasternak ("Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA", 1994, ASM Press), Itakura *et al.* (1984, *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323), y Climie *et al.* (1990, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87: 633).

Adicionalmente, pueden hacerse cambios en la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido mediante mutagénesis dirigida a sitio. Como se apreciará, esta técnica emplea típicamente un vector de fago que existe tanto en forma monocatenaria como bicatenaria. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida a sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos están fácilmente disponibles y su uso es generalmente bien conocido por los especialistas en la materia. Se emplean rutinariamente también plásmidos bicatenarios en la mutagénesis dirigida a sitio que eliminan la etapa de transferir el ácido nucleico de interés desde un plásmido hasta un fago.

En general, la mutagénesis dirigida a sitio se efectúa obteniendo en primer lugar un vector monocatenario o fusionando las dos hebras de un vector bicatenario que incluye en su secuencia una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Generalmente, se prepara sintéticamente un cebador oligonucleotídico que porta la secuencia mutada deseada. Este cebador se asocia entonces con el vector monocatenario, y se somete a enzimas polimerizadoras de ADN tales como el fragmento Klenow de polimerasa I de *E. coli*, para completar la síntesis de la hebra que porta la mutación. Por tanto, se forma un heterodúplex en el que una hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hebra porta la mutación deseada. Este vector heterodúplex se usa entonces para transformar o transfectar células apropiadas tales como células de *E. coli*, y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que portan la disposición de secuencia mutada. Se ha concebido un esquema de selección genética por Kunkel *et al.* (1987, Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154: 367-382) para enriquecer los clones que incorporan el oligonucleótido mutagénico. Como alternativa, el uso de PCR™ con enzimas termoestables comercialmente disponibles, tales como polimerasa Taq, puede usarse para incorporar un cebador oligonucleotídico mutagénico a un fragmento de ADN amplificado, que puede clonarse entonces en un vector de clonación o expresión apropiado. Los procedimientos de mutagénesis mediada por PCR™ de Tomic *et al.* (1990, *Nucl. Acids Res.*, 12:1656) y Upender *et al.* (1995, *Biotechniques*, 18:29-31) proporcionan dos ejemplos de dichos protocolos. Una PCR™ que emplea una ligasa termoestable además de una polimerasa termoestable puede usarse también para incorporar un oligonucleótido mutagénico fosforilado a un fragmento de ADN amplificado, que puede clonarse entonces en un vector de clonación o expresión apropiado. El procedimientos de mutagénesis descrito por Michael (1994, *Biotechniques* 16: 410-412) proporciona un ejemplo de uno de dichos protocolos.

No todas las secuencias de Asn-X-Ser/Thr están N-glicosiladas, sugiriendo que el contexto en que se presenta el motivo es importante. En otro enfoque, se crean colecciones de péptidos mutantes que tienen sitios de consenso N-ligados novedosos para identificar sitios N-ligados novedosos que se glicosilan *in vivo* y son beneficiosos para la actividad, estabilidad u otras características del péptido.

Como se observa anteriormente, la secuencia consenso para la adición de cadenas de glicano N-ligado a glicoproteínas es Asn-X-Ser/Thr, en que X puede ser cualquier aminoácido. La secuencia nucleotídica que codifica las dos posiciones aminoacídicas del extremo carboxiterminal de la Asn pueden mutarse para codificar un residuo de Ser y/o Thr usando procedimientos estándares conocidos por los especialistas en la materia. Como se afirma anteriormente, no todos los sitios Asn-X-Ser/Thr están modificados mediante la adición de glicanos. Por lo tanto, cada glicoproteína mutada recombinante debe expresarse en un sistema de expresión de hongo, levadura o animal o mamífero y analizarse la adición de una cadena de glicano N-ligado. Las técnicas para la caracterización de sitios de glicosilación son bien conocidas por el especialista en la materia. Además, la función biológica de la glicoproteína recombinante mutada puede determinarse usando ensayos estándares para la proteína partícula que se está examinando. Por tanto, resulta un asunto sencillo manipular la secuencia primaria de un péptido e identificar sitios de glicosilación novedosos contenidos en el mismo, y determinar además el efecto del sitio novedoso sobre la actividad biológica del péptido.

Se da a conocer también que la secuencia nucleotídica que codifica la posición aminoacídica 2 del lado aminoterminal de residuos de Ser/Thr puede mutarse para codificar una Asn usando procedimientos estándares conocidos por los especialistas en la materia. Se describen anteriormente los procedimientos para determinar si se ha creado un sitio de glicosilación novedoso y el efecto de este sitio sobre la actividad biológica del péptido.

#### B. Creación o eliminación de sitios de glicosilación O-ligados

La adición de un sitio de glicosilación O-ligado a un péptido se logra convenientemente alterando la secuencia aminoacídica primaria del péptido de tal modo que contenga uno o más sitios de glicosilación O-ligados en comparación con la secuencia aminoacídica primaria inicial del péptido. La adición de un sitio de glicosilación O-ligado al péptido puede lograrse mediante la incorporación de una o más especies aminoacídicas en el péptido que comprendan un grupo -OH, preferiblemente residuos de serina o treonina, a la secuencia del péptido, de tal modo que el grupo OH sea accesible y esté disponible para glicosilación O-ligada. De forma similar a la discusión de la alteración de los sitios de glicosilación N-ligados en un péptido, la secuencia aminoacídica primaria del péptido se altera preferiblemente a nivel nucleotídico. Pueden alterarse nucleótidos específicos en la secuencia de ADN que codifica el péptido de tal modo que

se codifique un aminoácido deseado por la secuencia. La(s) mutación(es) en el ADN se realizan preferiblemente usando métodos conocidos en la materia, tales como las técnicas de síntesis de ADN por el método de la fosforamidita y mutagénesis dirigida a sitio descritas anteriormente.

5 Como alternativa, puede añadirse una secuencia nucleotídica que codifica un presunto sitio de adición de glicano O-ligado a la molécula de ADN en una o varias copias al extremo 5' o 3' de la molécula. La secuencia alterada de ADN se expresa entonces en uno cualquiera de un sistema de expresión de hongo, levadura o animal o mamífero y se analiza la adición de la secuencia al péptido y si esta secuencia es un sitio de glicosilación O-ligado funcional o no. Brevemente, se introduce una secuencia aceptora de péptido sintética en el extremo 5' o 3' de la molécula de nucleótido. En principio, la adición de este tipo de secuencia es menos desestabilizadora para la glicoproteína resultante cuando se expresa en un sistema de expresión adecuado. El ADN alterado se expresa entonces en células de CHO u otro sistema de expresión adecuado y se examina en las proteínas así expresadas la presencia de un sitio de glicosilación O-ligado. Además, puede determinarse la presencia o ausencia de cadenas de glicano.

15 En aún otro enfoque, pueden encontrarse en un péptido sitios ventajosos para nuevos sitios O-ligados creando colecciones del péptido que contienen diversos sitios O-ligados. Por ejemplo, la secuencia aminoacídica consenso para la adición de N-acetilgalactosamina por una N-acetilgalactosaminiltransferasa depende de la transferasa específica usada. La secuencia aminoacídica de un péptido puede examinarse para identificar los grupos contiguos de los aminoácidos que pueden mutarse para generar sitios potenciales para la adición de cadenas de glicano O-ligadas. Estas mutaciones pueden generarse usando procedimientos estándares conocidos por los especialistas en la materia como se describe anteriormente. Para determinar si algún sitio de glicosilación descubierto está realmente glicosilado, se expresa entonces cada péptido mutado recombinante en un sistema de expresión adecuado y se analiza posteriormente la adición del sitio y/o la presencia de una cadena de glicano O-ligado.

### C. Síntesis química de péptidos

25 Aunque la estructura primaria de los péptidos útiles en la invención puede generarse más eficazmente en un sistema de expresión basado en célula, está dentro del alcance de la presente invención que los péptidos puedan generarse sintéticamente. La síntesis química de péptidos es bien conocida en la materia e incluye, sin limitación, síntesis en fase sólida por etapas y condensación de fragmentos en disolución o en fase sólida. Una síntesis en fase sólida por etapas clásica implica ligar covalentemente un aminoácido correspondiente al aminoácido carboxiterminal de la cadena peptídica deseada con un soporte sólido y extender la cadena peptídica hacia el extremo amino mediante acoplamiento por etapas de derivados aminoacídicos activados que tienen grupos carboxilo activados. Después de la terminación del ensamblaje de la cadena peptídica unida a la fase sólida totalmente protegida, se escinde la unión covalente del péptido-fase sólida mediante una química adecuada y se eliminan los grupos protectores, proporcionando el péptido producto. Véase R. Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis: The Synthesis of a Tetrapeptide", *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154 (1963). Cuanto más larga es la cadena peptídica, más complicado es obtener productos bien definidos de alta pureza. Debido a la producción de mezclas complejas, el enfoque de síntesis en fase sólida por etapas tiene limitaciones de tamaño. En general, no se preparan rutinariamente mediante síntesis en fase sólida por etapas péptidos bien definidos de 100 residuos aminoacídicos contiguos o más.

El método de condensación de segmentos implica la preparación de varios segmentos peptídicos mediante el método de fase sólida por etapas, seguido de la escisión de la fase sólida y la purificación de estos segmentos protegidos al máximo. Se condensan los segmentos protegidos uno por uno con el primer segmento, que se une a la fase sólida.

40 Los péptidos útiles en la presente invención pueden sintetizarse mediante síntesis en fase sólida exclusiva, métodos de fase sólida parcial, condensación de fragmentos o síntesis en disolución clásica. Estos métodos de síntesis son bien conocidos por los especialistas en la materia (véanse, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149 (1963), Stewart *et al.*, "Solid Phase Peptide Synthesis" (2ª edición), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer y Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3:3 (1986), Atherton *et al.*, "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach" (IRL Press 1989), Fields y Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis," *Methods in Enzymology* volumen 289 (Academic Press 1997) y Lloyd-Williams *et al.*, "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Peptides" (CRC Press, Inc. 1997)). También son estándares las variaciones en las estrategias de síntesis química total, tales como "ligamiento químico nativo" y "ligamiento peptídico expresado" (véanse, por ejemplo, Dawson *et al.*, *Science* 266: 776 (1994), Hackeng *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94: 7845 (1997), Dawson, *Methods Enzymol.* 287: 34 (1997), Muir *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95: 6705 (1998) y Severinov y Muir, *J. Biol. Chem.* 273: 16205 (1998)). Son también útiles los métodos de síntesis peptídica en fase sólida desarrollados por Gryphon Sciences, South San Francisco, CA. Véanse las patentes de EE.UU. nº 6.326.468, 6.217.873, 6.174.530, y 6.001.364, todas las cuales se incorporan en su totalidad como referencia a la presente memoria.

### D. Modificaciones postraduccionales

55 Se apreciará por un especialista en la materia que los péptidos pueden experimentar una modificación postraducciona aparte de la adición de glicanos N-ligados y/u O-ligados con el mismo. Se contempla que los péptidos que tienen modificaciones postraduccionales distintas de la glicosilación pueden usarse como péptidos de la invención, a condición de que la actividad o función biológica deseada del péptido se mantenga o mejore. Dichas modificaciones postraduccionales pueden ser modificaciones naturales llevadas a cabo habitualmente *in vivo*, o modificaciones por



ingeniería genética del péptido llevadas a cabo *in vitro*. Las modificaciones conocidas contempladas incluyen, pero sin limitación, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a péptidos mediada por ARN transferente tal como arginilación y ubiquitinación. Las enzimas que pueden usarse para llevar a cabo muchas de estas modificaciones son bien conocidas en la materia y están disponibles comercialmente de compañías tales como Boehringer Mannheim (Indianápolis, IN) y Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), entre otras.

Dichas modificaciones son bien conocidas por los especialistas en la materia y se han descrito con gran detalle en la bibliografía científica. Se describen varias modificaciones particularmente comunes, por ejemplo, glicosilación, unión de lípido, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, en la mayoría de textos básicos tales como "Peptides- Structure and Molecular Properties", 2ªE d., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993). Están disponibles muchas revisiones detalladas sobre este tema tales como de Wold, F., "Post-translational Covalent Modification of Peptides", B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, 1-12 (1983); Seifter *et al.* (Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990)) y Rattan *et al.* (Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992)).

Pueden introducirse también modificaciones covalentes de un péptido en la molécula *in vitro* haciendo reaccionar residuos aminoácidos orientados del péptido con un agente derivatizante orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos aminoácidos terminales. Los residuos derivatizados más comunes son cisteinilo, histidilo, lisinilo, arginilo, tirosilo, glutaminilo, asparaginilo y residuos aminoterminales. Son modificaciones la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo y treonilo, la metilación de grupos  $\alpha$ -amino de lisina, histidina y cadenas laterales de histidina, la acetilación de amina N-terminal y la amidación de grupos carboxílicos C-terminales. Dichos restos derivatizados pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica y similares. Los restos pueden eliminar o atenuar también cualquier efecto secundario indeseado del péptido y similar.

Además, la derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular el péptido con matrices de soporte no hidrosolubles o con otros portadores macromoleculares. Los agentes reticulantes usados comúnmente incluyen glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, imidoésteres homobifuncionales, 1,1-bis(diazoloacetil)-2-feniletano y maleimidas bifuncionales. Los agentes derivatizantes tales como 3-[9-p-azidofenil]ditiopropioimidato de metilo proporcionan intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. Como alternativa, pueden emplearse para inmovilización peptídica matrices no hidrosolubles tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de EE.UU. nº 3.969.287 y 3.691.016.

### 35 E. Péptidos de fusión/péptidos

Los péptidos útiles en la presente invención pueden comprender péptidos de fusión. Los péptidos de fusión son particularmente ventajosos cuando se desea combinar características biológicas y/o funcionales de dos péptidos en una molécula peptídica. Dichos péptidos de fusión pueden presentar combinaciones de actividad y función biológica que no se encuentran en la naturaleza para crear moléculas novedosas y útiles de aplicaciones terapéuticas e industriales. Las actividades biológicas de interés incluyen, pero sin limitación, actividad enzimática, actividad de receptor y/o ligando, motivos inmunogénicos y dominios estructurales.

Dichos péptidos de fusión son bien conocidos en la materia, y los métodos de creación serán bien conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, se ha preparado un péptido de fusión de  $\alpha$ -interferón-albúmina humana en el que el péptido resultante tiene los beneficios terapéuticos del  $\alpha$ -interferón combinados con la larga vida en circulación de la albúmina, creando así una composición terapéutica que permite una frecuencia de dosificación reducida y efectos secundarios potencialmente reducidos en pacientes. Véase Albuferon™ de Human Genome Sciences, Inc. y la patente de EE.UU. nº 5.766.883. Otros péptidos de fusión incluyen moléculas de anticuerpo que se describen en otro lugar de la presente memoria.

### F. Generación de moléculas "biológicamente activas" más pequeñas

Los péptidos usados en la invención pueden ser variantes de péptidos nativos, en los que se usa un fragmento del péptido nativo en lugar del péptido nativo completo. Además, se contemplan prepro- y prepéptidos. Los péptidos variantes pueden ser de menor tamaño que el péptido nativo, y pueden comprender uno o más dominios de un péptido mayor. La selección de los dominios del péptido específico puede ser ventajosa cuando se desea la actividad biológica de ciertos dominios del péptido, pero no se desea la actividad biológica de otros dominios del péptido. Se incluyen también truncamientos del péptido y deleciones internas que pueden potenciar el efecto terapéutico deseado del péptido. Se contempla que cualquiera de dichas formas de un péptido es útil en la presente invención a condición de que se mantenga la actividad biológica deseada del péptido.

Las versiones más cortas del péptido pueden tener ventajas únicas no encontradas en el péptido nativo. En el caso de albúmina humana, se ha encontrado que una forma truncada que comprende solo un 63% del péptido de albúmina nativo es ventajosa como expansor de volumen del plasma. El péptido de albúmina truncado se considera que es mejor que el péptido nativo para su fin terapéutico debido a que se requiere una dosis de péptido individual de solo la mitad a dos tercios de la seroalbúmina humana natural, o seroalbúmina humana recombinante, para un efecto osmótico coloidal equivalente. Véase la patente de EE.UU. nº 5.380.712, cuya totalidad se incorpora como referencia a la presente memoria.

Se ha encontrado que los péptidos "biológicamente activos" más pequeños tienen una actividad terapéutica potenciada en comparación con el péptido nativo. El potencial terapéutico de IL-2 está limitado por diversos efectos secundarios dominados por el síndrome de derrame vascular. Se ha encontrado que una versión sintetizada químicamente más corta del péptido consistente en los residuos 1-30 correspondientes a la  $\alpha$ -hélice entera se plegaba apropiadamente y contenía la actividad biológica de IL-2 natural sin los efectos secundarios adjuntos.

#### G. Generación de péptidos novedosos

El péptido de la invención puede derivar de una secuencia primaria de un péptido nativo, o puede modificarse por ingeniería genética usando cualquiera de los muchos medios conocidos por los especialistas en la materia. Dichos péptidos modificados por ingeniería genética pueden diseñarse y/o seleccionarse debido a propiedades potenciadas o novedosas en comparación con el péptido nativo. Por ejemplo, los péptidos pueden modificarse por ingeniería genética para tener velocidades de reacción enzimática aumentadas, afinidad de unión aumentada o reducida por un sustrato o ligando, afinidad de unión aumentada o reducida por un receptor, especificidad alterada por un sustrato, ligando, receptor u otra pareja de unión, estabilidad aumentada o reducida *in vitro* y/o *in vivo*, o inmunogenicidad aumentada o reducida en un animal.

#### H. Mutaciones

##### 1. Mutación de diseño racional

Los péptidos útiles en los métodos de la invención pueden mutarse para potenciar una actividad o función biológica deseada, para reducir una propiedad indeseable del péptido y/o para añadir actividades o funciones novedosas al péptido. El "diseño racional de péptidos" puede usarse para generar dichos péptidos alterados. Una vez son conocidas la secuencia aminoacídica y estructura del péptido y se planea la mutación deseada, las mutaciones pueden hacerse lo más convenientemente en el correspondiente codón de ácido nucleico que codifica el residuo aminoacídico que se desea mutar. Un especialista en la materia puede determinar fácilmente cómo debería alterarse la secuencia de ácido nucleico basándose en el código genético universal y el conocimiento de las preferencias de codón en el sistema de expresión de elección. Puede hacerse una mutación en un codón para cambiar el residuo aminoacídico que se polimerizará en el péptido durante la traducción. Como alternativa, puede mutarse un codón de modo que el correspondiente residuo aminoacídico sea el mismo, pero que la elección de codón sea mejor adecuada para el sistema de expresión del péptido deseado. Por ejemplo, pueden reemplazarse residuos en *cis* por otros aminoácidos para eliminar los enlaces disulfuro del péptido maduro, pueden mutarse los dominios catalíticos para alterar la actividad biológica y, en general, pueden modificarse por ingeniería genética las isoformas del péptido. Dichas mutaciones pueden ser mutaciones puntuales, deleciones, inserciones y truncamientos, entre otros.

Las técnicas para mutar aminoácidos específicos en un péptido son bien conocidas en la materia. La técnica de la mutagénesis dirigida a sitio, discutida anteriormente, es bien adecuada para la mutación dirigida de codones. El método de mutagénesis mediada por oligonucleótido se discute también con detalle en Sambrook *et al.* (2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, a partir de la página 15.51). Pueden hacerse deleciones, inserciones y truncamientos sistemáticos usando mutagénesis de inserción de ligador, digestión con nucleasa Bal31 y mutagénesis de exploración de ligador, entre otros métodos bien conocidos por los especialistas en la materia (Sambrook *et al.*, 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

El diseño racional de péptidos se ha usado exitosamente para aumentar la estabilidad de enzimas con respecto a la termoinactivación y oxidación. Por ejemplo, se mejoró la estabilidad de una enzima mediante la eliminación de residuos de asparagina en  $\alpha$ -amilasa (Declerck *et al.*, 2000, *J. Mol. Biol.* 301: 1041-1057), la introducción de elementos estructurales más rígidos tales como prolina en  $\alpha$ -amilasa (Igarashi *et al.*, 1999, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 1535-1540) y D-xilosa isomerasa (Zhu *et al.*, 1999, *Peptide Eng.* 12: 635-638). Además, la introducción de contactos hidrófobos adicionales estabilizó la 3-isopropilmalato deshidrogenasa (Akanuma *et al.*, 1999, *Eur. J. Biochem.* 260: 499-504) y la formiato deshidrogenasa obtenida de *Pseudomonas sp.* (Rojkova *et al.*, 1999, *FEBS Lett.* 445: 183-188). Los mecanismos detrás del efecto estabilizante de estas mutaciones son generalmente aplicables a muchos péptidos. Se contempla que estas y mutaciones similares son útiles con respecto a los péptidos remodelados en los métodos de la presente invención.

##### 2. Técnicas de mutagénesis aleatoria

Pueden generarse péptidos novedosos útiles en los métodos de la invención usando técnicas que introducen mutaciones aleatorias en la secuencia de codificación del ácido nucleico. Se expresa entonces el ácido nucleico en un

sistema de expresión deseado y se evalúa en el péptido resultante las propiedades de interés. Las técnicas para introducir mutaciones aleatorias en secuencias de ADN son bien conocidas en la materia, e incluyen mutagénesis por PCR, mutagénesis por saturación y enfoques de oligonucleótidos degenerados. Véanse Sambrook y Russell (2001, "Molecular Cloning, A Laboratory Approach", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) y Ausubel *et al.* (2002, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY).

En la mutagénesis por PCR, se usa polimerasa Taq de fidelidad reducida para introducir mutaciones aleatorias en un fragmento clonado de ADN (Leung *et al.*, 1989, Technique 1: 11-15). Este es un método muy potente y relativamente rápido de introducción de mutaciones aleatorias en una secuencia de ADN. Se amplifica la región de ADN a mutagenizar usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en condiciones para reducir la fidelidad de la síntesis de ADN por ADN polimerasa Taq, por ejemplo, usando una relación de dGTP/dATP alterada y añadiendo Mn<sup>2+</sup> a la reacción PCR. Se inserta el conjunto de fragmentos de ADN amplificados en vectores de clonación apropiados, proporcionando colecciones de mutantes aleatorias.

La mutagénesis por saturación permite una rápida introducción de un gran número de sustituciones de bases individuales en fragmentos de ADN clonados (Mayers *et al.*, 1985, Science 229: 242). Esta técnica incluye la generación de mutaciones, por ejemplo, mediante tratamiento químico o irradiación de ADN monocatenario *in vitro*, y la síntesis de la hebra de ADN complementaria. La frecuencia de mutación puede modularse modulando la potencia del tratamiento, y pueden obtenerse esencialmente todas las sustituciones de base posibles. Debido a que este procedimiento no implica una selección genética de fragmentos mutantes, se obtienen tanto sustituciones neutras como aquellas que alteran la función. La distribución de mutaciones puntuales no está sesgada hacia elementos de secuencia conservados.

Puede generarse también una colección de homólogos de ácido nucleico a partir de un conjunto de secuencias oligonucleotídicas. Puede llevarse a cabo la síntesis química de secuencias oligonucleotídicas degeneradas en un sintetizador de ADN automático, y pueden ligarse entonces los genes sintéticos en un vector de expresión apropiado. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es conocida en la materia (véanse, por ejemplo, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura *et al.* (1981) "Recombinant DNA, Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules", ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pág. 273-289; Itakura *et al.* (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura *et al.* (1984) Science 198: 1056; Ike *et al.* (1983) Nucleic Acid Res. 11: 477. Dichas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otros péptidos (véanse, por ejemplo, Scott *et al.* (1990) Science 249: 386-390; Roberts *et al.* (1992) PNAS 89: 2429-2433; Devlin *et al.* (1990) Science 249: 404-406; Cwirla *et al.* (1990) PNAS 87: 6378-6382, así como las patentes de EE.UU. n° 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

#### 30 a. Evolución dirigida

Los péptidos útiles en los métodos de la invención pueden generarse también usando técnicas de "evolución dirigida". En contraposición con las técnicas de mutagénesis dirigida a sitio en que se requiere el conocimiento de la estructura del péptido, existen ahora estrategias para generar colecciones de mutaciones de las que obtener péptidos con propiedades mejoradas sin conocimiento de los rasgos estructurales del péptido. Estas estrategias se conocen generalmente como tecnologías de "evolución dirigida" y son diferentes de los procedimientos de mutagénesis aleatoria tradicionales en que implican someter la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de interés a rondas repetidas de mutación, examen y amplificación.

En algunas técnicas de "evolución dirigida", se genera diversidad en los ácidos nucleicos obtenidos mediante métodos de mutación que crean aleatoriamente mutaciones puntuales en la secuencia de ácido nucleico. Las técnicas de mutación puntual incluyen, pero sin limitación, "PCR™ con tendencia al error" (Caldwell y Joyce, 1994; PCR Methods Appl. 2: 28-33 y Ke y Madison, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3371-3372), mutagénesis dirigida a oligonucleótido repetida (Reidhaar-Olson *et al.*, 1991, Methods Enzymol. 208: 564-586) y cualquiera de los métodos anteriormente mencionados de mutagénesis aleatoria.

Otro método de creación de diversidad sobre el que puede actuar la evolución dirigida es el uso de genes mutadores. Se cultiva el ácido nucleico de interés en una estirpe de células mutadoras cuyo genoma codifica típicamente genes de reparación de ADN defectivos (patente de EE.UU. n° 6.365.410; Selifonova *et al.*, 2001, Appl. Environ. Microbiol. 67: 3645-3649; Long-McGie *et al.*, 2000, Biotech. Bioeng. 68: 121-125; véase Genencor International Inc, Palo Alto CA).

Puede conseguirse también lograr diversidad usando técnicas de evolución dirigida usando mutagénesis por saturación junto con cebadores degenerados (Gene Site Saturation Mutagenesis™, Diversa Corp., San Diego, CA). En este tipo de mutagénesis por saturación, se usan cebadores degenerados diseñados para cubrir la longitud de la secuencia de ácido nucleico a diversificar para cebar la polimerasa en reacciones de PCR. De esta manera, puede mutarse cada codón de una secuencia de codificación de un aminoácido para codificar cada uno de los 19 aminoácidos comunes restantes. Esta técnica puede usarse también para introducir mutaciones, deleciones e inserciones en regiones específicas de una secuencia de codificación de ácido nucleico, dejando el resto de la molécula de ácido nucleico intacta. Los procedimientos para la técnica de saturación génica son bien conocidos en la materia y pueden encontrarse, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6.171.820.

#### b. Transposición de ADN

Pueden generarse también péptidos novedosos útiles en los métodos de la invención usando las técnicas de transposición génica, transposición de motivo, transposición de exón y/o transposición de codón (designadas colectivamente como "transposición de ADN"). Las técnicas de transposición de ADN pueden emplearse para modular las actividades de péptidos útiles en la invención y pueden usarse para generar péptidos que tienen actividad alterada. Véanse, en general, las patentes de EE.UU. n.º 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458, y Stemmer *et al.* (1994, Nature 370 (6488): 389-391); Cramer *et al.* (1998, Nature 391 (6664): 288-291); Zhang *et al.* (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(9): 4504-4509); Stemmer *et al.* (1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(22): 10747-10751), Patten *et al.* (1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 724-33); Harayama, (1998, Trends Biotechnol. 16 (2): 76-82); Hansson *et al.*, (1999, J. Mol. Biol. 287: 265-76) y Lorenzo y Blasco (1998, Biotechniques 24(2): 308-13) (cada una de estas patentes se incorpora a la presente como referencia en su totalidad).

La transposición de ADN implica el ensamblaje de dos o más segmentos de ADN mediante recombinación homóloga o específica de sitio para generar variación en la secuencia polinucleotídica. La transposición de ADN se ha usado para generar variaciones novedosas de proteínas del virus de la inmunodeficiencia de tipo 1 (Pekrun *et al.*, 2002, J. Virol. 76(6): 2924-35), triazina hidrolasas (Raillard *et al.* 2001, Chem. Biol. 8(9): 891-898), proteínas del virus de la leucemia de múrido (MLV) (Powell *et al.* 2000, Nat. Biotechnol. 18(12): 1279-1282) e indolglicerol fosfato sintasa (Merz *et al.* 2000, Biochemistry 39(5): 880-889).

La técnica de transposición de ADN se desarrolló para generar diversidad biomolecular imitando la recombinación natural al permitir la recombinación homóloga *in vitro* de ADN (Stemmler, 1994, Nature 370: 389-391 y Stemmler, 1994, PNAS 91: 10747-10 751). Generalmente, en este método se fragmenta una población de genes relacionados y se somete a ciclos repetidos de desnaturalización y rehibridación, seguidos de extensión de los salientes 5' por polimerasa Taq. Con cada ciclo, aumenta la longitud de los fragmentos, y aparece recombinación de ADN cuando hibridan entre sí los fragmentos originarios de diferentes genes. La fragmentación inicial del ADN se logra habitualmente mediante digestión con nucleasa, usando típicamente ADNasa (véanse las referencias de Stemmler anteriormente), pero puede lograrse también mediante síntesis por PCR interrumpida (patente de EE.UU. n.º 5.965.408, incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad; véase Diversa Corp., San Diego, CA). Los métodos de transposición de ADN tienen ventajas frente a los métodos de mutación puntual aleatoria en que se genera la recombinación directa de mutaciones beneficiosas por cada ronda de transposición y, por lo tanto, hay una autoselección de fenotipos mejorados de los péptidos.

Las técnicas de transposición de ADN son bien conocidas en la materia. Se encuentran explicaciones detalladas de dicha tecnología en Stemmler, 1994, Nature 370: 389-391 y Stemmler, 1994, PNAS 91: 10747-10751. La técnica de transposición de ADN se describe también en las patentes de EE.UU. n.º 6.180.406, 6.165.793, 6.132.970, 6.117.679, 6.096.548, 5.837.458, 5.834.252, 5.830.721, 5.811.238 y 5.605.793 (todas las cuales se incorporan como referencia a la presente memoria en su totalidad).

La materia proporciona también modificaciones aún más recientes de la técnica básica de transposición de ADN. En un ejemplo, la transposición de exón, se amplifican exones o combinaciones de exones que codifican dominios específicos de los péptidos, usando oligonucleótidos quiméricos. Se recombinan entonces las moléculas amplificadas mediante ensamblaje por PCR autocebante (Kolkman y Stemmler, 2001, Nat. Biotech. 19: 423-428). En otro ejemplo, usando la técnica de quimeragénesis aleatoria en la construcción de colecciones de moldes transitorios (RACHITT), se asocian fragmentos de ADN original monocatenario con un molde monocatenario completo (Coco *et al.*, 2001, Nat. Biotechnol. 19: 354-359). En aún otro ejemplo, se emplea el proceso de extensión por etapas (STEP), un termociclado con ciclos de asociación/extensión abreviados, para interrumpir repetidamente la polimerización de ADN a partir de cebadores flanqueantes (Zhao *et al.*, 1998, Nat. Biotechnol. 16: 258-261). En la técnica conocida como CLERY, se combina una familiar transposición *in vitro* con una recombinación homóloga *in vivo* en levadura (Abecassis *et al.*, 2000, "Nucleic Acids Res." 28:E88). Para maximizar la recombinación intergénica, se digiere ADN monocatenario de hebras complementarias de cada uno de los ácidos nucleicos con ADNasa y se asocian (Kikuchi *et al.*, 2000, Gene 243: 133-137). Se ligan entonces los extremos romos de dos ácidos nucleicos truncados de longitudes variables que están conectados por una secuencia escindible, generando una fusión génica sin recombinación homóloga (Sieber *et al.*, 2001, Nat Biotechnol. 19: 456-460; Lutz *et al.*, 2001, Nucleic Acids Res. 29:E16; Ostermeier *et al.*, 1999, Nat. Biotechnol. 17: 1205-1209; Lutz y Benkovic, 2000, Curr. Opin. Biotechnol. 11: 319-324). La recombinación entre ácidos nucleicos con baja homología de secuencia en común se ha potenciado también usando la generación de extremos romos mediada por exonucleasa de fragmentos de ADN y ligando los fragmentos conjuntamente para recombinarlos (patente de EE.UU. n.º 6.361.974, incorporada a la presente memoria como referencia en su totalidad). La invención contempla el uso de todas y cada una de las variaciones descritas anteriormente como medio para potenciar las propiedades biológicas de cualquiera de los péptidos y/o enzimas útiles en los métodos de la invención.

Además de los protocolos publicados que detallan las técnicas de evolución dirigida y transposición génica, están ahora disponibles servicios comerciales que ejecutarán los procedimientos de transposición génica y selección en los péptidos de elección. Maxygen (Redwood City, CA) ofrece servicios comerciales para generar colecciones transpuestas de ADN a medida. Además, esta compañía efectuará procedimientos de evolución dirigida a medida, incluyendo transposición génica y selección en una familia de péptidos de elección.

Optigenix, Inc. (Newark, DE) ofrece el servicio relacionado de transposición de plásmido. Optigenix usa familias de genes para obtener mutantes de los mismos que tienen nuevas propiedades. El ácido nucleico de interés se clona en un plásmido en un sistema de expresión de *Aspergillus*. Se introduce entonces el ADN de la familia relacionada en el sistema de expresión y ocurre la recombinación en regiones conservadas de la familia en el hospedador. Se expresan entonces los ADN mutantes resultantes y se examina en el péptido producido a partir de ellos la presencia de propiedades deseadas y la ausencia de propiedades indeseadas.

### c. Procedimientos de examen

Después de cada ronda repetida de “evolución”, se examinan en los péptidos deseados expresados por genes mutados las características de interés. Se amplifican entonces los genes “candidatos” y se combinan para la siguiente ronda de transposición de ADN. El procedimiento de examen usado es altamente dependiente del péptido que se está “evolucionando” y de la característica de interés. Pueden seleccionarse características tales como estabilidad del péptido, actividad biológica y antigenicidad entre otras usando procedimientos que son bien conocidos en la materia. Se describen en otro lugar de la presente memoria ensayos individuales de la actividad biológica de los péptidos preferidos útiles en los métodos de la invención.

### d. Combinaciones de técnicas

Se apreciará por el especialista en la materia que las técnicas anteriores de mutación y selección pueden combinarse entre sí y con procedimientos adicionales para generar la molécula peptídica mejor posible útil en los métodos de la invención. Por tanto, la invención no está limitada a ningún método para la generación de péptidos y debería considerarse que comprende todas y cada una de las metodologías descritas en la presente memoria. Por ejemplo, puede efectuarse inicialmente un procedimiento para introducir mutaciones puntuales en una secuencia de ácido nucleico, seguido de rondas repetidas de transposición de ADN, selección y amplificación. La introducción inicial de mutaciones puntuales puede usarse para introducir diversidad en una población génica cuando falta, y la siguiente ronda de transposición y examen de ADN seleccionará y recombinará las mutaciones puntuales ventajosas.

## III. Glicosidasas y glicosiltransferasas

### A. Glicosidasas

Las glicosidasas son glicosiltransferasas que usan agua como molécula aceptora y, como tales, son típicamente enzimas hidrolíticas de glicósido. Las glicosidasas pueden usarse para la formación de enlaces glicosídicos *in vitro* controlando la termodinámica o cinética de la mezcla de reacción. Incluso con condiciones de reacción modificadas, sin embargo, puede ser difícil trabajar con reacciones de glicosidasa, y las glicosidasas tienden a dar bajos rendimientos sintéticos como resultado de la reacción de transglicosilasa reversible y la reacción hidrolítica competidora.

Una glicosidasa puede funcionar reteniendo la estereoquímica del enlace que se rompe durante la hidrólisis o invirtiendo la estereoquímica del enlace que se rompe durante la hidrólisis, clasificando la glicosidasa como glicosidasa “retenedora” o glicosidasa “inversora”, respectivamente. Las glicosidasas retenedoras tienen dos restos de ácido carboxílico críticos presentes en el sitio activo, con un carboxilato actuando como catalizador ácido/base y el otro como nucleófilo, mientras que con las glicosidasas inversoras, un ácido carboxílico funciona como ácido y el otro funciona como base.

Los métodos para determinar la actividad y la especificidad de ligamiento de cualquier glicosidasa son bien conocidos en la materia, incluyendo un protocolo de HPLC simplificado (Jacob y Scudder, 1994, *Methods in Enzymol.* 230: 280-300). Se encuentra una discusión general de glicosidasas y tratamiento con glicosidasa en “*Glycobiology, A Practical Approach*”, (1993, Fukuda and Kobata eds., Oxford University Press Inc., Nueva York). Las glicosidasas útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, sialidasa, galactosidasa, endoglicanasa, manosidasa (concretamente,  $\alpha$  y  $\beta$ , ManI, ManII y ManIII,) xilosidasa, fucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa de *Agrobacterium sp.*, manosidasa 2A de *Cellulomonas fimi*, glicosidasa de *Humicola insolens*, glicosidasa de *Sulfolobus solfataricus* y glicosidasa de *Bacillus licheniformis*.

La elección de las fucosidasas para uso en la invención depende del ligamiento de la fucosa con otras moléculas. Las especificidades de muchas  $\alpha$ -fucosidasas útiles en los métodos de la invención son bien conocidas por los especialistas en la materia, y están también comercialmente disponibles muchas variedades de fucosidasas (Glyko, Novato, CA; PROzyme, San Leandro, CA; Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA; entre otras) Las  $\alpha$ -fucosidasas de interés incluyen, pero sin limitación,  $\alpha$ -fucosidasas de *Turbo cornutus*, *Charonia lampas*, *Bacillus fulminans*, *Aspergillus niger*, *Clostridium perfringens*, riñón bovino (Glyko), hígado de pollo (Tyagarajan *et al.*, 1996, *Glycobiology* 6:83-93) y  $\alpha$ -fucosidasa II de *Xanthomonas manihotis* (Glyko, PROzyme). La fucosidasa de hígado de pollo es particularmente útil para la eliminación de la fucosa de núcleo de glicanos N-ligados.

### B. Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas catalizan la adición de azúcares activados (NDP-azúcares donantes) por etapas a una proteína, glicopéptido, lípido o glicolípido o al extremo no reductor de un oligosacárido creciente. Los glicopéptidos N-ligados se sintetizan mediante una transferasa y un donante de oligosacárido ligado a lípido DoI-PP-NAG<sub>2</sub>Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub> en una

transferencia de bloque seguido del recorte del núcleo. En este caso, la naturaleza del sacárido de "núcleo" es algo diferente de las uniones posteriores. Son conocidas en la materia un muy gran número de glicosiltransferasas.

Las glicosiltransferasas para usar en la presente invención pueden ser cualquiera a condición de que pueda utilizar el azúcar modificado como donante de azúcar. Los ejemplos de dichas enzimas incluyen glicosiltransferasas de la ruta de Leloir, tales como galactosiltransferasa, N-acetilglucosaminiltransferasa, N-acetilgalactosaminiltransferasa, fucosiltransferasa, sialiltransferasa, manosiltransferasa, xilosiltransferasa, glucurononiltransferasa y similares.

