

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 093**

51 Int. Cl.:
C07K 14/61 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/18 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04751591 .1**
96 Fecha de presentación: **07.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1624847**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2006**

54 Título: **Composiciones y métodos para la preparación de mutantes de glucosilación de la hormona del crecimiento humana**

30 Prioridad:
09.05.2003 US 469114 P
13.08.2003 US 494751 P
14.08.2003 US 495076 P
08.01.2004 US 535290 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.05.2012

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

72 Inventor/es:
CLAUSEN, Henrik y
DEFREES, Shawn

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 380 093 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

Composiciones y métodos para la preparación de mutantes de glucosilación de la hormona del crecimiento humana.

Antecedentes de la invención

5 La Hormona del crecimiento humana (hGH) y las variantes agonistas de la misma son miembros de una familia de proteínas recombinantes descritas en la pat. de EE.UU. n° 4.658.021 y la pat. de EE.UU. n° 5.633.352. Su producción recombinante y métodos de uso se detallan en las pat. de EE.UU. n°s 4.342.832, 4.601.980; pat. de EE.UU. n° 4.898.830; pat. de EE.UU. n° 5.424.199; y pat. de EE.UU. n° 5.795.745. La hormona del crecimiento humana participa en diversos aspectos de la regulación del crecimiento y desarrollo humano normal. Por medio de la interacción con sus receptores, esta hormona hipofisaria de 22 kDa modula una multitud de efectos biológicos, tales como el crecimiento lineal (somatogénesis), lactación, activación de macrófagos, y efectos similares a la insulina y diabéticos. Chawla, *Annu. Rev. Med.*, **34**: 519 (1983); Edwards *et al.*, *Science*, **239**: 769 (1988); Isaksson *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.*, **47**: 483 (1985); Thomer y Vance, *J. Clin. Invest.*, **82**: 745 (1988); Hughes y Friesen, *Annu. Rev. Physiol.*, **47**: 469 (1985).

15 La administración de péptidos glicosilados y no glicosilados para provocar una respuesta fisiológica particular se conoce bien en la técnica médica. La hGH tanto purificada como recombinante se ha usado para tratar afecciones y enfermedades debidas a una deficiencia de hGH, p.ej., enanismo en niños. Un factor importante que ha limitado el uso de los péptidos terapéuticos es la naturaleza inmunógena de la mayoría de los péptidos. En un paciente, una respuesta inmunógena hacia un péptido administrado puede neutralizar el péptido y/o conducir al desarrollo de una respuesta alérgica en el paciente. Otras deficiencias de los glicopéptidos terapéuticos incluyen una potencia subóptima y velocidades de eliminación elevadas. Los problemas inherentes en los compuestos terapéuticos peptídicos se han reconocido en la técnica, y se han investigado diversos métodos para resolver estos problemas. Por ejemplo, para proporcionar compuestos terapéuticos de péptidos solubles, se han unido polímeros sintéticos al esqueleto peptídico.

25 Poli(etilenglicol) ("PEG") es un polímero ejemplar que se ha conjugado a polipéptidos. Se ha demostrado que el uso de PEG para derivatizar compuestos terapéuticos peptídicos reduce la inmunogenicidad de los péptidos. Por ejemplo, la pat. de EE.UU. n° 4.179.337 (Davis *et al.*) Se refiere a polipéptidos no inmunógenos, tales como enzimas y hormonas peptídicas acopladas a polietilén glicol (PEG) o polipropilén glicol. Se usan entre 10 y 100 moles de polímero por mol de polipéptido, y se mantiene al menos un 15% de la actividad fisiológica. Además, el tiempo de eliminación de la circulación se prolonga debido al tamaño incrementado del conjugado con PEG de los polipéptidos en cuestión. Los métodos descritos por Davis *et al.* son métodos de PEG-ilación química.

30 La modificación química de péptidos da como resultado con frecuencia una pérdida indeseable de actividad del péptido, que es atribuible a la naturaleza no selectiva de los procedimientos químicos utilizados para modificar el péptido. Por ejemplo, cuando el grupo modificador es un péptido hidrosoluble, p.ej. PEG, el modo principal de unión de PEG y de sus derivados a los péptidos es una unión inespecífica a través de un residuo de aminoácido del péptido. Los estudios de conjugados de polímeros hidrosolubles e interleucina-2 (Fisher *et al.*, *Br. J. Haematol.*, **82**: 654 (1992)), factor estimulante de colonias de granulocitos (Satake-Ishikawa *et al.*, *Cell Struct. Funct.*, **17**: 157 (1992)), factor de necrosis tumoral (Tsutsumi *et al.*, *Br. J. Cancer*, **71**: 963 (1996)) y hormona del crecimiento humana (Clark, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **271**:21969 (1996)) han revelado que la PEGilación química de estas proteínas disminuyen la actividad de unión al receptor in vivo de los péptidos.

40 En muchos métodos de PEGilación química, se añade poli(etilenglicol) de una manera básicamente aleatoria, inespecífica, a residuos reactivos de un esqueleto peptídico. Para la producción de péptidos terapéuticos, es claramente deseable utilizar una estrategia de derivatización que dé como resultado la formación de un producto marcado de manera específica, fácilmente caracterizable y esencialmente homogéneo. Una vía prometedora para preparar péptidos marcados de manera específica es por medio del uso de enzimas, tales como glicosiltransferasas, para unir un resto de carbohidrato modificado a un péptido.

45 Las síntesis basadas en enzimas tienen la ventaja de tener regioselectividad y estereoselectividad. Además, las síntesis enzimáticas se llevan a cabo mediante el uso de sustratos sin protección. Se usan tres clases principales de enzimas en la síntesis de carbohidratos, glicosiltransferasas (p.ej. sialiltransferasas, oligosacariltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas), y glicosidasas. Las glicosidasas se clasifican además como exoglicosidasas (p.ej., β -manosidasa, β -glucosidasa), y endoglicosidasas (p.ej., Endo-A, Endo-M). Cada una de estas tres clases de enzimas se ha usado con éxito sintéticamente para preparar carbohidratos. Para una revisión general, véase, Crout *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 98-111 (1998).

50 Las glicosiltransferasas modifican las estructuras de los oligosacáridos en los glicopéptidos, por lo que producen productos específicos con un buen control estereoquímico y regioquímico. Las glicosiltransferasas se usan para preparar oligosacáridos y para modificar estructuras de carbohidratos con unión en N y O terminales, en particular en glicopéptidos producidos en las células mamíferas. Por ejemplo, los oligosacáridos terminales de los glicopéptidos se han sialilado y/o fucosilado completamente para proporcionar estructuras de carbohidratos más consistentes, lo

que mejora la farmacodinámica del glicopéptido y una diversidad de otras propiedades biológicas. Por ejemplo, la β -1,4-galactosiltransferasa se usó para sintetizar lactosamina, un ejemplo de la utilidad de las glicosiltransferasas en la síntesis de carbohidratos (véase, p.ej., Wong *et al.*, *J. Org. Chem.* **47**: 5416-5418 (1982)). Además, numerosos procedimientos sintéticos han utilizado α -sialiltransferasas para transferir ácido siálico de ácido citidin-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico al 3-OH o 6-OH de galactosa (véase, p.ej., Kevin *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2**: 1359-1362 (1996)). Las fucosiltransferasas se usan en rutas sintéticas para transferir una unidad de fucosa de guanosin-5'-difosfocucosa a un hidroxilo específico de un sacárido aceptor. 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 avances recientes en la síntesis de glicoconjugados para uso terapéutico véase, Koeller *et al.*, *Nature Biotechnology* **18**: 835-841 (2000). Véanse además las patentes de EE.UU. nº 5.876.980; 6.030.815; 5.728.554; 5.922.577; y el documento WO/9831826.

Las glicosidasas también se han usado para preparar sacáridos. Las glicosidasas catalizan normalmente la hidrólisis de un enlace glicosídico. En condiciones adecuadas, sin embargo, se pueden usar para formar este enlace. La mayoría de glicosidasas usadas para la síntesis de carbohidratos son exoglicosidasas; la transferencia de glicosilo se da en el extremo no reductor del sustrato. La glicosidasa capta un donante de glicosilo en un intermedio glicosilo-enzima que es interceptado por el agua para proporcionar el producto de hidrólisis, o por un aceptor, para proporcionar un nuevo glicósido u oligosacárido. Una ruta ejemplar que usa una exoglicosidasa es las síntesis del trisacárido central de todos los glicopéptidos con unión en N, que incluyen la unión difícil de β -manósido, que se formó mediante la acción de la β -manosidasa (Singh *et al.*, *Chem. Commun.* 993-994 (1996)).

En otra aplicación ejemplar del uso de una glicosidasa para formar una unión glicosídica, se ha preparado una glicosidasa mutante en la que el aminoácido nucleófilo normal del sitio activo se cambia por un aminoácido no nucleófilo. Las enzimas mutantes no hidrolizan las uniones glicosídicas, pero todavía pueden formarlas. Las glicosidasas mutantes se usan para preparar oligosacáridos mediante el uso de un fluoruro de α -glicosilo donante y una molécula aceptora de glicósido (Withers *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.716.812). Aunque las glicosidasas mutantes son útiles para formar oligosacáridos libres, todavía se tiene que demostrar que tales enzimas son capaces de añadir donantes de glicosilo a polipéptidos glicosilados o no glicosilados, y tampoco se han usado estas enzimas con donantes de glicosilo inactivados.

Aunque su uso es menos habitual que el de las exoglicosidasas, las endoglicosidasas también se utilizan para preparar carbohidratos. Los métodos basados en el uso de las endoglicosidasas tiene la ventaja de que se transfiere un oligosacárido en vez de un monosacárido. Los fragmentos de oligosacáridos se han añadido a los sustratos mediante el uso de *endo*- β -N-acetilglucosaminas tales como *endo*-F, *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 también se aplican a la síntesis de glicopéptidos. Se ha publicado la síntesis de una glicofoma homogénea de ribonucleasa B (Witte K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 2114-2118 (1997)). El núcleo de manosa elevado de la ribonucleasa B se escindió mediante el tratamiento del glicopéptido con endoglicosidasa H. La escisión se dio de manera específica entre los dos residuos de GlcNAc del núcleo. El tetrasacárido sialil-Lewis X se reconstruyó después enzimáticamente en el sitio de anclaje de GlcNAc restante en la proteína ya homogénea mediante el uso secuencial de β -1,4-galactosiltransferasa, α -2,3-sialiltransferasa y α -1,3-fucosiltransferasa V. Cada etapa catalizada enzimáticamente se desarrolló con un rendimiento excelente.

También se conocen los métodos que combinan elementos sintéticos tanto químicos como enzimáticos. Por ejemplo, Yamamoto y colaboradores (*Carbohydr. Res.* **305**: 415-422 (1998)) informaron de la síntesis quimioenzimática del glicopéptido, Péptido T glicosilado, mediante el uso de una endoglicosidasa. El péptido N-acetilglucosaminilo se sintetizó mediante medios puramente químicos. El péptido posteriormente se elaboró enzimáticamente con el oligosacárido del glicopéptido de transferrina humana. La porción de sacárido se añadió al péptido tratándolo con una *endo*- β -N-acetilglucosaminidasa. El péptido glicosilado resultante fue muy estable y resistente a la proteólisis en comparación con el péptido T y N-acetilglucosaminil péptido T.

Se ha explorado el uso de glicosiltransferasas para modificar la estructura de un péptido con grupos indicadores. Por ejemplo, Brossmer *et al.* (patente de EE.UU. nº 5.405.753) describe la formación de un derivado de monofosfato de citidina ("CMP") marcado con fluorescencia de ácido siálico y el uso del glicósido fluorescente en un ensayo de la actividad sialil transferasa y para el marcaje fluorescente de superficies celulares, glicoproteínas y gangliósidos. Gross *et al.* (*Analyt. Biochem.* **186**: 127 (1990)) describe un ensayo similar. Bean *et al.* (patente de EE.UU. nº 5.432.059) describe un ensayo para trastornos por deficiencia de glicosilación que utilizan la reglicosilación de una proteína glicosilada de manera deficiente. La proteína deficiente se reglicosila con un glicósido de CMP marcado con fluorescencia. Cada uno de los derivados de ácido siálico fluorescentes se sustituye con el resto fluorescente en la posición 9 o en la amina que está acetilada normalmente en el ácido siálico. Los métodos que usan los derivados de ácido siálico fluorescentes son ensayos de la presencia de glicosiltransferasas o de glicoproteínas sin glicosilar o glicosiladas de manera inadecuada. Los ensayos se llevan a cabo con cantidades pequeñas de enzima o glicoproteína en una muestra de origen biológico. No se ha descrito o propuesto la derivatización enzimática de un péptido glicosilado o no glicosilado a escala preparativa o industrial mediante el uso de un ácido siálico modificado.

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

Los residuos de glicosilo también se han modificado para albergar grupos cetona. Por ejemplo, Mahal y colaboradores (*Science* **276**: 1125 (1997)) han preparado N-levulinoil manosamina ("ManLev"), que tiene una función cetona en la posición ocupada normalmente por el grupo acetilo en el sustrato natural. Las células se trataron con ManLev, por lo que se incorporó un grupo cetona en la superficie de las células. Véase 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).

Los carbohidratos se unen a los glicopéptidos de varias maneras, de las cuales las uniones en N a asparagina y las uniones en O de tipo mucina a serina y treonina son las más relevantes para los compuestos terapéuticos de glicoproteínas recombinantes. Un factor determinante para la iniciación de la glicosilación de una proteína es el contexto de la secuencia primaria, aunque otros factores desempeñan claramente un papel, lo que incluye la región de la proteína y la conformación. La glicosilación mediante unión en N se da en la secuencia consenso NXS/T, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina.

Los métodos discutidos anteriormente no proporcionan acceso a cantidades industrialmente relevantes de péptidos modificados, que mantengan sustancialmente la actividad farmacológica de sus análogos sin modificar. Además, los métodos no posibilitan la conjugación específica de sitio de un carbohidrato modificado hasta un péptido o glicopéptido. Los métodos tampoco proporcionan un medio para preparar péptidos modificados que estén glicosilados o gliconjugados en sitios que no son los naturales.

La presente descripción responde a estas necesidades proporcionando mutantes de hGH que contienen sitios de glicosilación con unión en N u O recién introducidos, lo que proporciona flexibilidad en la glicosilación y/o glicopegilación de estos mutantes de hGH recombinantes. Además, la invención proporciona un método industrialmente práctico para la modificación de péptidos de hGH mutantes con unión en N u O con grupos modificadores tales como polímeros hidrosolubles, restos terapéuticos, biomoléculas, y similares. Son de interés particular los métodos en los que la hGH mutante modificada tiene propiedades mejoradas, que potencian su uso como un agente terapéutico o diagnóstico.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas, proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una hormona del crecimiento humana mutante. La hormona del crecimiento humana mutante comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no está presente en la hormona del crecimiento humana de tipo natural, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15. En ciertas realizaciones, la hormona del crecimiento humana de tipo natural tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:1 o SEQ ID N°:2. En ciertas realizaciones preferidas, la hormona del crecimiento humana mutante incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un casete de expresión o una célula que comprende un ácido nucleico, p.ej., un ácido nucleico aislado, que incluye una secuencia polinucleotídica que codifica una hormona del crecimiento humana mutante. La hormona del crecimiento humana mutante incluye un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no está presente en la hormona del crecimiento humana de tipo natural, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una hormona del crecimiento humana mutante, que comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no está presente en la hormona del crecimiento humana de tipo natural, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15. En ciertas realizaciones, la hormona del crecimiento humana de tipo natural tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:1 o SEQ ID N°:2. En ciertas realizaciones preferidas, la hormona del crecimiento humana mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una hormona del crecimiento humana mutante, que comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no está presente en la hormona del crecimiento humana de tipo natural, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido

está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15. Este método incluye las etapas de producir de manera recombinante la hormona del crecimiento humana mutante, y glicosilar la hormona del crecimiento humana mutante en el sitio de glicosilación nuevo. En ciertas realizaciones, la hormona del crecimiento humana de tipo natural tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 o SEQ ID NO:2. En ciertas realizaciones preferidas, la hormona del crecimiento humana mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que tiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una hormona del crecimiento humana mutante que comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no está presente en la hormona del crecimiento humana de tipo natural, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15. En ciertas realizaciones, la hormona del crecimiento humana de tipo natural tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:1 o SEQ ID N°:2. En ciertas realizaciones preferidas, la hormona del crecimiento humana mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una hormona del crecimiento humana mutante en la fabricación de un medicamento para tratar una deficiencia de la hormona del crecimiento humana en un sujeto. El uso incluye administrar al sujeto una cantidad de una hormona del crecimiento humana mutante eficaz para tratar o mejorar la deficiencia de la hormona del crecimiento. La hormona del crecimiento humana mutante usada comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15. En ciertas realizaciones preferidas, la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 o SEQ ID NO:2. En ciertas realizaciones preferidas, la hormona del crecimiento humana mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

En cada uno de los aspectos descritos anteriormente, la hormona del crecimiento humana mutante está conjugada opcionalmente a uno o más grupos modificadores, preferiblemente a través de la glicoconjugación, lo que da lugar a un grupo ligador de glicosilo entre el sitio de glicosilación y el grupo modificador. Un grupo modificador ejemplar es poli(etilen glicol).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** son las secuencias de aminoácidos de GH-N (hGH derivada de hipófisis) y GH-V (hGH derivada de placenta). Las flechas indican la posición del aminoácido para la introducción mutacional de (GH-N) o un sitio de glicosilación con unión en N existente de forma natural (GH-V).

La **FIG. 2** es la representación de la estructura cristalina de una hGH mutante GH-N glicosilada (Lys140 a Asn140) y su polipéptido receptor.

La **FIG. 3** son esquemas de glicoPEGilación para mutantes con glicano unido en N de hGH producidos en células de insecto y células de mamífero.

La **FIG. 4** muestra la glicoPEGilación de un mutante con glicano unido en O de hGH producido en *Escherichia coli*.

La **FIG. 5** exhibe mutantes alternativos de GH-N para introducir sitios de glicosilación. Las flechas indican las regiones de los giros de la proteína de GH-N en los que se puede introducir un sitio de glicosilación.

La **FIG. 6** son las secuencias de aminoácidos de seis (6) sitios de glicosilación con unión en O diferentes que se pueden introducir en la hGH derivada de hipófisis (GH-N). También se muestra la secuencia de aminoácidos de tipo natural para GH-N como comparación. Las flechas indican el residuo de treonina del mutante de glicano GH-N en el que se dará la glicosilación con unión en O.

La **FIG. 7** son las secuencias de aminoácidos de un mutante GH-N con unión en O de hGH 134(rtg) → ttt y de un mutante GH-N 5' con unión en O de hGH en las que los aminoácidos -3 a -1 (ptt) se insertan en el extremo amino-terminal, lo que da como resultado un polipéptido de hGH de 194 de aminoácidos.

La **FIG. 8** son las secuencias de aminoácidos de un mutante GH-N con unión en O de hGH 134(rtg) → ttg y de un mutante GH-N 5' con unión en O de hGH en las que los aminoácidos -3 a -1 (mvt) se insertan en el extremo amino-terminal, lo que da como resultado un polipéptido de hGH de 194 de aminoácidos.

La **FIG. 9A** representa la secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento humana madura (GH-N) (SEQ ID N°:1). La **FIG. 9B** representa la secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento humana madura (GH-V)

(SEQ ID N°:2). La **FIG. 9C** representa la secuencia de aminoácidos del mutante 1 de la hormona del crecimiento humana (SEQ ID N°:3). La **FIG. 9D** representa la secuencia de aminoácidos del mutante 2 de la hormona del crecimiento humana (SEQ ID NO:4). La **FIG. 9E** representa la secuencia de aminoácidos del mutante 3 de la hormona del crecimiento humana (SEQ ID NO: 5). La **FIG. 9F** representa la secuencia de aminoácidos del mutante 4 de la hormona del crecimiento humana (SEQ ID NO:6). La **FIG. 9G** representa la secuencia de aminoácidos del mutante 5 de la hormona del crecimiento humana (SEQ ID NO:7). La **FIG. 9H** representa la secuencia de aminoácidos del mutante 6 de la hormona del crecimiento humana (SEQ ID NO:8). La **FIG. 9I** representa la secuencia de aminoácidos del mutante 7 de la hormona del crecimiento humana (SEQ ID NO:9).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 Definiciones

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite de manera específica, el término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique de otra manera, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente las variantes modificadas de manera conservativa de la misma (p.ej., sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNPs, y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. De forma específica, las sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o de todos ellos) está sustituida con residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* **19**:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* **260**:2605-2608 (1985); y Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* **8**:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se usa de manera intercambiable con gen, cADN, y mRNA codificado por un gen.

El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica. Puede incluir las regiones precedentes y posteriores a la región codificante (líder y tráiler), así como las secuencias intermedias (intrones) entre los segmentos codificantes individuales (exones).

El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o proteína está esencialmente exento de otros componentes celulares con los que está asociado en el estado natural. Preferiblemente, está en un estado homogéneo, aunque puede estar en seco o en disolución acuosa. La pureza y la homogeneidad se determinan en general mediante el uso de técnicas de química analítica tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado está separado de los marcos de lectura abiertos que flanquean el gen, y que codifican una proteína diferente del gen de interés. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel de electroforesis. En particular, significa que el ácido nucleico o proteína tiene una pureza de al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 95%, y lo más preferiblemente al menos un 99%.

El término aminoácido se refiere a los aminoácidos naturales y a los aminoácidos sintéticos, así como a los análogos de aminoácidos y a las moléculas miméticas de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, p.ej., hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que los aminoácidos naturales, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, p.ej., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (p.ej., norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Las "moléculas miméticas de aminoácidos" se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido natural.

Existen diversos métodos conocidos en la técnica que permiten la incorporación de un derivado o análogo de aminoácido que no es natural en una cadena polipeptídica de una manera específica de sitio, véase, p.ej., el documento WO 02/086075.

Los aminoácidos se pueden denominar en la presente memoria mediante los símbolos de tres letras conocidos comúnmente o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, de forma similar, se pueden denominar por sus códigos de una letra aceptados comúnmente.

"Variantes modificadas de manera conservativa" es aplicable tanto a las secuencias de aminoácidos como a las secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos particulares, "variantes modificadas de manera conservativa" se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, res-

pecto de secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican una proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Así, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón se puede alterar hasta cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de los ácidos nucleicos son "variaciones sinónimas", que son una especie de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente memoria que codifica un polipéptido también describe cada variación sinónima posible del ácido nucleico. Un experto en la técnica reconocerá que cualquier codón de un ácido nucleico (excepto AUG, que generalmente es el único codón para metionina, y TGG, que generalmente es el único codón para triptófano) se puede modificar para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. Por lo tanto, cada variación sinónima de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Como con las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o secuencia de proteína que altere, añada o elimine un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservativa" en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen muy bien en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservativa son adicionales, y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos interespecie, y alelos de la invención.

Los ocho grupos siguientes contienen cada uno los aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

(véase, p.ej., Creighton, *Proteins* (1984)).

Los aminoácidos se pueden denominar en la presente memoria mediante los símbolos de tres letras conocidos comúnmente o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, de forma similar, se pueden denominar por sus códigos de una letra aceptados comúnmente.

En la presente solicitud, los residuos de aminoácidos se numeran según sus posiciones relativas desde el residuo más a la izquierda, que se numera con el número 1, en una secuencia polipeptídica de tipo natural.

"Próximo a un residuo de prolina", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un aminoácido que está a una distancia menor de alrededor de 10 aminoácidos de un residuo de prolina, preferiblemente, a una distancia menor de alrededor de 9, 8, 7, 6 ó 5 aminoácidos de un residuo de prolina, más preferiblemente, a una distancia menor de alrededor de 4, 3, 2 o residuos de un residuo de prolina. El aminoácido "próximo a un residuo de prolina" puede estar en el lado C- o N-terminal del residuo de prolina.