Para las síntesis enzimáticas de sacárido que implican reacciones de glicosiltransferasa, las glicosiltransferasas pueden clonarse o aislarse de cualquier fuente. Son conocidas muchas glicosiltransferasas clonadas, así como sus secuencias polinucleotídicas. Véase Taniguchi *et al.*, 2002, "Handbook of glycosyltransferases and related genes", Springer, Tokio.

Las secuencias aminoacídicas de glicosiltransferasa y secuencias nucleotídicas que codifican glicosiltransferasas de las que pueden deducirse las secuencias aminoacídicas se encuentran también en diversas bases de datos disponibles públicamente, incluyendo GenBank, Swiss-Prot, EMBL y otras.

Las glicosiltransferasas que pueden emplearse en los métodos de la invención incluyen, pero sin limitación, galactosiltransferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas, glucuroniltransferasas, sialiltransferasas, manosiltransferasas, ácido glucurónico transferasas, ácido galacturónico transferasas y oligosacariltransferasas. Las glicosiltransferasas adecuadas incluyen aquellas obtenidas de eucariotas, así como de procariotas.

Puede obtenerse ADN que codifica glicosiltransferasas mediante síntesis química, examinando transcritos inversos de ARNm de células o cultivos de estirpe celular apropiados, examinando colecciones genómicas de células apropiadas o mediante combinaciones de estos procedimientos. El examen de ARNm o ADN genómico puede llevarse a cabo usando sondas oligonucleotídicas generadas a partir de la secuencia de ácido nucleico de glicosiltransferasas. Las sondas pueden marcarse con un marcador detectable tal como, pero sin limitación, un grupo fluorescente, un átomo radiactivo o un grupo quimioluminiscente de acuerdo con procedimientos conocidos y usados en ensayos de hibridación convencionales. Como alternativa, pueden obtenerse secuencias de ácido nucleico de glicosiltransferasas mediante el uso de un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estando producidos los cebadores oligonucleotídicos de la PCR a partir de la secuencia de ácido nucleico de glicosiltransferasas. Véanse la patente de EE.UU. n° 4.683.195 de Mullis *et al.* y la patente de EE.UU. n° 4.683.202 de Mullis.

Puede sintetizarse una enzima glicosiltransferasa en una célula hospedadora transformada con un vector que contiene ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa. Un vector es una construcción de ADN replicable. Los vectores se usan para amplificar ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa y/o para expresar ADN que codifica una enzima glicosiltransferasa. Un vector de expresión es una construcción de ADN replicable en que se liga operativamente una secuencia de ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa con secuencias de control adecuadas capaces de efectuar la expresión de la enzima glicosiltransferasa en un hospedador adecuado. La necesidad de dichas secuencias de control variará dependiendo del hospedador seleccionado y del método de transformación elegido. Generalmente, las secuencias de control incluyen un promotor transcripcional, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica los sitios de unión de ARNm ribosómico adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción. Los vectores de amplificación no requieren dominios de control de la expresión. Todo lo que se necesita es la capacidad de replicarse en un hospedador, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

#### 1. Fucosiltransferasas

En algunas realizaciones, es una glicosiltransferasa usada en el método de la invención una fucosiltransferasa. Las fucosiltransferasas son conocidas por los especialistas en la materia. Las fucosiltransferasas ejemplares incluyen enzimas que transfieren L-fucosa desde GDP-fucosa hasta una posición hidroxílica de un azúcar aceptor. Las fucosiltransferasas que transfieren desde azúcares no nucleotídicos hasta un aceptor son también de uso en la presente invención.

En algunas realizaciones, el azúcar aceptor es, por ejemplo, GlcNAc en un grupo Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3,4)GlcNAc $\beta$  en un glucósido oligosacárido. Las fucosiltransferasas adecuadas para esta reacción incluyen Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3,4)GlcNAc $\beta$ 1- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3,4) fucosiltransferasa (FTIII, n° E.C. 2.4.1.65), que se caracterizó por primera vez en leche humana (véanse Palcic *et al.*, *Carbohydrate Res.* 190: 1-11 (1989); Prieels, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256: 10456-10463 (1981) y Nunez, *et al.*, *Can. J. Chem.* 59: 2086-2095 (1981)) y Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc $\beta$ - $\alpha$ -fucosiltransferasas (FTIV, FTV, FTVI) que se encontraron en suero humano. Se ha caracterizado también la FTVII (n° E.C.2.4.1.65), una sialil-  $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc $\beta$  fucosiltransferasa. Se ha caracterizado también una forma recombinante de Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3,4)GlcNAc $\beta$ - $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3,4) fucosiltransferasa (véanse Dumas *et al.*, *Bioorg. Med. Letters* 1: 425-428 (1991) y Kukowska-Latallo *et al.*, *Genes and Development* 4: 1288-1303 (1990)). Otras fucosiltransferasas ejemplares incluyen, por ejemplo,  $\alpha$ 1,2-fucosiltransferasas (n° E.C. 2.4.1.69). La fucosilación enzimática puede llevarse a cabo mediante los métodos descritos en Mollicone *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 191: 169-176 (1990) o la patente de EE.UU. n° 5.374.655.

## 2. Galactosiltransferasas

En otro grupo de realizaciones, la glicosiltransferasa es una galactosiltransferasa. Las galactosiltransferasas ejemplares incluyen  $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasas (nº E.C. 2.4.1.151, véanse, por ejemplo, Dabkowski *et al.*, *Transplant Proc.* 25: 2921 (1993) y Yamamoto *et al.* *Nature* 345: 229-233 (1990), bovina (GenBank j04989, Joziassse *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264: 14290-14297 (1989)), de múrido (GenBank m26925; Larsen *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 86: 8227-8231 (1989)), porcina (GenBank L36152; Strahan *et al.*, *Immunogenetics* 41: 101-105 (1995)). Otra  $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa adecuada es la implicada en la síntesis del antígeno del grupo sanguíneo B (EC 2.4.1.37, Yamamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 1146-1151 (1990) (humana)).

Son también adecuadas para uso en los métodos de la invención las  $\beta(1,4)$ galactosiltransferasas que incluyen, por ejemplo, EC 2.4.1.90 (LacNAc sintetasa) y EC 2.4.1.22 (lactosa sintetasa), bovina (D'Agostaro *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 183: 211-217 (1989)), humana (Masri *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 657-663 (1988)), de múrido (Nakazawa *et al.*, *J. Biochem.* 104: 165-168 (1988)), así como E.C. 2.4.1.38 y la ceramida galactosiltransferasa (EC 2.4.1.45, Stahl *et al.*, *J. Neurosci. Res.* 38: 234-242 (1994)). Otras galactosiltransferasas adecuadas incluyen, por ejemplo,  $\alpha(1,2)$ galactosiltransferasas (por ejemplo, de *Schizosaccharomyces pombe*, Chapell *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 5: 519-528 (1994)). Para galactosiltransferasas adecuadas adicionales, véanse, Taniguchi *et al.* (2002, "Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes", Springer, Tokio), Guo *et al.* (2001, *Glycobiology*, 11(10): 813-820) y Breton *et al.* (1998, *J. Biochem.* 123: 1000-1009).

La producción de proteínas tales como la enzima GalNAc T<sub>I-XIV</sub> a partir de genes clonados mediante ingeniería genética es bien conocida. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.761.371. Un método implica la recogida de suficientes muestras y la determinación entonces de la secuencia aminoacídica de la enzima mediante secuenciación N-terminal. Se usa entonces esta información para aislar un clon de ADNc que codifica una transferasa (unida a membrana) completa que, tras expresión en la estirpe celular de insecto Sf9, da como resultado la síntesis de una enzima totalmente activa. Se determina entonces la especificidad de aceptor de la enzima usando un análisis semicuantitativo de los aminoácidos que rodean los sitios de glicosilación conocidos en 16 proteínas diferentes, seguido de estudios de glicosilación *in vitro* de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que ciertos residuos aminoacídicos están sobrerrepresentados en los segmentos peptídicos glicosilados y que los residuos en las posiciones específicas que rodean los residuos de serina y treonina glicosilados pueden tener una influencia más marcada sobre la eficacia del aceptor que otros restos aminoacídicos.

## 3. Sialiltransferasas

Las sialiltransferasas son otro tipo de glicosiltransferasa que es útil en las células recombinantes y las mezclas de reacción de la invención. Los ejemplos de sialiltransferasas que son adecuadas para uso en la presente invención incluyen ST3Gal III (por ejemplo, una ST3Gal III de rata o humana), ST3Gal IV, ST3Gal I, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II y ST6GalNAc III (la nomenclatura de sialiltransferasas usada en la presente memoria es como se describe en Tsuji *et al.*, *Glycobiology* 6: v-xiv (1996)). Una  $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa ejemplar designada como  $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico a la Gal terminal no reductora de un disacárido o glucósido Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Glc. Véanse Van den Eijnden *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256: 3159 (1981), Weinstein *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 13845 (1982) y Wen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 21011 (1992). Otra  $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa ejemplar (EC 2.4.99.4) transfiere ácido siálico a la Gal terminal no reductora del disacárido o glucósido, véanse Rearick *et al.*, *J. Biol. Chem.* 254: 4444 (1979) y Gillespie *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 21004 (1992). Las enzimas ejemplares adicionales incluyen Gal $\beta$ -1,4-GlcNAc  $\alpha$ -2,6 sialiltransferasa (véase Kurosawa *et al.* *Eur. J. Biochem.* 219: 375-381 (1994)).

Preferiblemente, para la glicosilación de carbohidratos de glicopéptidos, la sialiltransferasa podrá transferir ácido siálico a la secuencia Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, Gal $\beta$ 1, 3GlcNAc, o Gal $\beta$ 1,3GalNAc, las penúltimas secuencias más comunes por debajo del ácido siálico terminal en estructuras de carbohidratos totalmente sialiladas (véase la Tabla 8). Las  $\alpha(2,8)$ -sialiltransferasas capaces de transferir ácido siálico a  $\alpha(2,3)$ -Gal $\beta$ 1,4GlcNAc son también útiles en los métodos de la invención.

**Tabla 8.** Sialiltransferasas que usan la secuencia Gal $\beta$ 1,4GlcNAc como sustrato aceptor

Sialiltransferasa	Fuente	Secuencia(s) formada(s)	Ref.
ST6Gal I	Mamífero	NeuAca <sub>2,6</sub> Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	Mamífero	NeuAca <sub>2,3</sub> Gal $\beta$ 1,4GlcNAc- NeuAca <sub>2,3</sub> Gal $\beta$ 1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	Mamífero	NeuAca <sub>2,3</sub> Gal $\beta$ 1,4GlcNAc- NeuAca <sub>2,3</sub> Gal $\beta$ 1,3GlcNAc-	1
ST6Gal III	Mamífero	NeuAca <sub>2,6</sub> Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-	

ST6Gal II	<i>Photobacterium</i>	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitides</i>	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-	3
	<i>N. gonorrhoeae</i>		

---

1) Goochee *et al.*, Bio/Technology 9: 1347-1355 (1991)

2) Yamamoto *et al.*, J. Biochem. 120: 104-110 (1996)

3) Gilbert *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 28271-28276 (1996)

---

Un ejemplo de sialiltransferasa que es útil en los métodos reivindicados es la ST3Gal III, que se designa también como  $\alpha$ (2,3)sialiltransferasa (EC 2.4.99.6). Esta enzima cataliza la transferencia de ácido siálico a la Gal de un glucósido Gal $\beta$ 1,3GlcNAc o Gal $\beta$ 1,4GlcNAc (véanse, por ejemplo, Wen *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 21011 (1992); Van den Eijnden *et al.*, J. Biol. Chem. 256: 3159 (1991)) y es responsable de la sialilación de los oligosacáridos ligados con asparagina en glicopéptidos. El ácido siálico se liga con una Gal con la formación de un ligamiento  $\alpha$  entre los dos sacáridos. La unión (ligamiento) entre los sacáridos es entre la posición 2 de NeuAc y la posición 3 de Gal. Esta enzima particular puede aislarse de hígado de rata (Weinstein *et al.*, J. Biol. Chem. 257: 13845 (1982)); las secuencias de ADN de ADNc humano (Sasaki *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 268: 22782-22787; Kitagawa y Paulson (1994) J. Biol. Chem. 269: 1394-1401) y genómico (Kitagawa *et al.* (1996) J. Biol. Chem. 271: 931-938) son conocidas, facilitando la producción de esta enzima mediante expresión recombinante. En una realización preferida, los métodos de sialilación reivindicados usan una ST3Gal III de rata.

Es un ejemplo de una sialiltransferasa que es útil en los métodos reivindicados la CST-I de *Campylobacter* (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 6.503.744, 6.096.529 y 6.210.933 y WO99/49051 y la solicitud de patente de EE.UU. publicada 2002/2.042.369). Esta enzima cataliza la transferencia de ácido siálico a la Gal de un Gal $\beta$ 1,4Glc o Gal $\beta$ 1,3GalNAc. Otras sialiltransferasas ejemplares de uso en la presente invención incluyen aquellas aisladas de *Campylobacter jejuni*, incluyendo la  $\alpha$ (2,3)sialiltransferasa. Véase, por ejemplo, el documento WO99/49051.

Otras sialiltransferasas, incluyendo las enumeradas en la Tabla 8, son también útiles en un proceso económico y eficaz a gran escala de sialilación de glicopéptidos comercialmente importantes. Como un ensayo sencillo para descubrir la utilidad de estas otras enzimas, se hacen reaccionar diversas cantidades de cada enzima (1-100 mU/mg de proteína) con asialo- $\alpha$ <sub>1</sub>AGP (a 1-10 mg/ml) para comparar la capacidad de la sialiltransferasa de interés de sialilar glicopéptidos respecto a ST6Gal I bovina, ST3Gal III o ambas sialiltransferasas. Como alternativa, pueden usarse otros glicopéptidos u oligosacáridos N-ligados enzimáticamente liberados de la cadena principal peptídica en lugar de asialo- $\alpha$ <sub>1</sub>AGP para esta evaluación. Las sialiltransferasas con la capacidad de sialilar oligosacáridos N-ligados de glicopéptidos más eficazmente que la ST6Gal I son útiles en un proceso a gran escala práctico de sialilación peptídica (como se ilustra para ST3Gal III en esta divulgación).

#### 4. Otras glicosiltransferasas

Un especialista en la materia entenderá que pueden sustituirse otras glicosiltransferasas en ciclos de transferasa similares como se han descrito con detalle para la sialiltransferasa. En particular, las glicosiltransferasas pueden ser también, por ejemplo, glucosiltransferasas, por ejemplo, Alg8 (Stagljev *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5977 (1994)) o Alg5 (Heesen *et al.*, Eur. J. Biochem. 224: 71 (1994)).

Las N-acetilgalactosaminiltransferasas son también de uso en la práctica de la presente invención. Las N-acetilgalactosaminiltransferasas adecuadas incluyen, pero sin limitación,  $\alpha$ (1,3)-N-acetilgalactosaminiltransferasa,  $\beta$ (1,4)-N-acetilgalactosaminiltransferasas (Nagata *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 12082-12089 (1992) y Smith *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 15162 (1994)) y N-acetilgalactosaminiltransferasa peptídica (Homa *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 12609 (1993)). Las N-acetilglucosaminiltransferasas adecuadas incluyen GnT-I (2.4.1.101, Hull *et al.*, BBRC 176: 608 (1991)), GnT-II, GnT-III (Ihara *et al.*, J. Biochem. 113: 692 (1993)), GnT-IV, GnT-V (Shoreibah *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 15381 (1993)) y GnT-VI, N-acetilglucosaminiltransferasa O-ligada (Bierhuizen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9326 (1992)), N-acetilglucosamino-1-fosfato transferasa (Rajput *et al.*, Biochem J. 285: 985 (1992) y hialuronano sintasa.

Las manosiltransferasas son de uso para transferir restos de manosa modificados. Las manosiltransferasas útiles incluyen  $\alpha$ (1,2)-manosiltransferasa,  $\alpha$ (1,3)-manosiltransferasa,  $\alpha$ (1,6)-manosiltransferasa,  $\beta$ (1,4)-manosiltransferasa, Dol-P-Man sintasa, OCh1 y Pmt1 (véase Kornfeld *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 54: 631-664 (1985)).

Las xilosiltransferasas son también útiles en la presente invención. Véanse, por ejemplo, Rodgers, *et al.*, Biochem. J., 288:817-822 (1992) y Elbain, *et al.*, patente de EE.UU. n° 6.168.937.

Se describen otros ciclos de glicosiltransferasa adecuados en Ichikawa *et al.*, JACS 114: 9283 (1992), Wong *et al.*, J. Org. Chem. 57: 4343 (1992) e Ichikawa *et al.* en "CARBOHYDRATES AND CARBOHYDRATE POLYMERS", Yaltami, ed. (ATL Press, 1993).



Las glicosiltransferasas procarióticas son también útiles en la práctica de la invención. Dichas glicosiltransferasas incluyen enzimas implicadas en la síntesis de lipooligosacáridos (LOS), que se producen por muchas bacterias gramnegativas. Los LOS tienen típicamente secuencias de glicano terminales que imitan los glicoconjugados encontrados en la superficie de células epiteliales humanas o en secreciones del hospedador (Preston *et al.*, Critical Reviews in Microbiology 23(3): 139-180 (1996)). Dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, proteínas de operones *rfa* de especies tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, que incluyen una  $\beta$ 1,6-galactosiltransferasa y una  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa (véanse, por ejemplo, los nº de acceso a EMBL M80599 y M86935 (*E. coli*); el nº de acceso a EMBL S56361 (*S. typhimurium*)), una glucosiltransferasa (nº de acceso a Swiss-Prot P25740 (*E. coli*)), una  $\beta$ 1,2-glucosiltransferasa (*rfaJ*) (nº de acceso a Swiss-Prot P27129 (*E. coli*)) y nº de acceso a Swiss-Prot P19817 (*S. typhimurium*)) y una  $\beta$ 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (*rfaK*) (nº de acceso a EMBL U00039 (*E. coli*)). Otras glicosiltransferasas para las que son conocidas las secuencias aminoácidas incluyen aquellas que se codifican por operones tales como *rfaB*, que se han caracterizado en organismos tales como *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium leprosum* y el operón *rh1* de *Pseudomonas aeruginosa*.

15 Son también adecuadas para uso en la presente invención las glicosiltransferasas que están implicadas en la producción de estructuras que contienen lacto-N-neotetraosa, D-galactosil- $\beta$ -1,4-N-acetil-D-glucosaminil- $\beta$ -1,3-D-galactosil- $\beta$ -1,4-D-glucosa y la secuencia trisacárida del grupo sanguíneo P\*, D-galactosil- $\alpha$ -1,4-D-galactosil- $\beta$ -1,4-D-glucosa, que se han identificado en los LOS de los patógenos de mucosa *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Scholten *et al.*, J. Med. Microbiol. 41: 236-243 (1994)). Los genes de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* que codifican las glicosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de estas estructuras se han identificado a partir de los inmunotipos L3 y L1 de *N. meningitidis* (Jennings *et al.*, Mol. Microbiol. 18: 729-740 (1995)) y el mutante F62 de *N. gonorrhoeae* (Gotshlich, J. Exp. Med. 180: 2181-2190 (1994)). En *N. meningitidis*, un locus consistente en tres genes, *lgtA*, *lgtB* e *lgtE*, codifica las enzimas glicosiltransferasas necesarias para la adición de los últimos tres azúcares a la cadena de lacto-N-neotetraosa (Wakarchuk *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 19166-73 (1996)). Recientemente, se ha demostrado la actividad enzimática de los productos génicos de *lgtB* e *lgtA*, proporcionando la primera evidencia de su función glicosiltransferasa propuesta (Wakarchuk *et al.*, J. Biol. Chem. 271 (45): 28271-276 (1996)). En *N. gonorrhoeae*, hay dos genes adicionales, *lgtD* que añade una  $\beta$ -D-GalNAc a la posición 3 de la galactosa terminal de la estructura de lacto-N-neotetraosa e *lgtC*, que añade una  $\alpha$ -D-Gal terminal al elemento de lactosa de un LOS truncado, creando por tanto la estructura del antígeno del grupo sanguíneo P\* (Gotshlich (1994), supra.). En *N. meningitidis*, un inmunotipo L1 separado expresa también el antígeno del grupo sanguíneo P\* y se ha mostrado que porta un gen *lgtC* (Jennings *et al.*, (1995), supra.). Se describen también glicosiltransferasas de *Neisseria* y genes asociados en el documento USPN 5.545.553 (Gotschlich). Se han caracterizado también genes de  $\alpha$ 1,2-fucosiltransferasa y  $\alpha$ 1,3-fucosiltransferasa de *Helicobacter pylori* (Martin *et al.*, J. Biol. Chem. 272: 21349-21356 (1997)). Son también de uso en la presente invención las glicosiltransferasas de *Campylobacter jejuni* (véase Taniguchi *et al.*, 2002, "Handbook of glycosyltransferases and related genes, Springer, Tokio).

#### B. Sulfotransferasas

La invención proporciona también métodos para producir péptidos que incluyen moléculas sulfatadas incluyendo, por ejemplo, polisacáridos sulfatados tales como heparina, sulfato de heparano, carragenano y compuestos relacionados. Las sulfotransferasas adecuadas incluyen, por ejemplo, condroitin-6-sulfotransferasa (ADNc de pollo descrito por Fukuta *et al.*, J. Biol. Chem. 270: 18575-18580 (1995); nº de acceso a GenBank D49915), glicosaminoglicano-N-acetilglicosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 1 (Dixon *et al.*, Genomics 26: 239-241 (1995); UL18918) y glicosaminoglicano-N-acetilglicosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 2 (ADNc de murino descrito en Orellana *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 2270-2276 (1994) y Eriksson *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 10438-10443 (1994); ADNc humano descrito en el nº de acceso a GenBank U2304).

#### C. Glicosiltransferasas unidas a células

En otra realización, las enzimas utilizadas en el método de la invención son glicosiltransferasas unidas a células. Aunque son conocidas muchas glicosiltransferasas solubles (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.032.519), las glicosiltransferasas están generalmente en forma unida a membrana cuando se asocian con células. Muchas de las enzimas unidas a membrana estudiadas hasta ahora se considera que son proteínas intrínsecas; es decir, no se liberan de las membranas mediante sonicación y requieren detergentes para su solubilización. Se han identificado glicosiltransferasas de superficie en las superficies de células de vertebrados e invertebrados, y se ha reconocido también que estas transferasas de superficie mantienen la actividad catalítica en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la función más reconocida de las glicosiltransferasas de superficie celular es para reconocimiento intercelular (Roth, 1990, "Molecular Approaches to Supracellular Phenomena").

Se han desarrollado métodos para alterar las glicosiltransferasas expresadas por células. Por ejemplo, Larsen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8227-8231 (1989), notifican un enfoque genético para aislar secuencias de ADNc clonadas que determinan la expresión de estructuras oligosacáridas de superficie celular y sus glicosiltransferasas asociadas. Se transfirió en células COS-1 una colección de ADNc generada a partir de ARNm aislado de una estirpe celular de murino conocida por expresar UDP-galactosa: $\beta$ -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa. Se cultivaron entonces las células transfectadas y se ensayó la actividad  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa.

Francisco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2713-2717 (1992) dan a conocer un método de anclaje de  $\beta$ -lactamasa a la superficie externa de *Escherichia coli*. Se produce una fusión tripartita consistente en (i) una secuencia señal de una proteína de membrana externa, (ii) una sección que atraviesa la membrana de una proteína de membrana externa y (iii) una secuencia de  $\beta$ -lactamasa madura completa, dando como resultado una molécula de  $\beta$ -lactamasa unida a la superficie activa. Sin embargo, el método de Francisco está limitado solo a sistemas celulares procarióticos y, como se reconoce por los autores, requiere la fusión tripartita completa para su apropiado funcionamiento.

#### D. Enzimas de fusión

En otras realizaciones ejemplares, los métodos de la invención utilizan péptidos de fusión que tienen más de una actividad enzimática que está implicada en la síntesis de un conjugado glicopeptídico deseado. Los péptidos de fusión pueden estar compuestos, por ejemplo, por un dominio catalíticamente activo de una glicosiltransferasa que se une con un dominio catalíticamente activo de una enzima auxiliar. El dominio catalítico de la enzima auxiliar puede catalizar, por ejemplo, una etapa en la formación de un azúcar-nucleótido que es un donante de glicosiltransferasa, o catalizar una reacción implicada en un ciclo de glicosiltransferasa. Por ejemplo, puede unirse un polinucleótido que codifica una glicosiltransferasa, en fase, con un polinucleótido que codifica una enzima implicada en la síntesis de azúcar-nucleótido. El péptido de fusión resultante puede catalizar entonces no solo la síntesis del azúcar-nucleótido, sino también la transferencia del resto de azúcar a la molécula aceptora. El péptido de fusión puede ser dos o más enzimas del ciclo ligadas en una secuencia nucleotídica expresable. En otras realizaciones, el péptido de fusión incluye los dominios catalíticamente activos de dos o más glicosiltransferasas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.641.668. Los glicopéptidos modificados de la presente invención pueden diseñarse fácilmente y fabricarse usando diversos péptidos de fusión (véase, por ejemplo, la solicitud de patente PCT PCT/CA98/01180, que se publicó como WO 99/31224 el 24 de junio de 1999).

#### E. Enzimas inmovilizadas

Además de enzimas unidas a células, la presente invención proporciona también el uso de enzimas que están inmovilizadas en un soporte sólido y/o soluble. En una realización ejemplar, se proporciona una glicosiltransferasa que está conjugada con un PEG a través de un ligador de glicosilo intacto según los métodos de la invención. El conjugado de PEG-ligador-enzima se une opcionalmente al soporte sólido. El uso de enzimas soportadas en sólido en los métodos de la invención simplifica el procesamiento de la mezcla de reacción y la purificación del producto de reacción, y posibilita también una fácil recuperación de la enzima. El conjugado de glicosiltransferasa se utiliza en los métodos de la invención. Resultarán evidentes para los especialistas en la materia otras combinaciones de enzimas y soportes.

#### F. Mutagénesis de glicosiltransferasas

Las formas novedosas de glicosiltransferasas, sialiltransferasas, sulfotransferasas y cualquier otra enzima usada en el método de la invención pueden crearse usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente, así como otros bien conocidos por los especialistas en la materia. Son de particular interés las transferasas con especificidad por aceptor y/o especificidad por donante alteradas. Son también de interés enzimas con mayores tasas de conversión y mayor estabilidad, entre otras.

Pueden usarse técnicas de mutagénesis de diseño racional cuando la secuencia del péptido es conocida. Puesto que las secuencias, así como muchas de las estructuras terciarias de las transferasas y glicosidasas usadas en la invención, son conocidas, estas enzimas son ideales para el diseño racional de mutantes. Por ejemplo, el sitio catalítico de la enzima puede mutarse para alterar la especificidad de donante y/o aceptor de la enzima.

Los datos estructurales terciarios extensivos de las glicosiltransferasas y glicosidasas hidrolasas hacen también ideales a estas enzimas para mutaciones que implican intercambios de dominio. Las glicosiltransferasas y glicosidasas hidrolasas son enzimas modulares (véase Bourne y Henrissat, 2001, *Current Opinion in Structural Biology* 11:593-600). Las glicosiltransferasas se dividen en dos familias basándose en su estructura: GT-A y GT-B. Las glicosiltransferasas de la familia GT-A comprenden dos dominios distintos, uno implicado en la unión a nucleótido y el otro en la unión a aceptor. Por tanto, podría fusionarse convenientemente la secuencia de ADN que codifica el dominio de un gen en fase con un dominio de un segundo gen para crear un nuevo gen que codificara una proteína con una nueva especificidad de aceptor/donante. Dichos intercambios de dominios podrían incluir adicionalmente los módulos de carbohidrato y otros dominios auxiliares.

Las técnicas de mutación aleatoria y/o evolución dirigida, como se describen anteriormente, pueden usarse también para crear formas novedosas de las glicosiltransferasas y glicosidasas usadas en la invención.

### IV. Sistemas de expresión *in vitro* e *in vivo*

#### A. Células para la producción de glicopéptidos

La acción de las glicosiltransferasas es clave para la glicosilación de péptidos, por tanto, la diferencia en la expresión de un conjunto de glicosiltransferasas en cualquier tipo celular dado afecta al patrón de glicosilación de cualquier péptido dado producido en esa célula. Para una revisión de la glicosilación de péptidos dependiente de la célula hospedadora,

véase Kabata y Takasaki, "Structure and Biosynthesis of Cell Surface Carbohydrates," en "Cell Surface Carbohydrates and Cell Development", 1991, pág. 1-24, Eds. Minoru Fukuda, CRC Press, Boca Raton, FL.

5 Según la presente divulgación, el tipo de célula en que se produce el péptido es relevante solo con respecto al grado de remodelación necesario para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada. Por ejemplo, el número y secuencia de reacciones de digestión enzimática y el número y secuencia de las reacciones sintéticas enzimáticas que son necesarias *in vitro* para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada variarán dependiendo de la estructura del glicano en el péptido producido por un tipo celular particular. Aunque no debería considerarse en modo alguno que la invención esté limitada a la producción de péptidos a partir de ningún tipo celular particular, incluyendo cualquier tipo celular dado a conocer en la presente memoria, se presenta ahora una discusión de varios sistemas celulares que establece la potencia de la presente invención y su independencia del tipo celular en que se generan los péptidos.

10 En general, y para expresar un péptido a partir de un ácido nucleico que lo codifica, el ácido nucleico debe incorporarse a un módulo de expresión que comprende un elemento promotor, un elemento terminador y la secuencia de codificación del péptido ligada operativamente entre los dos. Se liga entonces operativamente el módulo de expresión en un vector. Con este fin, pueden emplearse adaptadores o ligadores para unir los fragmentos nucleotídicos o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, la eliminación de nucleótidos superfluos, la eliminación de sitios de restricción, o similares. Con este fin, pueden estar implicados mutagénesis *in vitro*, reparación de cebadores, restricción, asociación, resustituciones, por ejemplo, transiciones y transversiones. Un vector lanzadera tiene los elementos genéticos necesarios para replicación en una célula. Algunos vectores pueden replicarse solo en procariontes, o pueden replicarse tanto en procariontes como en eucariotes. Dicho vector de expresión plasmídico se mantendrá en uno o más sistemas de replicación, preferiblemente dos sistemas de replicación, que permitan el mantenimiento estable en una célula hospedadora de levadura con fines de expresión, y en un hospedador procarionte con fines de clonación. Están ahora disponibles comercialmente muchos vectores con diversas características. Los vectores son habitualmente plásmidos o fagos, pero pueden ser también cósmidos o minicromosomas. Convenientemente, muchos vectores comercialmente disponibles tendrán el promotor y terminador del módulo de expresión ya presentes, y un sitio poliligador en el que puede insertarse la secuencia de codificación del péptido de interés. El vector lanzadera que contiene el módulo de expresión se transforma entonces en *E. coli*, donde se replica durante la división celular creando una preparación de vector que es suficiente para transformar las células hospedadoras del sistema de expresión elegido. La metodología anterior es bien conocida por los especialistas en la materia, y los protocolos con los que se logra pueden encontrarse en Sambrook *et al.* (2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

15 El vector, una vez purificado de las células en que se amplifica, se transforma entonces en las células del sistema de expresión. El protocolo de transformación depende de la clase de célula y de la naturaleza del vector. Se cultivan los transformantes en un medio nutriente apropiado y, cuando sea apropiado, se mantienen bajo presión selectiva para asegurar la retención del ADN endógeno. Cuando la expresión es inducible, puede permitirse el crecimiento del hospedador de levadura para proporcionar una alta densidad de células, y entonces se induce la expresión. El péptido heterólogo secretado maduro puede recogerse con cualquier medio convencional, y purificarse mediante cromatografía, electroforesis, diálisis, extracción con disolvente-disolvente y similares.

20 Las técnicas de clonación molecular son bien conocidas en la materia. Además, pueden encontrarse técnicas para los procedimientos de clonación molecular en Sambrook *et al.* (2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Glover *et al.*, (1985, "DNA Cloning: A Practical Approach", volúmenes I y III); Gait *et al.*, (1985, "Oligonucleotide Synthesis"); Hames y Higgins (1985, "Nucleic Acid Hybridization"); Hames y Higgins (1984, "Transcription And Translation"); Freshney *et al.*, (1986, "Animal Cell Culture"); Perbal, (1986, "Immobilized Cells And Enzymes", IRL Press); Perbal, (1984, "A Practical Guide To Molecular Cloning"); Ausubel *et al.* (2002, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Inc.).

#### B. Hongos y levaduras

25 Los péptidos producidos en levadura están glicosilados y las estructuras de glicano presentes en los mismos son principalmente estructuras ricas en manosa. En el caso de los N-glicanos, las estructuras de glicano producidas en levadura pueden contener del orden de 9 o más residuos de manosa que pueden contener o no azúcares adicionales añadidos al mismo. Se muestra en la Figura 4, lado izquierdo, un ejemplo del tipo de glicano en péptidos producidos por células de levadura. Independientemente del número de residuos de manosa y del tipo y complejidad de los azúcares adicionales añadidos a los mismos, los N-glicanos como componentes de péptidos producidos en células de levadura comprenden una estructura de núcleo de trimanosilo como se muestra en la Figura 4. Cuando la estructura de glicano en un péptido producido por una célula de levadura es una estructura rica en manosa, es un asunto sencillo para el especialista en la materia eliminar *in vitro* usando enzimas manosidasa disponibles todos los residuos de manosa de la molécula, excepto aquellos que comprenden el núcleo de trimanosilo del glicano, generando por tanto un péptido que tiene un núcleo de trimanosilo elemental unido al mismo. Ahora, usando las técnicas disponibles en la materia y provistos de la presente divulgación, es un asunto sencillo añadir enzimáticamente *in vitro* restos de azúcar adicionales a la estructura de núcleo de trimanosilo elemental para generar un péptido que tenga la estructura de glicano deseada unida al mismo. De forma similar, cuando el péptido producido por la célula de levadura comprende una estructura rica en manosa además de otros azúcares complejos unidos al mismo, es un asunto sencillo escindir enzimáticamente todos

los azúcares adicionales, incluyendo los residuos de manosa extra, para llegar a la estructura de núcleo de trimanosilo elemental. Una vez se produce la estructura de núcleo de trimanosilo elemental, es posible la generación de un péptido que tenga la glicosilación deseada siguiendo las instrucciones proporcionadas en la presente memoria.

5 Se entiende por "levadura" las levaduras ascosporigénicas (*Endomycetales*), levaduras basidiosporogénicas y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (*Blastomycetes*). Las levaduras ascosporigénicas se dividen en dos familias, *Spermophthoraceae* y *Saccharomycetaceae*. Esta última está compuesta por cuatro subfamilias, *Schizosaccharomycoideae* (por ejemplo, género *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae* y *Saccharomycoideae* (por ejemplo, los géneros *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*). Las levaduras basidiosporogénicas incluyen los géneros *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* y *Filobasidiella*. Las levaduras pertenecientes a los hongos imperfectos se dividen en dos familias, *Sporobolomycetaceae* (por ejemplo, los géneros *Sporobolomyces*, *Bullera*) y *Cryptococcaceae* (por ejemplo, el género *Candida*). Son de interés particular para la presente invención las especies de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Kluyveromyces*, especialmente *K. lactis* y *K. drosophilum*, *Candida*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* y *Chryso sporium*. Puesto que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, con los fines de esta invención, se definirá levadura como se describe en Skinner *et al.*, eds. 1980 "Biology and Activities of Yeast" ("Soc. App. Bacteriol. Symp. Series" N° 9).

Además de lo anterior, los especialistas en la materia están presuntamente familiarizados con la biología de la levadura y la manipulación de la genética de la levadura. Véanse, por ejemplo, Bacila *et al.*, eds. (1978, "Biochemistry and Genetics of Yeast", Academic Press, Nueva York) y Rose y Harrison. (1987, "The Yeasts" (2ª ed.) Academic Press, Londres). Son bien conocidos en la materia los métodos de introducción de ADN exógeno en hospedadores de levadura. Hay una amplia variedad de métodos de transformación de levadura. Se enseña la transformación de esferoplastos por Hinnen *et al.* (1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1919-1933); Beggs, (1978, *Nature* 275(5676):104-109) y Stinchcomb *et al.*, (publicación de la OEP n° 45.573; incorporada a la presente memoria como referencia); la electroporación se enseña por Becker y Gaurante, (1991, *Methods Enzymol.* 194: 182-187); el acetato de litio se enseña por Gietz *et al.* (2002, *Methods Enzymol.* 350: 87-96) y Mount *et al.* (1996, *Methods Mol Biol.* 53: 139-145). Para una revisión de los sistemas de transformación de levaduras no *Saccharomyces*, véase Wang *et al.* (*Crit. Rev. Biotechnol.* 2001; 21(3): 177-218). Para procedimientos generales sobre la modificación genética de levadura, véase Barr *et al.*, (1989, "Yeast genetic engineering", Butterworths, Boston).

Además de la levadura de tipo silvestre y las células fúngicas, hay también estirpes de levadura y hongos que se han mutado y/o seleccionado para potenciar el nivel de expresión del gen exógeno y la pureza, el procesamiento postraduccional del péptido resultante y la recuperación y pureza del péptido maduro. La expresión de un péptido exógeno puede dirigirse también a la ruta secretora celular, como se ilustra por la expresión de insulina (véase Kjeldsen, 2000, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 277-286 y las referencias citadas en el mismo). En general, para causar que un péptido exógeno se secrete de la célula de levadura, pueden usarse señales de secreción derivadas de genes de levadura, tales como aquellas de los genes de la toxina mortal (Stark y Boyd, 1986, *EMBO J.* 5: 1995-2002) o la feromona alfa (Kurjan y Herskowitz, 1982, *Cell* 30: 933; Brake *et al.*, 1988, *Yeast* 4:S436).

Con respecto a los hongos filamentosos en general, pueden encontrarse métodos para su manipulación genética en Kinghorn y Turner (1992, "Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi", Blackie Academic and Professional, Nueva York). Puede encontrarse una guía sobre los vectores apropiados en Martinelli y Kinghorn (1994, "Aspergillus: 50 years", Elsevier, Amsterdam).