"Polipéptido", "péptido", y "proteína" se usan de manera intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los tres términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son una molécula mimética química artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos que se dan de manera natural y polímeros de aminoácidos que no se dan de manera natural. Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones abarcan las cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, que incluyen proteínas de tamaño completo, en las que los residuos de aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos covalentes.

El término "mutar" o "mutación", tal como se usa en el contexto de la introducción de sitio(s) de glicosilación con unión en N u O adicional(es) en una hormona del crecimiento humana de tipo natural, se refiere a la deleción, inserción, o sustitución de cualquier nucleótido o residuo de aminoácido, mediante medios químicos, enzimáticos o de otro tipo, en una secuencia polinucleotídica que codifica una hormona del crecimiento humana de tipo natural o la secuencia de aminoácidos de una hormona del crecimiento humana de tipo natural, respectivamente, de forma que la secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento humana resultante comprende al menos un sitio de

glicosilación con unión en N u O que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente. En el caso de la sustitución de aminoácidos, las sustituciones conservativas y no conservativas se pueden usar para crear un mutante de hGH que contiene un sitio de glicosilación con unión en N u O nuevo.

5 El sitio para una mutación que introduce un sitio de glicosilación con unión en N u O nuevo puede estar localizado en cualquier parte del polipéptido. Las secuencias de aminoácidos ejemplares para los mutantes de la hormona del crecimiento humana se representan en SEQ ID N°s:3-9. Una "hormona del crecimiento humana mutante" de esta invención, así, comprende al menos un residuo de aminoácido mutado. Por otra parte, la hormona del crecimiento humana de tipo natural cuya secuencia codificante se modifica para generar una hormona del crecimiento humana mutante se denomina en esta solicitud "la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente". Por ejemplo, SEQ ID N°:1 es la secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente para las hormonas del crecimiento humanas mutantes que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s:3-9.

15 El término "cantidad eficaz", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad que produce los efectos terapéuticos para los que se administra la sustancia. Los efectos incluyen la prevención, corrección, o inhibición de la progresión de los síntomas de una enfermedad/afección y las complicaciones relacionadas en cualquier grado detectable. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento y será determinable por un experto en la técnica mediante el uso de métodos conocidos (véase, p.ej., Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); y Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "carbohidrato modificado" se refiere a un carbohidrato natural o no natural que se añade enzimáticamente en un residuo de aminoácido o un residuo de glicosilo de un péptido en un procedimiento de la invención. El carbohidrato modificado se selecciona de varios sustratos enzimáticos que incluyen, pero sin limitación, nucleótidos de carbohidratos (mono-, di-, y trifosfatos), carbohidratos activados (p.ej., haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo) y carbohidratos que ni están activados ni son nucleótidos. El "carbohidrato modificado" se funcionaliza de manera covalente con un "grupo modificador". Los grupos modificadores útiles incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, biomoléculas y similares. El grupo modificador preferiblemente no es un carbohidrato natural, o un carbohidrato sin modificar. El lugar de la funcionalización con el grupo modificador se selecciona de tal manera que no impida que el "carbohidrato modificado" sea añadido enzimáticamente a un péptido.

30 El término "hidrosoluble" se refiere a restos que tienen cierto grado detectable de solubilidad en agua. Los métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua se conocen muy bien en la técnica. Los polímeros hidrosolubles ejemplares incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mixtas o estar compuestos de un único aminoácido, p.ej., poli(lisina). Un polisacárido ejemplar es poli(ácido siálico). Un poli(éter) ejemplar es poli(etilen glicol), p.ej., m-PEG. La poli(etilen imina) es una poliamina ejemplar, y el poli(ácido acrílico) es un poli(ácido carboxílico) representativo.

40 El esqueleto polimérico del polímero hidrosoluble puede ser poli(etilen glicol) (es decir, PEG). Sin embargo, se debería entender que también son adecuados otros polímeros relacionados para el uso en la práctica de esta invención, y que el uso del término PEG o poli(etilen glicol) pretende incluir, y no excluir, a este respecto. El término PEG incluye poli(etilen glicol) en cualquiera de sus formas, que incluyen alcoxil PEG, PEG difuncional, PEG con múltiples brazos, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG pendiente (es decir, PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales que penden del esqueleto polimérico), o PEG con uniones degradables en él.

45 El esqueleto polimérico puede ser lineal o ramificado. Los esqueletos poliméricos ramificados se conocen en general en la técnica. Generalmente, un polímero ramificado tiene un resto con un núcleo de rama central y una diversidad de cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo de la rama central. PEG se usa habitualmente en formas ramificadas que se pueden preparar mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. El resto de la rama central puede derivar también de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilen glicol) ramificado se puede representar en una forma general como R(-PEG-OH)_m, en la que R representa el resto del núcleo, tal como glicerol o pentaeritritol, y m representa el número de brazos. Las moléculas de PEG con múltiples brazos, tales como las descritas en la pat. de EE.UU. n° 5.932.462, que se incorpora como referencia en la presente memoria en su totalidad, también se pueden usar como esqueleto del polímero.

55 Otros muchos polímeros también son adecuados para la invención. Los esqueletos poliméricos no peptídicos e hidrosolubles, con 2 a alrededor de 300 extremos, son especialmente útiles en la invención. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, otros poli(alquilen glicoles), tales como poli(propilen glicol) ("PPG"), copolímeros de etilen glicol y propilen glicol y similares, poli(poliol oxetilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli(α-hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), tales como los descritos en la pat. de EE.UU. n° 5.629.384, que se incorpora como referencia en la presente memoria en su totalidad, y copolímeros, terpolímeros, y mezclas de los mismos. Aunque el peso molecular de cada cadena del esqueleto de polímero puede variar, normalmente está en el intervalo de alrededor de 100 Da a alrededor de 100.000 Da, a menudo de alrededor de 6.000 Da a alrededor de 80.000 Da.

El "área bajo la curva" o "ABC", tal 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 la circulación sistémica en el paciente como una función del tiempo de cero al infinito.

5 El término "semivida" o " $t_{1/2}$ ", tal 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 eliminación, redistribución, y otros mecanismos muy conocidos en la técnica. Normalmente, las semividas alfa y beta se definen de manera que la fase alfa está asociada a la redistribución, y la fase beta está asociada a la eliminación. Sin embargo, con los fármacos proteicos que, en su mayor parte, están confinados en el torrente sanguíneo, puede haber como mínimo dos semividas de eliminación. Para algunos péptidos glicosilados, la eliminación de la fase beta rápida puede estar mediada a través de receptores en los macrófagos, o células endoteliales que reconocen la lactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa, o fucosa terminales. La eliminación de fase beta más lenta se puede dar por medio de la filtración glomerular renal para moléculas con un radio efectivo < 2 nm (aproximadamente 68 kD) y/o la captación y el metabolismo específico o inespecífico en los tejidos. La glicoPEGilación puede tapar los carbohidratos terminales (p.ej., galactosa o N-acetilgalactosamina), y por lo tanto bloquear la eliminación de fase alfa rápida por medio de receptores que reconocen estos carbohidratos. También puede conferir un radio efectivo más largo, y por lo tanto disminuir el volumen de distribución y la captación tisular, por lo que se prolonga la fase beta tardía. Así, el impacto exacto de la glicoPEGilación sobre las semividas de la fase alfa y la fase beta variará dependiendo del tamaño, el estado de glicosilación, y otros parámetros, tal como se conoce en la técnica. Una explicación adicional de la "semivida" se halla en Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin y RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Ámsterdam, págs. 101 - 120).

25 El término "glicoconjugación", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la conjugación mediada enzimáticamente de una especie de carbohidrato modificado en un residuo de aminoácido o glicosilo de un polipéptido, p.ej., una hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención. Un subgénero de la "glicoconjugación" es la "glicol-PEGilación", en la que el grupo modificador del carbohidrato modificado es poli(etilen glicol), y un derivado de alquilo (p.ej., m-PEG) o derivado reactivo (p.ej., H_2N -PEG, $HOOC$ -PEG) del mismo.

Las expresiones "a gran escala" y "a escala industrial" se usan de manera intercambiable y se refieren a un ciclo de reacciones que produce al menos alrededor de 250 mg, preferiblemente al menos alrededor de 500 mg, y más preferiblemente al menos alrededor de 1 gramo de glicoconjugado al finalizar un único ciclo de reacciones.

30 La expresión "grupo ligador de glicosilo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un residuo de glicosilo al cual se le ha unido de manera covalente un grupo modificador (p.ej., resto de PEG, resto terapéutico, biomolécula); el grupo ligador de glicosilo une el grupo modificador al resto del conjugado. En los métodos de la invención, el "grupo ligador de glicosilo" se une de manera covalente a un péptido glicosilado o sin glicosilar, por lo que une el agente a un aminoácido y/o residuo de glicosilo del péptido. Un "grupo ligador de glicosilo" deriva en general de un "carbohidrato modificado" mediante la unión enzimática del "carbohidrato modificado" a un aminoácido y/o residuo de glicosilo del péptido. El grupo ligador de glicosilo puede ser una estructura derivada de sacárido que se degrada durante la formación del casete grupo modificador-carbohidrato modificado (p.ej., oxidación \rightarrow formación de base de Schiff \rightarrow reducción), o el grupo ligador de glicosilo puede estar intacto. Un "grupo ligador de glicosilo intacto" se refiere a un grupo ligador que deriva de un resto de glicosilo en el que el monómero de sacárido que une el grupo modificador y el resto del conjugado no se degrada, p.ej., oxida, p.ej., mediante metaperyodato sódico. Los "grupos ligadores de glicosilo intactos" de la invención se pueden derivar de un oligosacárido natural mediante la adición de unidad(es) de glicosilo o la extracción de una o más unidades de glicosilo de una estructura de sacárido inicial.

45 La expresión "resto de selección del objetivo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a las especies que se localizarán de manera selectiva en un tejido o región particular del organismo. La localización está mediada por el reconocimiento específico de determinantes moleculares, el tamaño molecular del agente o conjugado de selección del objetivo, las interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y similares. Los expertos en la técnica conocen otros mecanismos para seleccionar como objetivo con un agente un tejido o región particulares. Los restos de selección del objetivo ejemplares incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, transferrina, HS-glicoproteína, factores de coagulación, proteínas séricas, β -glicoproteína, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO y similares.

50 Tal como se usa en la presente memoria, "resto terapéutico" significa cualquier agente útil para la terapia que incluye, pero sin limitación, antibióticos, agentes anti-inflamatorios, fármacos anti-tumorales, citotoxinas, y agentes radiactivos. El "resto terapéutico" incluye profármacos de agentes bioactivos, construcciones en las que más de un resto terapéutico está unido a un portador, p.ej., agentes multivalentes. El resto terapéutico incluye también proteínas y construcciones que incluyen proteínas. Las proteínas ejemplares incluyen, pero sin limitación, eritropoyetina (EPO), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón (p.ej., interferón- α , $-\beta$, $-\gamma$), interleucina (p.ej., Interleucina II), proteínas séricas (p.ej., Factores VII, VIIa, VIII, IX, y X), gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH) y proteínas de fusión de anticuerpos (p.ej. proteína de fusión receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR)/dominio Fc).

Tal como se usa en la presente memoria, "fármaco anti-tumoral" significa cualquier agente útil para combatir el cáncer que incluye, pero sin limitación, citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, agentes antimetabólicos, procarbazona, hidroxiaurea, asparaginasa, corticoesteroides, interferones y agentes radiactivos. También están abarcados dentro del alcance del término "fármaco anti-tumoral" los conjugados de péptidos con actividad anti-tumoral, p.ej. TNF- α . Los conjugados incluyen, pero sin limitación, aquellos formados entre una proteína terapéutica y una glicoproteína de la invención. Un conjugado representativo es el que se forma entre PSGL-1 y TNF- α .

Tal como se usa en la presente memoria, "una citotoxina o agente citotóxico" significa cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracinediona, 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 la toxina de la difteria, y veneno de serpiente (p.ej., veneno de cobra).

Tal como se usa en la presente memoria, "un agente radiactivo" incluye cualquier radioisótopo que es eficaz en el diagnóstico o la destrucción de un tumor. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, indio-111, cobalto-60. Además, los elementos radiactivos naturales, tales como uranio, radio, y torio, que generalmente representan mezclas de radioisótopos, son ejemplos adecuados de un agente radiactivo. Los iones metálicos se quelan generalmente con un resto quelante orgánico.

Muchos grupos quelantes útiles, éteres corona, criptandos y similares se conocen en la técnica y se pueden incorporar en los compuestos de la invención (p.ej., EDTA, DTPA, DOTA, NTA, HDTA, etc., y sus análogos de fosfonato tales como DTPP, EDTP, HDTP, NTP, etc.). Véase, 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, págs. 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 ellos.

Además, los expertos en la técnica tienen a su disposición una diversidad de vías que permiten la unión de los agentes quelantes, éteres corona y ciclodextrinas a otras moléculas. Véase, 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, págs. 370-387; Kasina *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **9**: 108-117 (1998); Song *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **8**: 249-255 (1997).

Tal como se usa en la presente memoria, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que cuando se combina con el conjugado conserva la actividad del conjugado y no es reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos habituales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos que incluyen comprimidos revestidos y cápsulas. En general, tales vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, carbohidratos, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales del mismo, estearato magnésico o cálcico, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Tales vehículos pueden incluir también aditivos de aroma y color y otros ingredientes. Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan mediante métodos convencionales muy conocidos.

Tal como se usa en la presente memoria, "administrar" significa la administración oral, inhalación, administración en forma de un supositorio, contacto tópico, intravenoso, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal o la administración subcutánea, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, p.ej., una bomba mini-osmótica, al sujeto. La administración puede ser mediante cualquier vía que incluye la parenteral, y transmucosa (p.ej., oral, nasal, vaginal, rectal, o transdérmica). La administración parenteral incluye, p.ej., la intravenosa, intramuscular, intraarteriolar, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, e intracraneal. Además, cuando la inyección es para tratar un tumor, p.ej., inducir la apoptosis, la administración puede ser directamente en el tumor y/o en los tejidos que rodean el tumor. Otros modos de administración incluyen, pero sin limitación, el uso de formulaciones liposómicas, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

El término "aislado" se refiere a un material que está sustancialmente o esencialmente exento de componentes, que se usa para producir el material. Para los conjugados peptídicos de la invención, el término "aislado" se refiere a un material que está sustancialmente o esencialmente exento de componentes, que acompañan normalmente al material en la mezcla usada para preparar el conjugado peptídico. "Aislado" y "puro" se usan de manera intercambiable. En general, los conjugados peptídicos aislados de la invención tienen un nivel de pureza que se expresa preferiblemente en forma de un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza para los conjugados peptídicos es de alrededor del 60%, alrededor del 70% o alrededor del 80%, y el extremo superior del intervalo de pureza es de alrededor del 70%, alrededor del 80%, alrededor del 90% o más de alrededor del 90%.

Cuando los conjugados peptídicos tienen una pureza de más de alrededor del 90%, sus purezas también se expresan preferiblemente en forma de un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza es de alrededor del 90%, alrededor del 92%, alrededor del 94%, alrededor del 96% o alrededor del 98%. El extremo superior del intervalo de pureza es de alrededor del 92%, alrededor del 94%, alrededor del 96%, alrededor del 98% o alrededor del 100%.

- 5 La pureza se determina mediante cualquier método de análisis reconocido en la técnica (p.ej., intensidad de las bandas en un gel teñido con plata, electroforesis en gel de poli(acrilamida), HPLC, o un medio similar).

10 "Esencialmente cada miembro de la población", tal como se usa en la presente memoria, describe una característica de una población de conjugados peptídicos de la invención en la que un porcentaje seleccionado de los carbohidratos modificados añadidos a un péptido se añaden en múltiples sitios aceptores idénticos del péptido. "Esencialmente cada miembro de la población" se refiere a la "homogeneidad" de los sitios del péptido conjugados a un carbohidrato modificado, y se refiere a los conjugados de la invención, que tienen una homogeneidad de al menos alrededor del 80%, preferiblemente al menos alrededor del 90% y más preferiblemente al menos alrededor del 95%.

15 "Homogeneidad" se refiere a la consistencia estructural en una población de restos aceptores a los que se conjugan los carbohidratos modificados. Así, en un conjugado peptídico de la invención en el que cada resto de carbohidrato modificado se conjuga a un sitio aceptor que tiene la misma estructura que el sitio aceptor al que se conjugan todos los demás carbohidratos modificados, se dice que el conjugado peptídico tiene una homogeneidad de alrededor del 100%. La homogeneidad se expresa generalmente en forma de un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad para los conjugados peptídicos es de alrededor del 60%, alrededor del 70% o alrededor del 80%, y el extremo superior del intervalo de pureza es de alrededor del 70%, alrededor del 80%, alrededor del 90% o más de
20 alrededor del 90%.

Cuando los conjugados peptídicos tienen una homogeneidad mayor o igual a alrededor del 90%, su homogeneidad también se expresa preferiblemente en forma de un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad es de alrededor del 90%, alrededor del 92%, alrededor del 94%, alrededor del 96% o alrededor del 98%. El extremo superior del intervalo de homogeneidad es de alrededor del 92%, alrededor del 94%, alrededor del 96%, alrededor del 98% o alrededor del 100%. La pureza de los conjugados peptídicos se determina en general mediante uno o más
25 métodos conocidos para los expertos en la técnica, p.ej., cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción por láser asistida por matriz (MALDITOF), electroforesis capilar, y similares.

30 "Glicoforma sustancialmente uniforme" o un "patrón de glicosilación sustancialmente uniforme", cuando se refiere a una especie de glicopéptido, se refiere al porcentaje de restos aceptores que se glicosilan mediante la glicosiltransferasa de interés (p.ej., fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de una α 1,2 fucosiltransferasa, existe un patrón de fucosilación sustancialmente uniforme si sustancialmente todos los Gal β 1,4-GlcNAc-R (tal como se define más adelante) y los análogos sialilados de los mismos están fucosilados en un conjugado peptídico de la invención. Un experto en la técnica entenderá que el material de partida puede contener restos aceptores glicosilados (p.ej., restos Gal β 1,4-GlcNAc-R fucosilados). Así, el porcentaje calculado de glicosilación incluirá los restos aceptores que se glicosilan mediante los métodos de la invención, así como aquellos restos aceptores ya glicosilados en el material de
35 partida.

40 El término "sustancialmente" en las definiciones anteriores de "sustancialmente uniforme" significa en general que se glicosilan al menos alrededor del 40%, al menos alrededor del 70%, al menos alrededor del 80%, o más preferiblemente al menos alrededor del 90%, y aún más preferiblemente al menos alrededor del 95% de los restos aceptores para una glicosiltransferasa particular.

Otros objetivos, aspectos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente.

Abreviaturas

45 PEG, poli(etilenglicol); m-PEG, metoxi-poli(etilen glicol); PPG, poli(propilenglicol); m-PPG, metoxi-poli(propilen glicol); Fuc, fucosilo; Gal, galactosilo; GalNAc, N-acetilgalactosaminilo; Glc, glucosilo; GlcNAc, N-acetilglucosaminilo; Man, manosilo; ManAc, acetato de manosaminilo; Sia, ácido siálico; y NeuAc, N-acetilneuraminilo.

Introducción

50 Para mejorar la eficacia de la hormona del crecimiento humana recombinante usada para fines terapéuticos, la presente descripción proporciona mutantes modificados mediante ingeniería genética de la hormona del crecimiento humana que contienen sitios de glicosilación con unión en N u O que no están presentes en la hormona del crecimiento humana natural. Aunque estos mutantes de hGH conservan sustancialmente la actividad biológica de la hormona de tipo natural, los sitios de glicosilación recién introducidos permiten que los mutantes de hGH producidos de manera recombinante se glicosilen con una gran diversidad de patrones. Además, los sitios de glicosilación no naturales proporcionan lugares para la conjugación de grupos modificadores al péptido, p.ej., mediante glicoconjugación. Un grupo modificador ejemplar es un polímero hidrosoluble, tal como poli(etilen glicol), p.ej., metoxi-
55 poli(etilen glicol). La modificación de los mutantes de hGH puede mejorar la estabilidad y el tiempo de retención de la

hGH recombinante en la circulación del paciente, reducir su antigenicidad, y aumentar su capacidad de seleccionar como objetivo un tejido específico que necesita tratamiento.

Mutantes

5 En la presente memoria se describen mutantes de hGH que incluyen uno o más sitios de glicosilación con unión en O o N que no se hallan en el péptido de tipo natural. Los mutantes son sustratos para la glicosilación enzimática en uno o más sitios que normalmente no estarían glicosilados, o que estarían escasamente glicosilados, en el péptido de tipo natural. Así, los mutantes permiten que se modifique la posición de un residuo de glicosilo o un grupo ligador de glicosilo para obtener un péptido que tiene unas propiedades deseables seleccionadas. Además de la posición y el número de residuos de glicosilo o grupos ligadores de glicosilo, otras propiedades que se pueden variar mediante el uso de los mutantes y métodos de la invención incluyen la farmacocinética, farmacodinámica, resistencia a la proteólisis, inmunogenicidad, reconocimiento por el sistema reticuloendotelial, distribución tisular y similares.

10 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una hormona del crecimiento humana mutante. La hormona del crecimiento humana mutante comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15. En ciertas realizaciones, la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:1 o SEQ ID N°:2. En ciertas realizaciones preferidas, la hormona del crecimiento humana mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un casete de expresión o una célula que comprende un ácido nucleico, p.ej., un ácido nucleico aislado, que incluye una secuencia polinucleotídica que codifica una hormona del crecimiento humana mutante. La hormona del crecimiento humana mutante comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona una hormona del crecimiento humana mutante, que comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15. En ciertas realizaciones, la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:1 o SEQ ID N°:2. En ciertas realizaciones preferidas, la hormona del crecimiento humana mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una hormona del crecimiento humana mutante, que comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15. Este método comprende las etapas de producir de manera recombinante la hormona del crecimiento humana mutante, y glicosilar la hormona del crecimiento humana mutante en el sitio de glicosilación nuevo. En ciertas realizaciones, la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:1 o SEQ ID N°:2. En ciertas realizaciones preferidas, la hormona del crecimiento humana mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

Adquisición de las Secuencias Codificantes de hGH

Tecnología Recombinante General

Esta invención se basa en técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Los libros de texto básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (1994).

30 Para los ácidos nucleicos, los tamaños se proporcionan en kilobases (kb) o pares de bases (pb). Estos son estimaciones derivadas de electroforesis en geles de agarosa o acrilamida, de ácidos nucleicos secuenciados, o de secuencias de ADN publicadas. Para las proteínas, los tamaños se proporcionan en kilodaltons (kDa) o el número de residuos de aminoácidos. Los tamaños de las proteínas se estiman a partir de electroforesis en gel, de proteínas secuenciadas, de secuencias de aminoácidos derivadas, o de secuencias de proteínas publicadas.

Los oligonucleótidos que no están disponibles comercialmente se pueden sintetizar químicamente, p.ej., según el método de triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage & Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **22**: 1859-1862 (1981), mediante el uso de un sintetizador automatizado, tal como se describe en Van Devanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **12**: 6159-6168 (1984). La purificación de oligonucleótidos se lleva a cabo mediante el uso de cualquier estrategia reconocida en la técnica, p.ej., electroforesis en gel de acrilamida nativa o HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson & Reanier, *J. Chrom.* **255**: 137-149 (1983).

Las secuencias de los genes de la hormona del crecimiento humana de tipo natural clonada, el polinucleótido que codifica las hormonas del crecimiento humanas mutantes, y los oligonucleótidos sintéticos se pueden verificar después de la clonación mediante el uso, p.ej., del método de terminación de la cadena para la secuenciación de mol-des bicatenarios de Wallace *et al.*, *Gene* **16**: 21-26 (1981).

Clonación y Subclonación de una Secuencia Codificante de hGH de Tipo Natural

Se han determinado varias secuencias polinucleotídicas que codifican una hormona del crecimiento humana de tipo natural, p.ej., los nºs de acceso de GenBank NM 000515, NM 002059, NM 022556, NM 022557, NM 022558, NM 022559, NM 022560, NM 022561, y NM 022562, y se pueden obtener de un proveedor comercial.