### 1. *Saccharomyces*

En *Saccharomyces*, los vectores de levadura adecuados para uso que producen un péptido incluyen YRp7 (Struhl *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1035-1039, 1978), YEp13 (Broach *et al.*, *Gene* 8: 121-133, 1979), vectores POT (Kawasaki *et al.*, patente de EE.UU. n° 4.931.373, que se incorpora como referencia a la presente memoria), pJDB249 y pJDB219 (Beggs, *Nature* 275:104-108, 1978) y derivados de los mismos. Los promotores preferidos para uso en levadura incluyen promotores de la expresión de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 255: 12073-12080, 1980; Alber y Kawasaki, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 419-434, 1982; Kawasaki, patente de EE.UU. n° 4.599.311) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young *et al.*, en "Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals", Hollaender *et al.*, (eds.), pág. 355, Plenum, Nueva York, 1982; Ammerer, *Meth. Enzymol.* 101: 192-201, 1983) y el promotor ADH2-4<sup>c</sup> (Russell *et al.*, *Nature* 304: 652-654, 1983; Irani y Kilgore, solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 07/784.653, documentos CA 1.304.020 y EP 284.044, que se incorporan a la presente memoria como referencia). Las unidades de expresión pueden incluir también un terminador transcripcional. Es un terminador transcripcional preferido el terminador TPI1 (Alber y Kawasaki, *ibid.*).

Los ejemplos de dichos vectores lanzadera de levadura-bacterias incluyen Yep24 (Botstein *et al.* (1979) *Gene* 8: 17-24; pC1 (Brake *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4642-4646) y Yrp17 (Stinchomb *et al.* (1982) *J. Mol. Biol.* 158: 157). Adicionalmente, un vector de expresión plasmídico puede ser un plásmido de alto o bajo número de copias, estando generalmente el número de copias en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 200. En el caso de vectores de levadura de alto número de copias, habrá generalmente al menos 10, preferiblemente al menos 20 y habitualmente no más de aproximadamente 150 copias del vector en un solo hospedador. Dependiendo del péptido heterólogo seleccionado, puede ser deseable un vector de alto o bajo números de copias, dependiendo del efecto del

vector y del péptido recombinante sobre el hospedador. Véase, por ejemplo, Brake *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4642-4646. Las construcciones de ADN de la presente invención pueden integrarse también en el genoma de levadura mediante un vector integrador. Son conocidos en la materia ejemplos de dichos vectores. Véase, por ejemplo, Botstein *et al.* (1979) *Gene* 8: 17-24.

5 La selección de la levadura y otros hospedadores microorganismos adecuados para la práctica de la presente invención está dentro de las habilidades de la materia. Son de particular interés las especies *Saccharomyces S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis* y *S. oviformis*. Cuando se seleccionan células hospedadoras de levadura para la expresión de un péptido deseado, las células hospedadoras adecuadas pueden incluir aquellas que muestran tener, entre otros, buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica y vigor global.

10 La levadura y otros microorganismos están generalmente disponibles en una variedad de fuentes, incluyendo el Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, Calif.; y la American Type Culture Collection, Manassas VA. Para una revisión, véase Strathern *et al.*, eds. (1981, "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Son bien conocidos en la materia los métodos de introducción de ADN exógeno en hospedadores de levadura.

## 15 2. *Pichia*

El uso de *Pichia methanolica* como célula hospedadora para la producción de péptidos recombinantes se da a conocer en las solicitudes PCT WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Las moléculas de ADN para uso en la transformación de *P. methanolica* se preparan habitualmente en forma de plásmidos circulares bicatenarios que se linealizan preferiblemente antes de la transformación. Para la producción de péptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y el terminador del plásmido sean de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen de utilización de alcohol de *P. methanolica* (AUG1 o AUG2). Otros promotores útiles incluyen los genes de dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT), así como los dados a conocer en la patente de EE.UU. n° 5.252.726.

20 Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma del hospedador, se prefiere tener todo el segmento de expresión del plásmido flanqueado por ambos extremos con secuencias de ADN hospedador. Es un marcador detectable preferido para uso en *Pichia methanolica* un gen ADE2 de *P. methanolica*, que codifica la fosforibosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), que permite crecer a las células hospedadoras *ade2* en ausencia de adenina. Para procesos industriales a gran escala en que sea deseable minimizar el uso de metanol, se prefieren las células hospedadoras en que se eliminan ambos genes de utilización de metanol (AUG1 y AUG2). Para la producción de péptidos secretados, se prefieren células hospedadoras deficientes en genes de proteasa vacuolar (PEP4 y PRB1). La electroporación se usa para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un péptido de interés en células de *P. methanolica*. Se prefiere transformar células de *P. methanolica* mediante electroporación usando un campo eléctrico por pulsos de degradación exponencial que tiene una potencia de campo de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferiblemente de aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante temporal (t) de 1 a 40 ms, lo más preferiblemente de aproximadamente 20 ms. Para una revisión del uso de *Pichia pastoris* para la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpo, véase Fischer *et al.*, (1999, "Biotechnol Appl Biochem." 30 (Pt 2): 117-120).

## 3. *Aspergillus*

Los métodos para expresar péptidos en *Aspergillus spp.* son bien conocidos en la materia incluyendo, pero sin limitación, aquellos descritos en Carrez *et al.*, 1990, *Gene* 94: 147-154; Contreras, 1991, *Bio/Technology* 9: 378-381; Yelton *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470-1474; Tilburn *et al.*, 1983, *Gene* 26:205-221; Kelly y Hynes, 1985, *EMBO J.* 4: 475-479; Ballance *et al.*, 1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 112: 284-289; Buxton *et al.*, 1985, *Gene* 37:207-214 y la patente de EE.UU. n° 4.935.349, incorporados como referencia a la presente memoria en su totalidad. Se encuentran ejemplos de promotores útiles en *Aspergillus* en la patente de EE.UU. n° 5.252.726. Se encuentran estirpes de *Aspergillus* útiles para la expresión de péptidos en la patente de EE.UU. n° 4.935.349. Está disponible la producción comercial de péptidos exógenos en Novoenzymes para *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*.

## 45 4. *Trichoderma*

El *Trichoderma* tiene ciertas ventajas frente a otras especies de células hospedadoras recombinantes para la expresión de péptidos deseados. Este organismo es fácil de cultivar en grandes cantidades y tiene la capacidad de glicosilar y secretar eficazmente péptidos recombinantes de mamífero al medio con altos rendimientos, haciendo relativamente fácil el aislamiento del péptido. Además, el patrón de glicosilación en los péptidos expresados es más similar al de péptidos humanos que los péptidos expresados en muchos otros sistemas. Son embargo, sigue habiendo diferencias en las estructuras de glicano en los péptidos expresados a partir de estas células. Por ejemplo, los residuos de ácido siálico terminales son importantes para la función terapéutica de un péptido en un sistema de mamífero, puesto que la presencia de estos restos en el extremo de la estructura de glicano impide un aclaramiento del péptido de la corriente sanguínea del mamífero. El mecanismo detrás de la semivida biológica aumentada de las moléculas sialiladas se cree que se basa en su reconocimiento reducido por lectinas (Drickamer, 1988, *J. Biol. Chem.* 263: 9557-9560). Sin embargo, las células fúngicas genéricas no añaden residuos de ácido siálico terminales a glicanos en péptidos, y los péptidos sintetizados en células fúngicas son por lo tanto asiálicos. Según la presente invención, esta deficiencia puede remediarse usando los métodos de remodelación de glicano *in vitro* de la invención descritos con detalle en otro lugar de la presente memoria.

Las especies de *Trichoderma* útiles como hospedadoras para la producción de péptidos para remodelar incluyen *T. reesei*, tales como QM6a, ALKO2442 o CBS383.78 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, PO Box 273, 3740 AG Baarn, Holanda, o ATCC13631 (American Type Culture Collection, Manassas VA, 10852, EE.UU, tipo); *T. viride* (tales como CBS189.79 (det. W. Gams); *T. longibrachiatum* tales como CBS816.68 (tipo); *T. pseudokoningii* (tales como MUCL19358; Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain); *T. saturnisporum* CBS330.70 (tipp); *T. harzianum* CBS316.31 (det. W. Gams); *T. virgatum* (*T. pseudokoningii*) ATCC24961. Lo más preferiblemente, el hospedador es *T. reesei* y, más preferiblemente, es las estirpes de *T. reesei* QM9414 (ATCC 26921), RUT-C-30 (ATCC 56765) y mutantes altamente productivos tales como VTT-D-79125, que deriva de QM9414 (Nevalainen, Technical Research Centre of Finland Publications 26, (1985), Espoo, Finlandia).

Se efectúa la transformación de *Trichoderma* con ADN usando cualquier técnica conocida en la materia, incluyendo la enseñada en la patente europea nº EP0244234, Harkki (1989, Bio/Technology 7: 596-601) y Uusitalo (1991, J. Biotech. 17: 35-50). El cultivo de *Trichoderma* está apoyado por una extensa experiencia previa en técnicas de fermentación a escala industrial; por ejemplo, véase Finkelstein, 1992, "Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Products", Butterworth-Heinemann, publishers, Stoneham, Mass.

#### 5. Kluyveromyces

Las levaduras pertenecientes al género *Kluyveromyces* se han usado como organismos hospedadoras para la producción de péptidos recombinantes. Los péptidos producidos por este género de levadura son, en particular, quimosina (patente europea 96.430), taumatina (patente europea 96.910), albúmina, interleucina 1 $\beta$ , TPA, TIMP (patente europea 361.991) y derivados de albúmina que tienen una función terapéutica (patente europea 413.622). Las especies de interés particular del género *Kluyveromyces* incluyen *K. lactis*.

Los métodos de expresión de péptidos recombinantes en *Kluyveromyces spp.* son bien conocidos en la materia. Los vectores para la expresión y secreción de péptidos recombinantes humanos en *Kuyveromyces* son conocidos en la materia (Yeh, J. Cell. Biochem. Suppl. 14C:68, res. H402; Fleer, 1990, Yeast 6 (nº especial):S449) así como los procedimientos para la transformación y expresión de péptidos recombinantes (Ito *et al.*, 1983, J. Bacteriol. 153: 163-168; van den Berg, 1990, Bio/Technology 8: 135-139; patente de EE.UU. nº 5.633.146, documentos WO8304050A1, EP0096910, EP0241435, EP0301670, EP0361991, todos los cuales se incorporan como referencia a la presente memoria en su totalidad). Para una revisión de la manipulación genética de plásmidos de ADN lineal de *Kluyveromyces lactis* por orientación génica y transposiciones de plásmidos, véase Schaffrath *et al.* (1999, FEMS Microbiol Lett. 178(2): 201-210).

#### 6. Chrysosporium

El género de hongos *Chrysosporium* se ha usado recientemente para la expresión de péptidos recombinantes extraños. Puede encontrarse una descripción de los procedimientos mediante los que un especialista en la materia puede usar *Chrysosporium* para expresar péptidos extraños en el documento WO 00/20555 (incorporado como referencia a la presente memoria en su totalidad). Las especies particularmente adecuadas como sistema de expresión incluyen, pero sin limitación, *C. botryoides*, *C. carmichaelii*, *C. crassitunicatum*, *C. europae*, *C. evolceannui*, *F. fastidium*, *C. filiforme*, *C. gerogiae*, *C. globiferum*, *C. globiferum var. articulatum*, *C. globiferum var. niveum*, *C. hirundo*, *C. hispanicum*, *C. holmii*, *C. indicum*, *C. inops*, *C. keratinophilum*, *C. kreiselii*, *C. kuzurovianum*, *C. lignorum*, *C. lobatum*, *C. lucknowense*, *C. lucknowense Garg 27K*, *C. medium*, *C. medium var. spissescens*, *C. mephiticum*, *C. merdarium*, *C. merdarium var. roseum*, *C. minor*, *C. pannicola*, *C. parvum*, *C. parvum var. crescens*, *C. pilosum*, *C. peodomerderium*, *C. pyriformis*, *C. queenslandicum*, *C. sigleri*, *C. sulfureum*, *C. synchronum*, *C. tropicum*, *C. undulatum*, *C. vallenarense*, *C. vespertilium* y *C. zonatum*.

#### 7. Otros

Se dan a conocer métodos para transformar *Schwanniomyces* en la patente europea 394.538. Se dan a conocer métodos para transformar *Acremonium chrysogenum* en la patente de EE.UU. nº 5.162.228. Se dan a conocer métodos para transformar *Neurospora* en la patente de EE.UU. nº 4.486.533. Se conoce también un sistema de expresión específico de *Schizosaccharomyces pombe* (patente europea 385.391). Pueden encontrarse métodos generales para expresar péptidos en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* en Giga-Hama y Kumagai (1997, "Foreign gene expression in fission yeast: Schizosaccharomyces pombe", Springer, Berlin).

#### C. Sistemas de mamíferos

Como se discute anteriormente, las células de mamífero producen típicamente una mezcla heterogénea de estructuras de N-glicano que varía con respecto al número y disposición de los azúcares adicionales unidos al núcleo de trimanosilo. Típicamente, las células de mamífero producen péptidos que tienen una estructura de glicano compleja, tal como la mostrada en la Figura 3, lado derecho. Usando los métodos de la presente invención, puede remodelarse *in vitro* un péptido producido en una célula de mamífero generando un péptido que tiene la glicosilación deseada identificando en primer lugar la estructura de glicano primaria y determinando entonces cuáles azúcares deben eliminarse para remodelar la estructura de glicano. Como se discute en la presente memoria, los azúcares para eliminar determinarán cuáles enzimas de escisión se usarán y, por tanto, las etapas precisas del proceso de remodelación variarán dependiendo de la estructura de glicano primaria usada como sustrato inicial. Se muestra en la Figura 2 un

esquema de muestra de la remodelación de una estructura de glicano producida habitualmente en células de mamífero. La ruta biosintética de N-glicano en células de mamífero se ha caracterizado bien (revisada en Moremen, 1994, *Glycobiology* 4: 113-125). Se ha identificado muchas de las enzimas necesarias para la síntesis de glicano, y se han aislado estirpes celulares mutantes defectivas de esta ruta enzimática, incluyendo las estirpes celulares Lec23 (defectiva de alfa-glicosidasa I) y Lec18 (GlcNAc-TVIII novedosa) de ovario de hámster chino (CHO). El patrón de glicosilación producido por estas células mutantes está alterado respecto a las células de CHO normales. Como se discute en la presente memoria, pueden explotarse los defectos de glicosilación en estas y otras células mutantes con el fin de producir un péptido que carezca de una estructura de glicano compleja. Por ejemplo, los péptidos producidos por células Lec23 carecen de residuos de ácido siálico, y por tanto requieren menos manipulación enzimática para reducir la estructura de glicano hasta un núcleo de trimanosilo elemental o Man3GlcNAc4. Por tanto, los péptidos producidos en estas células pueden servir como sustratos preferidos para la remodelación de glicano. Un especialista en la materia podría aislar o identificar otras estirpes celulares defectivas de glicosilación basándose en métodos conocidos, por ejemplo, el método descrito en Stanley *et al.*, 1990, *Somatic Cell Mol. Genet.*, 16: 211-223. El uso de estirpes celulares defectivas de glicosilación, tanto las identificadas como las aún no identificadas, se incluye en la invención con el fin de generar sustratos peptídicos preferidos para los procesos de remodelación descritos en la presente memoria.

Los vectores de expresión útiles para expresar péptidos exógenos en células de mamífero son numerosos, y son bien conocidos por los especialistas en la materia. Están ahora comercialmente disponibles muchos vectores de expresión de mamífero en compañías que incluyen Novagen, Inc (Madison, WI), Gene Therapy Systems (San Diego, CA), Promega (Madison, WI), ClonTech Inc. (Palo Alto, CA) y Stratagene (La Jolla, CA), entre otras.

Hay varias estirpes celulares de mamífero que son particularmente aptas para expresar péptidos exógenos. Típicamente, las estirpes celulares de mamífero se originan a partir de células tumorales extraídas de mamíferos que se inmortalizado, es decir, que pueden replicarse en cultivo de forma esencialmente indefinida. Estas estirpes celulares incluyen, pero sin limitación, CHO (ovario de hámster chino, por ejemplo, CHO-K1; ATCC n° CCL 61) y variantes de la misma, NSO (mieloma de ratón), BNK, BHK 570 (ATCC n° CRL 10314), BHK (ATCC n° CRL 1632), Per.C6™ (células humanas inmortalizadas, Crucell N.V., Leiden, Holanda), COS-1 (ATCC n° CRL 1650), COS-7 (ATCC n° CRL 1651), HEK 293, células L de ratón, estirpes celulares de linfocitos T, células BW5147 y MDCK (riñón canino de Madin-Darby), HeLa (humanas), A549 (carcinoma pulmonar humano), 293 (ATCC n° CRL 1573; Graham *et al.*, 1977, *Gen. Virol.* 36: 59-72), BGMK (riñón de mono verde Buffalo), Hep-2 (carcinoma de laringe epidermoide humano), LLC-MK<sub>2</sub> (riñón de mono verde africano), McCoy, NCI-H292 (tubo de carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano), RD (rabdiosarcoma), Vero (riñón de mono verde africano), HEL (pulmón embrionario humano), pulmón fetal humano, Chang, MRC5 (pulmón embrionario humano), MRHF (glándula humana) y WI-38 (pulmón embrionario humano). En algunos casos, las células en que se expresa el péptido terapéutico pueden ser células derivadas del paciente a tratar, o pueden derivar de otro mamífero relacionado o no relacionado. Por ejemplo, las células de fibroblasto pueden aislarse de tejido cutáneo de mamífero y cultivarse y transformarse *in vitro*. Esta tecnología está comercialmente disponible en Transkaryotic Therapies, Inc. (Cambridge, MA). Casi todas las estirpes celulares usadas actualmente están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y BioWhittaker (Walkersville, Maryland).

Las células de mamífero pueden transformarse con ADN usando una cualquiera de varias técnicas que son bien conocidas por los especialistas en la materia. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación, transformación con fosfato de calcio (Chen y Okayama, 1988; Graham y van der Eb, 1973; Corsaro y Pearson, 1981, *Somatic Cell Genetics* 7: 603), transfección con dietilaminoetil (DEAE)-dextrano (Fujita *et al.*, 1986; Lopata *et al.*, 1984; Selden *et al.*, 1986), electroporación (Neumann *et al.*, 1982; Potter, 1988; Potter *et al.*, 1984; Wong y Neuman, 1982), transfección con reactivo lipídico catiónico (Elroy-Stein y Moss, 1990; Feigner *et al.*, 1987; Rose *et al.*, 1991; Whitt *et al.*, 1990; Hawley-Nelson *et al.*, 1993, *Focus* 15: 73; Ciccarone *et al.*, 1993, *Focus* 15: 80), retroviral (Cepko *et al.*, 1984; Miller y Baltimore, 1986; Pear *et al.*, 1993; Austin y Cepko, 1990; Bodine *et al.*, 1991; Fekete y Cepko, 1993; Lemischka *et al.*, 1986; Turner *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1984; Miller y Rosman, 1989, *BioTechniques* 7: 980-90; Wang y Finer, 1996, *Nature Med.* 2: 714-6), polibreno (Chaney *et al.*, 1986; Kawai y Nishizawa, 1984), microinyección (Capecchi, 1980) y fusión de protoplastos (Rassoulzadegan *et al.*, 1982; Sandri-Goldin *et al.*, 1981; Schaffer, 1980), entre otros. En general, véanse Sambrook *et al.* (2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) y Ausubel *et al.* (2002, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Nueva York) para técnicas de transformación.

Recientemente, se ha adaptado el sistema de baculovirus, popular para la transformación de células de insecto, para la transformación estable de células de mamífero (véase, para revisión, Koat y Condreay, 2002, *Trends Biotechnol.* 20: 173-180, y las referencias citadas en el mismo). Se da a conocer la producción de péptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 4.713.339; 4.784.950; 4.579.821 y 4.656.134. Varias compañías ofrecen los servicios de transformación y cultivo de células de mamífero, incluyendo Cell Trends, Inc. (Middletown, MD). Las técnicas para cultivar células de mamífero son bien conocidas en la materia, y se encuentran además en Hauser *et al.* (1997, "Mammalian Cell Biotechnology", Walter de Gruyter, Inc., Hawthorne, NY) y Sambrook *et al.* (2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor y las referencias citadas en el mismo).

#### D. Insecto

Las células de insecto, y en particular células de insecto cultivadas, expresan estructuras de glicano N-ligado que raramente están sialiladas y habitualmente comprenden residuos de manosa que pueden tener o no residuos de fucosa

adicionales unidos a los mismos. Se muestran en la Figura 6 ejemplos de los tipos de estructuras de glicano presentes en péptidos producidos en células de insecto cultivadas, y los glicanos de manos de las mismas. En esta situación, puede haber o no presente una fucosa de núcleo que, si está presente, puede estar ligada con el glicano a través de varios diferentes ligamientos.

5 La expresión mediada por baculovirus en células de insecto se ha vuelto particularmente bien establecida para la producción de péptidos recombinantes (Altmann *et al.*, 1999, *Glycoconjugate J.* 16: 109-123). Con respecto al plegamiento de péptidos y al procesamiento postraduccional, las células de insecto son secundarias solo a las estirpes de células de mamífero. Sin embargo, como se observa anteriormente, la N-glicosilación de péptidos en células de insecto difiere en muchos aspectos de la N-glicosilación en células de mamífero, particularmente en que las células de insecto generan frecuentemente estructuras de glicano truncadas que comprenden oligosacáridos que contienen solo tres o a veces solo dos residuos de manosa. Estas estructuras pueden estar sustituidas adicionalmente con residuos de fucosa.

10 Según la presente invención, puede remodelarse *in vitro* un péptido producido en una célula de insecto generando un péptido con una glicosilación deseada eliminando opcionalmente en primer lugar cualquier residuo de fucosa sustituido usando una enzima fucosidasa apropiada. En casos en que el péptido comprende una estructura de núcleo de trimanosilo elemental después de la eliminación de los residuos de fucosa, entonces todo lo que se requiere es la adición *in vitro* de los azúcares apropiados a la estructura de núcleo de trimanosilo para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada. En casos en que el péptido pueda contener solo dos residuos de manosa en la estructura de glicano después de la eliminación de todos los residuos de fucosa, puede añadirse un tercer residuo de manosa usando una enzima manosiltransferasa y una molécula donante adecuada tal como GDP-manosa, y después de ello, se añaden los residuos apropiados para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada. Opcionalmente, pueden generarse también glicanos monoantennados a partir de estas especies.

15 Los protocolos para el uso de baculovirus para transformar células de insecto son bien conocidos en la materia. Se han publicado varios libros que proporcionan los procedimientos para usar el sistema de baculovirus para expresar péptidos en células de insecto. Estos libros incluyen, pero sin limitación, Richardson ("Baculovirus Expression Protocols", 1998, "Methods in Molecular Biology", Vol 39, Humana Pr), O'Reilly *et al.* (1994, "Baculovirus Expression Vectors A Laboratory Manual", Oxford Univ Press) y King y Possee (1992, "The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide", Chapman & Hall). Además, hay también publicaciones tales como Lucklow (1993, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 564-572) y Miller (1993, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 97-101).

20 Se han expedido también muchas patentes relacionadas con sistemas para la expresión en baculovirus de proteínas extrañas. Estas patentes incluyen, pero sin limitación, la patente de EE.UU. n° 6.210.966 (Medio de cultivo para células de insecto que carece de glutamina y que contiene sal de amonio), patente de EE.UU. n° 6.090.584 (Uso de BVAC (cromosomas artificiales de baculovirus) para producir péptidos recombinantes), patente de EE.UU. n° 5.871.986 (Uso de un baculovirus para expresar un ácido nucleico recombinante en una célula de mamífero), patente de EE.UU. n° 5.759.809 (Métodos de expresión de péptidos en células de insecto y métodos insecticidas), patente de EE.UU. n° 5.753.220 (Baculovirus defectivo del gen de cisteína proteasa, proceso para su producción y proceso para la producción económica de un péptido usando el mismo), patente de EE.UU. n° 5.750.383 (Sistema de clonación de baculovirus), patente de EE.UU. n° 5.731.182 (Virus de ADN no de mamífero para expresar un ácido nucleico recombinante en una célula de mamífero), patente de EE.UU. n° 5.728.580 (Métodos y medios de cultivo para inducir una suspensión monocelular en estirpes celulares de insecto), patente de EE.UU. n° 5.583.023 (Baculovirus modificado, su proceso de preparación y su aplicación como vector de expresión génica), patente de EE.UU. n° 5.571.709 (Baculovirus modificado y vectores de expresión de baculovirus), patente de EE.UU. n° 5.521.299 (Oligonucleótidos para la detección de infección por baculovirus), patente de EE.UU. n° 5.516.657 (Vectores de baculovirus para la expresión de péptidos secretados y unidos a membrana), patente de EE.UU. n° 5.475.090 (Gen que codifica un péptido que potencia la infección vírica de insectos hospedadores), patente de EE.UU. n° 5.472.858 (Producción de péptidos recombinantes en larvas de insecto), patente de EE.UU. n° 5.348.886 (Método de producción de virus eucarióticos recombinantes en bacterias), patente de EE.UU. n° 5.322.774 (Secuencia líder procariótica en un sistema de expresión de baculovirus recombinante), patente de EE.UU. n° 5.278.050 (Método para mejorar la eficacia de procesamiento y secreción de genes recombinantes en sistemas de insecto), patente de EE.UU. n° 5.244.805 (Vectores de expresión de baculovirus), patente de EE.UU. n° 5.229.293 (Baculovirus recombinante), patente de EE.UU. n° 5.194.376 (Sistema de expresión de baculovirus capaz de producir péptidos recombinantes a altos niveles), patente de EE.UU. n° 5.179.007 (Método y vector para la purificación de péptidos recombinantes), patente de EE.UU. n° 5.169.784 (Vector de expresión promotor dual de baculovirus), patente de EE.UU. n° 5.162.222 (Uso de promotores tempranos de baculovirus para la expresión de ácidos nucleicos recombinantes en células de insecto transformadas establemente o baculovirus recombinantes), patente de EE.UU. n° 5.155.037 (Secuencias señal de insecto útiles para mejorar la eficacia de procesamiento y la secreción de ácidos nucleicos recombinantes en sistemas de insecto), patente de EE.UU. n° 5.147.788 (Vectores de baculovirus y métodos de uso), patente de EE.UU. n° 5.110.729 (Método de producción de péptidos usando vectores de baculovirus en células cultivadas), patente de EE.UU. n° 5.077.214 (Uso de promotores tempranos de baculovirus para la expresión de genes recombinantes en células de insecto transformadas establemente), patente de EE.UU. n° 5.023.328 (secuencia señal AKH de lepidóptero) y las patentes de EE.UU. n° 4.879.236 y 4.745.051 (Método para la producción de un vector de expresión de baculovirus recombinante). Todas las patentes anteriormente mencionadas se incorporan en su totalidad como referencia a la presente memoria.



Se están usando actualmente estirpes celulares de insectos de varias especies diferentes para la expresión de péptidos, y estas estirpes son bien conocidas por los especialistas en la materia. Las estirpes de células de insecto de interés incluyen, pero sin limitación, células de insectos dípteros y lepidópteros, en general, Sf9 y variantes de la misma (gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*), *Estigmene acrea*, *Trichoplusia ni*, *Bombyx mori*, *Malacosoma disstri*, las estirpes de *Drosophila* Kc1 y SL2 entre otras y mosquito.

#### E. Plantas

Las células de planta como productores de péptidos presentan un conjunto diferente de aspectos. Aunque los glicanos N-ligados producidos en plantas comprenden una estructura de núcleo de trimanosilo, esta cadena principal pentasacárida puede comprender varios azúcares diferentes adicionales como se muestra en la Figura 5. Por ejemplo, en un caso, la estructura de núcleo de trimanosilo se sustituye por un residuo de xilosa  $\beta$ 1,2-ligado y un residuo de fucosa  $\alpha$ 1,3-ligado. Además, las células de planta pueden producir también una estructura de Man5GlcNAc2. Los péptidos producidos en células de planta son a menudo altamente antigénicos como resultado de la presencia de la  $\alpha$ 1,3-fucosa y xilosa de núcleo en la estructura de glicano, y se aclaran rápidamente de la corriente sanguínea cuando se introducen en un mamífero debido a la ausencia de residuos de ácido siálico terminales. Por lo tanto, a menos que estos péptidos se remodelen usando los métodos proporcionados en la presente memoria, se consideran generalmente inadecuados como agentes terapéuticos en mamíferos. Aunque se encontró que algunos anticuerpos monoclonales expresados en células de planta no eran inmunogénicos en ratones, es probable que las cadenas de glicanos no fueran inmunogénicas debido a que estaban enterradas en la región Fc de estos anticuerpos (Chargelegue *et al.*, 2000, Transgenic Res. 9(3): 187-194).

Siguiendo las instrucciones proporcionadas en la presente memoria, es ahora posible generar un péptido producido en una célula de planta en el que un número aumentado de estructuras de glicano presentes en el mismo comprendan una estructura de núcleo de trimanosilo elemental, o una estructura de Man3GlcNAc4. Esto se logra escindiendo *in vitro* cualquier azúcar adicional usando una combinación de glicosidasas apropiadas, incluyendo fucosidasas, hasta llegar a la estructura de núcleo de trimanosilo elemental o la estructura de Man3GlcNAc4. Estas reacciones de escisión deberían incluir también la eliminación de cualquier residuo de fucosa o xilosa de las estructuras para reducir la antigenicidad del péptido final cuando se introduce en un mamífero. Las células de planta que tienen mutaciones que inhiben la adición de residuos de fucosa y xilosa a la estructura de núcleo de trimanosilo son conocidas en la materia (von Schaeuwen *et al.*, 1993, Plant Physiology 102: 1109-1118). El uso de estas células para producir péptidos que tienen glicanos que carecen de fucosa y xilosa está contemplado por la invención. Tras la producción del núcleo de trimanosilo elemental o la estructura de Man3GlcNAc4, pueden añadirse entonces azúcares adicionales al mismo para llegar a un péptido que tenga la glicosilación deseada y que, por lo tanto, sea adecuado para uso terapéutico en un mamífero.

Las plantas transgénicas son consideradas por muchos los sistemas de expresión de elección para péptidos farmacéuticos. Potencialmente, las plantas pueden proporcionar una fuente más barata de péptidos recombinantes. Se ha estimado que los costes de producción de péptidos recombinantes en plantas podrían ser entre 10 y 50 veces menores que los de producir el mismo péptido en *E. coli*. Aunque hay ligeras diferencias en el uso de codón en plantas en comparación con animales, estas pueden compensarse ajustando las secuencias de ADN recombinante (véanse Kusnadi *et al.*, 1997, Biotechnol. Bioeng. 56: 473-484; Khoudi *et al.*, 1999, Biotechnol. Bioeng. 135-143; Hood *et al.*, 1999, Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127-147). Además, la síntesis peptídica, secreción y modificación postraduccional son muy similares en plantas y animales, con solo diferencias menores en la glicosilación de plantas (véase Fischer *et al.*, 2000, J. Biol. Regul. Homest. Agents 14: 83-92). Entonces, es también menos probable que los productos de plantas transgénicas se contaminen por patógenos animales, toxinas microbianas y secuencias oncogénicas.

La expresión de péptidos recombinantes en células de planta es bien conocida en la materia. Además de las plantas transgénicas, los péptidos pueden producirse también en cultivos de células de plantas transgénicas (Lee *et al.*, 1997, Mol. Cell. 7: 783-787) y plantas no transgénicas inoculadas con virus de planta recombinante. Se han publicado varios libros que describen protocolos para la transformación genética de células de plantas Potrykus (1995, "Gene transfer to plants", Springer, Nueva York), Nickoloff (1995, "Plant Cell Electroporation and electrofusion protocols", Humana Press, Totowa, Nueva York) y Draper (1988, "Plant geneti transformation", Oxford Press, Boston).

Actualmente se usan varios métodos para transformar establemente células de planta con material genético recombinante. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, transformación de *Agrobacterium* (Bechtold y Pelletier, 1998; Escudero y Hohn, 1997; Hansen y Chilton, 1999; Touraev *et al.*, 1997), biolística (microproyectiles) (Finer *et al.*, 1999; Hansen y Chilton, 1999; Shilito, 1999), electroporación de protoplastos (Fromm *et al.*, 1985, Ou-Lee *et al.*, 1986; Rhodes *et al.*, 1988; Saunders *et al.*, 1989; Trick *et al.*, 1997), tratamiento con polietilenglicol (Shilito, 1999; Trick *et al.*, 1997), microinyección en la planta (Leduc *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1983), embebimiento en semilla (Trick *et al.*, 1997), rayo láser (1996) y filamentos de carburo de silicio (Thompson *et al.*, 1995; solicitud de patente de EE.UU. nº 20020100077, incorporada como referencia a la presente memoria en su totalidad).

Muchas clases de plantas son susceptibles de transformación y expresión de péptidos exógenos. Las plantas de interés particular para expresar los péptidos para usar en el método de remodelación de la invención incluyen, pero sin limitación, *Arabidopsis thaliana*, colza (*Brassica spp.*; Ruiz y Blumwald, 2002, Planta 214: 965-969), soja (*Glycine max*), girasol (*Helianthus unnuus*), palma aceitera (*Elaeis guineensis*), cacahuete (maní, *Arachis hypogaea*; Deng *et al.*, 2001,

Cell. Res. 11: 156-160), coco (*Cocos nucifera*), ricino (*Ricinus communis*), alazor (*Carthamus tinctorius*), mostaza (*Brassica spp.* y *Sinapis alba*), cilantro (*Coriandrum sativum*), calabaza (*Cucurbita maxima*; Spencer y Snow, 2001, Heredity 86(Pt 6): 694-702), lino (*Linum usitatissimum*; Lamblin *et al.*, 2001, Physiol. Plant 112: 223-232), nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), yoyoba (*Simmondsia chinensis*), maíz (*Zea mays*; Hood *et al.*, 1999, Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127-147; Hood *et al.*, 1997, Mol. Breed. 3: 291-306; Petolino *et al.*, 2000, Transgenic Research 9: 1-9), alfalfa (Khoudi *et al.*, 1999, Biotechnol. Bioeng. 64: 135-143), tabaco (*Nicotiana tabacum*; Wright *et al.*, Transgenic Res. 10: 177-181; Frigerio *et al.*, 2000, Plant Physiol. 123: 1483-1493; Cramer *et al.*, 1996, Ann. New York Acad. Sci. 792: 62-8-71; Cabanes-Macheteau *et al.*, 1999, Glycobiology 9: 365-372; Ruggiero *et al.*, 2000, FEBS Lett. 469: 132-136), canola (Bai *et al.*, 2001, Biotechnol. Prog. 17: 168-174; Zhang *et al.*, 2000, J. Anim. Sci. 78: 2868-2878)), patata (Ticket *et al.*, 1998, J. Infect. Dis. 182: 302-305; Richter *et al.*, 2000, Nat. Biotechnol. 18: 1167-1171; Chong *et al.*, 2000, Transgenic Res. 9: 71-78), alfalfa (Wigdorovitz *et al.*, 1999, Virology 255: 347-353), guisante (*Pisum sativum*; Perrin *et al.*, 2000, Mol. Breed. 6: 345-352), arroz (*Oryza sativa*; Stoger *et al.*, 2000, Plant Mol. Biol. 42: 583-590), algodón (*Gossypium hirsutum*; Kornyejev *et al.*, 2001, Physiol. Plant 113: 323-331), cebada (*Hordeum vulgare*; Petersen *et al.*, 2002, Plant Mol. Biol. 49: 45-58); trigo (*Triticum spp.*; Pellegrineschi *et al.*, 2002, Genome 45: 421-430) y judía (*Vicia spp.*; Saalbach *et al.*, 1994, Mol. Gen. Genet. 242: 226-236).

Si se desea la expresión del ácido nucleico recombinante en una planta entera en lugar de en células cultivadas, se transforman en primer lugar las células de planta con ADN que codifica el péptido, después de lo cual se regenera la planta. Esto implica procedimientos de cultivo de tejido que se optimizan típicamente para cada especie de planta. Los protocolos para regenerar plantas son ya bien conocidos en la materia para muchas especies. Además, pueden desarrollarse protocolos para otras especies por un especialista en la materia usando experimentación rutinaria. Están disponibles numerosos manuales de laboratorio que describen procedimientos para la regeneración de plantas, incluyendo pero sin limitación, Smith (2000, "Plant tissue culture: techniques and experiments", Academic Press, San Diego), Bhojwani y Razdan (1996, "Plant tissue culture: theory and practice", Elsevier Science Pub., Amsterdam), Islam (1996, "Plant tissue culture", Oxford & IBH Pub. Co., New Delhi, India), Dodds y Roberts (1995, "Experiments in plant tissue culture", Nueva York: Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra), Bhojwani ("Plant tissue culture : applications and limitations", Elsevier, Amsterdam, 1990), Trigiano y Gray (2000, "Plant tissue culture concepts and laboratory exercises.", CRC Press, Boca Raton, Fla) y Lindsey (1991, "Plant tissue culture manual: fundamentals and applications", Kluwer Academic, Boston).

Aunque purificar péptidos recombinantes de plantas puede ser potencialmente costoso, se han desarrollado varios sistemas para minimizar estos costes. Un método dirige el péptido sintetizado al endospermio de la semilla del que puede extraerse fácilmente (Wright *et al.*, 2001, Transgenic Res. 10: 177-181, Guda *et al.*, 2000, Plant Cell Res. 19: 257-262 y la patente de EE.UU. n° 5.767.379, que se incorpora como referencia a la presente memoria en su totalidad). Es un enfoque alternativo la coextracción del péptido recombinante con productos vegetales convencionales tales como almidón, harina o aceite. En colza oleaginosa, se une un péptido de fusión de oleosina-hurudina, cuando se expresa en la planta, al cuerpo oleoso de la semilla y puede extraerse de la semilla de planta junto con el aceite (Parmenter, 1995, Plant Mol. Biol. 29: 1167-1180; patentes de EE.UU. n° 5.650.554, 5.792.922, 5.948.682 y 6.288.304 y solicitud de EE.UU. n° 2002/0037303, todas las cuales se incorporan en su totalidad como referencia a la presente memoria). En una variación de este enfoque, se fusiona la oleosina con un péptido que tiene afinidad por el péptido de interés exógeno coexpresado (patente de EE.UU. n° 5.856.452, incorporada como referencia a la presente memoria en su totalidad).

La expresión de péptidos recombinantes en plástidos de planta, tales como cloroplasto, genera péptidos que no tienen estructuras de glicano unidas al mismo, similar a la situación en procariotas. Sin embargo, el rendimiento de dichos péptidos es mucho mayor cuando se expresan en estos orgánulos de célula de planta, y por tanto este tipo de sistema de expresión puede tener ventajas frente a otros sistemas. Para una revisión general de la tecnología de la expresión en plástidos de péptidos exógenos en plantas superiores, véase Hager y Beck (2000, Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 302-310, y las referencias citadas en el mismo). La expresión en plástidos ha sido particularmente exitosa en tabaco (véase, por ejemplo, Staub *et al.*, 2000, Nat. Biotechnol. 18: 333-338).