El progreso rápido en los estudios del genoma humano ha hecho posible una aproximación de clonación, en la que se puede realizar una búsqueda en una base de datos de secuencias de ADN humano para cualquier segmento génico que tenga un cierto porcentaje de homología de secuencia respecto de una secuencia nucleotídica conocida, tal como una que codifica una hormona del crecimiento humana identificada previamente. Cualquier secuencia de ADN identificada de esta manera se puede obtener posteriormente mediante una síntesis química y/o una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como un método de prolongación solapante. Para una secuencia corta, puede ser suficiente la síntesis completamente *de novo*; a la vez que puede ser necesario un aislamiento adicional de una secuencia codificante de tamaño completo a partir de una biblioteca de cADN o ADN genómico humano mediante el uso de una sonda sintética para obtener un gen más largo.

De manera alternativa, se puede aislar una secuencia de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento humana a partir de una biblioteca de cADN o de ADN genómico humano mediante el uso de técnicas de clonación habituales, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en las que los cebadores basados en la homología pueden proceder a menudo de una secuencia de ácido nucleico conocida que codifica una hormona del crecimiento humana. Las técnicas utilizadas con más frecuencia para este fin se describen en libros de texto habituales, p.ej., Sambrook y Russell, anteriormente mencionados.

Las bibliotecas de cADN adecuadas para obtener una secuencia codificante para una hormona del crecimiento humana de tipo natural pueden estar disponibles comercialmente o se pueden construir. Los métodos generales para el aislamiento del mRNA, producción de cADN mediante transcripción inversa, ligadura del cADN en un vector recombinante, transfección a un hospedador recombinante para la propagación, cribado, y clonación se conocen muy bien (véase, p.ej., Gubler y Hoffman, *Gene*, **25**: 263-269 (1983); Ausubel *et al.*, anteriormente mencionado). Tras la obtención de un segmento amplificado de una secuencia nucleotídica mediante PCR, el segmento se puede usar posteriormente como sonda para aislar la secuencia polinucleotídica de tamaño completo que codifica la hormona del crecimiento humana de tipo natural a partir de la biblioteca de cADN. Se puede hallar una descripción general de los procedimientos adecuados en Sambrook y Russell, anteriormente mencionados.

Se puede seguir un procedimiento similar para obtener una secuencia de tamaño completo que codifica una hormona del crecimiento humana de tipo natural, p.ej., cualquiera de los nºs de acceso de GenBank mencionados anteriormente, a partir de una biblioteca genómica humana. Las bibliotecas genómicas humanas están disponibles comercialmente o se pueden construir según diversos métodos reconocidos en la técnica. En general, para construir una biblioteca genómica, primero se extrae el ADN de un tejido en el que es probable hallar una hormona del crecimiento humana. Después el ADN se fragmenta de manera mecánica o se digiere enzimáticamente para proporcionar fragmentos de alrededor de 12-20 kb de longitud. Los fragmentos se separan posteriormente mediante centrifugación en gradiente de los fragmentos polinucleotídicos de tamaños no deseados, y se insertan en vectores de bacteriófago λ . Estos vectores y fagos se empaquetan *in vitro*. Los fagos recombinantes se analizan mediante hibridación de placas como se describió en Benton y Davis, *Science*, **196**: 180-182 (1977). La hibridación de las colonias se lleva a cabo como se describió en Grunstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 3961-3965 (1975).

Basándose en la homología de secuencia, se pueden diseñar oligonucleótidos degenerados como grupos de cebadores, y se puede llevar a cabo la PCR en condiciones adecuadas (véase, p.ej., White *et al.*, *PCR Protocols: Current Methods and Applications*, 1993; Griffin y Griffin, *PCR Technology*, CRC Press Inc. 1994) para amplificar un segmento de secuencia nucleotídica a partir de una biblioteca genómica o de cADN. Mediante el uso del segmento amplificado como sonda, se obtiene el ácido nucleico de tamaño completo que codifica una hormona del crecimiento humana de tipo natural.

Después de conseguir una secuencia de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento humana de tipo natural, la secuencia codificante se puede subclonar en un vector, por ejemplo, un vector de expresión, de manera

que la hormona del crecimiento humana de tipo natural recombinante se puede producir a partir de la construcción resultante. Posteriormente se pueden realizar modificaciones adicionales a la secuencia codificante de la hormona del crecimiento humana de tipo natural, p.ej., sustituciones de nucleósidos, para alterar las características de la molécula.

5 Introducción de Mutaciones en una Secuencia de hGH

A partir de la secuencia polinucleotídica codificante, se puede determinar la secuencia de aminoácidos de una hormona del crecimiento humana de tipo natural, p.ej., SEQ ID N°:1 o SEQ ID N°:2. Posteriormente, esta secuencia de aminoácidos se puede modificar para alterar el patrón de glicosilación de la proteína, mediante la introducción de sitio(s) de glicosilación adicional(es) en diversas localizaciones de la secuencia de aminoácidos.

10 Se conocen bien en la técnica varios tipos de sitios de glicosilación de proteínas. Por ejemplo, en eucariotas, la glicosilación con unión en N se da en la asparagina de la secuencia consenso Asn-X_{aa}-Ser/Thr, en la que X_{aa} es cualquier aminoácido excepto prolina (Kornfeld *et al.*, *Ann Rev Biochem* **54**:631-664 (1985); Kukuruzinska *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:2145-2149 (1987); Herscovics *et al.*, *FASEB J* **7**:540-550 (1993); y Orlean, *Saccharomyces* **Vol. 3** (1996)). La glicosilación con unión en O tiene lugar en residuos de serina o treonina (Tanner *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **906**: 81-91, (1987). y Hounsell *et al.*, *Glycoconj. J.* **13**:19-26 (1996)). Otros patrones de glicosilación se forman mediante la unión de glicosilfosfatidilinositol al grupo 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). Basándose en estos conocimientos, se pueden introducir así mutaciones adecuadas en una secuencia de una hormona del crecimiento humana de tipo natural para formar sitios de glicosilación nuevos.

20 Aunque la modificación directa de un residuo de aminoácido dentro de una secuencia polipeptídica de una hormona del crecimiento humana puede ser adecuada para introducir un sitio de glicosilación con unión en N o con unión en O nuevo, de manera más frecuente, la introducción de un sitio de glicosilación nuevo se lleva a cabo mutando la secuencia polinucleotídica que codifica una hormona del crecimiento humana. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, algunos de los cuales se discuten más adelante.
25 Las modificaciones ejemplares de la hormona del crecimiento humana incluyen las ilustradas en SEQ ID N°:3 o SEQ ID N°:4.

En la técnica se establecen y se describen una diversidad de protocolos que generan mutaciones. Véase. p.ej., Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 4504-4509 (1997); y Stemmer, *Nature*, **370**: 389-391 (1994). Los procedimientos se pueden usar por separado o en combinación para producir variantes de un grupo de ácidos nucleicos, y por lo tanto variantes de los polipéptidos codificados. Los equipos para la mutagénesis, la construcción de bibliotecas, y otros métodos para la generación de diversidad están disponibles comercialmente.

Los métodos mutacionales para la generación de diversidad incluyen, por ejemplo, la mutagénesis dirigida (Botstein y Shortle, *Science*, **229**: 1193-1201 (1985)), la mutagénesis mediante el uso de moldes que contienen uracilo (Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 488-492 (1985)), la mutagénesis dirigida en oligonucleótidos (Zoller y Smith, *Nucl. Acids Res.*, **10**: 6487-6500 (1982)), la mutagénesis de ADN modificado mediante fosforotioato (Taylor *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **13**: 8749-8764 y 8765-8787 (1985)), y la mutagénesis mediante el uso de ADN doble con huecos (Kramer *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **12**: 9441-9456 (1984)).

Otros métodos posibles para generar mutaciones incluyen la reparación de errores puntuales (Kramer *et al.*, *Cell*, **38**: 879-887 (1984)), la mutagénesis mediante el uso de cepas hospedadoras sin reparación (Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **13**: 4431-4443 (1985)), la mutagénesis por delección (Eghtedarzadeh y Henikoff, *Nucl. Acids Res.*, **14**: 5115 (1986)), la selección de restricción y purificación de restricción (Wells *et al.*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, **317**: 415-423 (1986)), la mutagénesis mediante síntesis génica total (Nambiar *et al.*, *Science*, **223**: 1299-1301 (1984)), la reparación de rupturas bicatenarias (Mandecki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 7177-7181 (1986)), la mutagénesis mediante métodos de terminación de la cadena polinucleotídica (patente de EE.UU. n° 5.965.408), y la PCR propensa a errores (Leung *et al.*, *Biotechniques*, **1**: 11-15 (1989)).

Modificación de los Ácidos Nucleicos para la Utilización de Codones Preferidos en un Organismo Hospedador

La secuencia polinucleotídica que codifica una hormona del crecimiento humana mutante se puede alterar adicionalmente para que coincida con la utilización de codones preferidos en un hospedador particular. Por ejemplo, se puede usar la utilización de codones preferidos de una cepa de células bacterianas para modificar un polinucleótido que codifica una hormona del crecimiento humana mutante de la invención y que incluya los codones favorecidos por esta cepa. La frecuencia de la utilización de los codones preferidos exhibida por una célula hospedadora se puede calcular realizando la media de la frecuencia de la utilización de codones preferidos en un gran número de genes expresados por la célula hospedadora (p.ej., hay disponible un servicio de cálculo en el sitio de Internet del Instituto de Investigación de ADN Kazusa, Japón). Este análisis se limita preferiblemente a los genes que la célula hospedadora expresa en gran cantidad. La patente de EE.UU. n° 5.824.864, por ejemplo, proporciona la frecuencia de utilización de codones de genes muy expresados exhibida por plantas dicotiledóneas y plantas monocotiledóneas.

Al final de la modificación, las secuencias codificantes de la hormona del crecimiento humana mutante se verifican mediante secuenciación, y después se subclonan en un vector de expresión adecuado para la producción recombinante de la misma manera que las hormonas del crecimiento humanas de tipo natural.

Expresión y Purificación de la hGH Mutante

5 Tras la verificación de la secuencia, la hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención se puede producir mediante el uso de técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante, que se basan en las secuencias polinucleotídicas que codifican el polipéptido descrito en la presente memoria.

Sistemas de Expresión

10 Para obtener un nivel elevado de expresión de un ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención, en general se subclona un polinucleótido que codifica la hormona del crecimiento humana mutante en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción y un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados se conocen bien en la técnica y se describieron, p.ej., en Sambrook y Russell, anteriormente mencionados, y Ausubel *et al.*, anteriormente mencionado. Los sistemas de expresión bacterianos para expresar la hormona del crecimiento humana de tipo natural o mutante están disponibles, p.ej., en *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Salmonella*, y *Caulobacter*. Los equipos para tales sistemas de expresión están disponibles comercialmente. Los sistemas de expresión eucarióticos para células mamíferas, levaduras, y células de insecto se conocen bien en la técnica y también están disponibles comercialmente. En una realización, el vector de expresión eucariótico es un vector adenoviral, un vector adenoasociado, o un vector retroviral.

20 El promotor utilizado para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación particular. El promotor se coloca opcionalmente aproximadamente a la misma distancia del sitio de inicio heterólogo de la transcripción a la que está del sitio de inicio de la transcripción en su entorno natural. Tal como se conoce en la técnica, sin embargo, se puede adaptar cierta variación de esta distancia sin la pérdida de la función del promotor.

25 Además del promotor, el vector de expresión incluye en general una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales necesarios para la expresión de la hormona del crecimiento humana mutante en las células hospedadoras. Un casete de expresión típico contiene así un promotor unido de forma operable a la secuencia de ácido nucleico que codifica la hormona del crecimiento humana mutante y las señales necesarias para la poliadenilación eficaz del transcrito, los sitios de unión al ribosoma, y de terminación de la traducción. La secuencia de ácido nucleico que codifica la hormona del crecimiento humana está unida generalmente a una secuencia de un péptido señal de escisión para favorecer la secreción de la hormona del crecimiento humana por la célula transformada. Tales péptidos señal incluyen, entre otros, los péptidos señal del activador de plasminógeno tisular, insulina, y factor de crecimiento neuronal, y la esterasa de la hormona juvenil de *Heliothis virescens*. Otros elementos del casete pueden incluir potenciadores y, si se usa ADN genómico como gen estructural, intrones funcionales con sitios donantes y aceptores de corte y empalme.

35 Además de una secuencia promotora, el casete de expresión debería contener además una región de terminación de la transcripción en posición 3' del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. La región de terminación se puede obtener del mismo gen que la secuencia promotora, o se puede obtener de genes diferentes.

40 El vector de expresión particular usado para transportar la información genética a la célula no es especialmente crítico. Se puede usar cualquiera de los vectores convencionales usados para la expresión en células eucarióticas o procarióticas. Los vectores de expresión bacteriana habituales incluyen plásmidos tales como los plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D, y sistemas de expresión mediante fusión tales como GST y LacZ. También se pueden añadir marcadores de epítomos a las proteínas recombinantes para proporcionar métodos prácticos de aislamiento, p.ej., c-myc.

45 Generalmente se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucarióticos en los vectores de expresión eucarióticos, p.ej., vectores de SV40, vectores de papiloma virus, y vectores derivados del virus de Epstein-Barr. Otros vectores eucarióticos ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A, pMTO10/A, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV40, el promotor tardío de SV40, el promotor de metalotioneína, el promotor del virus de tumor mamario murino, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor de polihedrina, u otros promotores que se ha demostrado que son eficaces para la expresión en las células eucarióticas.

50 Algunos sistemas de expresión tienen marcadores que proporcionan una amplificación génica, tal como timidina quinasa, higromicina B fosfotransferasa, y dihidrofolato reductasa. De manera alternativa, también son adecuados los sistemas de expresión de alto rendimiento que no implican una amplificación génica, tal como un vector de baculovirus en células de insecto, con una secuencia polinucleotídica que codifica la hormona del crecimiento humana mutante bajo la dirección del promotor de polihedrina u otros promotores fuertes de baculovirus.

Los elementos que se incluyen en general en los vectores de expresión también incluyen un replicón que funciona

en *E. coli*, un gen que codifica una resistencia a antibiótico para permitir la selección de las bacterias que albergan los plásmidos recombinantes, y sitios de restricción únicos en regiones que no son esenciales del plásmido para permitir la inserción de secuencias eucarióticas. El gen de resistencia a antibióticos particular elegido no es crítico, y es adecuado cualquiera de los muchos genes de resistencia conocidos en la técnica. Las secuencias procarióticas se eligen opcionalmente de manera que no interfieran con la replicación del ADN en las células eucarióticas, si es necesario. De forma similar a los marcadores de selección por resistencia a antibióticos, también se pueden usar marcadores de selección metabólicos basados en rutas metabólicas conocidas como medio para seleccionar las células hospedadoras transformadas.

Cuando se desea la expresión periplásmica de una proteína recombinante (p.ej., un mutante de hGH de la presente invención), el vector de expresión comprende además una secuencia que codifica una señal de secreción, tal como la señal de secreción OppA (proteína periplásmica de unión a oligopéptido) de *E. coli* o una versión modificada de la misma, que se conecta directamente al extremo 5' de la secuencia codificante de la proteína a expresar. Esta secuencia señal dirige a la proteína recombinante producida en el citoplasma a través de la membrana celular hacia el espacio periplásmico. El vector de expresión puede comprender además una secuencia codificante para una señal peptidasa 1, que es capaz de escindir enzimáticamente la secuencia señal cuando la proteína recombinante va a entrar en el espacio periplásmico. Se puede encontrar una descripción más detallada de la producción periplásmica de una proteína recombinante, p.ej., en Gray et al., *Gene* **39**: 247-254 (1985), patentes de EE.UU. nºs 6.160.089 y 6.436.674.

Tal como se discutió anteriormente, un experto en la técnica reconocerá que se pueden realizar diversas sustituciones conservativas en cualquier hormona del crecimiento humana de tipo natural o mutante o en su secuencia codificante, a la vez que se mantiene la actividad biológica de la hormona del crecimiento humana. Además, también se pueden realizar modificaciones de una secuencia codificante polinucleotídica para adaptar la utilización de codones preferida en un hospedador de expresión particular sin alterar la secuencia de aminoácidos resultante.

Métodos de Transfección

Se usan métodos de transfección habituales para producir líneas celulares bacterianas, mamíferas, de levadura, de insecto, o vegetales que expresan grandes cantidades de la hormona del crecimiento humana mutante, que después se purifica mediante el uso de técnicas habituales (véase, p.ej., Colley et al., *J. Biol. Chem.* **264**: 17619-17622 (1989); *Guide to Protein Purification*, en *Methods in Enzymology*, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). La transformación de las células eucarióticas y procarióticas se lleva a cabo según las técnicas habituales (véase, p.ej., Morrison, *J. Bact.* **132**: 349-351 (1977); Clark-Curtiss & Curtiss, *Methods in Enzymology* **101**: 347-362 (Wu et al., eds, 1983).

Se puede usar cualquiera de los procedimientos conocidos para la introducción de secuencias nucleotídicas exógenas en células hospedadoras. Estos incluyen el uso de la transfección mediante fosfato cálcico, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmáticos, vectores virales y cualquiera de los otros métodos conocidos para la introducción de ADN genómico clonado, cADN, ADN sintético u otro material genético exógeno en una célula hospedadora (véase, p.ej., Sambrook y Russell, anteriormente mencionados). Únicamente es necesario que el procedimiento de ingeniería genética particular usado sea capaz de introducir con éxito al menos un gen en la célula hospedadora capaz de expresar la hormona del crecimiento humana mutante.

Detección de la Expresión de la hGH Mutante en las Células Hospedadoras

Después de introducir el vector de expresión en células hospedadoras adecuadas, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión de la hormona del crecimiento humana mutante. Después las células se someten a un cribado en función de la expresión del polipéptido recombinante, que se recupera posteriormente del cultivo mediante el uso de técnicas habituales (véase, p.ej., Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); patente de EE.UU. nº 4.673.641; Ausubel et al., anteriormente mencionado; y Sambrook y Russell, anteriormente mencionados).

Los expertos en la técnica conocen varios métodos generales para el cribado de la expresión génica. Primero, se puede detectar la expresión génica a nivel del ácido nucleico. Se usa habitualmente una diversidad de métodos de medida específica de ADN y ARN mediante el uso de técnicas de hibridación de ácido nucleico (p.ej., Sambrook y Russell, anteriormente mencionados). Algunos métodos implican una separación electroforética (p.ej., transferencia de Southern para detectar el ADN y transferencia de Northern para detectar el ARN), pero la detección del ADN o ARN también se puede llevar a cabo sin electroforesis (tal como mediante transferencia puntual). La presencia de un ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento humana mutante en células transfectadas se puede detectar también mediante PCR o RT-PCR con el uso de cebadores específicos de secuencia.

En segundo lugar, se puede detectar la expresión génica a nivel del polipéptido. Los expertos en la técnica usan de manera rutinaria diversos ensayos inmunológicos para medir el nivel de un producto génico, en particular mediante el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales que reaccionan de manera específica con una hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención, tal como un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nº:3, 4, o 5, (p.ej., Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, capítulo 14, Cold Spring Harbor,

1988; Kohler y Milstein, *Nature*, **256**: 495-497 (1975)). Tales técnicas requieren la preparación de un anticuerpo seleccionando los anticuerpos con una especificidad elevada hacia la hormona del crecimiento humana mutante o una porción antigénica de la misma. Los métodos para generar anticuerpos policlonales y monoclonales están bien establecidos, y sus descripciones se pueden hallar en la bibliografía, véase, p.ej., Harlow y Lane, anteriormente mencionados; Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, **6**: 511-519 (1976). En una sección posterior se proporciona una descripción más detallada para la preparación de anticuerpos hacia la hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención y para llevar a cabo ensayos inmunológicos que detectan la hormona del crecimiento humana mutante.

Purificación de la hGH Mutante Producida de Manera Recombinante

10 Una vez que se confirma la expresión de una hormona del crecimiento humana mutante recombinante en las células hospedadoras transfectadas, las células hospedadoras se cultivan a una escala adecuada con el fin de purificar el polipéptido recombinante.

Purificación de hGH Mutante Producida de Manera Recombinante a Partir de Bacterias

15 Cuando las hormonas del crecimiento humanas mutantes de la presente invención se producen de manera recombinante mediante bacterias transformadas en grandes cantidades, en general tras la inducción de un promotor, aunque la expresión puede ser constitutiva, las proteínas pueden formar agregados insolubles. Existen varios protocolos que son adecuados para la purificación de cuerpos de inclusión proteicos. Por ejemplo, la purificación de proteínas agregadas (más adelante en la presente memoria denominadas cuerpos de inclusión) implica en general la extracción, separación y/o purificación de los cuerpos de inclusión mediante la ruptura de las células bacterianas, p.ej., mediante incubación en un tampón de alrededor de 100-150 µg/ml de lisozima y 0,1% de Nonidet P40, un detergente no iónico. La suspensión de células se puede homogeneizar mediante el uso de un homogeneizador Polítron (Brinkman Instruments, Westbury, NY). De manera alternativa, las células se pueden someter a sonicación en hielo. Se describen métodos alternativos para lisar bacterias en Ausubel *et al.* y Sambrook y Russell, ambos mencionados anteriormente, y serán evidentes para los expertos en la técnica.

25 La suspensión de células generalmente se centrifuga, y el sedimento que contiene los cuerpos de inclusión se resuspende en un tampón que no los disuelve, sino que lava los cuerpos de inclusión, p.ej., Tris-HCl 20 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM y 2% de Triton-X 100, un detergente no iónico. Puede ser necesario repetir la etapa de lavado para eliminar tantos restos celulares como sea posible. El sedimento restante de cuerpos de inclusión se puede resuspender en un tampón adecuado (p.ej., fosfato sódico 20 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM). Otros tampones adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica.

35 Tras la etapa de lavado, los cuerpos de inclusión se solubilizan mediante la adición de un disolvente que es un aceptor fuerte de hidrógeno y un donante fuerte de hidrógeno (o una combinación de disolventes que tienen cada uno estas propiedades). Las proteínas que forman los cuerpos de inclusión se pueden renaturalizar después mediante dilución o diálisis con un tampón compatible. Los disolventes adecuados incluyen, pero sin limitación, urea (de alrededor de 4 M a alrededor de 8 M), formamida (al menos alrededor del 80%, en volumen/volumen), e hidrocloreto de guanidina (de alrededor de 4 M a alrededor de 8 M). Ciertos disolventes que son capaces de solubilizar proteínas que forman agregados, tales como SDS (dodecil sulfato sódico) y un 70% de ácido fórmico, pueden ser inadecuados para el uso en este procedimiento debido a la posibilidad de una desnaturalización irreversible de las proteínas, acompañada por la ausencia de inmunogenicidad y/o actividad. Aunque el hidrocloreto de guanidina y los agentes similares son desnaturalizantes, esta desnaturalización no es irreversible, y se puede dar la renaturalización tras la eliminación (mediante diálisis, por ejemplo) o dilución del desnaturalizante, lo que permite el restablecimiento de la proteína de interés inmunológicamente y/o biológicamente activa. Tras la solubilización, la proteína se puede separar de otras proteínas bacterianas mediante técnicas de separación habituales. Para una descripción adicional de la purificación de hormonas del crecimiento humanas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión bacterianos, véase, p.ej., Patra *et al.*, *Protein Expression and Purification* **18**: 182-190 (2000).

45 De manera alternativa, es posible purificar polipéptidos recombinantes, p.ej., una hormona del crecimiento humana mutante, a partir del periplasma bacteriano. Cuando la proteína recombinante se exporta al periplasma de las bacterias, la fracción periplásmica de las bacterias se puede aislar mediante choque osmótico en frío, además de otros métodos conocidos para los expertos en la técnica (véase p.ej., Ausubel *et al.*, anteriormente mencionado). Para aislar proteínas recombinantes a partir del periplasma, las células bacterianas se centrifugan para formar un sedimento. El sedimento se resuspende en un tampón que contiene un 20% de sacarosa. Para lisar las células, las bacterias se centrifugan y el sedimento se resuspende en MgSO₄ 5 mM helado y se mantiene en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión de células se centrifuga, y el sobrenadante se decanta y se guarda. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante se pueden separar de las proteínas del hospedador mediante técnicas de separación habituales muy conocidas para los expertos en la técnica.