#### F. Animales transgénicos

La introducción de un ADN recombinante en el cigoto fertilizado de un animal (por ejemplo un mamífero) puede lograrse usando cualquier número de técnicas estándares en la tecnología de animales transgénicos. Véase Hogan *et al.*, "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986 y la patente de EE.UU. n° 5.811.634, que se incorporan como referencia a la presente memoria en su totalidad. Lo más habitualmente, el ADN recombinante se introduce en el embrión a modo de microinyección pronuclear (Gordon *et al.*, 1980, PNAS 77: 7380-7384; Gordon y Ruddle, 1981, Science 214: 1244-1246; Brinster *et al.*, 1981, Cell 27: 223-231; Costantini y Lacy, 1981, Nature 294: 92-94). La microinyección tiene la ventaja de ser aplicable a una amplia variedad de especies. Los embriones preimplantados pueden transformarse también con retrovirus (Jaenisch y Mintz, 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 1250-1254; Jaenisch *et al.*, 1976, Hamatol. Bluttransfus. 19: 341-356; Stuhlmann *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 7151-7155). La transformación mediada por retrovirus tiene la ventaja de añadir copias individuales del ácido nucleico recombinante a la célula, pero produce un alto grado de mosaicismo. Más recientemente, se han usado técnicas mediadas por citoblastos embrionarios (Gossler *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 9065-9069); y se han usado también la transferencia de segmentos cromosómicos enteros (Lavitrano *et al.*, 1989, Cell 57: 717-723) y la transfección de gametos junto con la fertilización *in vitro* (Lavitrano

*et al.*, 1989, *Cell* 57: 717-723). Se han publicado varios libros de procedimientos de laboratorio que dan a conocer estas técnicas: Cid-Arregui y García-Carrancá (1998, *Microinjection and Transgenesis: Strategies and Protocols*, Springer, Berlín), Clarke (2002, *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ) y Pinkert (1994, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press, San Diego).

- 5 Una vez se introduce el ADN recombinante en el cigoto, se incuba el cigoto durante un corto periodo de tiempo y se transforma entonces en un animal pseudoembarazado de la misma especie del que se ha obtenido el cigoto (Hogan *et al.*, supra). En el caso de animales, se inyectan típicamente 125 cigotos por experimento, aproximadamente dos tercios de los cuales sobrevivirán al procedimiento. Se transfieren 20 cigotos viables a un mamífero pseudoembarazado, cuatro de diez de los cuales se desarrollarán hasta progenie viva. Típicamente, un 10-30% de la progenie (en el caso de ratones) porta el ADN recombinante.

Aunque puede usarse el animal entero como sistema de expresión para los péptidos de la invención, en una realización preferida, el péptido exógeno se acumula en productos del animal, de los que puede recogerse sin daño para el animal. En realizaciones preferidas, el péptido exógeno se acumula en leche, huevos, pelo, sangre y orina.

- 15 Si el péptido recombinante se va a acumular en la leche del animal, son mamíferos adecuados los rumiantes, ungulados, mamíferos domesticados y animales lecheros. Se prefieren particularmente cabras, ovejas, camellos, vacas, cerdos, caballos, bueyes y llamas. Los métodos para generar vacas transgénicas que acumulan un péptido recombinante en su leche son bien conocidos: véanse, Newton (1999, *J. Immunol. Methods* 231: 159-167), Ebert *et al.* (1991, *Biotechnology* 9: 835-838) y las patentes de EE.UU. nº 6.210.736, 5.849.992, 5.843.705, 5.827.690, 6.222.094, todos los cuales se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad. La generación de mamíferos transgénicos que producen un péptido recombinante deseado está comercialmente disponible en GTC Biotherapeutics, Framingham, MA.

- 20 Si el péptido recombinante se va a acumular en huevos, las aves adecuadas incluyen, pero sin limitación, pollos, gansos y pavos. Otros animales de interés incluyen, pero sin limitación, otras especies de pájaros, peces, reptiles y anfibios. La introducción de ADN recombinante en un pollo mediante transformación retroviral es bien conocida en la materia: Thoraval *et al.* (1995, *Transgenic Research* 4: 369-376), Bosselman *et al.*, (1989, *Science* 243: 533-535), Petropoulos *et al.* (1992, *J. Virol.* 66: 3391-3397), patente de EE.UU. nº 5.162.215, incorporados como referencia a la presente memoria en su totalidad. Se consiguió también la transformación exitosa de pollos con ADN recombinante, en el que el ADN se introduce en células blastodérmicas y las células blastodérmicas así transfectadas se introducen en el embrión: Brazolot *et al.* (1991, *Mol. Reprod. Dev.* 30: 304-312), Fraser *et al.* (1993, *Int. J. Dev. Biol.* 37: 381-385) y Petite *et al.* (1990, *Development* 108: 185-189). Se ha desarrollado una tecnología de alto rendimiento para evaluar si un pollo transgénico expresa el péptido deseado (Harvey *et al.*, 2002, *Poult. Sci.* 81: 202-212, patente de EE.UU. nº 6.423.488, incorporado como referencia a la presente memoria en su totalidad). Usando la transformación retroviral de pollos con un ADN recombinante, se acumuló  $\beta$ -lactamasa en la clara de huevo del pollo (Harvey *et al.*, 2002, *Nat. Biotechnol.* 20(4): 396-399). La producción de pollos productores de péptidos exógenos en huevo está comercialmente disponible en AviGenics, Inc., Athens GA.

#### G. Bacterias

Los péptidos expresados recombinantemente producidos en bacterias no están generalmente glicosilados. Sin embargo, se han puesto en evidencia sistemas bacterianos capaces de glicosilar péptidos y, por lo tanto, es probable que puedan producirse péptidos recombinantes glicosilados en bacterias en el futuro.

- 40 Son conocidos en la materia numerosos sistemas de expresión bacterianos. Las especies bacterianas preferidas incluyen, pero sin limitación, *E.coli* y especies de *Bacillus*. La expresión de péptidos recombinantes en *E. coli* es bien conocida en la materia. Se encuentran protocolos para sistemas de expresión basados en *E. coli* en la solicitud de EE.UU. nº 20020064835, las patentes de EE.UU. nº 6.245.539, 5.606.031, 5.420.027, 5.151.511 y RE33.653, entre otros. Los métodos para transformar bacterias incluyen, pero sin limitación, cloruro de calcio (Cohen *et al.*, 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2110-2114; Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580; Mandel y Higa, 1970, *J. Mol. Biol.* 53: 159-162) y electroporación (Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751) y aquellos descritos en Sambrook *et al.*, 2001 (supra). Para una revisión de los protocolos de laboratorio sobre transformación y sistemas de expresión microbianos, véanse Saunders y Saunders (1987, *Microbial Genetics Applied to Biotechnology: Principles and Techniques of Gene Transfer and Manipulation*, Croom Helm, Londres), Pühler (1993, *Genetic Engineering of Microorganisms*, Weinheim, Nueva York), Lee *et al.*, (1999, *Metabolic Engineering*, Marcel Dekker, Nueva York), Adolph (1996, *Microbial Genome Methods*, CRC Press, Boca Raton) y Birren y Lai (1996, *Nonmammalian Genomic Analysis : A Practical Guide*, Academic Press, San Diego),

- 50 Para una revisión general sobre la bibliografía de la expresión de péptidos en *E. coli*, véase Balbas (2001, *Mol. Biotechnol.* 19: 251-267). Varias compañías ofrecen ahora estirpes bacterianas seleccionadas para la expresión de péptidos de mamíferos tales como las estirpes Rosetta™ de *E. coli* (Novagen, inc., Madison, WI; con expresión potenciada de codones eucarióticos no usados normalmente en células de bacterias, y formación de enlace disulfuro potenciada).

#### H. Ingeniería genética celular

Resultará evidente a partir de la presente divulgación que cuanto más uniforme sea el material de partida producido por una célula, más eficaz será la generación *in vitro* de grandes cantidades de péptidos que tengan la glicosilación deseada. Por tanto, la ingeniería genética de células hospedadoras para producir péptidos glicosilados uniformemente como material de partida para las reacciones enzimáticas *in vitro* dadas a conocer en la presente memoria proporciona una ventaja significativa frente a usar un material de partida peptídico que tenga un conjunto heterogéneo de estructuras de glicano unidas al mismo. Un material de partida preferido para uso en la presente invención es un péptido que tiene principalmente moléculas de glicano que consisten únicamente en una estructura de núcleo de trimanosilo elemental. Otro material de partida preferido es Man3GlcNAc4. Después del proceso de remodelación, los péptidos preferidos darán lugar a mayor cantidad de péptidos que tengan la glicosilación deseada, y por tanto a una eficacia clínica mejorada. Sin embargo, es también adecuado otro material de partida de glicano para uso en los métodos descritos en la presente memoria en que, por ejemplo, pueden reducirse fácilmente *in vitro* glicanos ricos en manosa hasta estructuras de núcleo de trimanosilo elemental usando una serie de manosidasas. Como se describe en otro lugar en la presente memoria, puede usarse también otro material de partida de glicano, a condición de que sea posible escindir todos los restos de azúcar superfluos de modo que se genere la estructura de núcleo de trimanosilo elemental o Man3GlcNAc4. Por tanto, el fin de usar células modificadas por ingeniería genética para la producción de péptidos de la presente invención es generar péptidos que tengan una estructura de glicano unida a los mismos lo más uniforme posible, en la que la estructura de glicano puede remodelarse *in vitro* generando un péptido que tenga la glicosilación deseada. Esto dará como resultado una reducción drástica de los costes de producción de estos péptidos. Puesto que los glicopéptidos producidos usando esta metodología tendrán predominantemente la misma estructura de glicano N-ligado, el protocolo de modificación postproducción puede estandarizarse y optimizarse para producir una mayor consistencia de lote a lote de producto final. Como resultado, los productos de cadena completada final pueden ser menos heterogéneos que los actualmente disponibles. Los productos tendrán una semivid biológica y bioactividad mejoradas en comparación con los productos de la técnica anterior. Como alternativa, si se desea, la invención puede usarse para introducir una heterogeneidad limitada y específica, por ejemplo, eligiendo las condiciones de reacción que den como resultado una adición diferencial de restos de azúcar.

Preferiblemente, aunque no como requisito firme, la célula modificada por ingeniería genética es aquella que produce péptidos que tienen estructuras de glicano que comprenden principalmente una estructura de núcleo de trimanosilo elemental o Man3GlcNAc4. Como mínimo, la proporción de estas estructuras preferidas producidas por la célula modificada por ingeniería genética debe ser suficiente para proporcionar un péptido que tenga una glicosilación deseada después del protocolo de remodelación.

En general, puede modificarse cualquier tipo de célula eucariótica para convertirse en una célula hospedadora de la presente invención. En primer lugar, se determina el patrón de glicosilación tanto de péptidos endógenos como recombinantes producidos por el organismo para identificar las adiciones/deleciones adecuadas de actividades enzimáticas que dan como resultado la producción de glicopéptidos de núcleo de trimanosilo elemental o glicopéptidos Man3GlcNAc4. Esto conllevará típicamente actividades de deleción que usan glicopéptidos de trimanosilo como sustratos para una reacción de glicosiltransferasa y actividades enzimáticas de inserción que degraden los glicanos N-ligados más complejos produciendo cadenas más cortas. Además, las células modificadas por ingeniería genética pueden producir glicanos ricos en manosa que pueden escindirse por manosidasa, produciendo las estructuras de glicano de partida deseadas. La manosidasa puede ser activa *in vivo* en la célula (concretamente, la célula puede modificarse por ingeniería genética para producirlas) o puede usarse en reacciones de postproducción *in vitro*.

Las técnicas para modificar genéticamente células hospedadoras para alterar el perfil de glicosilación de los péptidos expresados son bien conocidas. Véanse, por ejemplo, Altmann *et al.* (1999, Glycoconjugate J. 16: 109-123), Ailor *et al.* (2000, Glycobiology 10(8): 837-847), Jarvis *et al.*, ("Invitrogen Conference", marzo de 1999, resumen), Hollister y Jarvis, (2001, Glycobiology 11(1): 1-9) y Palacpac *et al.*, (1999, PNAS USA 96: 4697), Jarvis *et al.*, (1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 528-533), Gemgross (publicación de patente de EE.UU. nº 20020137134), todos los cuales dan a conocer técnicas de "mamiferización" de sistemas de expresión de células de insecto o planta mediante la transfección de células de insecto o planta con genes de glicosiltransferasa.

Existen también técnicas para alterar genéticamente el perfil de glicosilación de péptidos expresados en *E. coli*. La *E. coli* se ha modificado por ingeniería genética con diversas glicosiltransferasas de las bacterias *Neisseria meningitidis* y *Azorhizobium* para producir oligosacáridos *in vivo* (Bettler *et al.*, 1999, Glycoconj. J. 16: 205-212). La *E. coli* que se ha modificado por ingeniería genética para sobreexpresar el gen *IgtA* de  $\beta$ 1,3N-acetilglicosaminiltransferasa de *Neisseria meningitidis* glicosilará eficazmente la lactosa exógena (Priem *et al.*, 2002, Glycobiology 12: 235-240).

Se han modificado también por ingeniería genética células fúngicas para producir glicosiltransferasas exógenas (Yoshida *et al.*, 1999, Glycobiology, 9(1): 53-58; Kalsner *et al.*, 1995, Glycoconj. J. 12: 360-370; Schwientek y Ernst, 1994, Gene 145 (2): 299-303; Chiba *et al.*, 1995, Biochem. J. 308: 405-409).

Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una célula que glicosila una población de glicopéptidos de tal modo que una proporción de los glicopéptidos así producidos tiene un núcleo de trimanosilo elemental o una estructura de Man3GlcNAc4. Preferiblemente, la célula produce un péptido que tiene una estructura de glicano que comprende únicamente un núcleo de trimanosilo elemental. Como mínimo, la proporción de péptidos que tienen un núcleo de trimanosilo elemental o una estructura de Man3GlcNAc4 es suficiente para proporcionar péptidos que tengan la glicosilación deseada después del proceso de remodelación. La célula tiene introducidas en la misma una o más

unidades de expresión de ácido nucleico heterólogo, cada una de las cuales puede comprender una o más secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más péptidos de interés. La forma natural del glicopéptido de interés puede comprender uno o más glicanos N-ligados complejos o puede ser simplemente un glicano rico en manosa.

5 La célula puede ser cualquier tipo de célula y es preferiblemente una célula eucariótica. La célula puede ser una célula de mamífero tal como humana, de ratón, rata, conejo, hámster u otro tipo de célula de mamífero. Cuando la célula es una célula de mamífero, la célula de mamífero puede derivar de, o estar contenida, en un mamífero transgénico no humano en que la célula en el mamífero codifica el glicopéptido deseado y una variedad de enzimas glicosilantes y glicosidasas según sea necesario para la producción de las moléculas de glicopéptido deseadas. Además, la célula puede ser una célula fúngica, preferiblemente una célula de levadura, o la célula puede ser una célula de insecto o  
10 célula de planta. De forma similar, cuando la célula es una célula de planta, la célula de planta puede derivar de, o estar contenida en, una planta transgénica, en la que la planta codifica el glicopéptido deseado y una variedad de enzimas glicosilantes y glicosidasas según sea necesario para la producción de las moléculas de glicopéptido deseadas.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora puede ser una célula eucariótica que expresa una o más enzimas glicosiltransferasas heterólogas y/o una o más glicosidasas heterólogas, en la que la expresión de un glicopéptido recombinante en las célula hospedadora da como resultado la producción de un glicopéptido recombinante que tiene un núcleo de trimanosilo elemental como estructura de glicano primaria unida al mismo.  
15

En algunas realizaciones, la enzima glicosiltransferasa heteróloga útil en la célula puede seleccionarse del grupo consistente en cualquier enzima glicosiltransferasa conocida incluida, por ejemplo, en la lista de "Familias de glicosiltransferasas" disponible en Taniguchi *et al.* (2002, "Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes",  
20 Springer, Nueva York).

En otras realizaciones, la enzima glicosilasa heteróloga puede seleccionarse del grupo consistente en manosidasa 1, manosidasa 2, manosidasa 3 y otras manosidasas incluyendo, pero sin limitación, manosidasas microbianas. Se proporciona en otro lugar de la presente memoria una divulgación adicional respecto a las enzimas útiles en la presente invención.

25 En aún otras realizaciones, la célula hospedadora puede ser una célula eucariótica en la que una o más enzimas glicosiltransferasas endógenas y/o una o más enzimas glicosidasas endógenas se han inactivado de tal modo que la expresión de un glicopéptido recombinante en la célula hospedadora dé como resultado la producción de un glicopéptido recombinante que tenga un núcleo de trimanosilo elemental como estructura de glicano primaria unida al mismo.

30 En realizaciones adicionales, la célula hospedadora puede expresar enzimas glicosiltransferasas y/o enzimas glicosidasas heterólogas mientras que al mismo tiempo están inactivadas una o más enzimas glicosiltransferasas y/o enzimas glicosidasas endógenas. Las enzimas glicosiltransferasas y/o enzimas glicosidasas endógenas pueden inactivarse usando cualquier técnica conocida por los especialistas en la materia incluyendo, pero sin limitación, técnicas anticodificantes y técnicas que implican la inserción de ácidos nucleicos en el genoma de la célula hospedadora. En  
35 algunas realizaciones, las enzimas endógenas pueden seleccionarse del grupo consistente en GnT-I, una selección de manosidasas, xilosiltransferasa,  $\alpha$ 1,3-fucosiltransferasa de núcleo, serina/treonina O-manosiltransferasas y similares.

Como alternativa, puede explotarse un sistema de expresión que glicosila naturalmente péptidos de tal modo que los glicanos N-ligados sean predominantemente de tipo núcleo de trimanosilo, o de tipo Man3GlcNAc4. Es un ejemplo de un tipo de célula que produce el núcleo de trimanosilo las células Sf9. Pueden identificarse otros de dichos sistemas de  
40 expresión analizando glicopéptidos que se expresan natural o recombinantemente en células y seleccionando aquellos que exhiban las características de glicosilación deseadas. Debería considerarse que la invención incluye todas y cada una de las células para la producción de péptidos de la presente invención.

#### V. Purificación de péptidos de glicano remodelado y/o glicoconjugados

45 Si la glicoproteína modificada se produce intracelularmente o se secreta, como primera etapa, se elimina el desecho particulado, tanto células hospedadoras como fragmentos lisados, por ejemplo mediante centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, la proteína puede concentrarse con un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, seguido de la separación de la variante peptídica de otras impurezas mediante una o más etapas seleccionadas de cromatografía por inmunoafinidad, fraccionamiento por columna de intercambio iónico (por ejemplo, en dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contengan grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía en Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, lectina de lenteja-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Ether Toyopearl, Butyl Toyopearl, Phenyl Toyopearl, o proteína A-Sepharose, cromatografía por PAGE-SDS, cromatografía en sílice, cromatoenfoque, HPLC en fase inversa (HPLC-FI), filtración por gel usando, por ejemplo, cromatografía de tamiz molecular o exclusión por tamaño Sephadex, cromatografía en columnas que unen selectivamente el péptido y precipitación por etanol, pH o sulfato de amonio, filtración por membrana y diversas técnicas  
50

55 Los péptidos modificados producidos en cultivo se aíslan habitualmente mediante extracción inicial desde células, enzimas, etc., seguido de una o más etapas de concentración, precipitación salina, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión por tamaño. Adicionalmente, la glicoproteína modificada puede modificarse por cromatografía de afinidad. Puede emplearse entonces HPLC para las etapas de purificación finales.

Puede incluirse un inhibidor de proteasa, por ejemplo, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

5 En otra realización, se concentran en primer lugar los sobrenadantes de sistemas que producen el péptido modificado de la invención usando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, puede aplicarse el concentrado a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender un ligando para el péptido, una molécula de lectina o anticuerpo unida a un soporte adecuado. Como alternativa, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos DEAE pendientes. Las matrices  
10 adecuadas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados habitualmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren particularmente los grupos sulfopropilo.

15 Pueden emplearse entonces una o más etapas de HPLC-FI que emplean medios de HPLC-FI hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros alifáticos pendientes, para purificar adicionalmente una composición de variante peptídica. Pueden emplearse también algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una glicoproteína modificada homogénea.

20 El péptido modificado de la invención resultante de una fermentación a gran escala puede purificarse mediante métodos análogos a los dados a conocer por Urdal *et al.*, *J. Chromatog.* 296: 171 (1984). Esta referencia describe dos etapas de HPLC-FI secuenciales para la purificación de IL-2 humana recombinante en una columna de HPLC preparativa. Como alternativa, pueden utilizarse técnicas tales como cromatografía de afinidad para purificar la glicoproteína modificada.

#### VI. Péptidos preferidos y ácidos nucleicos que codifican los péptidos preferidos

25 La presente invención incluye ácidos nucleicos que codifican diversos péptidos y proteínas, y moléculas similares o fragmentos de las mismas. No debería considerarse que la invención esté limitada en modo alguno únicamente al uso de estos péptidos en los métodos de la invención, sino en lugar de ello debería considerarse que incluye todos y cada uno de los péptidos disponibles actualmente o que se harán disponibles para los especialistas en la materia. Además, no debería considerarse que la invención incluye solo un ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico particular de los péptidos enumerados en la presente memoria, sino que en lugar de ello debería considerarse que incluye todas y cada una de las variantes, homólogos, mutantes, etc. de cada uno de los péptidos. Debería observarse que, cuando se  
30 identifica un péptido particular que tiene una mutación u otra alteración en la secuencia de ese péptido, se fija la numeración de los aminoácidos que identifican la alteración o mutación de modo que el primer aminoácido de la secuencia peptídica madura sea el aminoácido nº 1, a menos que se indique otra cosa en la presente memoria.

35 Los péptidos preferidos incluyen, pero sin limitación, factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF), interferón alfa humano (IFN- $\alpha$ ), interferón beta humano (IFN- $\beta$ ), factor VII humano (factor VII), factor IX humano (factor IX), hormona estimulante de folículo humano (FSH), eritropoyetina humana (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos humanos (GM-CSF), interferón gamma humano (IFN- $\gamma$ ), inhibidor de  $\alpha$ 1-proteasa humana (también conocido como  $\alpha$ 1-antitripsina o inhibidor de  $\alpha$ 1-tripsina; A-1-PI), glucocerebrosidasa, activador de tipo de tejido humano (TPA), interleucina 2 humana (IL-2), factor VIII humano (factor VIII), un receptor de factor de necrosis tumoral de 75 kDa fusionado con una porción Fc de inmunoglobulina IgG humana, comercialmente conocido como ENBREL™ o ETANERCEPT™ (TNFR quimérico), urocinasa humana (urocinasa), un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal quimérico humano/de ratón que se une específicamente a glicoproteína IIb/IIIa y el receptor  $\alpha$ v $\beta$ 3 de vitronectina, comercialmente conocido como REOPRO™ o ABCIXIMAB (anticuerpo antiglicoproteína IIb/IIIa quimérica), un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón/humano que se une específicamente a HER2 humano, conocido comercialmente como HERCEPTIN™ (anticuerpo anti-HER2 quimérico), un anticuerpo quimérico humano/de ratón que se une específicamente al sitio antigénico A o a la proteína F del virus respiratorio sincitial comercialmente conocido como SYNAGIS™ o PALIVIZUMAB (anticuerpo quimérico anti-RSV), un anticuerpo monoclonal quimérico humano/de ratón que se une específicamente a CD20 en linfocitos B humanos, conocido comercialmente como RITUXAN™ o RITUXAMAB (anticuerpo quimérico anti-CD20), ADNasa recombinante humana (ADNasa), un anticuerpo monoclonal quimérico humano/de ratón que se une específicamente a factor de necrosis tumoral humano, conocido comercialmente como REMICADE™ o INFLIXIMAB (anticuerpo quimérico anti-TNF), insulina humana, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (subtipo adw; HBsAg) y hormona de crecimiento humana (HGH),  $\alpha$ -galactosidasa A (Fabryzyme™),  $\alpha$ -iduronidasa (Aldurazyme™), antitrombina (antitrombina III, AT-III), gonadotropia coriónica humana (hCG), interferón omega y similares.

55 Debería considerarse que el ácido nucleico aislado de la invención incluye una secuencia de ARN o ADN que codifica cualquiera de los péptidos anteriormente identificados de la invención, y cualquier forma modificada de los mismos, incluyendo modificaciones químicas del ADN o ARN que vuelven a la secuencia nucleotídica más estable cuando está exenta de células o cuando está asociada con una célula. Como ejemplo no limitante, los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son conocidos por conferir al oligonucleótido una resistencia potenciada a nucleasas. Los ejemplos específicos de oligonucleótidos modificados incluyen aquellos que contienen  
60 fosforotioato, fosfotriéster, fosfonato de metilo, ligamientos interazúcar de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o

ligamietors interazúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta (“cadena principal”). Además, pueden usarse también oligonucleótidos que tienen estructuras de cadena principal de morfolino (patente de EE.UU. nº 5.034.506) o estructuras de cadena principal de poliamida (Nielsen *et al.*, 1991, *Science* 254: 1497).

5 Pueden usarse también modificaciones químicas de nucleótidos para potenciar la eficacia con la que se incorpora una secuencia nucleotídica por una célula o la eficacia con que se expresa en una célula. Se contemplan todas y cada una de las combinaciones o modificaciones de secuencias nucleotídicas en la presente invención.

10 No debería considerarse que la presente invención esté limitada únicamente a las secuencias de ácido nucleico y aminoácidas dadas a conocer en la presente memoria. Como se describe con más detalle en otro lugar de la presente memoria, una vez provisto de la presente invención, resulta fácilmente evidente para un especialista en la materia que pueden obtenerse otros ácidos nucleicos que codifican péptidos de la presente invención siguiendo los procedimientos descritos en la presente memoria (por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio, mutaciones de desplazamiento de marco y similares), y procedimientos que son bien conocidos en la materia.

15 Se incluyen también ácidos nucleicos aislados que codifican fragmentos de péptidos, en los que los fragmentos de péptidos retienen la actividad biológica deseada del péptido. Además, aunque se dan a conocer en la presente memoria ácidos nucleicos ejemplares que codifican péptidos preferidos con relación a SEQ ID NOS específicas, no debería considerarse en modo alguno que la invención esté limitada a ningún ácido nucleico específico dado a conocer en la presente memoria. En lugar de ello, debería considerarse que la invención incluye todas y cada una de las moléculas de ácido nucleico que tienen una identidad porcentual suficiente con las secuencias dadas a conocer en la presente memoria de tal modo que estos ácidos nucleicos codifiquen también un péptido que tenga la actividad biológica deseada dada a conocer en la presente memoria. Se contemplan también ácidos nucleicos aislados que son más cortos que los ácidos nucleicos completos, en los que se retiene la actividad biológica del péptido así codificado por los mismos. Se dan a conocer en otro lugar de la presente memoria los métodos para determinar la identidad porcentual entre un ácido nucleico y otro, así como los ensayos para la determinación de la actividad biológica de cualquier péptido preferido específico.

25 También, como se da a conocer en otro lugar de la presente memoria, puede usarse cualquier otra serie de procedimientos para la generación de derivados, mutantes o formas variantes de los péptidos de la presente invención usando metodología de ADN recombinante bien conocida en la materia tal como, por ejemplo, la descrita en Sambrook *et al.* (1989, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y Ausubel *et al.* (1997, “Current Protocols in Molecular Biology”, Green & Wiley, Nueva York). Los procedimientos para la introducción de cambios aminoácidos en un péptido o polipéptido mediante la alteración de la secuencia de ADN que codifica el péptido son bien conocidos en la materia y se describen también en Sambrook *et al.* (1989, *supra*); Ausubel *et al.* (1997, *supra*).

35 Se da a conocer también en la presente memoria un ácido nucleico que codifica G-CSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , factor VII, factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , A-1-PI, glucocerebrosidasa, TPA, IL-2, factor VIII, TNFR quimérico, urocinasa, anticuerpo antiglicoproteína IIb/IIIa quimérico, anticuerpo anti-HER2 quimérico, anticuerpo anti-RSV quimérico, anticuerpo anti-CD20 quimérico, ADNasa, anticuerpo anti-TNF quimérico, insulina humana, HBsAg y HGH, en el que un ácido nucleico que codifica un péptido de marcaje está unido covalentemente con el mismo. Es decir, la invención comprende un ácido nucleico quimérico en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de marcaje está ligada covalentemente con el ácido nucleico que codifica un péptido de la presente invención. Dichos péptidos de marcaje son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), myc, myc-piruvato cinasa (myc-PK), His6, proteína de unión a maltosa (MBP), un polipéptido de marcaje de hemaglutinina del virus de la gripe, un polipéptido de marcaje flag (FLAG) y un polipéptido de marcaje de glutation-S-transferasa (GST). Sin embargo, no debería considerarse en modo alguno que la invención esté limitada a los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de marcaje anteriormente enumerados. En lugar de ello, debería considerarse que cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique un péptido que pueda funcionar de manera sustancialmente similar a estos péptidos de marcaje está incluida en la presente invención.

50 El ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido de marcaje puede usarse para localizar un péptido de la presente invención en una célula, tejido y/u organismo completo (por ejemplo, un embrión de mamífero), detectar un péptido de la presente invención secretado desde una célula y para estudiar el(los) papel(es) del péptido en una célula. Además, la adición de un péptido de marcaje facilita el aislamiento y purificación del péptido “marcado” de tal modo que los péptidos de la invención pueden producirse y purificarse fácilmente.

55 La invención incluye los siguientes péptidos aislados preferidos: G-CSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , factor VIII, factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , A-1-PI, glucocerebrosidasa, TPA, IL-2, factor VIII, TNFR quimérico, urocinasa, anticuerpo antiglicoproteína IIb/IIIa quimérico, anticuerpo anti-HER2 quimérico, anticuerpo anti-RSV quimérico, anticuerpo anti-CD20 quimérico, ADNasa, anticuerpo anti-TNF quimérico, insulina humana, HBsAg, HGH,  $\alpha$ -galactosidasa A,  $\alpha$ -iduronidasa, antitrombina III, hCG e interferón  $\omega$  y similares.

Debería considerarse también que la presente invención comprende “derivados”, “mutantes” y “variantes” de los péptidos de la invención (o del ADN que codifica los mismos), siendo dichos derivados, mutantes y variantes péptidos que están alterados en uno o más aminoácidos (o, cuando se designa la secuencia nucleotídica que codifica los

mismos, están alterados en uno o más pares de bases) de tal modo que el péptido (o ADN) resultante no sea idéntico a las secuencias indicadas en la presente memoria, pero que tenga la misma propiedad biológica que los péptidos dados a conocer en la presente memoria, en que el péptido tiene las propiedades biológicas/bioquímicas de G-CSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , factor VII, factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , A-1-PI, glucocerebrosidasa, TPA, IL-2, factor VIII, TNFR quimérico, urocinasa, anticuerpo anti-glicoproteína IIb/IIIa quimérico, anticuerpo anti-HER2 quimérico, anticuerpo anti-RSV quimérico, anticuerpo anti-CD20 quimérico, ADNasa, anticuerpo anti-TNF quimérico, insulina humana, HBsAg y HGH.

Se incluyen además fragmentos de péptidos que retienen la actividad biológica deseada del péptido independientemente de la longitud del péptido. Está dentro de las habilidades del especialista aislar formas menores que las completas de cualquiera de los péptidos útiles en la invención y determinar, usando los ensayos proporcionados en la presente memoria, cuáles fragmentos aislados retienen una actividad biológica deseada y son por lo tanto péptidos útiles en la invención.

Debería considerarse que una propiedad biológica de una proteína de la presente invención incluye, pero sin limitación, la capacidad del péptido de funcionar en el ensayo biológico y los entornos descritos en la presente memoria, tales como reducción de la inflamación, desencadenamiento de una respuesta inmunitaria, coagulación sanguínea, rendimiento hematopoyético aumentado, inhibición de proteasa, modulación del sistema inmunitario, unión a antígeno, crecimiento, alivio del tratamiento de una enfermedad, escisión de ADN y similares.

#### A. G-CSF

La presente invención comprende un método para la modificación de la estructura de glicano de G-CSF. El G-CSF es bien conocido en la materia como una citocina producida por linfocitos T activados, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos estromales. El G-CSF actúa principalmente sobre la médula ósea aumentando la producción de leucocitos inflamatorios y funciona adicionalmente como hormona endocrina para iniciar la reposición de los neutrófilos consumidos durante las funciones inflamatorias. El G-CSF tiene también aplicaciones clínicas en el reemplazo de médula ósea después de quimioterapia.

Puede administrarse un péptido G-CSF remodelado a un paciente seleccionado del grupo consistente en un paciente de cáncer no mieloide que recibe quimioterapia mielosupresiva, un paciente que tiene leucemia mieloide aguda (AML) que recibe quimioterapia de inducción o consolidación, un paciente de cáncer no mieloide que recibe un trasplante de médula ósea, un paciente que experimenta la recogida de células progenitoras de sangre periférica, un paciente que tiene una neutropenia crónica grave y un paciente que tiene neutropenia persistente y también que tiene una infección por VIH avanzada. Preferiblemente, el paciente es un paciente humano.

Aunque se ha mostrado que el G-CSF es un compuesto importante y útil para aplicaciones terapéuticas en mamíferos, especialmente seres humanos, los métodos actuales para la producción de G-CSF a partir de células recombinantes dan como resultado un producto que tiene una vida biológica relativamente corta y un patrón de glicosilación inexacto que podría conducir potencialmente a inmunogenicidad, pérdida de función y una necesidad aumentada de dosis tanto mayores como más frecuentes para alcanzar el mismo efecto, y similares.

Se ha aislado y clonado G-CSF, cuyas secuencias de ácido nucleico y aminoácida se presentan como las SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente (Figura 58A y 58B, respectivamente). La presente invención comprende un método para la modificación de G-CSF, particularmente en lo que se refiere a la capacidad del G-CSF de funcionar como una molécula biológica potente y funcional. El especialista en la materia, equipado con la presente divulgación y las enseñanzas de la presente memoria, entenderá fácilmente que la presente invención proporciona composiciones y métodos para la modificación de G-CSF.

La presente invención comprende además variantes de G-CSF, como son bien conocidas en la materia. Como ejemplo, pero sin pretender limitar en modo alguno la presente invención, se ha descrito una variante de G-CSF en la patente de EE.UU. n° 6.166.183, en la que se describe un G-CSF que comprende el complemento natural de residuos de lisina y está ligado además con una o dos moléculas de polietilenglicol. Adicionalmente, las patentes de EE.UU. n° 6.004.548, 5.580.755, 5.582.823 y 5.676.941 describen una variante de G-CSF en que se reemplazan uno o más de los residuos de cisteína en las posiciones 17, 36, 42, 64 y 74 por alanina o, como alternativa, por serina. La patente de EE.UU. n° 5.416.195 describe una molécula de G-CSF en que la cisteína en posición 17, el ácido aspártico en posición 27 y las serinas en posiciones 65 y 66 están sustituidas por serina, serina, prolina y prolina, respectivamente. Son bien conocidas en la materia otras variantes y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.399.345.

La expresión y actividad de una molécula de G-CSF modificada de la presente invención pueden ensayarse usando métodos bien conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.810.643. Como ejemplo, la actividad puede medirse usando ensayos de captación de timidina radiomarcada. Brevemente, se somete médula ósea humana de donantes sanos a un corte de densidad con Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml, Pharmacia, Piscataway, NJ) y se suspenden las células de baja densidad en medio de Iscove (GIBCO, La Jolla, CA) que contiene un 10% de suero fetal bovino, glutamina y antibióticos. Se incuban aproximadamente  $2 \times 10^4$  células de médula ósea humana con medio de control o el G-CSF de la presente invención en placas de fondo plano de 96 pocillos aproximadamente a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en aire durante aproximadamente 2 días. Se someten entonces los cultivos a



pulsos durante aproximadamente 4 horas con 0,5  $\mu\text{Ci}$ /pocillo de  $^3\text{H}$ -timidina (New England Nuclear, Boston, Mass.) y se mide la captación como se describe, por ejemplo, en Ventua *et al.* (1983, Blood 61: 781). Un aumento de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina a las células de médula ósea humana en comparación con las células de médula ósea tratadas con un compuesto de control es una indicación de un compuesto de G-CSF activo y viable.

## 5 VII. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un polímero hidrosoluble de origen no natural, un resto terapéutico o biomolécula y un péptido glicosilado o no glicosilado. Se conjuga el polímero, resto terapéutico o biomolécula con el péptido mediante un grupo ligante de glicosilo intacto intercalado entre, y ligado covalentemente con ambos de, péptido y polímero, resto terapéutico o biomolécula.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos. Las formulaciones adecuadas para uso en la presente invención se encuentran en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mace Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos de suministro de fármacos, véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier manera de administración apropiada, incluyendo por ejemplo administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el portador comprende preferiblemente agua, disolución salina, alcohol, una grasa, cera o tampón. Para administración oral, puede emplearse cualquiera de los portadores anteriores o un portador sólido tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. Pueden emplearse también microesferas biodegradables (por ejemplo, polilactato, poliglicolato) como portadores de las composiciones farmacéuticas de esta invención. Se dan a conocer microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 4.897.268 y 5.075.109.

Habitualmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, intravenosa. Por tanto, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden el compuesto disuelto o suspendido en un portador aceptable, preferiblemente un portador acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, disolución salina, PBS y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden esterilizarse por filtración. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para uso como tales o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones estará típicamente entre 3 y 11, más preferiblemente entre 5 y 9, y lo más preferiblemente entre 7 y 8.

En algunas realizaciones, los péptidos de la invención pueden incorporarse a liposomas formados a partir de lípidos formadores de vesícula estándares. Están disponibles una variedad de métodos para preparar liposomas como se describen, por ejemplo, en Szoka *et al.*, Arm. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), patentes de EE.UU. nº 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028. La orientación de liposomas usando una variedad de agentes orientadores (por ejemplo, las sialilgalactosidas de la invención) es bien conocida en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.957.773 y 4.603.044).

Pueden usarse métodos estándares para acoplar agentes orientadores a liposomas. Estos métodos implican generalmente la incorporación a liposomas de componentes lipídicos, tales como fosfatidiletanolamina, que pueden activarse para la unión de agentes orientadores, o compuestos lipófilos derivatizados, tales como los péptidos derivatizados con lípido de la invención.