Técnicas de Separación de Proteínas Habituales para la Purificación

Cuando un polipéptido recombinante, p.ej., la hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención, se

expresa en células hospedadoras en una forma soluble, su purificación puede seguir el procedimiento de purificación de proteínas habitual descrito más adelante.

Fraccionamiento Mediante Solubilidad

5 A menudo como etapa inicial, y si la mezcla de proteínas es compleja, un fraccionamiento salino inicial puede separar muchas de las proteínas indeseadas de la célula hospedadora (o proteínas derivadas del medio de cultivo celular) de la proteína recombinante de interés, p.ej., una hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención. La sal preferida es sulfato amónico. El sulfato amónico precipita las proteínas reduciendo de manera efectiva la cantidad de agua en la mezcla proteica. Las proteínas precipitan después en base a su solubilidad. Cuanto más hidrófoba es una proteína, es más probable que precipite a una concentración baja de sulfato amónico. 10 Un protocolo típico es añadir sulfato amónico saturado a una disolución de proteínas de manera que la concentración de sulfato amónico resultante sea del 20-30%. Esto hará que precipite la mayor parte de las proteínas hidrófobas. El precipitado se descarta (a menos que la proteína de interés sea hidrófoba) y se añade sulfato amónico al sobrenadante a una concentración que se sabe que hace precipitar la proteína de interés. El precipitado se solubiliza después en un tampón, y el exceso salino se elimina si es necesario, por medio de diálisis o diafiltración. Otros métodos que se basan en la solubilidad de las proteínas, tales como precipitación con etanol frío, son muy conocidos para los expertos en la técnica, y se pueden usar para fraccionar mezclas proteicas complejas. 15

Filtración Diferencial por Tamaño

Basándose en un peso molecular calculado, se puede aislar una proteína de un tamaño mayor o menor mediante el uso de la ultrafiltración a través de membranas de diferentes tamaños de poro (por ejemplo, membranas Amicon o Millipore). Como primera etapa, la mezcla de proteínas se somete a ultrafiltración a través de una membrana con un tamaño de poro que tiene un umbral de peso molecular menor que el peso molecular de la proteína de interés, p.ej., una hormona del crecimiento humana mutante. La fracción retenida de la ultrafiltración se somete después a ultrafiltración con una membrana con un umbral de peso molecular mayor que el peso molecular de la proteína de interés. La proteína recombinante pasará a través de la membrana al filtrado. El filtrado se puede someter después a cromatografía como se describe a continuación. 20 25

Cromatografía en Columna

Las proteínas de interés (tales como la hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención) se pueden separar también de otras proteínas basándose en su tamaño, carga superficial neta, hidrofobicidad, o afinidad por ligandos. Además, se pueden conjugar anticuerpos generados hacia la hormona del crecimiento humana a las matrices de las columnas, y la hormona del crecimiento humana se puede someter a una inmunopurificación. Todos estos métodos se conocen bien en la técnica. 30

Será evidente para un experto en la técnica que los métodos cromatográficos se pueden llevar a cabo a cualquier escala mediante el uso del equipo de diferentes fabricantes (p.ej., Pharmacia Biotech).

Inmunoensayos para la Detección de la Expresión de hGH Mutante

35 Para confirmar la producción de una hormona del crecimiento humana mutante recombinante, pueden ser útiles los ensayos inmunológicos para detectar en una muestra la expresión del polipéptido. Los ensayos inmunológicos también son útiles para cuantificar el nivel de expresión de la hormona recombinante. Los anticuerpos hacia la hormona del crecimiento humana mutante son necesarios para llevar a cabo estos ensayos inmunológicos.

Producción de Anticuerpos hacia hGH Mutante

40 Los expertos en la técnica conocen los métodos para la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan de manera específica con un inmunógeno de interés (véase, p.ej., Coligan, *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY, 1991; Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, NY, 1989; Stites *et al.* (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4^a ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias citadas en ese documento; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2^a ed.) Academic Press, Nueva York, NY, 1986; y Kohler y Milstein *Nature* **256**: 495-497, 1975). Tales técnicas incluyen la preparación de anticuerpos mediante la selección de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares (véase, Huse *et al.*, *Science* **246**: 1275-1281, 1989; y Ward *et al.*, *Nature* **341**: 544-546, 1989). 45

Para producir antisueros que contienen anticuerpos con una especificidad deseada, se puede usar el polipéptido de interés (p.ej., una hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención) o un fragmento antigénico del mismo para inmunizar animales adecuados, p.ej., ratones, conejos o primates. Se puede usar un adyuvante habitual, tal como adyuvante de Freund, de acuerdo con un protocolo de inmunización habitual. De manera alternativa, se puede conjugar un péptido antigénico sintético derivado de ese polipéptido particular a una proteína portadora, y posteriormente usarlo como inmunógeno. 50

La respuesta inmunitaria del animal a la preparación de inmunógeno se monitoriza realizando extracciones de san-

gre y determinando el título de la reactividad hacia el antígeno de interés. Cuando se obtienen de manera apropiada títulos elevados de anticuerpo hacia el antígeno, se recoge la sangre del animal y se preparan los antisueros. Posteriormente se puede llevar a cabo un fraccionamiento adicional de los antisueros para enriquecerlos en los anticuerpos reactivos específicamente hacia el antígeno y una purificación de los anticuerpos, véase, Harlow y Lane, anteriormente mencionados, y las descripciones generales de purificación de proteínas proporcionadas anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen mediante el uso de diversos métodos familiares para los expertos en la técnica. En general, las células del bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado se immortalizan, habitualmente mediante fusión con una célula de mieloma (véase, Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* **6**:511-519, 1976). Los métodos alternativos de immortalización incluyen, p.ej., la transformación con un virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus, u otros métodos muy conocidos en la técnica. Las colonias que se generan a partir de células inmortalizadas individuales se criban en función de la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas hacia el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por tales células se puede aumentar mediante diversas técnicas, que incluyen la inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado.

Además, los anticuerpos monoclonales también se pueden producir de manera recombinante tras la identificación de las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo con la especificidad deseada o un fragmento de unión de tal anticuerpo mediante cribado de una biblioteca de cADN de células B humanas según el protocolo general resumido por Huse *et al.*, anteriormente mencionado. Los principios y métodos generales de producción de polipéptidos recombinantes discutidos anteriormente son aplicables a la producción de anticuerpos mediante métodos recombinantes.

Cuando se desee, se pueden ensayar los anticuerpos capaces de reconocer de manera específica una hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención en función de su reactividad cruzada hacia la hormona del crecimiento humana de tipo natural y así distinguirlos de los anticuerpos hacia la proteína de tipo natural. Por ejemplo, los antisueros obtenidos a partir de un animal inmunizado con una hormona del crecimiento humana mutante se pueden hacer pasar a través de una columna en la que está inmovilizada una hormona del crecimiento humana de tipo natural. La porción de los antisueros que pasa a través de la columna reconoce solamente la hormona del crecimiento humana mutante, y no la hormona del crecimiento humana de tipo natural. De forma similar, los anticuerpos hacia la hormona del crecimiento humana mutante se pueden cribar también en función de su exclusividad en el reconocimiento únicamente de la hormona del crecimiento humana mutante, pero no de la de tipo natural.

Los anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen de manera específica solamente la hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención, pero no la hormona del crecimiento humana de tipo natural, son útiles para aislar la proteína mutante de la proteína de tipo natural, por ejemplo, incubando una muestra con un anticuerpo policlonal o monoclonal específico de la hormona del crecimiento humana mutante inmovilizado en un soporte sólido.

Inmunoensayos para la Detección de la Expresión de hGH Mutante

Una vez que están disponibles los anticuerpos específicos para una hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención, se puede medir la cantidad del polipéptido en una muestra, p.ej., un lisado celular, mediante una diversidad de métodos de inmunoensayos que proporcionan resultados cualitativos y cuantitativos a un técnico experto. Para una revisión de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayos, en general, véase, p.ej., Stites, anteriormente mencionado; patentes de EE.UU. N°s 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168.

Marcaje en Inmunoensayos

Los inmunoensayos utilizan a menudo un agente marcador para unirse de manera específica y marcar el complejo de unión formado por el anticuerpo y la proteína objetivo. El agente marcador puede ser él mismo uno de los restos que constituyen el complejo anticuerpo/proteína objetivo, o puede ser un tercer resto, tal como otro anticuerpo, que se une específicamente al complejo anticuerpo/proteína objetivo. Un marcador puede ser detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, microesferas magnéticas (p.ej., Dynabeads™), tintes fluorescentes (p.ej., isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares), radiomarcadores (p.ej., ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (p.ej., peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, y otras usadas habitualmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o microesferas de vidrio o plástico coloreado (p.ej., poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

En algunos casos, el agente marcador es un segundo anticuerpo que alberga un marcador detectable. De manera alternativa, el segundo anticuerpo puede carecer de un marcador, pero puede, a su vez, unirse a un tercer anticuerpo marcado específico hacia los anticuerpos de la especie de la que deriva el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo se puede modificar con un resto detectable, tal como biotina, al cual se puede unir de manera específica una tercera molécula marcada, tal como estreptavidina marcada con una enzima.

También se pueden usar como agentes marcadores otras proteínas capaces de unirse de manera específica a re-

giones constantes de inmunoglobulinas, tales como proteína A o proteína G. Estas proteínas son constituyentes normales de las paredes celulares de las bacterias estreptocócicas. Exhiben una reactividad no inmunógena intensa con las regiones constantes de las inmunoglobulinas de una diversidad de especies (véase, en general, Kronval, *et al. J. Immunol.*, **111**: 1401-1406 (1973); y Akerstrom, *et al., J. Immunol.*, **135**: 2589-2542 (1985)).

5 Formatos de Inmunoensayos

Los inmunoensayos para detectar una proteína objetivo de interés (p.ej., una hormona del crecimiento humana mutante) a partir de muestras pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que la cantidad de proteína objetivo capturada se mide directamente. En un ensayo de tipo "sándwich" preferido, por ejemplo, el anticuerpo específico para la proteína objetivo puede estar unido directamente a un soporte sólido en el que el anticuerpo está inmovilizado. Después captura la proteína objetivo de las muestras de ensayo. El complejo anticuerpo/proteína objetivo así inmovilizado se une después a un agente marcador, tal como un segundo o tercer anticuerpo que alberga un marcador, como se describió anteriormente.

En los ensayos competitivos, la cantidad de proteína objetivo en una muestra se mide de manera indirecta midiendo la cantidad de una proteína objetivo añadida (exógena) desplazada (o reemplazada competitivamente) de un anticuerpo específico para la proteína objetivo presente en la muestra. En un ejemplo típico de tal ensayo, el anticuerpo está inmovilizado y la proteína objetivo exógena está marcada. Debido a que la cantidad de la proteína objetivo exógena unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de la proteína objetivo presente en la muestra, el nivel de proteína objetivo en la muestra se puede determinar así basándose en la cantidad de la proteína objetivo exógena unida al anticuerpo y así inmovilizada.

En algunos casos, se usa del análisis de transferencia de western (inmunotransferencia) para detectar y cuantificar la presencia de una hormona del crecimiento humana mutante en las muestras. La técnica comprende en general separar las proteínas de la muestra mediante electroforesis en gel basándose en el peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon, o un filtro de nailon derivatizado) e incubar las muestras con los anticuerpos que se unen de manera específica a la proteína objetivo. Estos anticuerpos pueden estar marcados directamente, o de manera alternativa se pueden detectar posteriormente mediante el uso de anticuerpos marcados (p.ej., anticuerpos anti-ratón de oveja marcados) que se unen de manera específica a los anticuerpos hacia la hormona del crecimiento humana mutante.