Los mecanismos de orientación requieren generalmente que los agentes orientadores se coloquen sobre la superficie del liposoma de tal manera que los restos orientadores estén disponibles para interacción con la diana, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Los carbohidratos de la invención pueden unirse a una molécula de lípido antes de formar el liposoma usando métodos conocidos por los especialistas en la materia (por ejemplo, alquilación o acilación de un grupo hidroxilo presente en el carbohidrato con un haluro de alquilo de cadena larga o con un ácido graso, respectivamente). Como alternativa, el liposoma puede crearse de tal modo que se incorpore en primer lugar una porción conectora a la membrana en el momento de formación de la membrana. La porción conectora debe tener una porción lipófila, que se embembe firmemente y se ancla en la membrana. Debe tener también una porción reactiva que esté químicamente disponible sobre la superficie acuosa del liposoma. La porción reactiva se selecciona de modo que sea químicamente adecuada para formar un enlace químico estable con el agente orientador o carbohidrato, que se añade después. En algunos casos, es posible unir el agente orientador a la molécula conectora directamente, pero en la mayoría de casos es más adecuado usar una tercera molécula para actuar como puente químico, ligando por tanto la molécula conectora que está en la membrana con el agente orientador o carbohidrato que está extendido tridimensionalmente fuera de la superficie de la vesícula. Los intervalos de dosificación para la administración de péptidos de la invención son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado en que los síntomas de la respuesta inmunitaria muestren cierto grado de supresión. La dosificación no debería ser tan alta como para causar

efectos secundarios adversos. Generalmente, la dosificación variará con la edad, condición, sexo y extensión de la enfermedad en el animal y puede determinarse por un especialista en la materia. La dosificación puede ajustarse por el facultativo individual en el caso de cualquier contraindicación.

5 Pueden emplearse métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción. Pueden conseguirse preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para conjugar, complejar o adsorber el péptido. El suministro controlado puede ejercerse seleccionando las macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, poliaminocarboximetilcelulosa y sulfato de protamina) y la concentración de macromoléculas, así como los métodos de incorporación para controlar la liberación. Es otro posible método para controlar la duración de la acción por preparaciones de liberación controlada, incorporar el péptido a partículas de un material polimérico tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli(ácido láctico) o copolímeros de etileno-acetato de vinilo.

10 Para proteger a los péptidos de la unión con proteínas plasmáticas, se prefiere atrapar los péptidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfásica, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, o en sistemas de suministro de fármaco coloidales, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas o en macroemulsiones. Se dan a conocer dichas enseñanzas en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (16° Ed., A. Oslo, ed., Mack, Easton, Pa., 1980).

15 Los péptidos de la invención son bien adecuados para uso en sistemas de suministro de fármaco orientables tales como polímeros sintéticos o naturales en forma de complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas o perlas, y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, liposomas y eritrocitos resellados. Estos sistemas son conocidos colectivamente como sistemas de suministro de fármaco coloidales. Típicamente, dichas partículas coloidales que contienen péptidos dispersados son de aproximadamente 50 nm-2 µm de diámetro. El tamaño de las partículas coloidales las permite administrarse por vía intravenosa tal como por inyección, o en aerosol. Los materiales usados en la preparación de sistemas coloidales son típicamente esterilizables por esterilización por filtrado, no tóxicos y biodegradables, por ejemplo, albúmina, etilcelulosa, caseína, gelatina, lecitina, fosfolípidos y aceite de soja. Se preparan sistemas coloidales poliméricos mediante un proceso similar a la coacervación de una microencapsulación.

20 Se dan a conocer también péptidos que son componentes de un liposoma, usados como sistema de suministro orientado. Cuando se dispersan suavemente fosfolípidos en medios acuosos, se hinchan, se hidratan y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares con capas de medios acuosos separando la bicapa lipídica. Dichos sistemas se designan habitualmente como liposomas multilamelares o vesículas multilamelares (MLV) y tienen diámetros en el intervalo de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 4 µm. Cuando se sonicen las MLV, se forman vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nm, que contienen una disolución acuosa en el núcleo de la SUV.

25 Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. Se prefieren particularmente los diacilfosfatidilgliceroles, en que el resto lipídico contiene 14-18 átomos de carbono, particularmente 16-18 átomos de carbono, y están saturados. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina.

30 En la preparación de liposomas que contienen los péptidos de la invención, deberían considerarse variables tales como la eficacia de la encapsulación del péptido, labilidad del péptido, homogeneidad y tamaño de la población resultante de liposomas, relación de péptido a lípido, permeabilidad, inestabilidad de la preparación y aceptabilidad farmacéutica de la formulación. Szoka, *et al.*, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 9: 467 (1980); Deamer *et al.*, en "LIPOSOMES", Marcel Dekker, Nueva York, 1983, 27: Hope *et al.*, *Chem. Phys. Lipids*, 40: 89 (1986)).

35 El sistema de suministro orientado que contiene los péptidos de la invención puede administrarse de una variedad de modos a un hospedador, particularmente un hospedador mamífero, tal como por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intravascular, tópica, intracavitaria, transdérmica, intranasal y por inhalación. La concentración de los péptidos variará según la aplicación particular, la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración o similares. El sistema de suministro orientado-péptido encapsulado puede proporcionarse en una formulación que comprende otros compuestos según sea apropiado y un medio acuoso fisiológicamente aceptable, por ejemplo, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato o similares.

40 Los compuestos preparados mediante los métodos de la invención pueden encontrar uso también como reactivos de diagnóstico. Por ejemplo, pueden usarse compuestos marcados para localizar zonas de inflamación o metástasis tumoral en un paciente sospechoso de tener una inflamación. Para este uso, los compuestos pueden marcarse con <sup>125</sup>I, <sup>14</sup>C o tritio.

## 55 EJEMPLOS EXPERIMENTALES

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan con fines de ilustración solo y no debería considerarse en modo alguno que la invención esté limitada a estos ejemplos, sino que en

lugar de ello debería considerarse que comprende todas y cada una de las variaciones que se harán evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria.

Se describen ahora los materiales y métodos usados en los experimentos presentados en este ejemplo.

#### A. Procedimientos generales

##### 5 1. Preparación de CMP-SA-PEG

Este ejemplo expone la preparación de CMP-SA-PEG.

**Preparación de 2-(benciloxicarboxamido)glicilamido-2-desoxi-D-manopiranososa.** Se añadió éster de N-benciloxicarbonilglicil-N-hidroxisuccinimida (3,125 g, 10,2 mmol) a una disolución que contenía HCl de D-manosamina (2 g, 9,3 mmol) y trietilamina (1,42 ml, 10,2 mmol) disueltos en MeOH (10 ml) y H<sub>2</sub>O (6 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas y se concentró usando rotavapor. La cromatografía (sílice, 10% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) proporcionó 1,71 g (50% de rendimiento) de producto en forma de un sólido blanco: R<sub>f</sub>= 0,62 (sílice; CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 6/4/1); RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) δ 3,24-3,27 (m, 2H), 3,44 (t, 1H), 3,55 (t, 1H), 3,63-3,66 (m, 1H), 3,76-3,90 (m, 6H), 3,91 (s, 2H), 4,0 (dd, 2H), 4,28 (d, 1H, J= 4,4), 4,41 (d, 1H, J= 3,2), 5,03 (s, 1H), 5,10 (m, 3H), 7,29-7,38 (m, 10H).

**Preparación de 5-(N-benciloxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato.** Se disolvió 2-(N-benciloxicarboxamido)glicilamido-2-desoxi-D-manopiranososa (1,59 g, 4,3 mmol) en una disolución de HEPES 0,1 M (12 ml, pH 7,5) y piruvato de sodio (4,73 g, 43 mmol). Se añadió ácido neuramínico aldolasa (540 U de enzima en 45 ml de una disolución tamponada con fosfato 10 mM que contiene NaCl 0,1 M a pH 6,9) y se calentó la mezcla de reacción a 37°C durante 24 h. Se centrifugó entonces la mezcla de reacción y se sometió a cromatografía el sobrenadante (sílice C18, gradiente de H<sub>2</sub>O (100%) a 30% de MeOH/agua). Se combinaron las fracciones apropiadas, se concentraron y se sometió a cromatografía el residuo (sílice, gradiente de 10% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 6/4/1). Se recogieron las fracciones apropiadas, se concentraron y se resuspendió el residuo en agua. Después de liofilizar, se obtuvo el producto (1,67 g, 87% de rendimiento) en forma de un sólido blanco: R<sub>f</sub>= 0,26 (sílice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 6/4/1); RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) δ 1,82 (t, 1H), 2,20 (m, 1H), 3,49 (d, 1H), 3,59 (dd, 1H), 3,67-3,86 (m, 2H), 3,87 (s, 2H), 8,89-4,05 (m, 3H), 5,16 (s, 2H), 7,45 (m, 5R).

**Preparación de 5-glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato.** Se disolvió 5-(N-benciloxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (1,66 g, 3,6 mmol) en 20 ml de agua/metanol al 50%. Se sometió a vacío repetidamente el matraz, se dispuso en atmósfera de argón y entonces se añadió Pd/C al 10% (0,225 g). Después de someter repetidamente a vacío, se añadió entonces hidrógeno (aprox. 101 kPa) al matraz y se agitó la mezcla de reacción durante 18 h. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite, se concentró por rotavapor y se liofilizó, proporcionando 1,24 g (100% de rendimiento) de producto en forma de un sólido blanco: R<sub>f</sub>= 0,25 (sílice, IPA/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH 7/2/1); RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) δ 1,83 (t, 1H, J= 9,9), 2,23 (dd, 1H, J= 12,9, 4,69), 3,51-3,70 (m, 2H), 3,61 (s, 2H), 3,75-3,84 (m, 2H), 3,95-4,06 (m, 3H).

**Preparación de 5'-monofosforil-[5-(N-fluorenilmetoxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina].** Se añadió una disolución que contenía 5-glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (0,55 g, 1,70 mmol) disuelto en 20 ml de H<sub>2</sub>O a una disolución de Tris (1,38 g, 11,4 mmol), MgCl<sub>2</sub> 1 M (1,1 ml) y BSA (55 mg). Se ajustó el pH de la disolución a 8,8 con NaOH 1 M (2 ml) y se añadió CTP-2Na<sup>+</sup> (2,23 g, 4,2 mmol). Se controló el pH de la mezcla de reacción con un controlador del pH que suministraba NaOH 1 M según fuera necesario para mantener el pH a 8,8. Se añadió la proteína de fusión (sialiltransferasa/CMP-ácido neuramínico sintetasa) a la disolución y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Después de 2 días, se añadió una cantidad adicional de proteína de fusión y se agitó la reacción durante 40 horas adicionales. Se precipitó la mezcla de reacción con EtOH y se lavó el precipitado 5 veces con EtOH frío, proporcionando 2,3 g de un sólido blanco. Se disolvió aproximadamente 1,0 g del producto bruto en 1,4-dioxano (4 ml), H<sub>2</sub>O (4 ml) y NaHCO<sub>3</sub> saturado (3 ml) y se añadió gota a gota una disolución de Fmoc-Cl (308 mg, 1,2 mmol) disuelto en 2 ml de dioxano. Después de agitar durante 16 h a temperatura ambiente, se concentró la mezcla de reacción aproximadamente a 6 ml por rotavapor y se purificó usando cromatografía (sílice C18, gradiente de 100% de H<sub>2</sub>O a 30% de MeOH/H<sub>2</sub>O). Se combinaron las fracciones apropiadas y se concentraron. Se disolvió el residuo en agua y se liofilizó, proporcionando 253 mg de un sólido blanco: R<sub>f</sub>= 0,50 (sílice, IPA/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH 7/2/1); RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) δ 1,64 (dt, 1H, J= 12,0, 6,0), 2,50 (dd, 1H, J= 13,2, 4,9), 3,38 (d, J= 9,67, 1H), 3,60 (dd, J= 11,65, 6,64, 1H), 3,79 (d, J= 4,11, 1H), 3,87 (dd, J= 12,24, 1,0, 1H), 3,97 (m, 2H), 4,07 (td, J= 10,75, 4,84, 1H), 4,17 (dd, J= 10,68, 1,0, 1H), 4,25 (s, 2H), 4,32 (t, J= 4,4, 1H), 4,37 (t, J= 5,8, 1H), 4,6-4,7 (m, oscurecido por el pico de disolvente), 5,95 (d, J= 4, 1H), 6,03 (d, J= 7,4, 1H), 7,43-7,53 (m, 3H), 7,74 (m, 2H), 7,94 (c, J= 7, 3H). EM (ES); calc. para C<sub>35</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>18</sub>P ([M-H]<sup>-</sup>), 851,7; encontrado 850,0.

**Preparación de 5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina).** Se añadió diisopropilamina (83 μl, 0,587 μmol) a una disolución de 5'-monofosforil-[5-(N-fluorenilmetoxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina] (100 mg, 0,117 mmol) disuelto en agua (3 ml) y metanol (1 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 16 h a temperatura ambiente y se eliminó el metanol de reacción de la mezcla de reacción por rotavapor. Se filtró la mezcla de reacción bruta a través de una columna de gel de sílice C18 usando agua, se recogió el efluente y se liofilizó, proporcionando (87

mg, 100%) de producto en forma de un sólido blanco: Rf= 0,21 (sílice, IPA/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH 7/2/1); RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H, J= 5,3), 2,50 (dd, 1H, J= 13,2, 4,6), 3,43 (d, J= 9,58, 1H), 3,63 (dd, J= 11,9, 6,44, 1H), 3,88 (dd, J= 11,8, 1,0, 1H), 3,95 (td, J= 9,0, 2,3, 1H), 4,10 (t, J= 10,42, 1H), 4,12 (td, J= 10,34, 4,66, 1H), 4,18 (d, J= 10,36, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,31 (t, J= 4,64, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J= 4,37, 1H), 6,13 (d, J= 7,71, 1H), 7,98 (d, J= 7,64, 1H). EM (ES); calc. para C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>P ([M-H]<sup>-</sup>), 629,47; encontrado 627,9.

**Preparación de 5'-monofosforil-[5-(N-metoxipolioxietilen-(1 kDa)-3-oxipropionamido)-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina].** Se añadió hexafluorofosfato de benciltriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP, 21 mg, 48 μmol) a una disolución de ácido metoxipolioxietilen(1 kDa de peso molecular medio)-3-oxipropiónico (48 mg, 48 μmol) disuelto en DMF anhidra (700 μL) y trietilamina (13 μL, 95 μmol). Después de 30 min, se añadió una disolución que contenía 5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina) (30 mg, 48 μmol), agua (400 μL) y trietilamina (13 μL, 95 μmol). Se agitó esta disolución durante 20 min a temperatura ambiente y se sometió entonces a cromatografía (sílice C18, gradiente de metanol/agua). Se recogieron las fracciones apropiadas, se concentraron, se disolvió el residuo en agua y se liofilizó, proporcionando 40 mg (50% de rendimiento) de un sólido blanco: Rf= 0,36 (sílice, IPA/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH 7/2/1); RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H, J= 5,3), 2,50 (dd, 1H, J= 13,2, 4,6), 2,64 (t, J= 5,99, 3H), 3,43 (d, J= 9,58, 1H), 3,63 (m, 1H), 3,71 (s, 70H), 3,79 (m, oscurecido por el pico de 3,71), 3,82 (t, J= 6,19, 1H), 3,88 (dd, J= 11,8, 1,0, 1H), 3,95 (td, J= 9,0, 2,3, 1H), 3,98 (t, J= 5,06, 1H), 4,12 (td, J= 10,34, 4,66, 1H), 4,18 (d, J= 10,36, 1H), 4,23 (d, J= 4,85, 2H), 4,31 (t, J= 4,64, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J= 4,55, 1H), 6,13 (d, J= 7,56, 1H), 7,98 (d, J= 7,54, 1H). EM (MALDI), [M-H]<sup>-</sup> observado; 1594,5, 1638,5, 1682,4, 1726,4, 1770,3, 1814,4, 1858,2, 1881,5, 1903,5, 1947,3.

**Preparación de 5'-monofosforil-[5-(N-metoxipolioxietilen-(10 kDa)-oxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina].** Se añadieron 5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina) (2,5 mg, 4 μmol) y agua (180 μL) a una disolución de éster de (metoxipolioxietilen-(10 kDa, peso molecular medio)-oxicarbonil-(N-oxibenzotriazol) (40 mg, 4 μmol) en DMF anhidra (800 μL) que contenía trietilamina (1,1 μL, 8 μmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 1 h a temperatura ambiente. Se diluyó entonces la mezcla de reacción con agua (8 ml) y se purificó por cromatografía ultrarrápida en fase inversa (sílice C18, gradiente de metanol/agua). Se combinaron las fracciones apropiadas, se concentraron, se disolvió el residuo en agua y se liofilizó, proporcionando 20 mg (46% de rendimiento) del producto en forma de un sólido blanco: Rf= 0,35 (sílice, IPA/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH 7/2/1); RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H), 2,50 (dd, 1H), 2,64 (t, 3H), 3,55-3,7 (m, oscurecido por el pico de 3,71), 3,71 (s, 488H), 3,72-4,0 (m, oscurecido por el pico de 3,71), 4,23 (m, 3H), 4,31 (t, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J= 4,77, 1H), 6,12 (d, J= 7,52, 1H), 7,98 (d, J= 7,89, 1H). EM (MALDI), [M-CMP+Na]<sup>+</sup> observado; 10780.

## 2. Preparación de CMP-SA-PEG II

Este ejemplo ilustra el procedimiento general para preparar CMP-SA-PEG, y procedimientos específicos para preparar CMP-SA-PEG (1 kDa) y CMP-SA-PEG (20 kDa).

**Procedimientos generales de preparación de 5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina).** Se disolvió 5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina) (870 mg, 1,02 mmol) en 25 ml de agua y se añadieron 5,5 ml de disolución de dimetilamina al 40% en peso en H<sub>2</sub>O. Se agitó la reacción durante 1 h y se eliminó entonces el exceso de dimetilamina por rotavapor. Se filtró la disolución acuosa a través de una columna de gel de sílice C-18 y se lavó la columna con agua. Se combinaron los eluyentes y se liofilizaron, proporcionando 638 mg (93%) de un sólido blanco. Rf= 0,10 (sílice, IPA/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>Cl; 7/2/1). RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H, J= 5,3), 2,50 (dd, 1H, J= 13,2, 4,6), 3,43 (d, J= 9,58, 1H), 3,63 (dd, J= 11,9, 6,44, 1H), 3,88 (dd, J= 11,8, 1,0, 1H), 3,95 (td, J= 9,0, 2,3, 1H), 4,10 (t, J= 10,42, 1H), 4,12 (td, J= 10,34, 4,66, 1H), 4,18 (d, J= 10,36, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,31 (t, J= 4,64, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J= 4,37, 1H), 6,13 (d, J= 7,71, 1H), 7,98 (d, J= 7,64, 1H). EM (ES); calc. para C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>P ([M-H]<sup>-</sup>), 629,47; encontrado 627,9.

**Procedimientos generales para la preparación de CMP-SA-PEG usando carbonato de p-nitrofenilo de mPEG.** Se disolvió 5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina) (175 mg, 0,259 mmol) en una mezcla de agua a pH 8,5 y DMF o THF (a una relación de 1:2). Se añadió el carbonato de nitrofenilo de mPEG (mPEG de 2 a 20 kDa) (0,519 mmol) en varias porciones durante 8 h a temperatura ambiente y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 días. Cuando se completó, se añadieron agua (40 ml) y 1,5 ml de NH<sub>4</sub>OH (disolución acuosa al 29%). Se agitó la mezcla de reacción amarilla durante otras 2 h y se concentró entonces por rotavapor. Se diluyó entonces la mezcla de reacción con agua (pH 8,5) hasta aproximadamente 500 ml de volumen y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en fase inversa (Biotage 40M, columna de sílice C18) con un gradiente de metanol/agua. Se combinaron las fracciones apropiadas y se concentraron, proporcionando los productos en forma de sólidos blancos. Rf (sílice; 1-propanol / agua / 29% de NH<sub>4</sub>OH; 7 / 2 / 1); (PEG de 2 kDa)= 0,31; (PEG de 5 kDa)= 0,33; (PEG de 10 kDa)= 0,36; (PEG de 20 kDa)= 0,38 (TLC en sílice, IPA/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH 7/2/1); EM (MALDI), observado [M-CMP+Na]<sup>+</sup>; (2 kDa)= 2460; (5 kDa) = 5250; (10 kDa)= 10700; (20 kDa) = 22500.

**Preparación de 5'-monofosforil-[5-(N-fluorenilmetoxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina].** Se mezclaron piruvato de sodio (2,4 g, 218 mmol), tampón HEPES (0,25 M, pH 7,34) y 1,0 g (22 mmol) de Fmoc-glicilmanosamida en una botella de policarbonato de 150 ml. Se añadió entonces una disolución de ácido neuramínico aldolasa (19 ml, ~600 U) y se incubó la mezcla de reacción a 30°C en un

agitador orbital. Después de 23 horas, la cromatografía en capa fina (TLC) indicó que había ocurrido aproximadamente un 75% de conversión en el producto. Se añadieron entonces CTP (1,72 g, 33 mmol) y  $MnCl_2$  0,1 M (6 ml) a la mezcla de reacción. Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 1 M (5,5 ml) y se añadió una disolución que contenía CMP-ácido neuramínico sintetasa (*Neisseria*) (25 ml, 386 U). Se completó la reacción después de 24 horas y se sometió a cromatografía la mezcla de reacción (sílice C-18, gradiente de  $H_2O$  (100%) a 10% de MeOH/ $H_2O$ ). Se recombinaron las fracciones apropiadas, se concentraron y liofilizaron, proporcionando un sólido blanco, Rf (IPA/  $H_2O/NH_4OH$ , 7/2/1)= 0,52. RMN- $^1H$  ( $D_2O$ , 500 MHz)  $\delta$  1,64 (dt, 1H, J= 12,0, 6,0), 2,50 (dd, 1H, J= 13,2, 4,9), 3,38 (d, J= 9,67, 1H), 3,60 (dd, J= 11,65, 6,64, 1H), 3,79 (d, J= 4,11, 1H), 3,87 (dd, J= 12,24, 1,0, 1H), 3,97 (m, 2H), 4,07 (td, J= 10,75, 4,84, 1H), 4,17 (dd, J= 10,68, 1,0, 1H), 4,25 (s, 2H), 4,32 (t, J= 4,4, 1H), 4,37 (t, J= 5,81H), 4,6-4,7 (m, oscurecido por el pico de disolvente), 5,95 (d, J= 4, 1H), 6,03 (d, J= 7,4, 1H), 7,43-7,53 (m, 3H), 7,74 (m, 2H), 7,94 (c, J= 7, 3H). EM (ES); calc. para  $C_{35}H_{42}N_5O_{18}P$  [(M-H) $^-$ ], 850,7; encontrado 850,8.

**Preparación de 5'-monofosforil-[5-(N-metoxipolioxietilen-(1 kDa)-3-oxipropionamido)glicilamido-3,5-didesoxi- $\beta$ -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina].** Se añadió 5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi- $\beta$ -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina) (30 mg, 48  $\mu$ mol) en forma de sólido a éster de metoxipolioxietilen-(1 kDa de peso molecular medio)-3-oxipropionato-N-succinimidilo (52 mg, 52  $\mu$ mol) disuelto en DMF anhidra (450  $\mu$ l) y trietilamina (33  $\mu$ l, 238  $\mu$ mol). Se añadió agua a pH 8 (330  $\mu$ l) y, después de 30 min, se añadieron 28 mg adicionales de PEG activado con NHS. Después de 5 min adicionales, se sometió a cromatografía la mezcla de reacción (sílice C-18, gradiente de metanol/agua) y se concentraron las fracciones apropiadas, proporcionando 32 mg (40% de rendimiento) de un sólido blanco, Rf= 0,31 (sílice, IPA/ $H_2O/NH_4OH$  7/2/1); RMN- $^1H$  ( $D_2O$ , 500 MHz)  $\delta$  1,66 (td, 1H, J= 5,3), 2,50 (dd, 1H, J= 13,2, 4,6), 2,64 (t, J= 5,99, 3H), 3,43 (d, J= 9,58, 1H), 3,63 (m, 1H), 3,71 (s, 70H), 3,79 (m, oscurecido por el pico de 3,71), 3,82 (t, J= 6,19, 1H), 3,88 (dd, J= 11,8, 1,0, 1H), 3,95 (td, J= 9,0, 2,3, 1H), 3,98 (t, J= 5,06, 1H), 4,12 (td, J= 10,34, 4,66, 1H), 4,18 (d, J= 10,36, 1H), 4,23 (d, J= 4,85, 2H), 4,31 (t, J= 4,64, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J= 4,55, 1 H), 6,13 (d, J= 7,56, 1H), 7,98 (d, J= 7,54, 1H). EM (MALDI), [(M-CMP)-H] observado; 1506,4, 1550,4, 1594,5, 1638,5, 1682,4, 1726,4, 1770,3, 1814,4, 1858,2.

**Preparación de 5'-monofosforil-[5-[N-(2,6-dimetoxipolioxietilen-(20 kDa)-3-oxipropionamidil)lisilamido]-glicilamido-3,5-didesoxi- $\beta$ -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina].** Se disolvió éster de 2,6-di[metoxipolioxietilen-(20 kDa de peso molecular medio)-3-oxipropionamidil]lisilamido-N-succinimidilo (367 mg, 9  $\mu$ mol) en THF anhidro (7 ml) y trietilamina (5  $\mu$ l, 36  $\mu$ mol). Se disolvió 5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi- $\beta$ -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato) de citidina (30 mg, 48  $\mu$ mol) en 1,0 ml de agua y se añadió a la mezcla de reacción. Se agitó la reacción durante 4 horas a temperatura ambiente y se sometió entonces a cromatografía (HPLC, Waters Xterra RP8, gradiente de agua/ $NH_4OH$ , 100% a 20% de metanol/agua / $NH_4OH$  a 1 ml/min), proporcionando un sólido blanco con un Rt= 22,8 min. EM (MALDI), [(M-CMP)-H] observado; 43027,01 (40.000 – 45.500).

### 3. Preparación de UDP-Gal-PEG.

Este ejemplo expone el procedimiento general para la preparación de UDP-Gal-PEG.

Se añadieron 348 mg de éster metoxipolioxietilenpropionato-N-hidroxisuccinimida (nnPEG-SPA, PM 1.000) en THF (0,5 ml) a una disolución de 25 mg de 1-fosfato de galactosamina en 1 ml de agua, seguido de la adición de 67  $\mu$ l de trietilamina. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 17 h. La concentración a presiones reducidas proporcionó una mezcla de reacción bruta que se purificó mediante cromatografía (sílice C-18, usando un gradiente por etapas de 10%, 20%, 30%, 40% de MeOH acuoso), proporcionando 90 mg (74%) de producto después de combinar las fracciones apropiadas y concentrar hasta sequedad. Rf= 0,5 (sílice, propanol/ $H_2O/NH_4OH$  30/20/2); EM (MALDI), observado 1356, 1400, 1444, 1488, 1532, 1576, 1620.

**[ $\alpha$ -1-(Uridin-5'-difosforil)]-2-desoxi-2-(metoxipolioxietilenpropionoilamido-1 kDa)- $\alpha$ -D-galactosamina.** Se disolvió 2-desoxi-2-(metoxipolioxietilenpropionoilamido-1 kDa)- $\alpha$ -1-monofosfato-D-galactosamina (58 mg) en 6 ml de DMF y 1,2 ml de piridina. Se añadió entonces UMP-morfolidato (60 mg) y se agitó la mezcla resultante a 70°C durante 48 h. Después de concentrar, se sometió el residuo a cromatografía (sílice C-18, usando un gradiente por etapas de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% y 80% de MeOH), proporcionando 50 mg de producto después de concentrar las fracciones apropiadas. Rf= 0,54 (sílice, propanol/ $H_2O/NH_4OH$  30/20/2). EM (MALDI); observado 1485, 1529, 1618, 1706.

**[ $\alpha$ -1-(Uridin-5'-difosforil)]-6-desoxi-6-(metoxipolioxietilenamino-2 kDa)- $\alpha$ -D-galactosa.** Se disolvió [ $\alpha$ -1-(uridin-5'-difosforil)]-6-carboxaldehído- $\alpha$ -D-galactosa (10 mg) en 2 ml de tampón fosfato de sodio 25 mM (pH 6,0) y se trató con metoxipolietilenglicolamina (PM 2.000, 70 mg) y entonces 25  $\mu$ l de disolución de  $NaBH_3CN$  1 M a 0°C. Se congeló la mezcla resultante a -20°C durante 3 días. Se sometió a cromatografía la mezcla de reacción (HPLC, Water Xterra P8) usando  $NH_4OH$  0,015 M como fase móvil A y MeOH como fase móvil B como eluyente a una velocidad de 1,0 ml/min. Se recogió el producto y se concentró, proporcionando un sólido; Rt= 9,4 minutos. Rf = 0,27 (sílice, EtOH/ $H_2O$  7/3).

**[ $\alpha$ -1-(Uridin-5'-difosforil)]-6-amino-6-desoxi- $\alpha$ -D-galactosa.** Se añadieron 15 mg de acetato de amonio a una disolución de [ $\alpha$ -1-(uridin-5'-difosforil)]-6-carboxaldehído- $\alpha$ -D-galactopiranosido (10 mg) en tampón fosfato de sodio (pH 6,0). Se añadió entonces una disolución de  $NaBH_3CN$  1 M (25  $\mu$ l) y se agitó la mezcla durante 24 h. Se concentró la disolución y se sometió el residuo a cromatografía (Sephadex G10), proporcionando 10 mg de un sólido blanco, Rf= 0,62 (sílice, EtOH/ $NH_4Ac$  0,1 M).

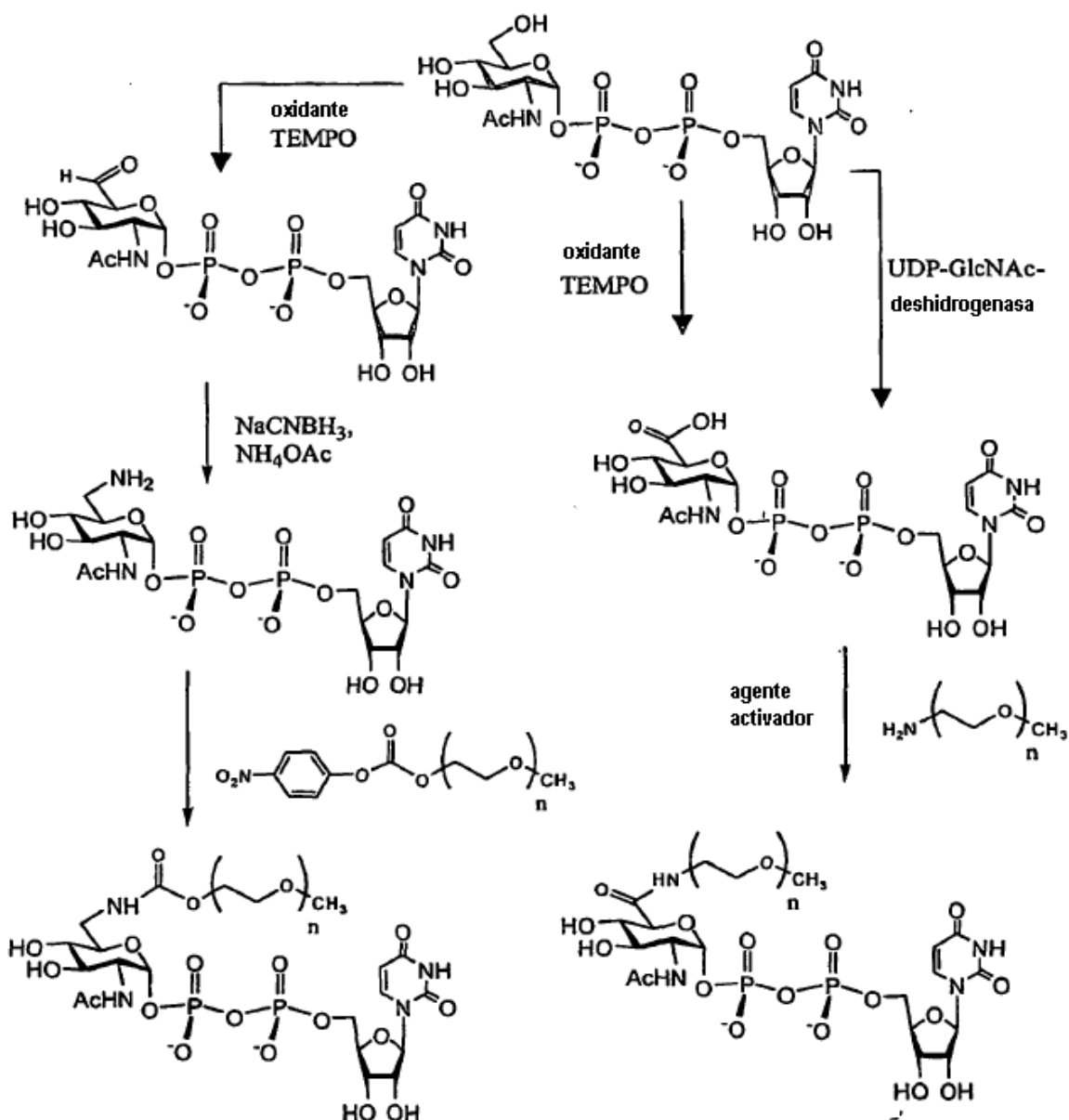
5 **[ $\alpha$ -1-(Uridin-5'-difosforil)]-6-desoxi-6-(metoxipolioxietilpropionoilamido, ~2 kDa)- $\alpha$ -D-galactopiranosido.** Se disolvió [ $\alpha$ -1-(uridin-5'-difosforil)]-6-amino-6-desoxi- $\alpha$ -D-galactopiranosido (5 mg) en 1 ml de H<sub>2</sub>O. Se añadió entonces éster de metoxipolietilenglicolpropionoil-NHS (PM ~2.000, 66 mg), seguido de 4,6  $\mu$ l de trietilamina. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante una noche y se purificó entonces en HPLC (sílice C-8), proporcionando el producto, Rt = 9,0 min.

10 **[ $\alpha$ -1-(Uridin-5'-difosforil)]-6-desoxi-6-(metoxipolioxietilencarboxamido, ~2 kDa)- $\alpha$ -D-galactopiranosido.** Se mezcló [ $\alpha$ -1-(uridin-5'-difosforil)]-6-amino-6-desoxi- $\alpha$ -D-galactopiranosido (10 mg) con metoxipolietilenglicolcarboxi-HOBT (PM 2000, 67 mg) en 1 ml de H<sub>2</sub>O, seguido de la adición de 6,4 mg de EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y 4,6  $\mu$ l de trietilamina. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 24 h. Se sometió la mezcla a cromatografía (sílice C-8), proporcionando el producto.

#### 4. Preparación de UDP-GlcNAc-PEG

15 Este ejemplo expone el procedimiento general para la preparación de UDP-GlcNAc-PEG. En el lado izquierdo del esquema 17, se oxida el azúcar-difosfonucleótido protegido en amino formando un aldehído en la posición 6 del azúcar. Se convierte el aldehído en la correspondiente amina primaria mediante la formación y reducción de la base de Schiff.  
 20 Se pone en contacto el aducto resultante con carbonato de p-nitrofenilo de m-PEG, que reacciona con la amina uniendo el m-PEG con el núcleo de sacárido a través de un enlace amida. En el lado derecho del esquema 17, parte superior, se trata el azúcar-difosfonucleótido protegido en amina con un oxidante químico, formando un grupo carboxilo en el carbono 6 del núcleo de azúcar. Se activa el grupo carboxilo y se hace reaccionar con m-PEG-amina, uniéndose el m-PEG con el núcleo de sacárido a través de un enlace amida. En el lado derecho del esquema 17, parte inferior, las reacciones son sustancialmente similares a la parte superior derecha, con la excepción de que el azúcar-nucleótido de partida se pone en contacto con una enzima oxidante tal como una deshidrogenasa en lugar de con un oxidante químico.

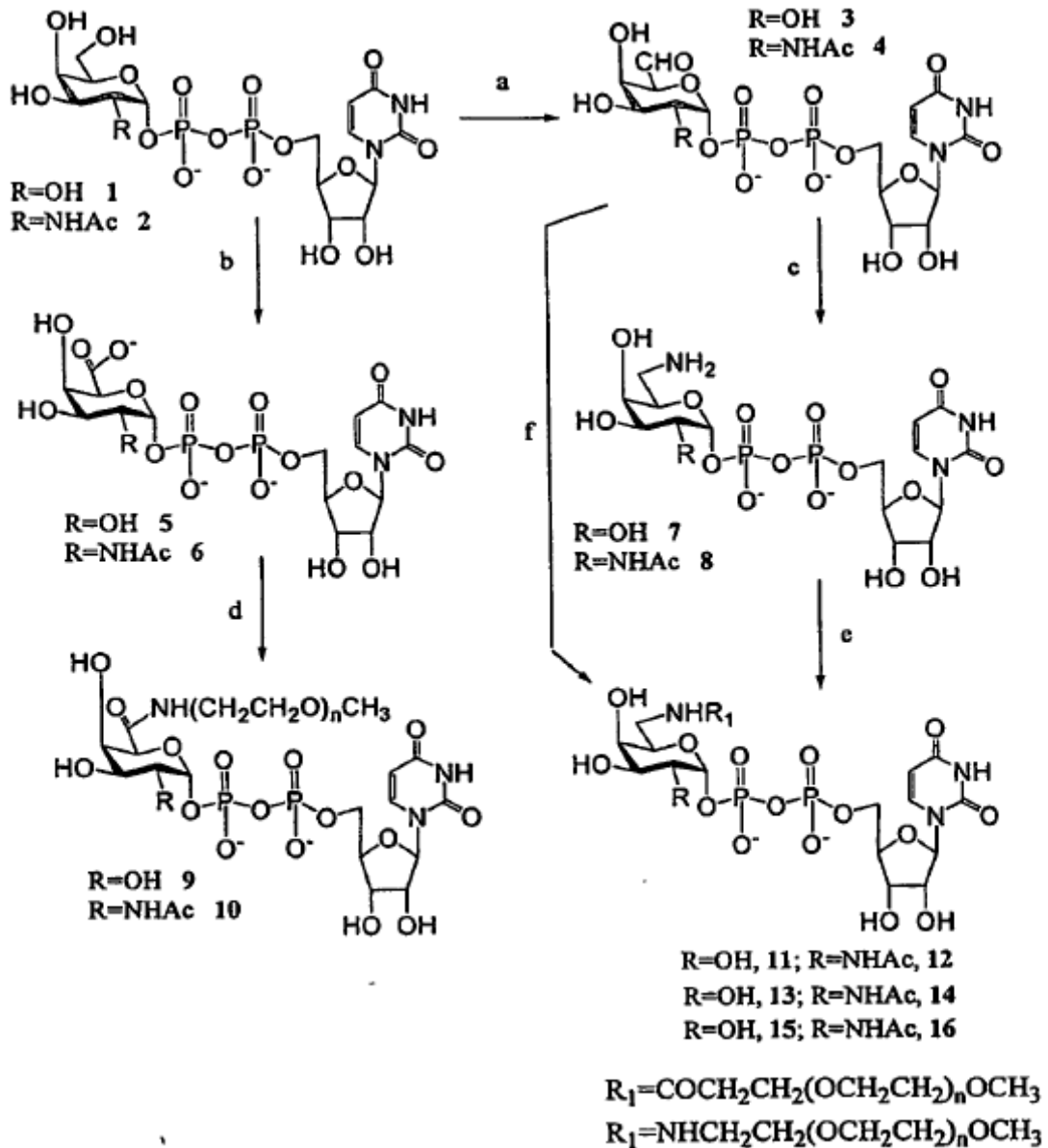
#### Esquema 17



### 5. Preparación de UDP-GalNAc-PEG

- Este ejemplo (esquema 18) expone el procedimiento general para la preparación de UDP-GalNAc-PEG. La reacción expuesta anteriormente se origina en un azúcar-difosfonucleótido en que R es un hidroxilo **1** o una amina protegida **2**.
- 5 En la etapa a, se trata el azúcar de partida con una mezcla de una oxidasa y una catalasa, convirtiendo la posición 6 del azúcar en un resto aldehído (**3** y **4**). En la etapa c, se convierte el aldehído en la correspondiente amina (**7** y **8**) mediante la formación y reducción de una base de Schiff. En la etapa e, se trata opcionalmente la amina con un derivado de m-PEG activado, acilando así la amina y produciendo la correspondiente m-PEG-amida (**11** y **13**). Como alternativa, en la
- 10 etapa f, se pone en contacto la amina con una especie de m-PEG activada, tal como un éster activo de m-PEG, formando así la correspondiente m-PEG-amida (**12** y **14**). En la etapa b, se trata también el material de partida con una catalasa y oxidasa, oxidando completamente el resto hidroximetilo y formando un grupo carboxilo en la posición 6. En la etapa d, se activa el resto carboxilo y se convierte posteriormente en un aducto de m-PEG (**9** y **10**) mediante reacción con un intermedio m-PEG-amina. Esto se muestra en el esquema 18.

### Esquema 18

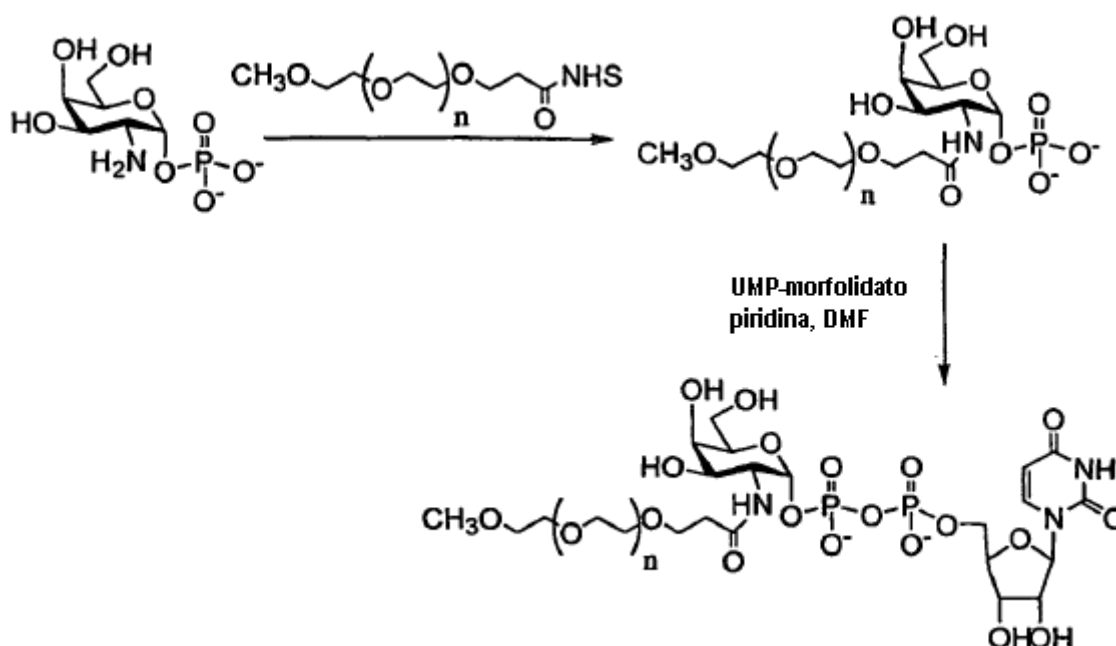


a y b): galactosa oxidasa y catalasa en tampón fosfato de sodio 25 mM (pH 6,0); c)  $NH_4Ac$ ,  $NaBH_3CN$  en tampón fosfato de sodio 25 mM (pH 6,0); d)  $CH_3(OCH_2CH_2)NH_2$ , EDC,  $H_2O$ ; e)  $CH_3(OCH_2CH_2)_nNH_2$ ,  $NaBH_3CN$ ,  $H_2O$  para **15** y **16**; f)  $CH_3O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2CONHS$ ,  $H_2O$ ,  $Et_3N$

- 5 Se pone en contacto el fosfato de aminoazúcar con un éster activo de m-PEG-N-hidroxisuccinimida, formando así la correspondiente azúcar-PEG-amida. Se pone en contacto la amida con UMP-morfolidato, formando el correspondiente azúcar-difosfonucleótido activo.

Esquema 19





#### 6. Síntesis de CMP-SA-levulinato

Este ejemplo expone el procedimiento para la síntesis de CMP-SA-levulinato.

5 **Preparación de 2-levulinamido-2-desoxi-D-manopiranososa.** Se añadió gota a gota cloroformiato de isobutilo (100  $\mu$ l, 0,77 mmol) a una disolución de ácido levulínico (86  $\mu$ l, 0,84 mmol), THF anhidro (3 ml) y trietilamina (127  $\mu$ l, 0,91 mmol). Se agitó esta disolución durante 3 horas a temperatura ambiente y se añadió entonces gota a gota a una disolución que contenía hidrocloreuro de D-manosamina (151 mg, 0,7 mmol), trietilamina (127  $\mu$ l, 0,91 mmol), THF (2 ml) y agua (2 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 15 horas y se concentró entonces hasta sequedad por rotavapor. Se usó la

10 cromatografía (sílice, gradiente por etapas de 5-15% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para aislar el producto, proporcionando 0,156 g (73% de rendimiento) de un sólido blanco: R<sub>f</sub> = 0,41 (sílice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/agua 6/4/1); RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)  $\delta$  2,23 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,57 (td, J = 6,54, 3,68, 2H), 2,63 (t, J = 6,71, 2H), 2,86-2,90 (m, 4H), 3,42 (m, 1H), 3,53 (t, J = 9,76, 1H), 3,64 (t, J = 9,43, 1H), 3,80-3,91 (m, 4H), 4,04 (dd, J = 9,79, 4,71, 1H), 4,31 (dd, J = 4,63, 1,14, 1H), 4,45 (dd, J = 4,16, 1,13, 1H), 5,02 (d, J = 1,29, 1H), 5,11 (s, J = 1,30, 1H), EM (ES); calculado para C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>7</sub>, 277,27; [M+1] encontrado 277,9.

15 **Preparación de 5-levulinamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato.** Se añadieron piruvato de sodio (0,616 g, 5,6 mmol) y ácido N-acetilneuramínico aldolasa (50 U) a una disolución de 2-levulinato-2-desoxi-D-manopiranososa (0,156 g, 0,56 mmol) en HEPES 0,1 M (pH 7,5). Se calentó la mezcla de reacción a 37°C durante 20 horas y después se congeló. Se filtró entonces la mezcla de reacción a través de sílice C-18, se congeló y se liofilizó. Se purificó el sólido bruto usando cromatografía ultrarrápida (sílice, usando en primer lugar 10-40% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y

20 entonces CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 6/4/0,5). Se combinaron las fracciones apropiadas y se concentraron, proporcionando 45 mg (80% de rendimiento) de un sólido blanco: R<sub>f</sub> = 0,15 (sílice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/agua 6/4/1); RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)  $\delta$  1,82 (t, J = 11,9, 1H), 2,21 (dd, J = 13,76, 4,84, 1H), 2,23 (s, 3H), 2,57 (c ap., J = 6,6, 2H), 2,86-2,95 (m, 2H), 3,15-3,18 (m, 1H), 3,28-3,61 (complejo, 1H), 3,60 (dd, J = 11,91, 6,66, 1H), 3,75 (td, J = 6,65, 2,62, 1H), 3,84 (dd, J = 11,89, 2,65, 1H), 3,88-4,01 (complejo, 2H), 4,04 (td, J = 11,18, 4,67, 1H). EM (ES); calculado para C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>10</sub>, 365,33; ([M-1]<sup>-</sup>) encontrado, 363,97.

25 **Preparación de 5'-monofosforil-(5-levulinamido-3,5-didesoxi- $\beta$ -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato de citidina).** Se disolvió 5-levulinamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (50 mg, 137  $\mu$ mol) en 2 ml de tampón HEPES 100 mM a pH 7,5 y se añadió MnCl<sub>2</sub> 1 M (300  $\mu$ l, 300  $\mu$ mol). Se disolvió CTP-2Na<sup>+</sup> (79 mg, 1,5  $\mu$ mol) en 5 ml de tampón HEPES y se añadió al azúcar. Se añadió la enzima de fusión sialiltransferasa/CMP-ácido neuramínico sintetasa (11 U) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 45 horas. Se filtró la mezcla de reacción a través de un filtro de un PM de corte 10.000 y se usó directamente el filtrado, que contenía el producto de reacción, sin purificación adicional: R<sub>f</sub> = 0,35 (sílice, IPA/agua/NH<sub>4</sub>OH 7/2/1).

#### B. Glicoconjugación y glicoPEGilación de péptidos

##### G-CSF

35 28. GlicoPEGilación de G-CSF producido en células de CHO

5 **Preparación de asialo-factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).** Se disuelve G-CSF producido en células de CHO a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM y se concentra a 500 µl en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. Se incuba la disolución con neuraminidasa II 300 mU/ml (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32°C. Para monitorizar la reacción, se diluye una pequeña alícuota de la reacción con el tampón apropiado y se efectúa un IEF en gel. Se añade entonces la mezcla de reacción a un conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa prelavado (800 µl/ml de volumen de reacción) y se centrifugan suavemente las perlas lavadas durante 24 horas a 4°C. Se centrifuga la mezcla a 10.000 rpm y se recoge el sobrenadante. Se lavan las perlas 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml de tampón Tris-EDTA, y se reúnen todos los sobrenadantes. Se dializa el sobrenadante a 4°C frente a Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 1 mM, 0,05% de NaN<sub>3</sub> y entonces dos veces más frente a Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 1 M, 0,05% de NaN<sub>3</sub>. Se concentra entonces la disolución dializada usando un filtro centrífugo Centricon Plus 20 y se almacena a 20°C. Se procesaron las condiciones para el IEF en gel según los procedimientos y reactivos proporcionados por Invitrogen. Se dializaron muestras de G-CSF nativo y desialilado frente a agua y se analizaron por EM MALDI-TOF.

15 **Preparación de G-CSF-(α2,3)-sialil-PEG.** Se disolvió G-CSF desialilado a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, 0,05% de NaN<sub>3</sub>, pH 7,2. Se incuba la disolución con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y ST3Gal1 0,1 U/ml a 32°C durante 2 días. Para monitorizar la incorporación de ácido siálico-PEG, se añade a una pequeña alícuota de la reacción CMP-SA-PEG-ligando fluorescente; se separa el marcador incorporado al péptido del marcador libre por filtración por gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1). Se cuantifica la incorporación del marcador fluorescente al péptido usando un detector fluorescente en línea. Después de 2 días, se purifica la mezcla de reacción usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1) y se recogen las fracciones basándose en la absorción UV. Se analiza el producto de reacción usando PAGE-SDS y análisis por IEF según los procedimientos y reactivos suministrados por Invitrogen. Se dializan muestras de G-CSF nativo y PEGilado frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

25 **Preparación de G-CSF-(α2,8)-sialil-PEG.** Se disuelve G-CSF producido en células de CHO, que contiene un glicano O-ligado α2,3-sialilado, a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, 0,05% de NaN<sub>3</sub>, pH 7,2. Se incuba la disolución con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y CST-II 0,1 U/ml a 32°C durante 2 días. Para monitorizar la incorporación de ácido siálico-PEG, se añade a una pequeña alícuota de la reacción CMP-SA-PEG-ligando fluorescente y se separa el marcador incorporado al péptido del marcador libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1). Se cuantifica la incorporación del marcador fluorescente al péptido usando un detector fluorescente en línea. Después de 2 días, se purifica la mezcla de reacción usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1), y se recogen las fracciones basándose en la absorción UV. Se analiza el producto de la reacción usando PAGE-SDS y análisis de IEF según los procedimientos y reactivos suministrados por Invitrogen. Se dializan muestras de G-CSF nativo y PEGilado frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

35 **Preparación de G-CSF-(α2,6)-sialil-PEG.** Se disuelve G-CSF, que contiene solo GalNAc O-ligado, a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, 0,05% de NaN<sub>3</sub>, pH 7,2. Se incuba la disolución con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y ST6GalNAc1 o II 0,1 U/ml a 32°C durante 2 días. Para monitorizar la incorporación de ácido siálico-PEG, se añade a una pequeña alícuota de la reacción CMP-SA-PEG-ligando fluorescente; se separa el marcador incorporado al péptido del marcador libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1). Se cuantifica la incorporación del marcador fluorescente al péptido usando un detector fluorescente en línea. Después de 2 días, se purifica la mezcla de reacción usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1) y se recogen las fracciones basándose en la absorción UV. Se analiza el producto de la reacción usando PAGE-SDS y análisis de IEF según los procedimientos y reactivos suministrados por Invitrogen. Se dializan muestras de G-CSF nativo y PEGilado frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

45 Se trató G-CSF producido en células de CHO con sialidasa de *Arthrobacter* y se purificó entonces por exclusión por tamaño en Superdex75, se trató con ST3Gal1 o ST3Gal2 y entonces con CMP-SA-PEG 20 kDa. Se purificó la molécula resultante por intercambio iónico y filtración en gel, y el análisis por PAGE-SDS demostró que la PEGilación era completa. Esta es la primera demostración de glicoPEGilación de un glicano O-ligado.

50 Las divulgaciones de todas y cada una de las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas en la presente memoria se incorporan a la presente como referencia en su totalidad.

Aunque esta invención se ha dado a conocer con referencia a realizaciones específicas, resulta evidente que pueden concebirse otras realizaciones y variaciones de esta invención por otros especialistas en la materia sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Se pretende considerar que las reivindicaciones adjuntas incluyan todas dichas realizaciones y variaciones equivalentes.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

5 <110> Neose Technologies. Inc.  
 DeFrees. Shawn  
 Zopf. David  
 Bayer. Robert  
 Hakes. David  
 10 Chen. Xi  
 Bowe. Caryne

<120> MÉTODOS DE GLICOPEGILACIÓN Y PROTEÍNAS/PÉPTIDOS PRODUCIDOS POR LOS MÉTODOS

15 <130> 040853-01-5051WO

<150> US 60/328.523  
 <151> 10-10-2001

20 <150> US 60/334.233  
 <151> 28-11-2001

<150> US 60/334.301  
 <151> 28-11-2001

25 <150> US 60/344.692  
 <151> 19-10-2001

<150> US 60/387.292  
 30 <151> 06-07-2002

<150> US 60/391.777  
 <151> 25-06-2002

35 <150> US 60/396.594  
 <151> 17-07-2002

<150> US 60/404.249  
 <151> 16-08-2002

40 <150> US 60/407.527  
 <151> 28-08-2002

<150> PCT/US02/32263  
 45 <151> 09-10-2002

<150> US 10/360.779  
 <151> 19-02-2003

50 <150> US 10/360.770  
 <151> 06-01-2003

<150> US 10/287.994  
 <151> 05-11-2002

55 <160> 75

<170> PatentIn versión 3.2

60 <210> 1  
 <211> 525  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

65 <400> 1

ES 2 373 708 T3

acccccctgg gccctgccag ctccctgccc cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa  
60

gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag  
120

ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc  
180

ctgagcagct gccccagcca ggccctgcag ctggcaggct gcttgagcca actccatagc  
240

ggccttttcc tctaccaggg gtcctgcag gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt  
300

cccaccttgg acacactgca gctggacgtc gccgactttg ccaccacat ctggcagcag  
360

atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg cagcccaccc agggtgccat gccggccttc  
420

gcctctgctt tccagcgccg ggacaggagg gtccctgggtg cctcccatct gcagagcttc  
480

ctggaggtgt cgtaccgctg tctacgccac cttgccagc cctga  
525

<210> 2

<211> 174

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

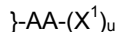
<400> 2

ES 2 373 708 T3

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln  
 20 25 30  
 Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys  
 50 55 60  
 Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser  
 85 90 95  
 Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp  
 100 105 110  
 Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro  
 115 120 125  
 Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe  
 130 135 140  
 Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
 165 170

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* exento de células de remodelación de un péptido G-CSF que comprende polietilenglicol (PEG), teniendo dicho péptido la fórmula:



5 en la que AA es un residuo aminoacídico terminal o interno de dicho péptido;

X<sup>1</sup> es un residuo monosacárido ligado covalentemente con dicho AA; y

u es un entero seleccionado de 0 y 1;

comprendiendo dicho método poner en contacto dicho péptido con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo que comprende polietilenglicol que tiene un peso molecular de 20 kDa ligado covalentemente con el mismo, en condiciones adecuadas para transferir dicho al menos un donante de glicosilo a dicho péptido.

2. El método de la reivindicación 1, en el que AA es un aminoácido que contiene un grupo hidroxilo libre.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que AA es un aminoácido seleccionado de serina, treonina e hidroxiprolina.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que AA es un residuo de treonina correspondiente a la Thr133 de G-CSF humano.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el donante de glicosilo es ácido siálico-polietilenglicol.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el residuo de monosacárido es GalNAc.

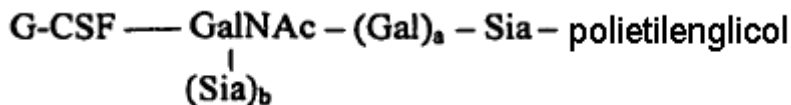
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que u es 1.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el péptido G-CSF se obtiene mediante la expresión de *E. coli*.

9. Uso de un CMP-ácido siálico-polietilenglicol para formar un conjugado covalente entre un péptido G-CSF y polietilenglicol que tiene un peso molecular de 20 kDa.

10. Un conjugado covalente entre un péptido G-CSF y polietilenglicol que tiene un peso molecular de 20 kDa mediante un grupo ligante de glicosilo que comprende GalNAc y ácido siálico, en el que el conjugado tiene la estructura G-CSF-GalNAc-ácido siálico-polietilenglicol, el péptido G-CSF se obtiene mediante la expresión de *E. coli* y el grupo ligante de glicosilo se une al péptido G-CSF en un residuo de treonina correspondiente a la Thr133 del G-CSF humano.

11. Un conjugado covalente entre un péptido G-CSF y polietilenglicol que tiene un peso molecular de 20 kDa mediante un grupo ligante de glicosilo que comprende GalNAc y ácido siálico, en el que el conjugado tiene la estructura



30 a y b se seleccionan independientemente de 0 o 1, el péptido G-CSF se obtiene mediante la expresión de células de CHO y el grupo ligante de glicosilo se une al péptido G-CSF en un residuo de treonina correspondiente a la treonina 133 del G-CSF humano.

12. Composición farmacéutica que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente según la reivindicación 10 u 11.

13. El conjugado covalente de la reivindicación 10 u 11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 12 para uso en el tratamiento de un paciente humano que padece un cáncer no mielóide y que recibe quimioterapia mielosupresora, o que tiene leucemia mielóide aguda y recibe quimioterapia de inducción o consolidación, o que padece un cáncer no mielóide y recibe un trasplante de médula ósea, o que experimenta la recogida de células progenitoras de sangre periférica o que tiene una neutropenia crónica grave o que tiene neutropenia persistente y también que tiene una infección por VIH avanzada.



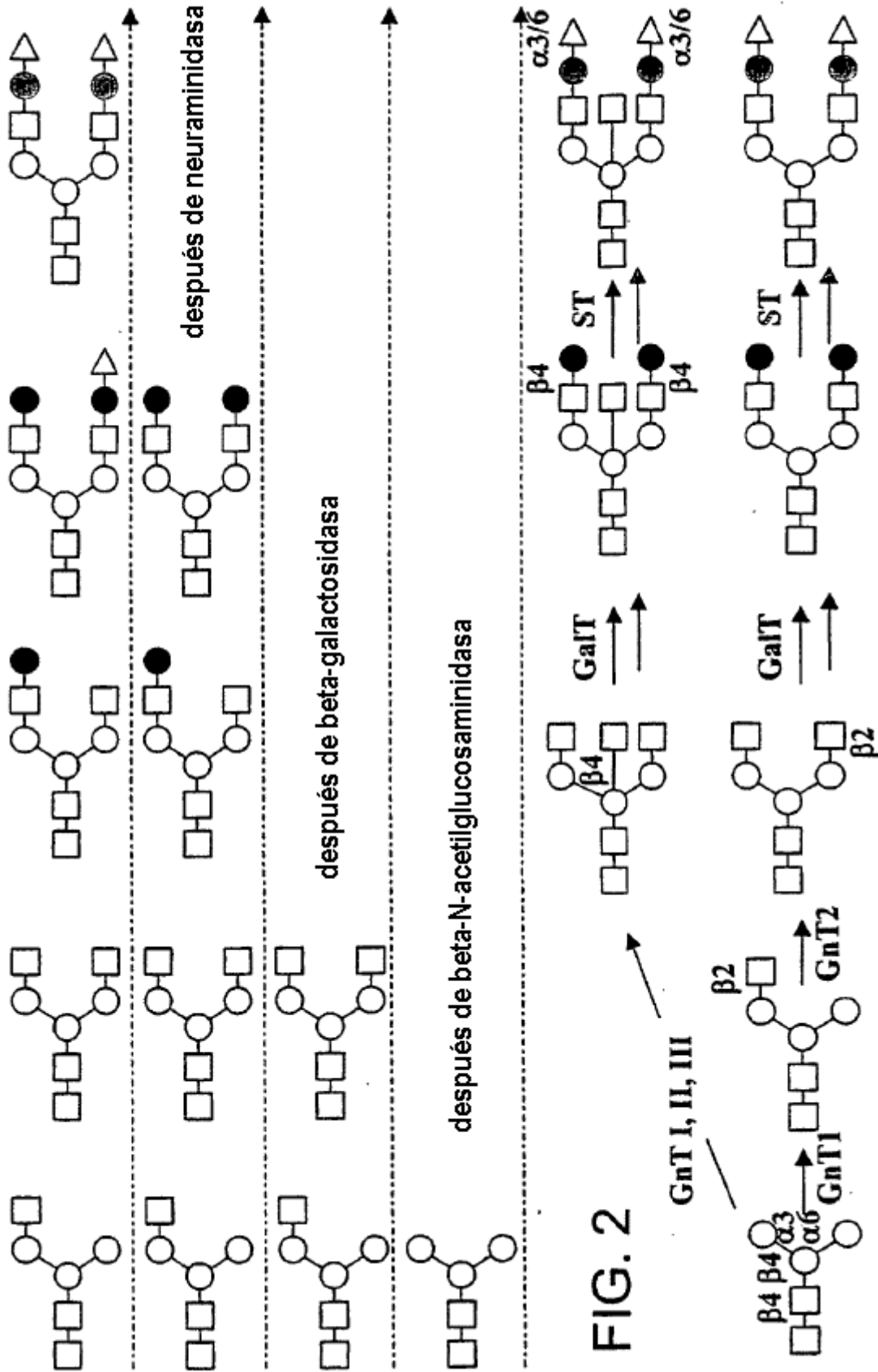


FIG. 2



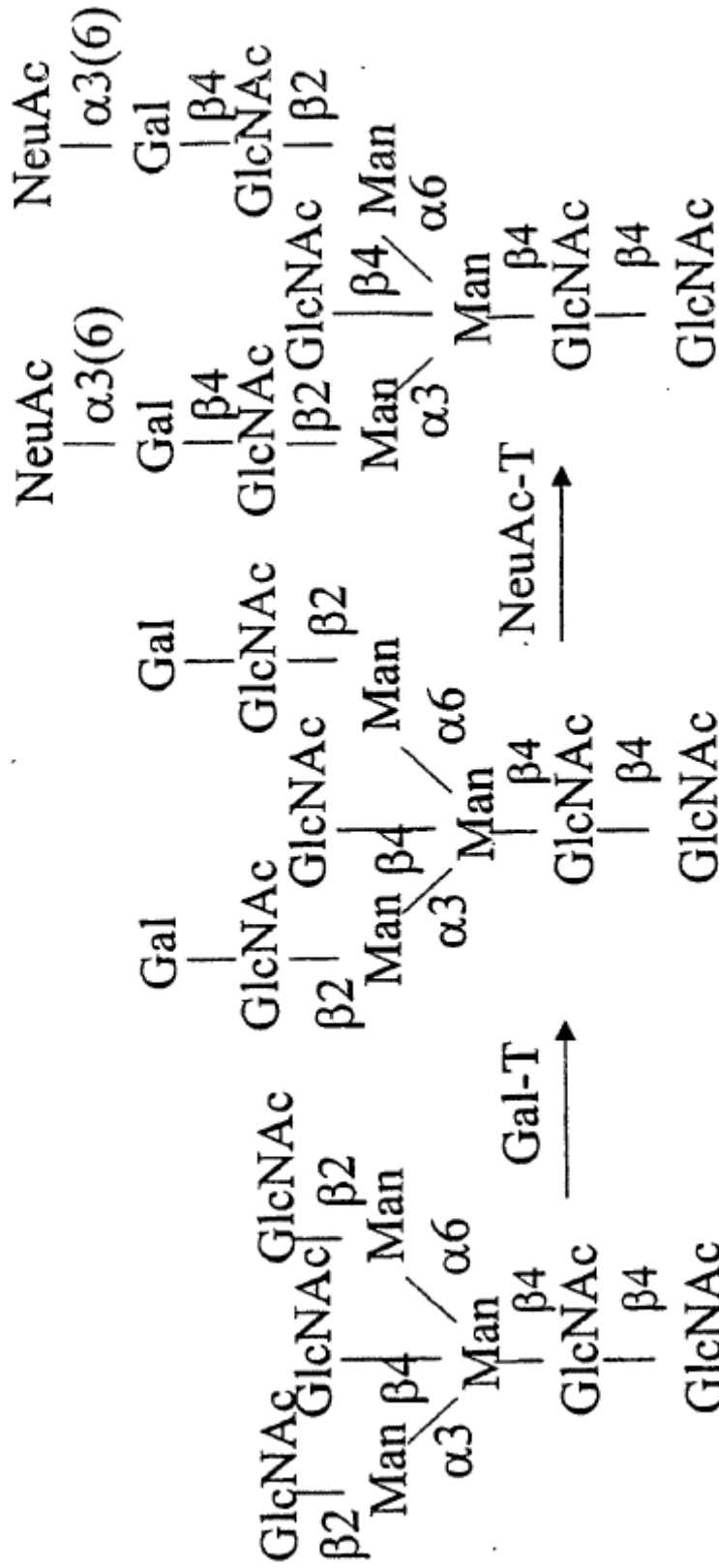


FIG. 3

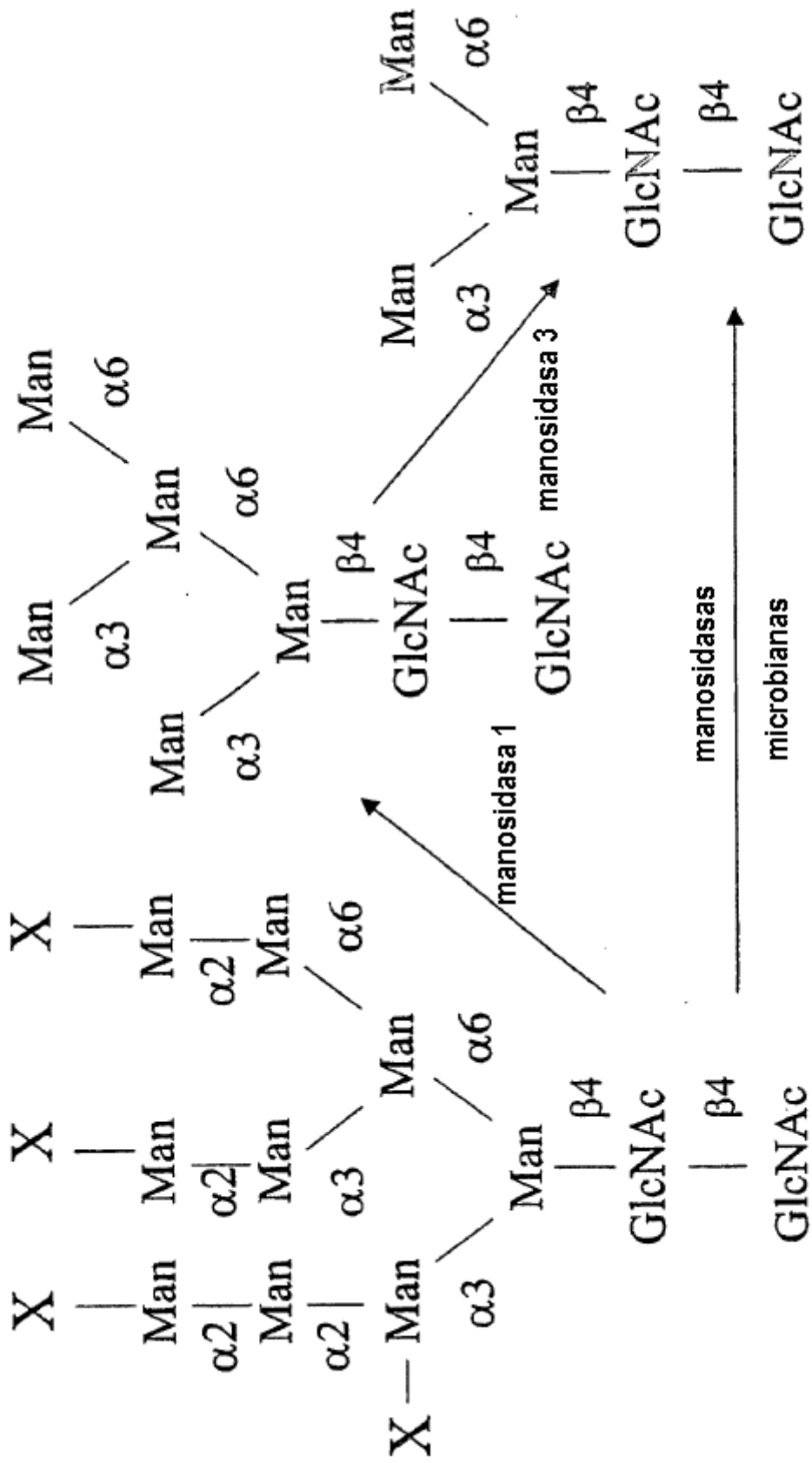


FIG. 4

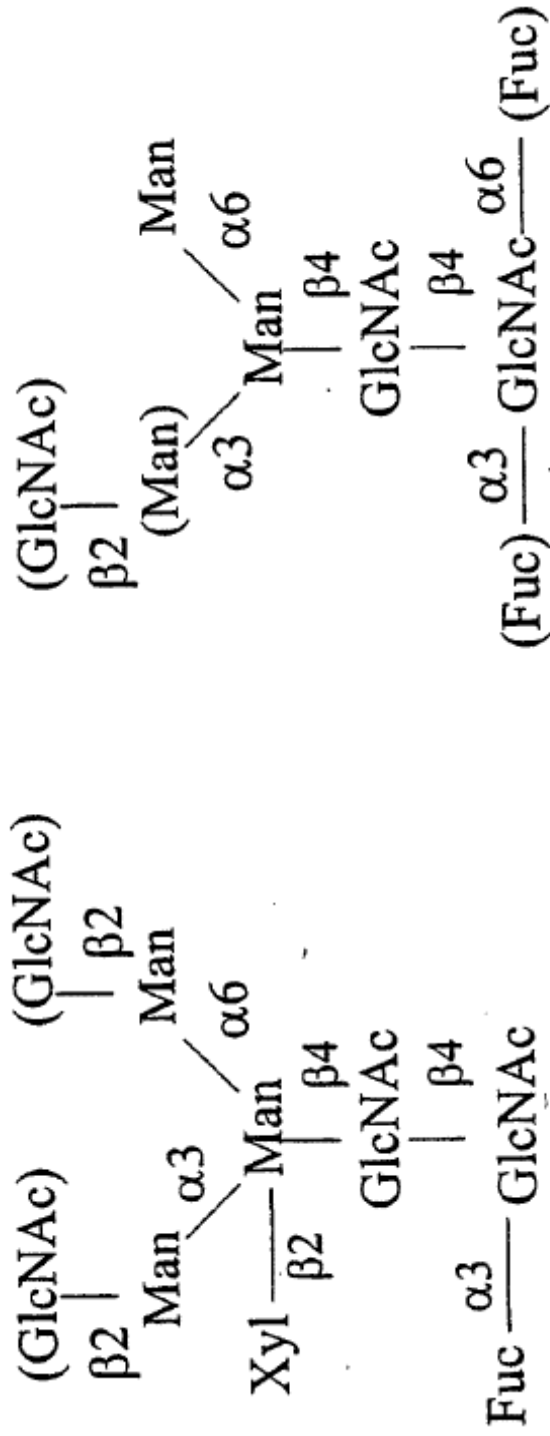


FIG. 5

FIG. 6

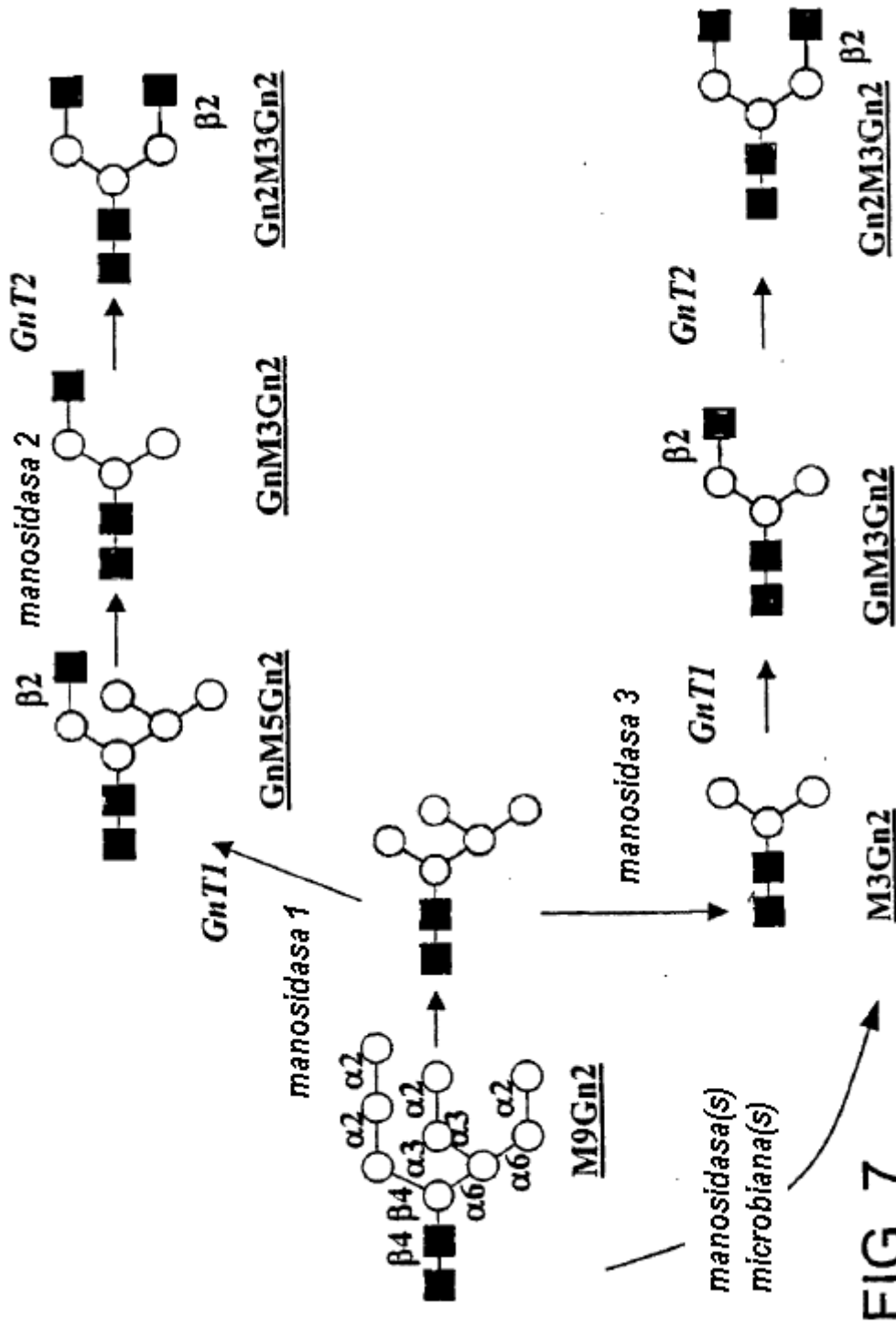


FIG. 7

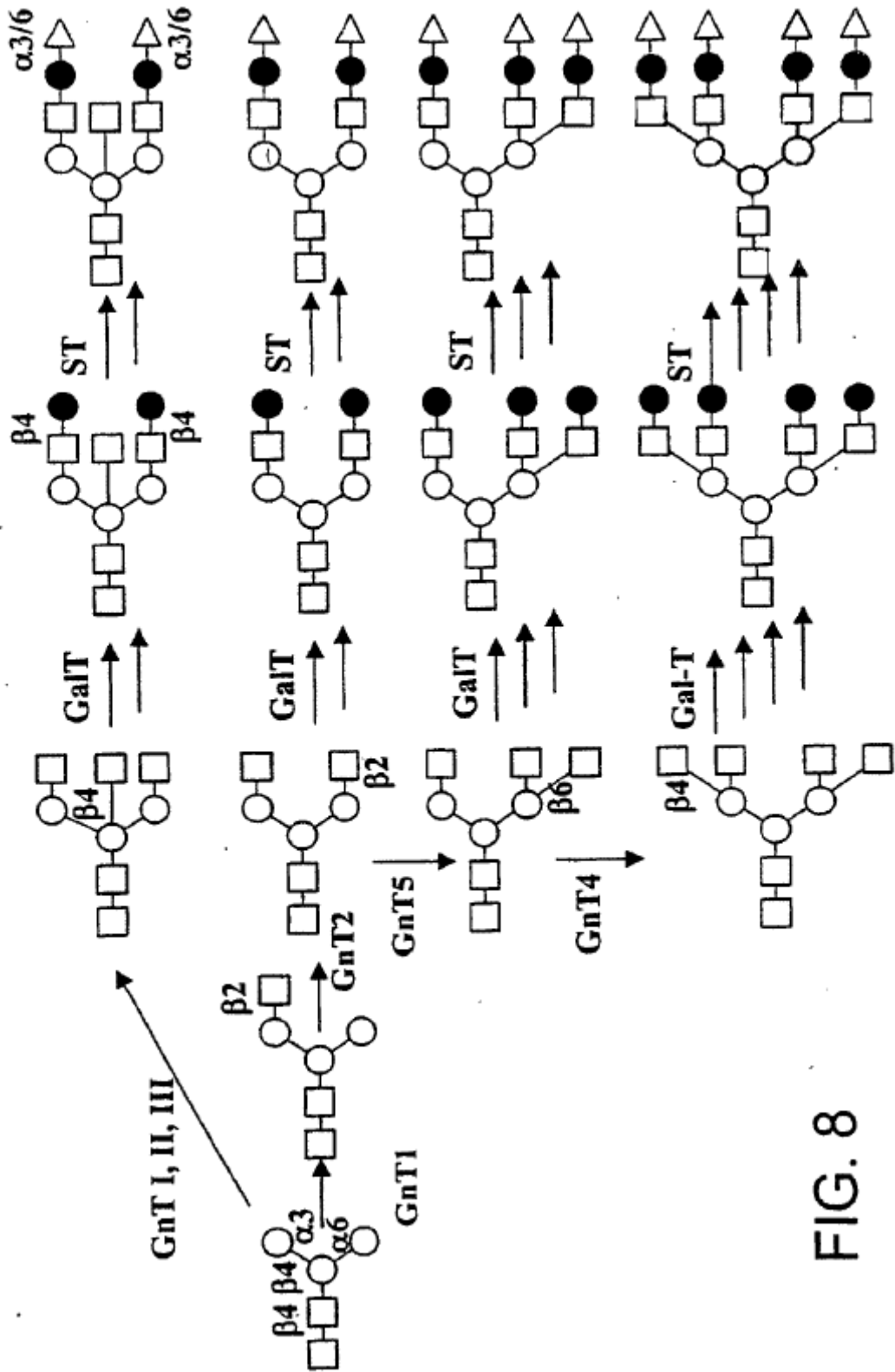


FIG. 8

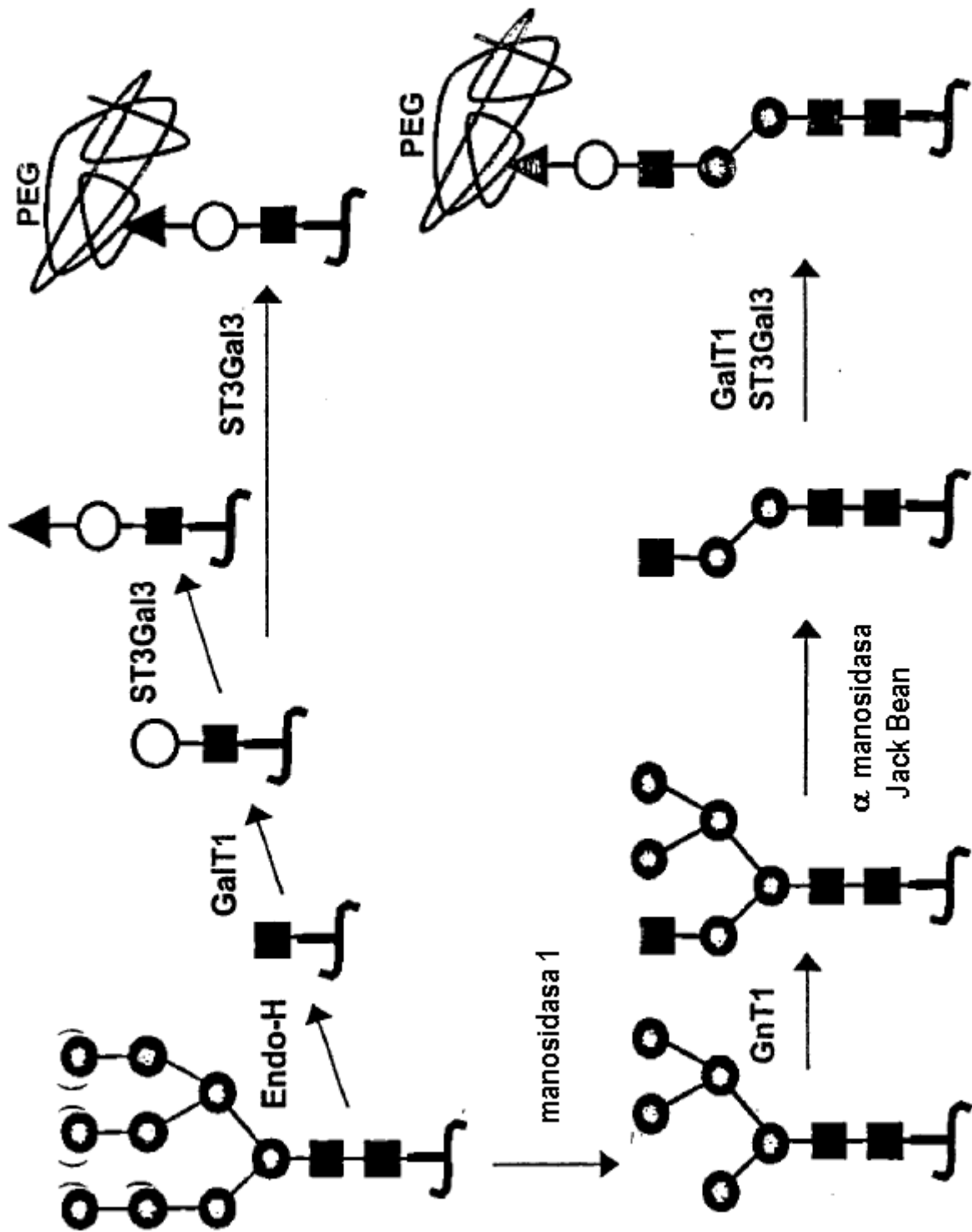


FIG. 9

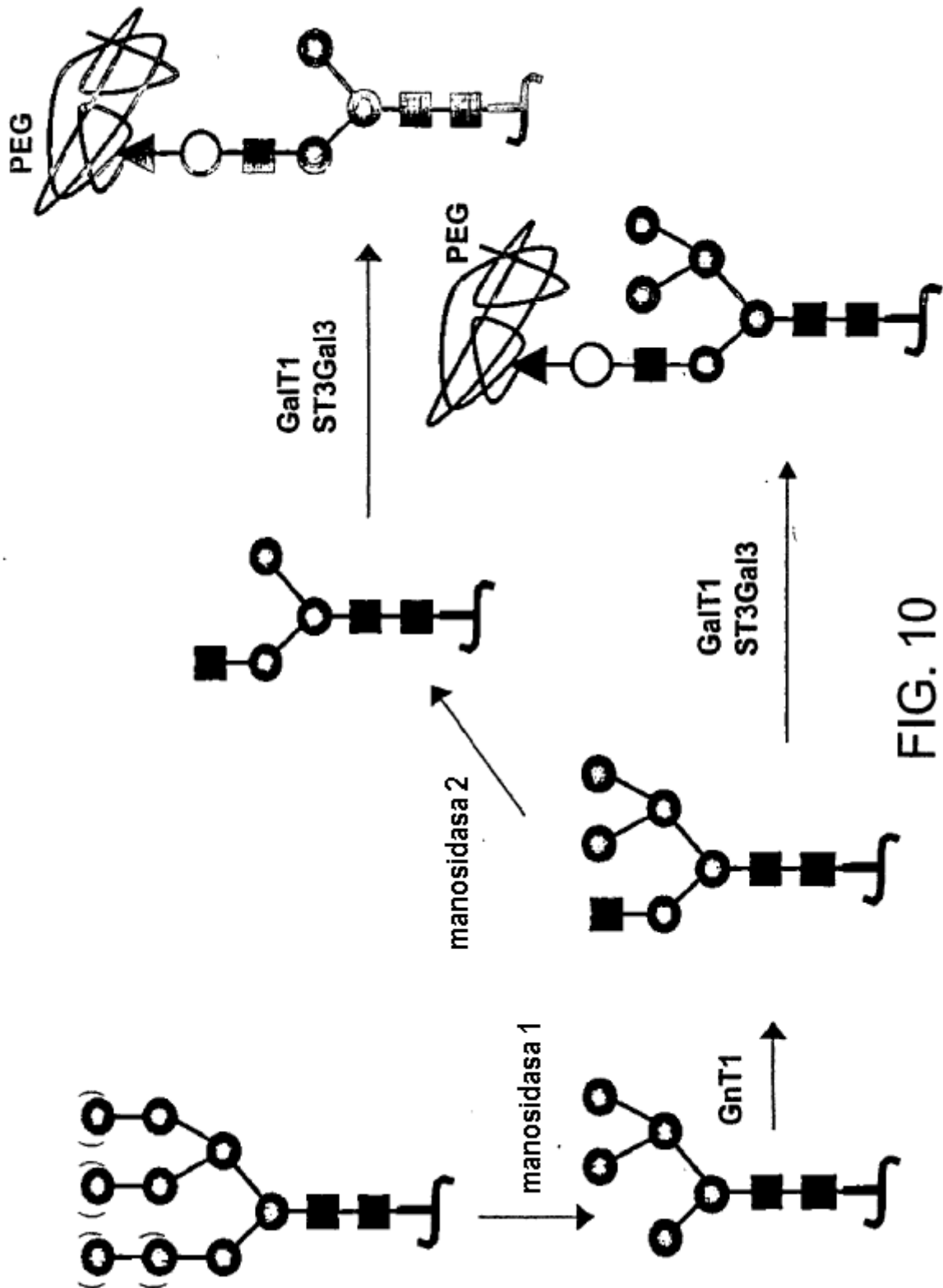


FIG. 10

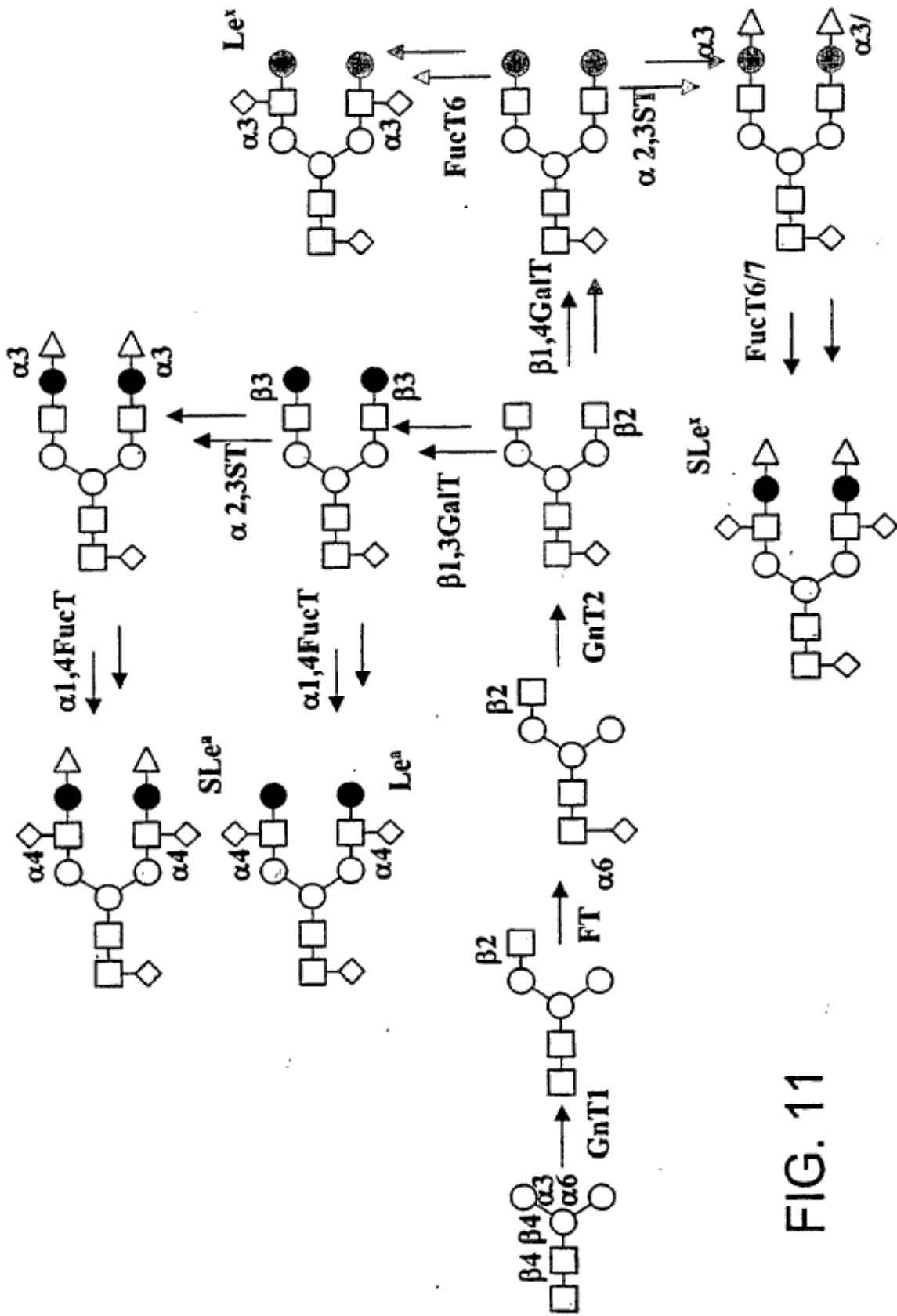


FIG. 11

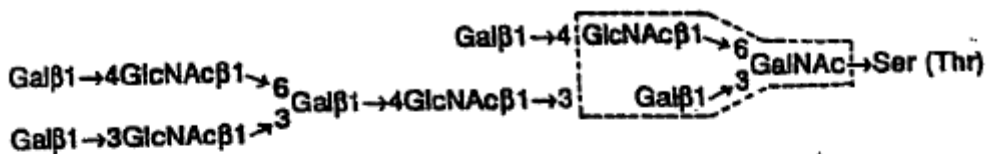
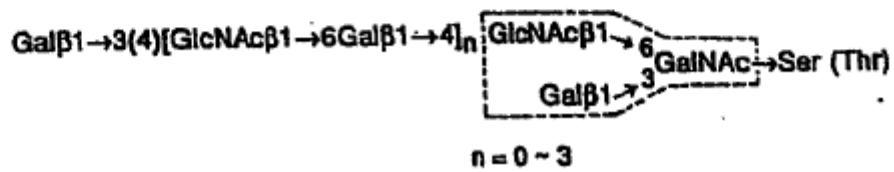
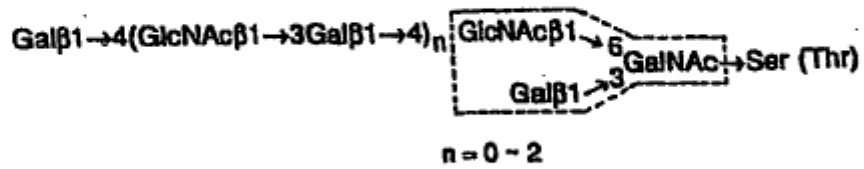




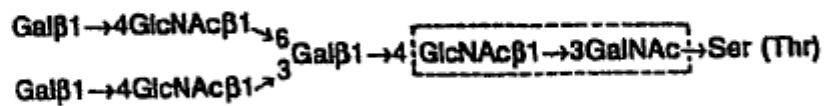
*Núcleo 1*



*Núcleo 2*



*Núcleo 3*



*Núcleo 4*

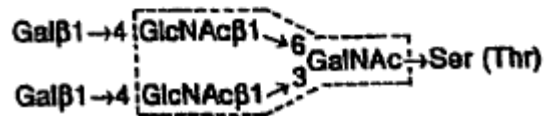


FIG. 13







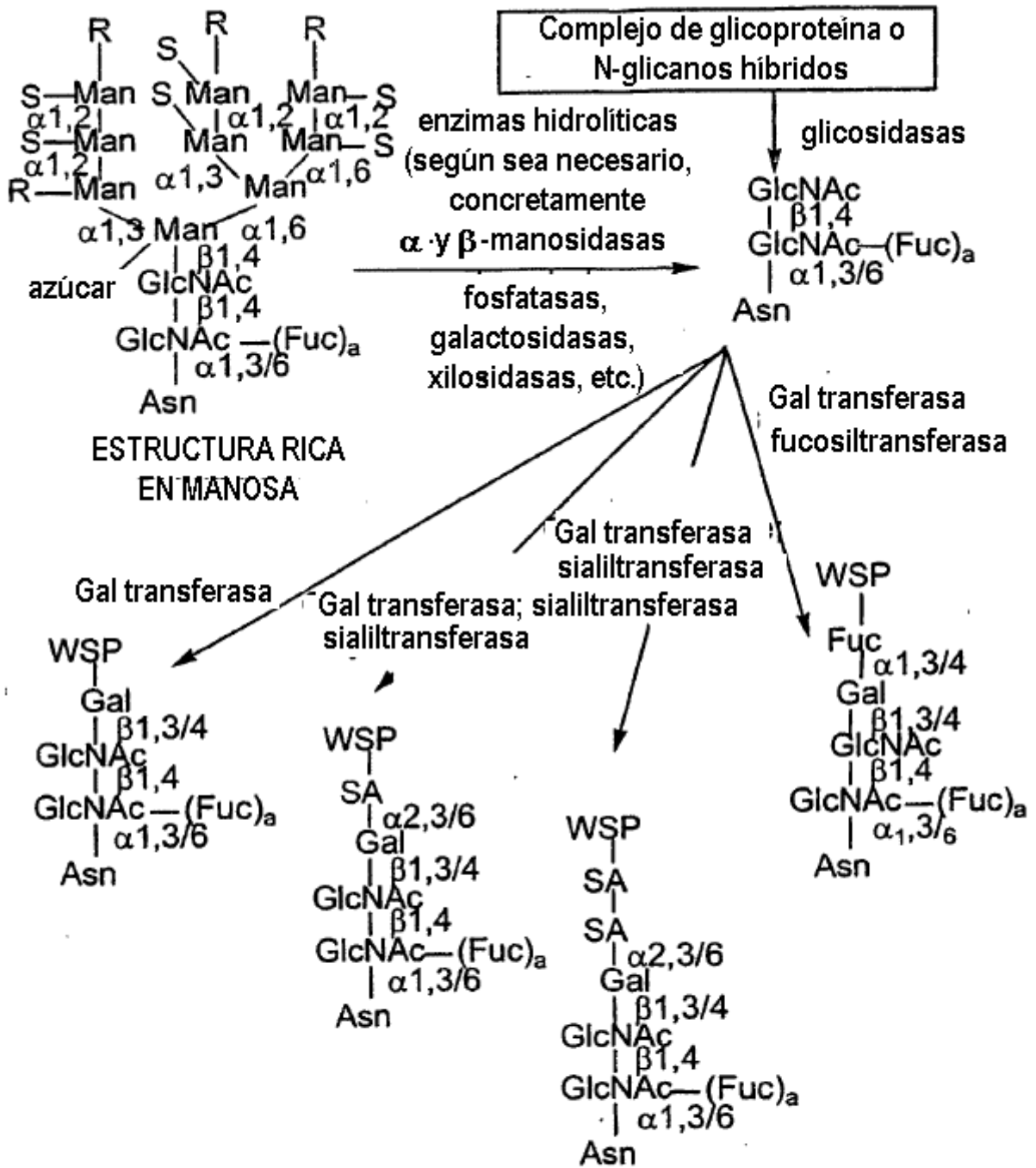


FIG. 16

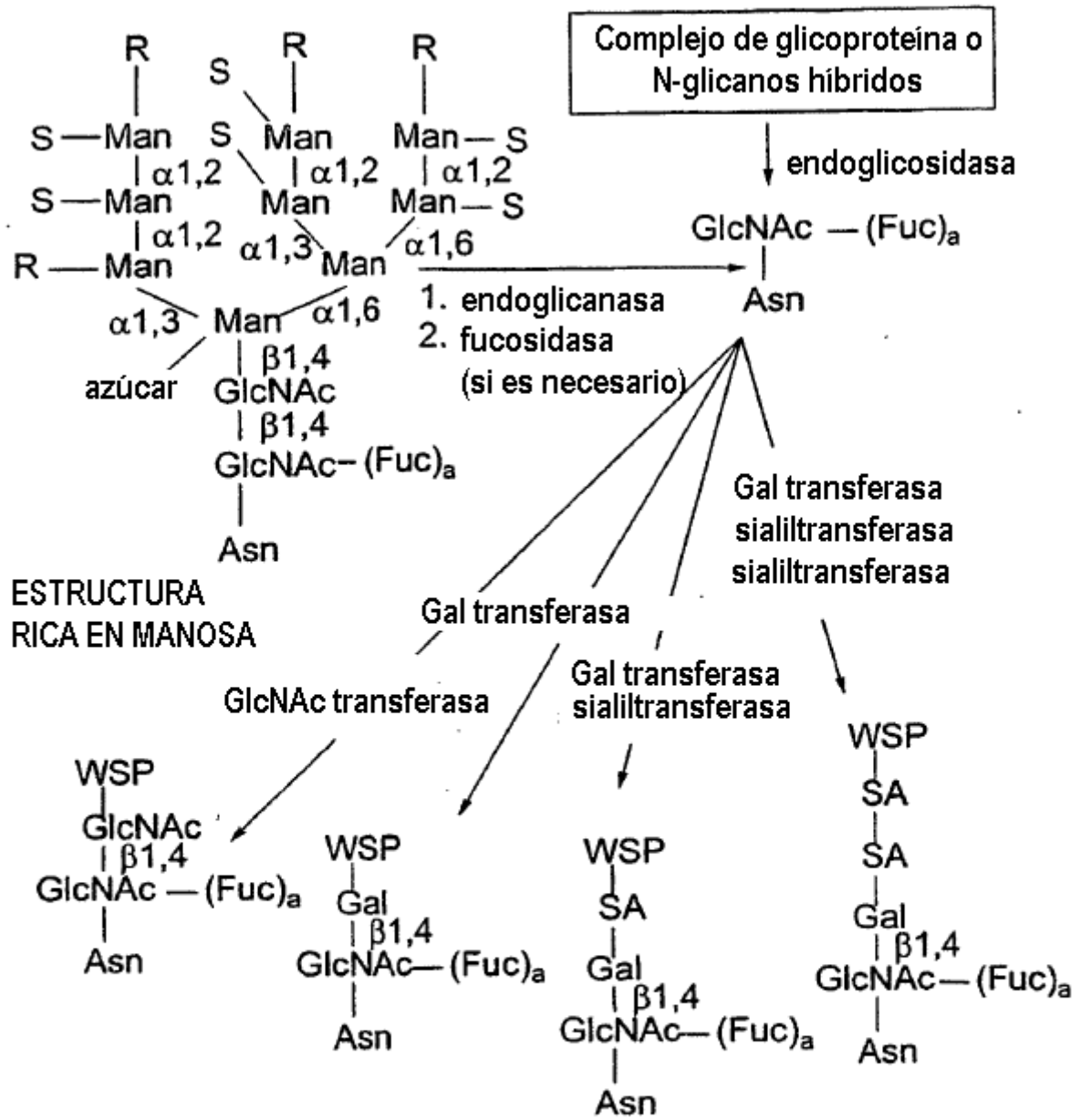
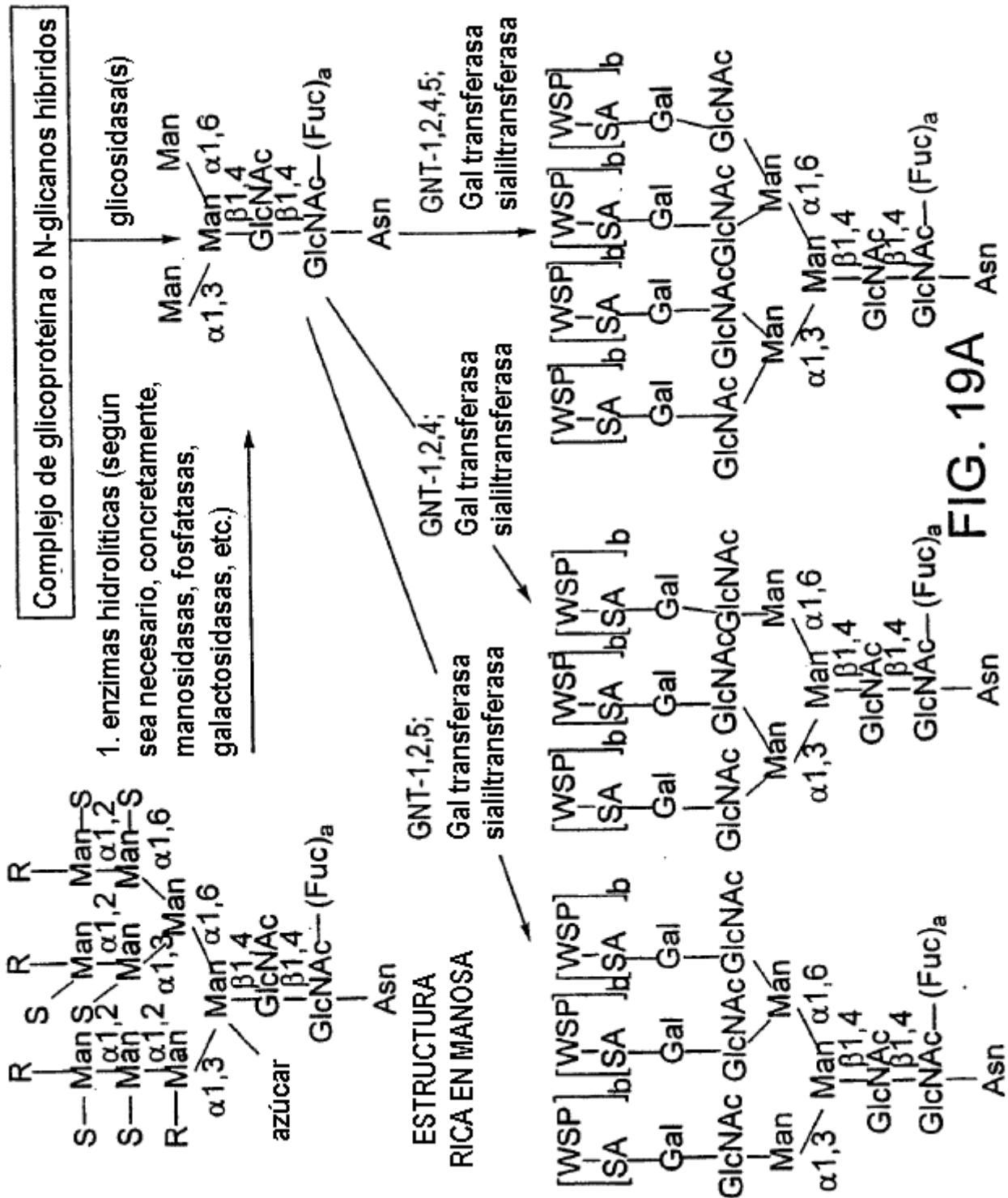


FIG. 17











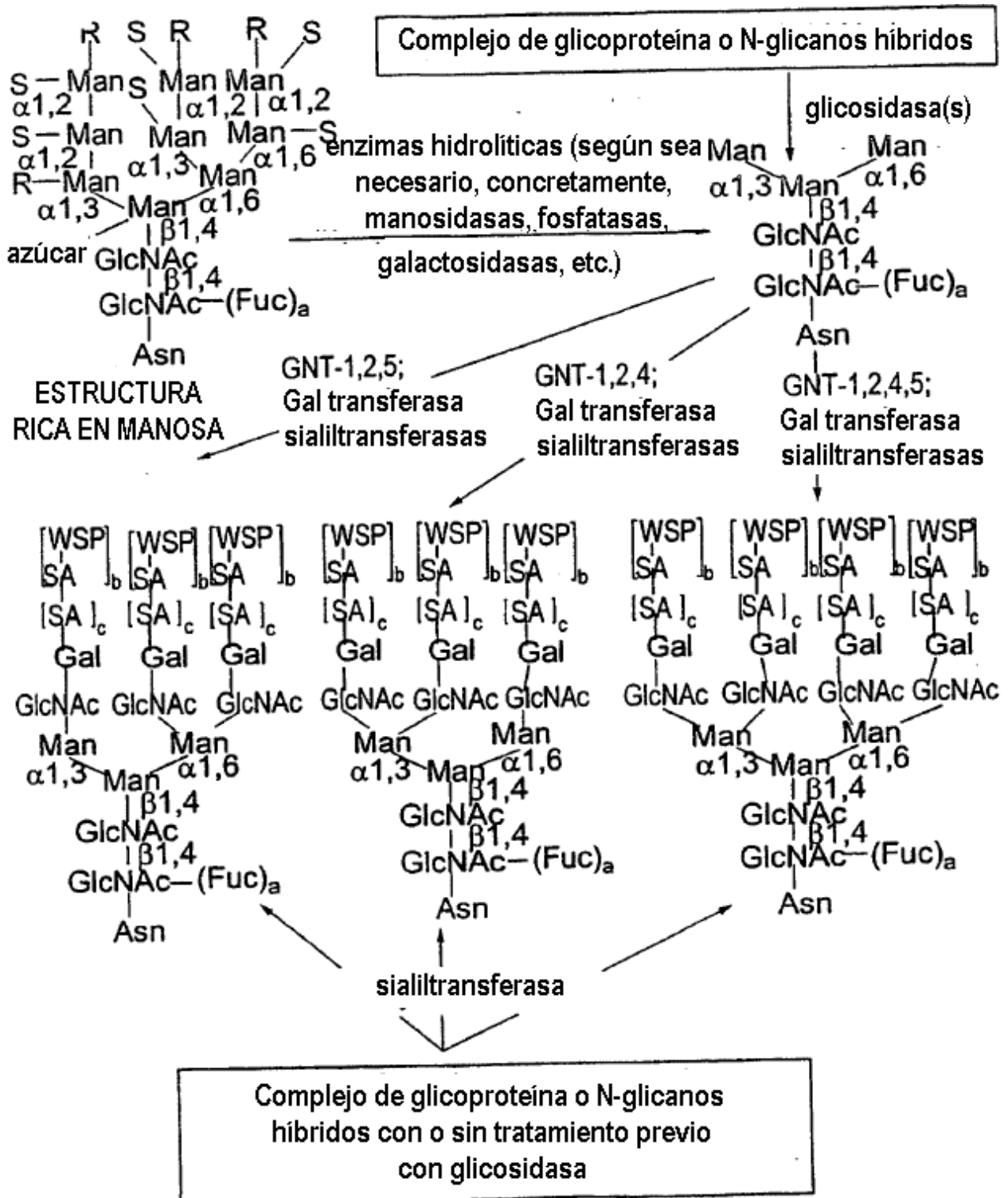


FIG. 20

OLIGOSACÁRIDOS O-LIGADOS

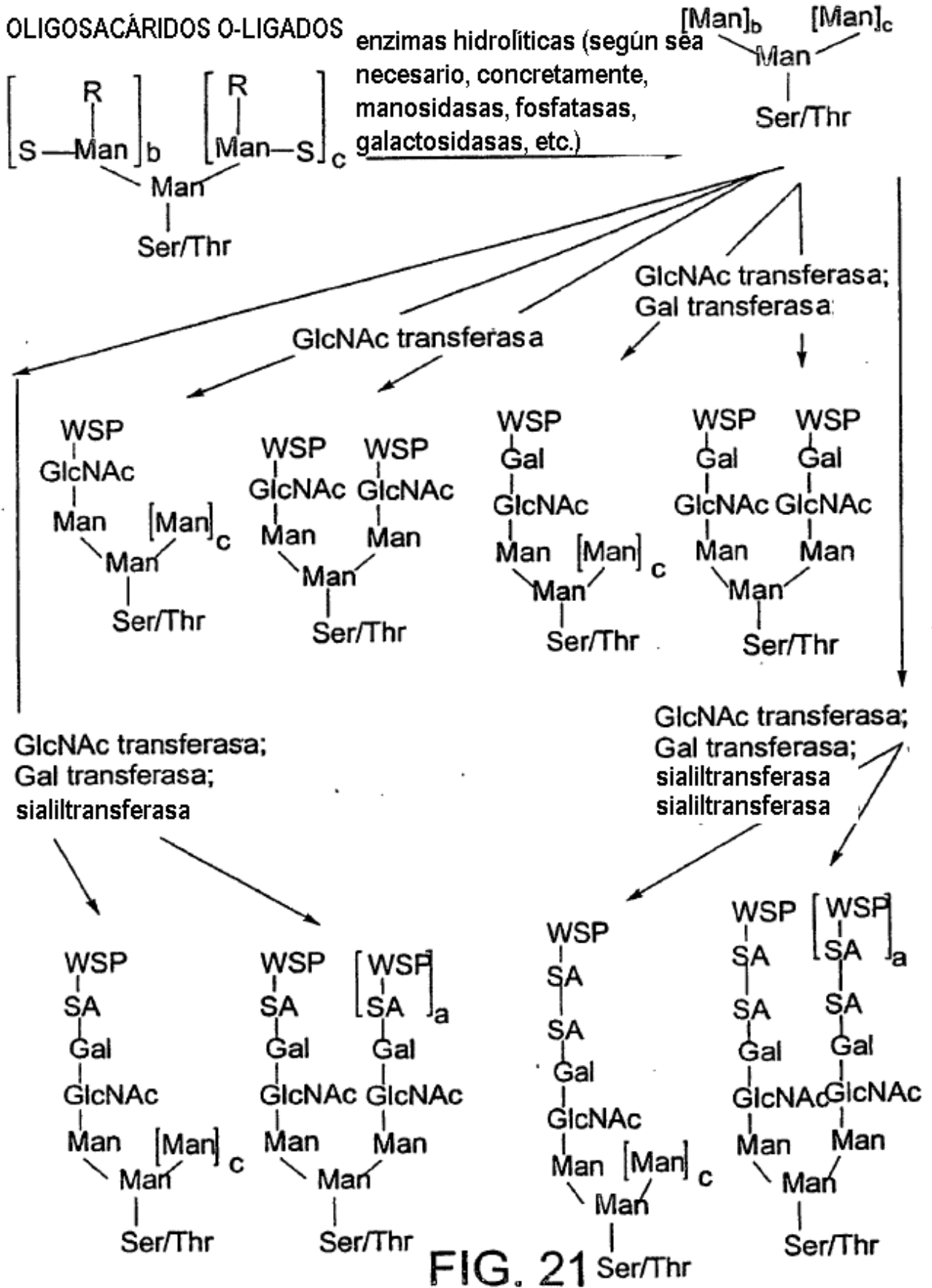
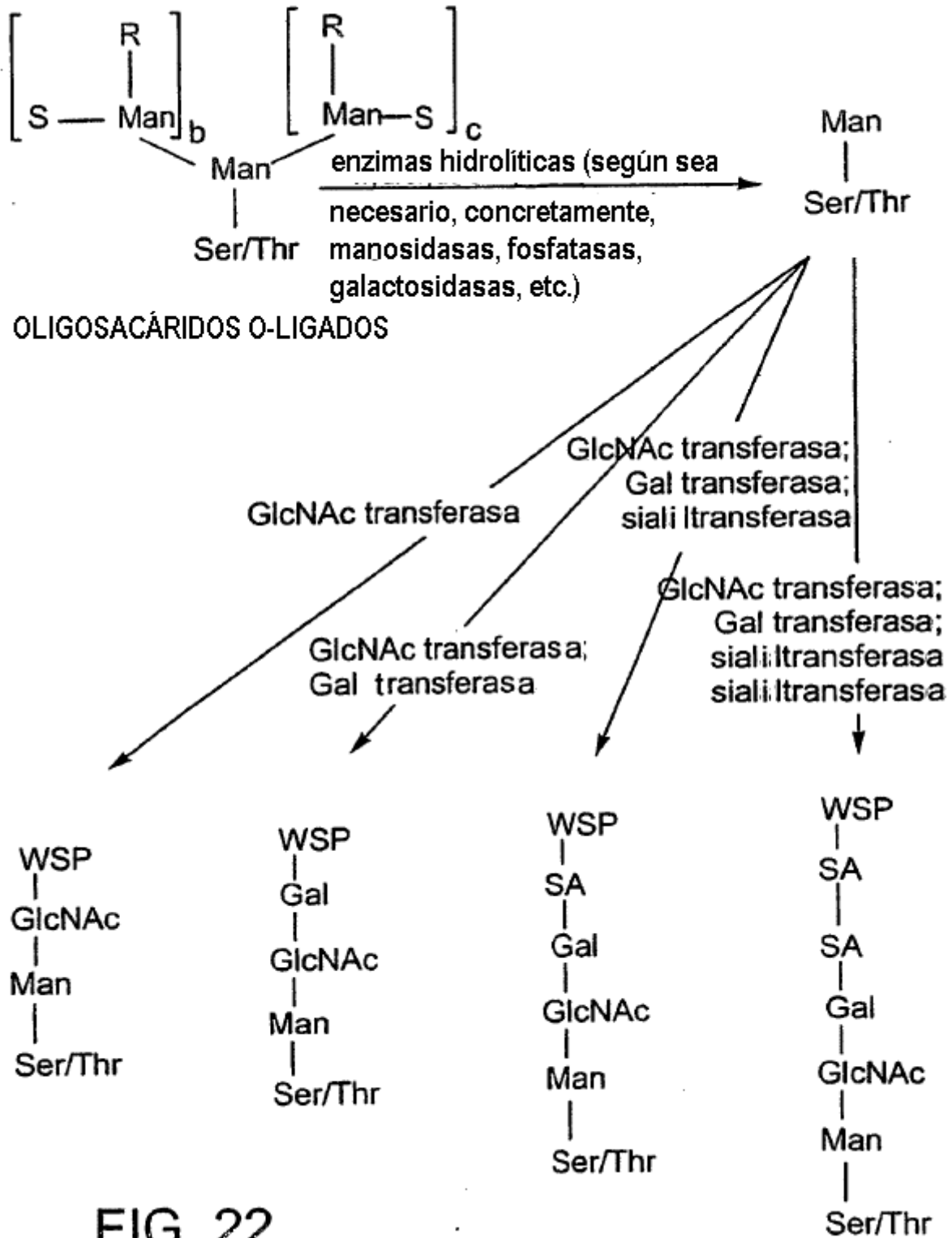


FIG. 21 Ser/Thr



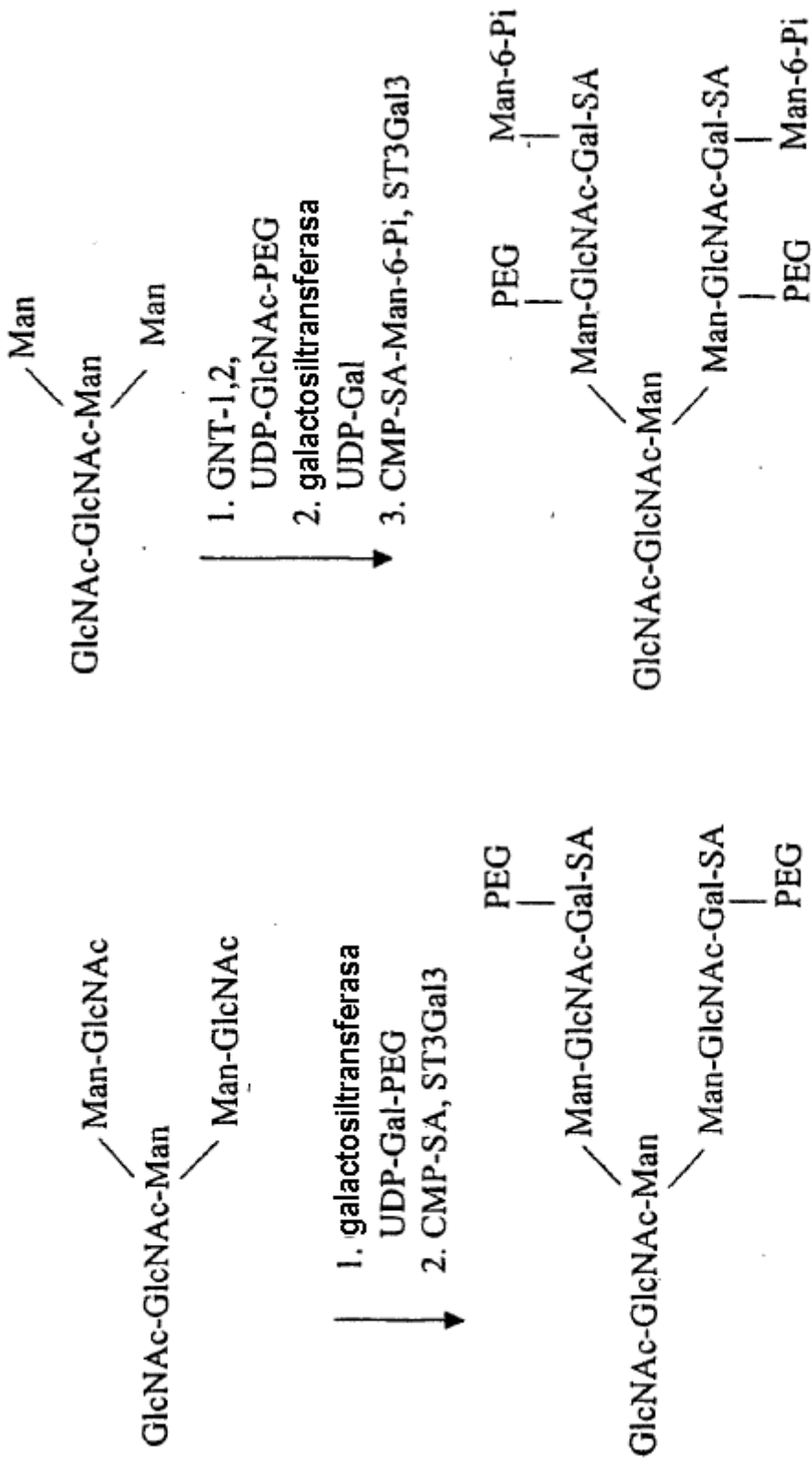


FIG. 23A

FIG. 23B

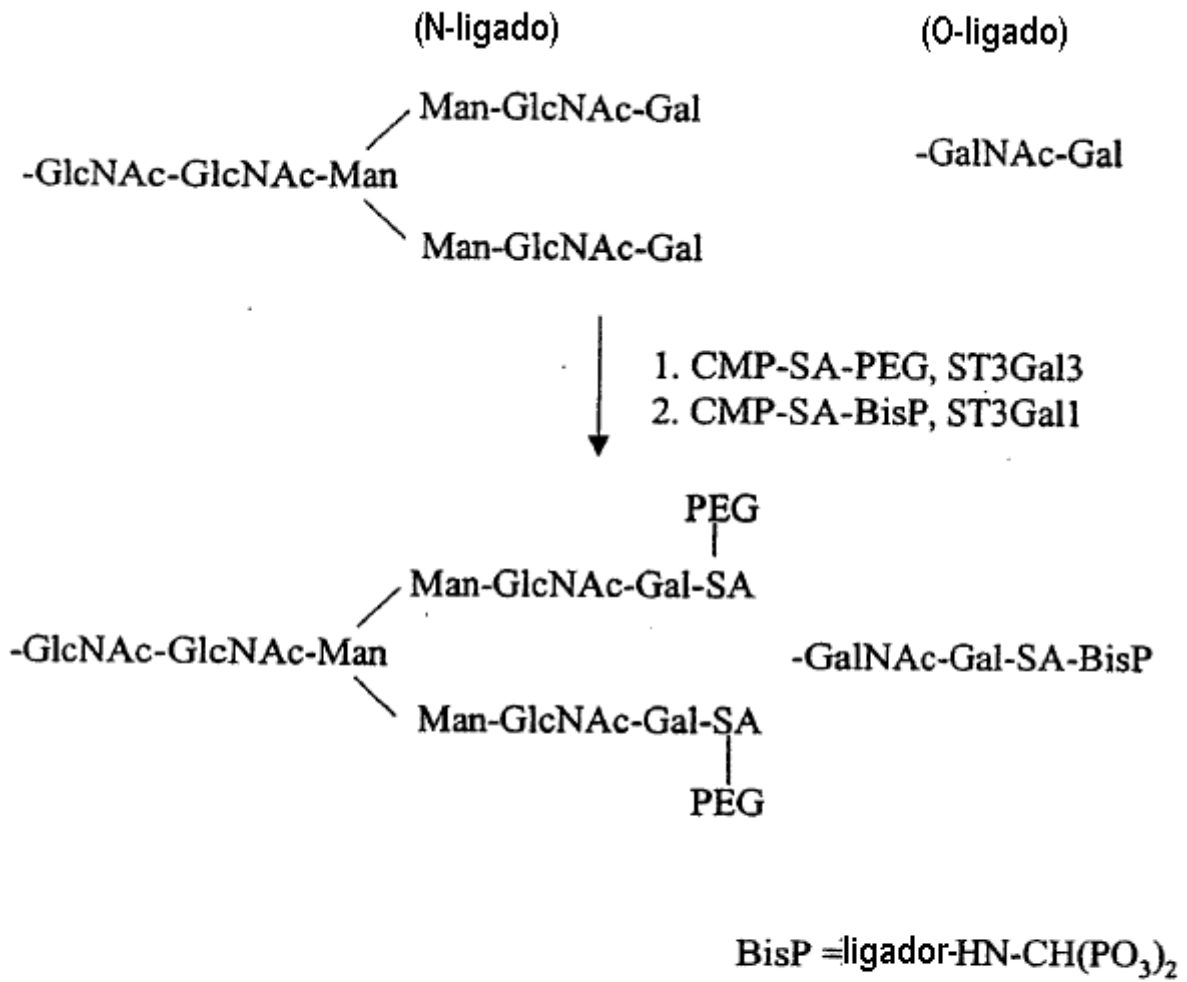


FIG. 23C



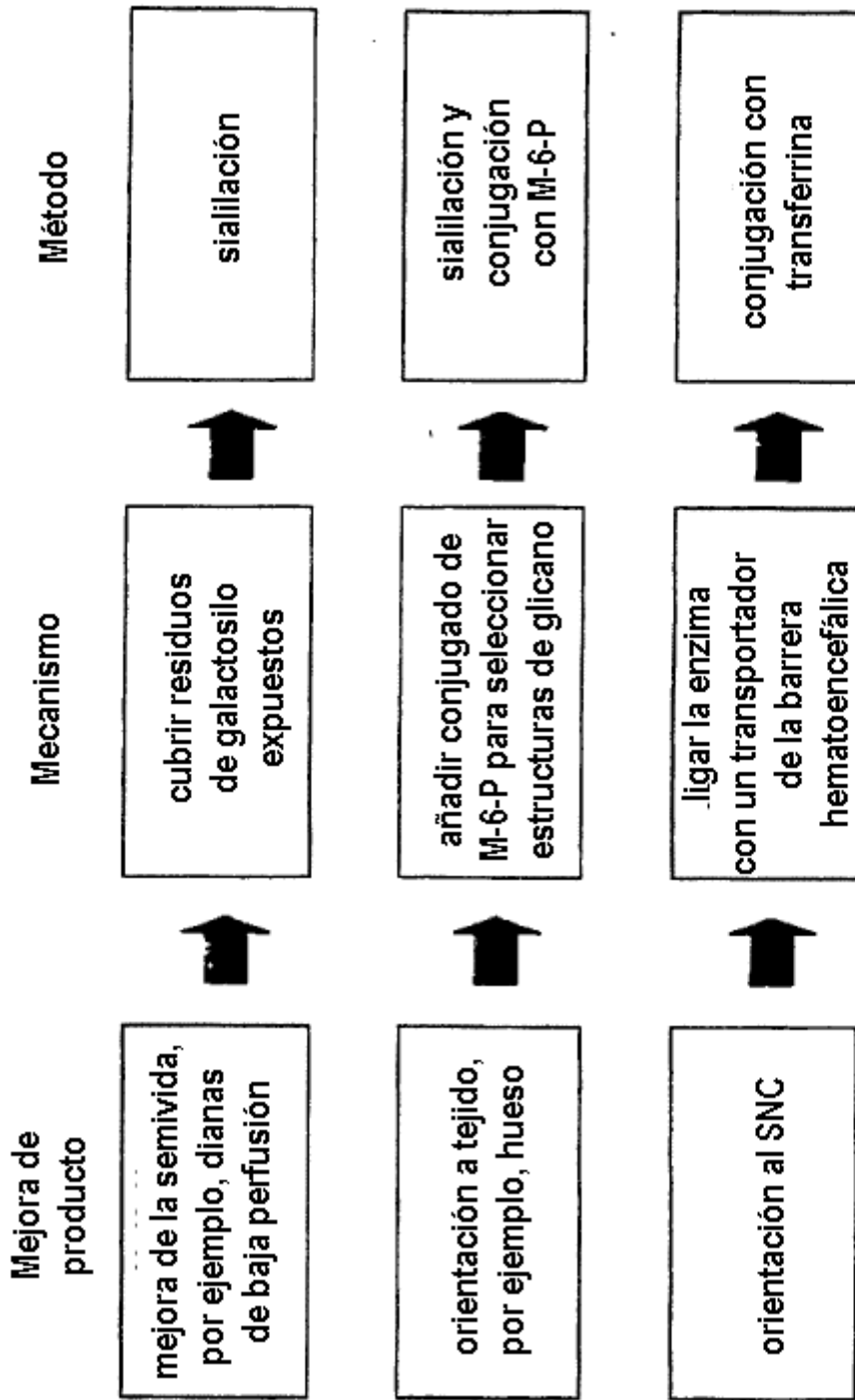


FIG. 24

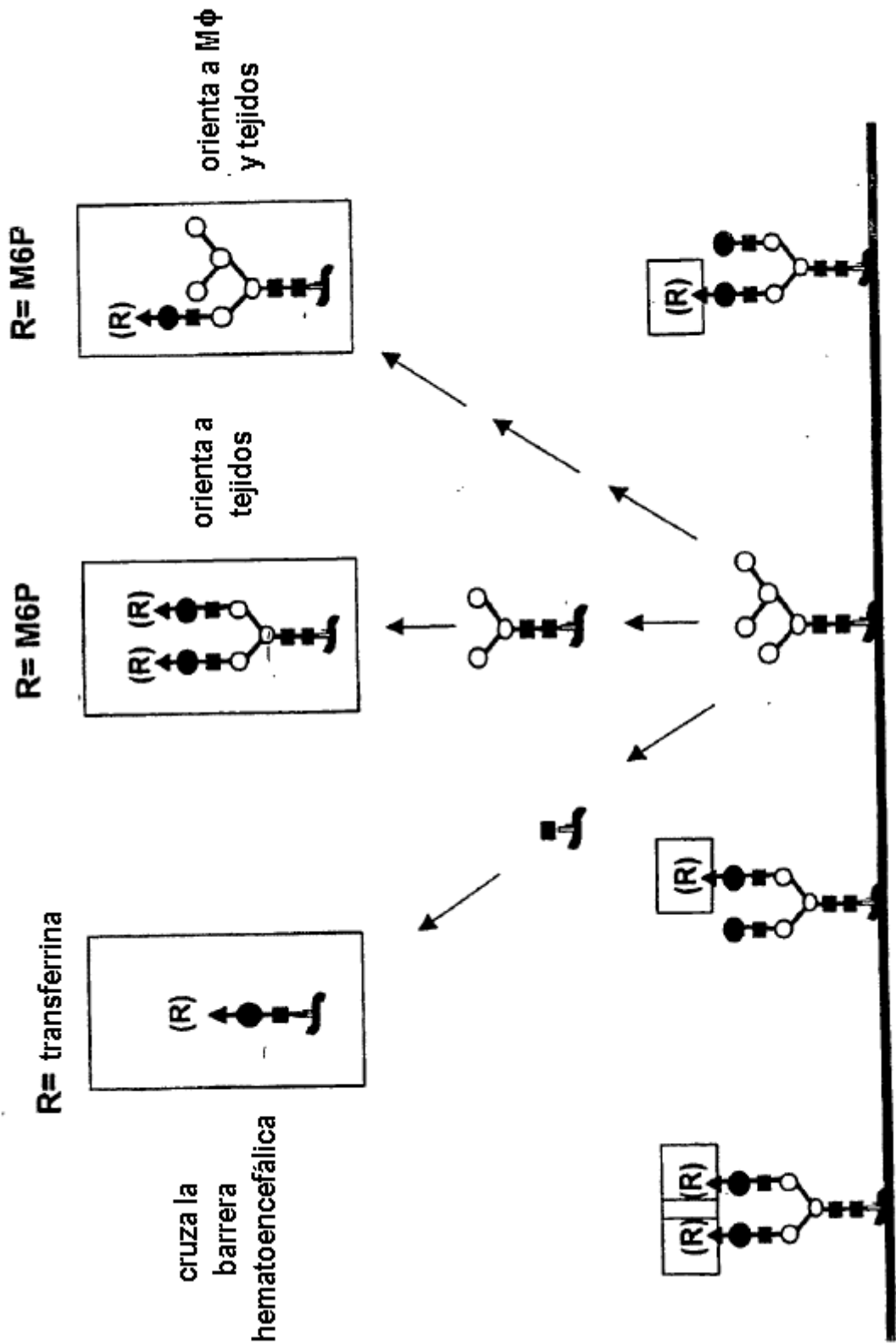


FIG. 25

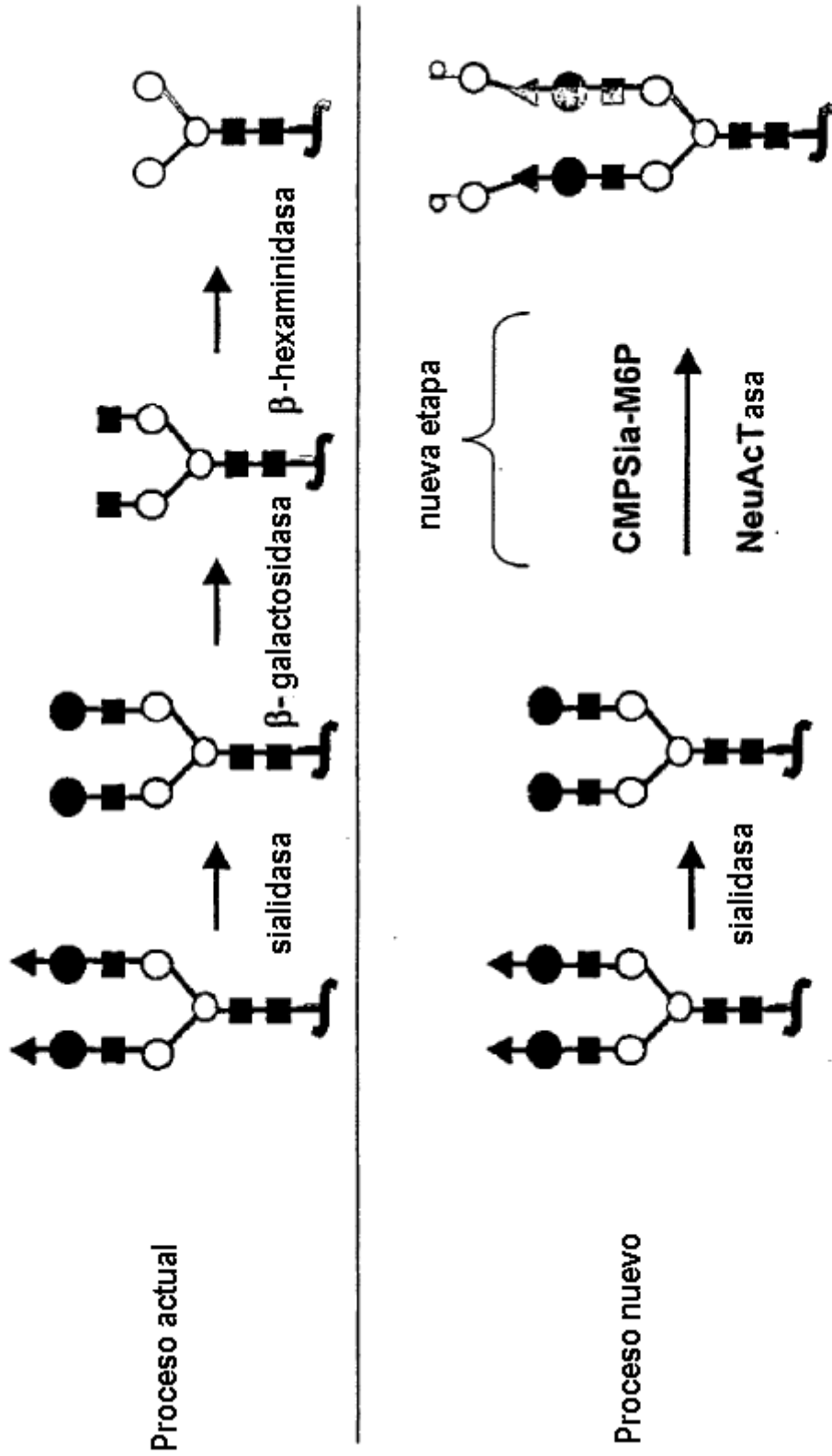


FIG. 26

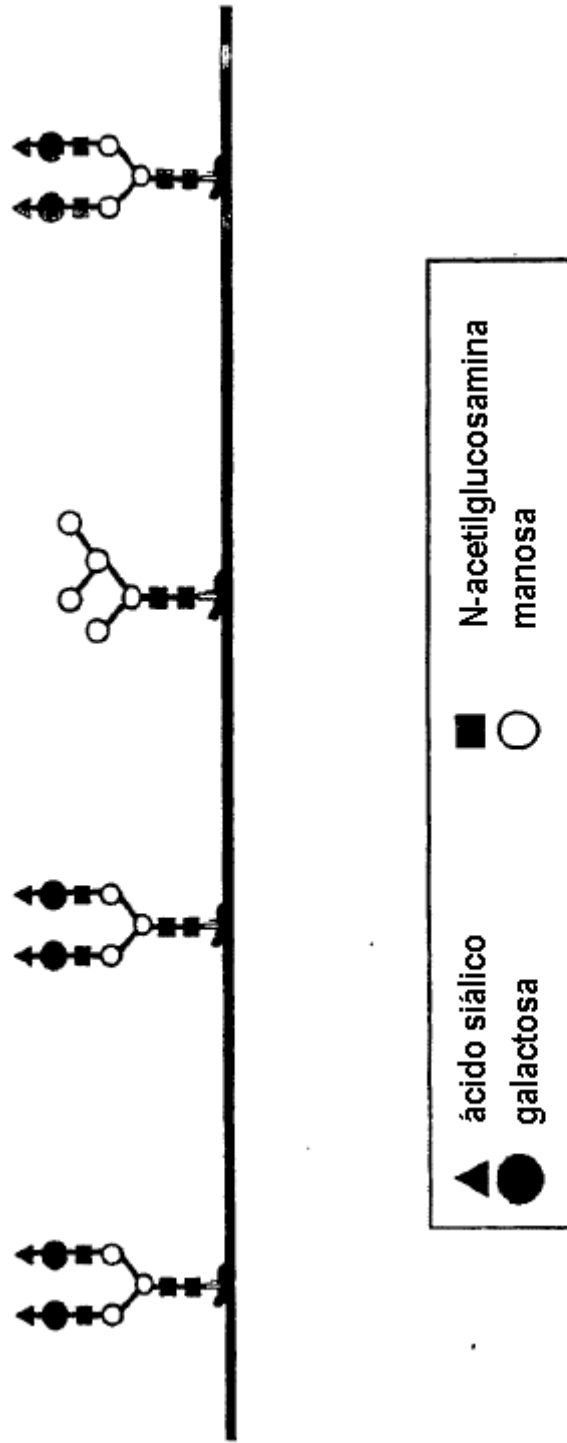
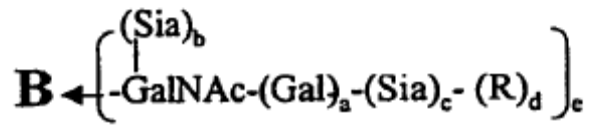
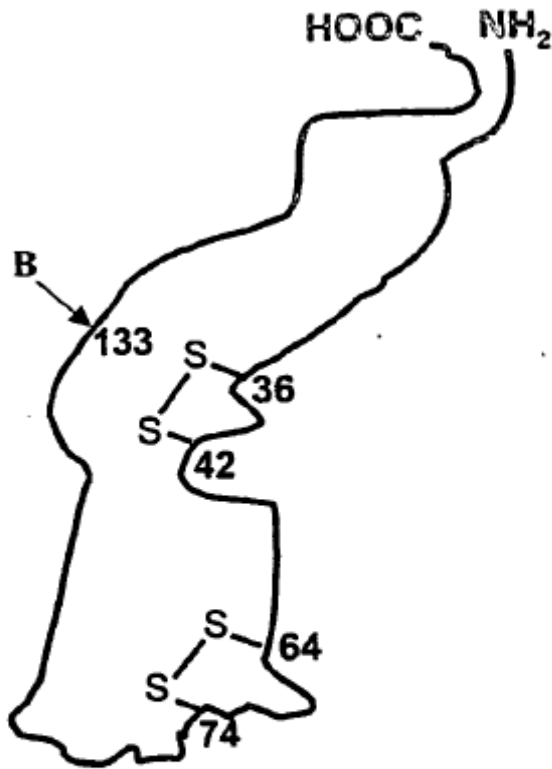


FIG. 27

Folistatina- Biotech Australia, Human Therapeutics	Glutamato descarboxilasa- Genzyme Transgenics
Folitropina alfa, Alkermes, ProLease, PowderJect, Serono, Akzo Nobel	Glicoproteína S3- Kureha
Folitropina beta, Bayer, Organon	GM-CSF, Immunex
FP59	Vacuna tumoral de GM-CSF, PowderJect
FSH- Ferring	GnRH inmunoterapéutica- Protherics
FSH + LH- Ferring	Goserelina (antagonista de LHRH)- AstraZeneca
F-espondina- CeNeS	Antígeno de gp75- ImClone
Sistema de suministro de proteína de fusión- UAB Research Foundation	gp96- Antigenics
Toxinas de fusión- Boston Life Sciences	GPI 0100- Galenica
G 5598- Genentech	GR 4991W93- GlaxoSmithKline
GA-II- Transkaryotic Therapies	Factor estimulante de colonias de granulocitos- Dong-A
Análogos de interferón gamma- SRC VB VECTOR	Conjugado de factor estimulante de colonias de granulocitos- terapia de alergia a la hierba- Dynavax
Ganirelix- Roche	GRF1-44- ICN
Lipasa gástrica- Meristem	Factor de crecimiento- Chiron, Atrigel, Atrix, Innogenetics, ZymoGenetics, Novo
Gavilimomab-	Péptidos de factor de crecimiento- Biotherapeutics
G-CSF- Amgen, SRC VB VECTOR	Hormona de crecimiento, LG
GDF-1- CeNeS	Hormona de crecimiento humana recombinante- Serono
GDF-5- Biopharm	GT 4086- Gliatech
GDNF (factor neurotrófico derivado de glía)- Amgen	GW-353430-GlaxoSmithKline
Gelsolina- Biogen	GW-278884- GlaxoSmithKline
Gemtuzumab ozogamicina- Celltech	H 11- Viventia Biotech
Epoetina alfa activada génicamente- Aventis Pharma- Transkaryotic Therapies	Vacuna del virus de la gripe A H5N1- Protein Sciences
Terapia génica de trombasterina de Glanzmann-	Hemoglobina- Biopure
Acetato de glatiramer- Yeda	Hemoglobina 3011 recombinante- Baxter Healthcare
Factor de crecimiento glial 2- CeNeS	Crosfumarilo de hemoglobina- Baxter Intl.
GLP-1- Amylin, Suntory, TheraTech Watson	Hemoglobina estabilizada- Ajinomoto
Glucagón- Eli Lilly, ZymoGenetics	Hemoglobina recombinante- Apex
Péptido 17-36-amida de tipo glucagón- Suntory	HAF- Immune response
Péptido de tipo glucagón- Amylin	Vacuna de hantavirus
Glucocerebrosidasa- Genzyme	HB 19
	HBNF- Regeneron
	HCC-1- Pharis
	hCG- Milkhaus

**FIG. 28L**



a-c, e (independientemente seleccionados)= 0 o 1;

d= 0;

R= grupo modificador, sialilo u oligosialilo

FIG. 29A

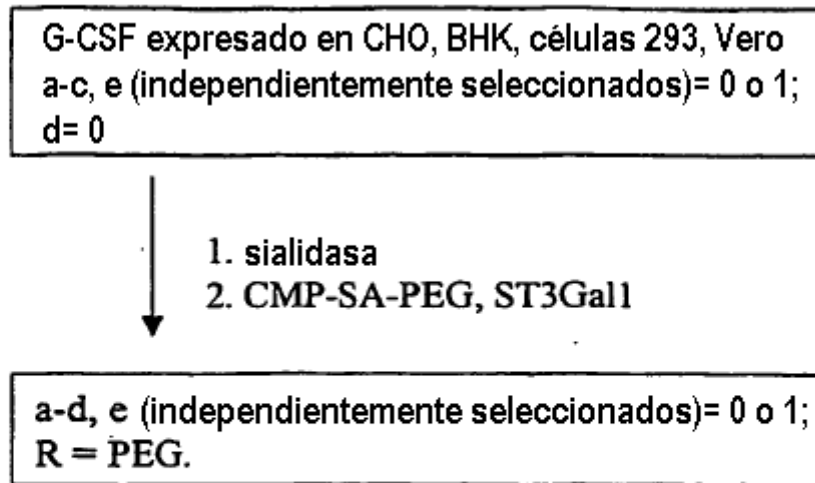


FIG. 29B

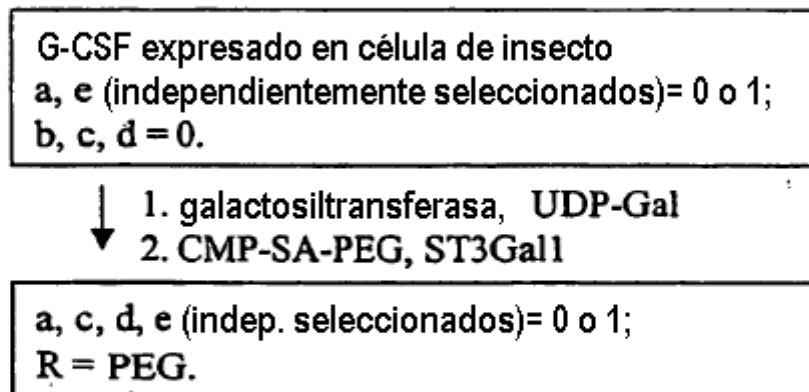


FIG. 29C

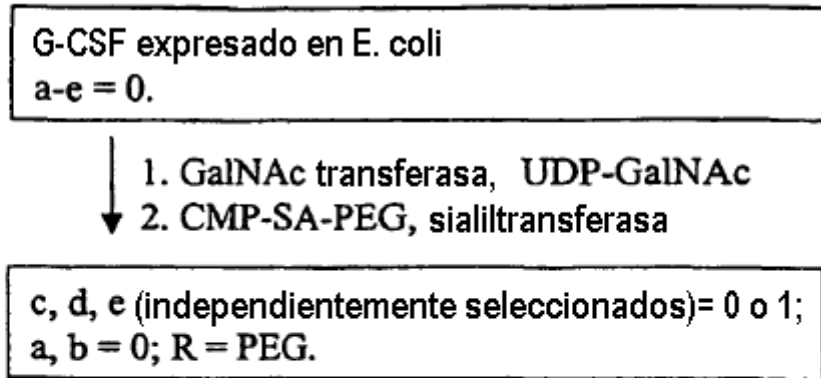


FIG. 29D

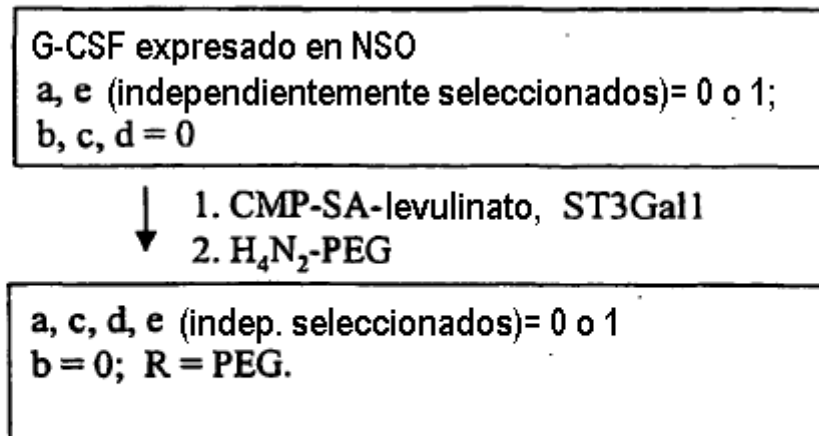


FIG. 29E



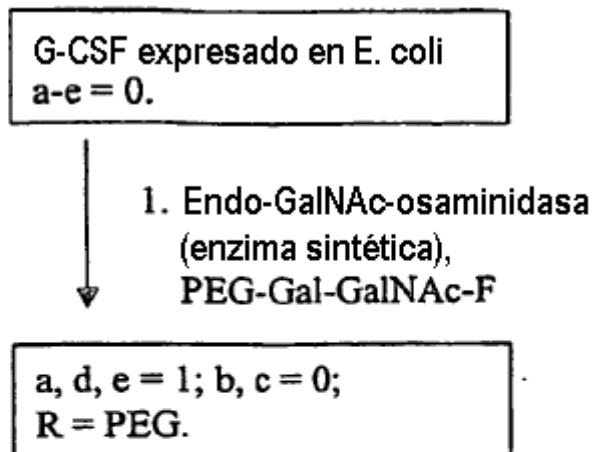


FIG. 29F

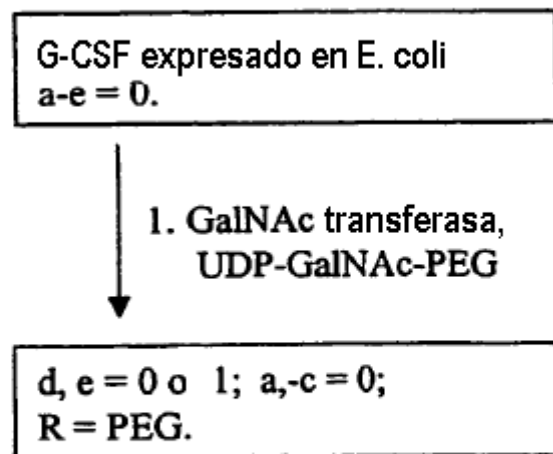


FIG. 29G

FIG. 58A

ACCCCCCTGGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAT  
 GCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAG  
 GAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGT  
 GCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTG  
 CCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATA  
 GCGGCCTTTTCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCT  
 CCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCC  
 ACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAAGTGGGAATGGCC  
 CCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCT  
 TTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAG  
 CTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCCCTG  
 A

FIG. 58B

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu  
 Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr  
 Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro  
 Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser  
 Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile  
 Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe  
 Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro  
 Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val  
 Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His  
 Leu Ala Gln Pro

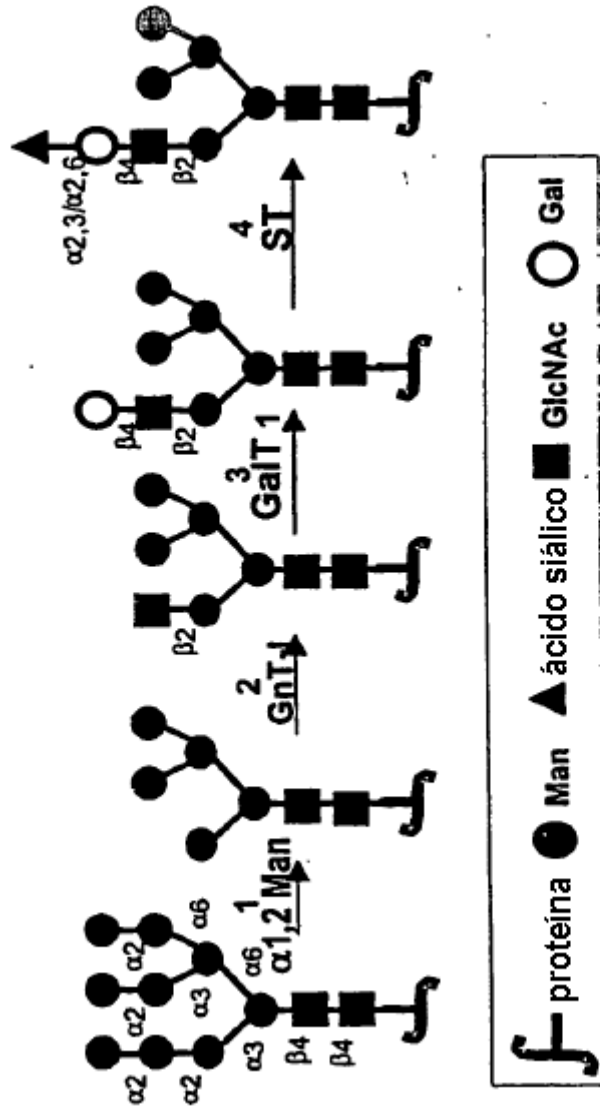


FIG. 181

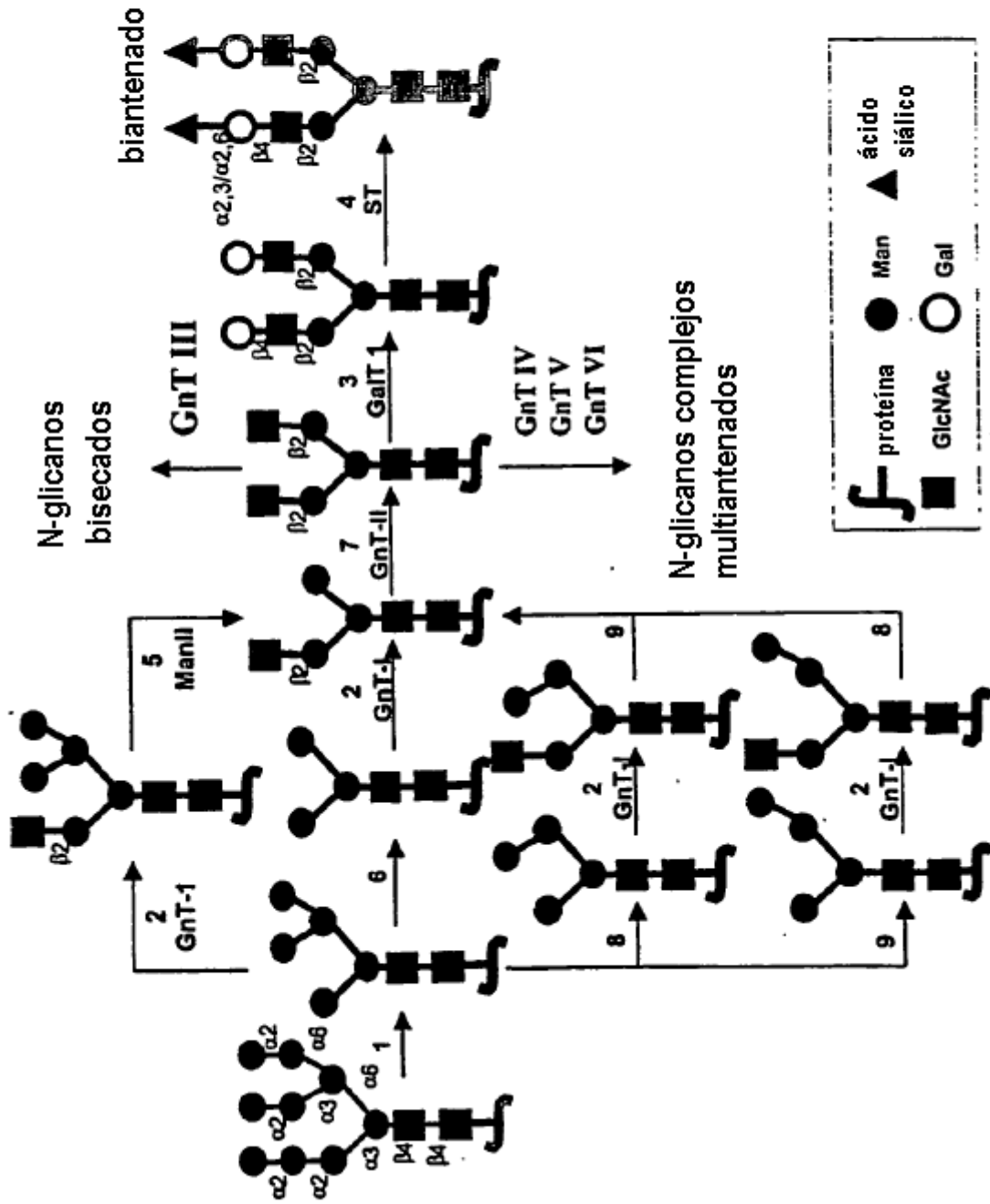


FIG. 188