Otros formatos de ensayo incluyen los inmunoensayos con liposomas (LIA), que usan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (p.ej., anticuerpos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados. Los productos químicos liberados se detectan después según las técnicas habituales (véase, Monroe *et al., Amer. Clin. Prod. Rev.*, **5**: 34-41 (1986)).

Glicosilación y Glicoconjugación de la hGH Mutante

Glicosilación y Glicoconjugación mediante Métodos Enzimáticos

La modificación *in vitro* post-expresión de los péptidos es una estrategia atractiva para remediar las deficiencias de los métodos que se basan en el control de la glicosilación mediante sistemas de expresión modificados; incluyen la modificación de las estructuras de glicano o la introducción de glicanos en sitios nuevos. Hay disponible una colección extensa de enzimas que transfieren restos donantes de sacáridos, lo que hace posible la síntesis enzimática *in vitro* de glucoconjugados con patrones de glicosilación y estructuras de glicosilo diseñadas a medida. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°s 5.876.980; 6.030.815; 5.728.554; 5.922.577; y las solicitudes de patentes publicadas WO 98/31826; WO 01/88117; WO 03/031464; WO 03/046150; WO 03/045980; WO 03/093448; WO 04/009838; US2002/142370; US2003/040037; US2003/180835; US2004/063911; US2003/207406; y US2003/124645.

También se describen en la presente memoria los métodos para preparar conjugados de hormonas del crecimiento humanas mutantes glicosiladas y sin glicosilar, que tienen sitios de glicosilación nuevos que no existen en la hGH de tipo natural correspondiente. Tal conjugación puede tener lugar directamente en las unidades de carbohidrato adecuadas de una hGH mutante glicosilada, o tras la eliminación (es decir, el "recorte") de cualquier unidad de carbohidrato indeseada. Los conjugados se forman entre péptidos y diversas especies tales como polímeros hidrosolubles, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, restos de selección del objetivo y similares. También se describen conjugados que incluyen dos o más péptidos unidos entre sí por medio de un brazo ligador, es decir, 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.

Los conjugados se forman mediante la unión enzimática de un carbohidrato modificado al péptido glicosilado o sin glicosilar. El carbohidrato modificado, cuando se interpone entre el péptido y el grupo modificador del carbohidrato se convierte en lo que se denomina en la presente memoria "un grupo ligador de glicosilo intacto". Mediante el uso de la selectividad exquisita de las enzimas, tales como las glicosiltransferasas, el presente método proporciona péptidos que albergan un grupo deseado en una o más localizaciones específicas. Así, según la presente descripción, un

carbohidrato modificado se une directamente a un sitio seleccionado de la cadena peptídica o, de manera alternativa, el carbohidrato modificado se añade a un resto de carbohidrato de un glicopéptido. Los péptidos en los que hay unidos carbohidratos modificados tanto a un carbohidrato de glicopéptido como directamente a un residuo de aminoácido del esqueleto peptídico también están dentro del alcance de la presente invención.

- 5 En contraste con las estrategias químicas y enzimáticas de elaboración de péptidos, los métodos de la invención hacen posible construir péptidos y glicopéptidos que tienen un patrón de derivatización sustancialmente homogéneo; las enzimas usadas en la invención son selectivas en general para un residuo de aminoácido particular o combinación de residuos de aminoácidos del péptido. Los métodos también son prácticos para la producción a gran escala de péptidos modificados y glicopéptidos. Así, los métodos de la invención proporcionan un medio práctico para la preparación a gran escala de glicopéptidos que tienen patrones de derivatización uniformes preseleccionados. Los métodos son muy adecuados especialmente para la modificación de péptidos terapéuticos, que incluyen, pero sin limitación, glicopéptidos que se glicosilan de manera incompleta durante la producción en las células cultivadas (p.ej., células de mamífero, células de insecto, células vegetales, células fúngicas, células de levadura, o células procariontes) o plantas o animales transgénicos.
- 10 Los métodos proporcionan además conjugados de péptidos glicosilados y sin glicosilar con una semivida terapéutica incrementada debido, por ejemplo, a una velocidad de eliminación reducida, o a una velocidad reducida de captación por el sistema inmunitario o reticuloendotelial (SRE). Además, los métodos de la invención proporcionan un medio para enmascarar determinantes antigénicos en los péptidos, por lo que se reduce o se elimina una respuesta inmunitaria del hospedador contra el péptido. También se puede usar la unión selectiva de agentes de selección del objetivo para dirigir un péptido hacia un tejido particular o hacia un receptor de la superficie celular que es específico para el agente de selección del objetivo particular.
- 15 20

Conjugados

La presente descripción describe un conjugado entre un grupo modificador seleccionado y un péptido mutante de hGH que tiene un sitio de glicosilación que no está presente en el péptido de tipo natural. El grupo modificador se puede unir en el sitio de glicosilación mutante o en un sitio que está presente en el péptido de tipo natural.

25

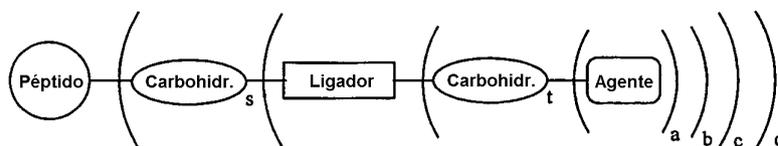
La unión entre el péptido y el grupo modificador incluye un grupo ligador de glicosilo interpuesto entre el péptido y el resto seleccionado. Tal como se discute en la presente memoria, el resto seleccionado es esencialmente cualquier especie que se puede unir a una unidad de sacárido, lo que da como resultado un carbohidrato modificado que es reconocido por una enzima transferasa adecuada, que une el carbohidrato modificado al péptido. El componente de sacárido del carbohidrato modificado, cuando está interpuesto entre el péptido y un resto seleccionado, se convierte en un "grupo ligador de glicosilo", p.ej., un "grupo ligador de glicosilo intacto". El grupo ligador de glicosilo se forma a partir de cualquier mono- u oligo-sacárido que, tras la modificación con un grupo modificador, es un sustrato para una enzima que añade el carbohidrato modificado a un aminoácido o residuo de glicosilo de un péptido.

30

El grupo ligador de glicosilo puede ser, o puede incluir, un resto de sacárido que se modifica de forma degradativa durante la adición del grupo modificador. Por ejemplo, el grupo ligador de glicosilo puede proceder de un residuo de sacárido que se produce mediante la degradación oxidativa de un sacárido intacto hasta el aldehído correspondiente, p.ej., por medio de la acción de metaperiodato, y que se convierte posteriormente en una base de Schiff con una amina adecuada, que después se reduce hasta la amina correspondiente.

35

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



40 en la que los símbolos a, b, c, d y s representan un número entero positivo que no es cero; y t es 0 o un número entero positivo. El "agente" es un agente terapéutico, un agente bioactivo, un marcador detectable, resto hidrosoluble (p.ej., PEG, m-PEG, PPG, y m-PPG) o similares. El "agente" puede ser un péptido, p.ej., enzima, anticuerpo, antígeno, etc. El ligador puede ser cualquiera de una serie extensa de grupos ligadores, mencionados más adelante. De manera alternativa, el ligador puede ser un enlace simple o un "ligador de orden cero".

45

En una realización ejemplar, el grupo modificador seleccionado es un polímero hidrosoluble, p.ej., m-PEG. El polímero hidrosoluble se une de manera covalente al péptido por medio de un grupo ligador de glicosilo. El grupo ligador de glicosilo se une de manera covalente a un residuo de aminoácido o a un residuo de glicosilo del péptido. La invención también proporciona conjugados en los que un residuo de aminoácido y un residuo de glicosilo se modifican con un grupo ligador de glicosilo.

50

Un polímero hidrosoluble ejemplar es poli(etilen glicol), p.ej., metoxipoli(etilen glicol). El poli(etilen glicol) usado en la

presente invención no está limitado a ninguna forma o intervalo de peso molecular particular. El peso molecular del poli(etilen glicol) es preferiblemente de entre 500 y 100.000. Se usa preferiblemente un peso molecular de 500-60.000, y preferiblemente de 1.000-40.000. Más preferiblemente, el peso molecular es de alrededor de 5.000 a alrededor de 40.000.

5 En otra realización, el poli(etilen glicol) es un PEG ramificado que tiene más de un resto de PEG unido. Los ejemplos de PEGs ramificados se describen en la pat. de EE.UU. nº 5.932.462; pat. de EE.UU. nº 5.342.940; pat. de EE.UU. nº 5.643.575; pat. de EE.UU. nº 5.919.455; pat. de EE.UU. nº 6.113.906; pat. de EE.UU. nº 5.183.660; documento WO 02/09766; Kodera Y., *Bioconjugate Chemistry* **5**: 283-288 (1994); y Yamasaki *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **52**: 2125-2127, 1998. En una realización preferida, el peso molecular de cada poli(etilen glicol) del PEG ramificado es
10 5.000-20.000.

Además de proporcionar conjugados que se forman por medio de un grupo ligador de glicosilo añadido enzimáticamente, la presente invención proporciona conjugados que son muy homogéneos en sus patrones de sustitución. Mediante el uso de los métodos de la invención, es posible formar conjugados peptídicos en los que esencialmente todos los restos de carbohidratos modificados en una población de conjugados de la invención están unidos en múltiples copias de un residuo de aminoácido o de glicosilo estructuralmente idéntico. Así, en un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos de polímeros hidrosolubles, que están unidos de manera covalente al péptido a través de un grupo ligador de glicosilo intacto. En un conjugado preferido de la invención, esencialmente cada miembro de la población se une a través del grupo ligador de glicosilo a un residuo de glicosilo del péptido, y cada residuo de glicosilo del péptido al que está unido el grupo ligador de glicosilo tiene la misma estructura.
15
20

También se proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos de polímero hidrosoluble unidos de manera covalente a él por medio de un grupo ligador de glicosilo. En una realización preferida, esencialmente cada miembro de la población de restos de polímero hidrosoluble está unido a un residuo de aminoácido del péptido a través de un grupo ligador de glicosilo, y cada residuo de aminoácido que tiene un grupo ligador de glicosilo unido a él tiene la misma estructura.
25

La presente invención también proporciona conjugados análogos a los descritos anteriormente en los que el péptido está conjugado a un resto terapéutico, resto de diagnóstico, resto de selección del objetivo, resto de toxina o similar a través de un grupo ligador de glicosilo intacto. Cada uno de los restos anteriormente enumerados puede ser una molécula pequeña, polímero natural (p.ej., polipéptido) o polímero sintético.

30 En una realización ejemplar, la hormona del crecimiento humana mutante está conjugada a transferrina a través de un ligador bifuncional que incluye un grupo ligador de glicosilo intacto en cada extremo del resto de PEG (Esquema 1). Por ejemplo, un extremo del ligador de PEG esta funcionalizado con un ligador de ácido siálico intacto que está unido a transferrina, y el otro está funcionalizado con un ligador de GalNAc intacto que está unido a la hGH mutante.

Los conjugados de la invención pueden incluir grupos ligadores de glicosilo intactos que son mono- o multi-valentes (p.ej., estructuras de antena). Así, los conjugados de la invención incluyen ambas especies en las que un resto seleccionado está unido a un péptido a través de un grupo ligador de glicosilo monovalente. También están incluidos en la invención los conjugados en los que más de un resto seleccionado está unido a un péptido a través de un grupo ligador multivalente.
35

En una realización adicional, la invención proporciona conjugados que se localizan de manera selectiva en un tejido particular debido a la presencia de un agente de selección del objetivo como componente del conjugado. En una realización ejemplar, el agente de selección del objetivo es una proteína. Las proteínas ejemplares incluyen transferrina (cerebro, conjunto de la sangre), HS-glicoproteína (hueso, cerebro, conjunto de la sangre), anticuerpos (cerebro, tejido con antígeno específico de anticuerpo, conjunto de la sangre), factores de coagulación V-XII (tejido lesionado, coágulos, cáncer, conjunto de la sangre), proteínas séricas, p.ej., α -glicoproteína ácida, fetuina, α -feto proteína (cerebro, conjunto de la sangre), β 2-glicoproteína (hígado, placas ateroscleróticas, cerebro, conjunto de la sangre), G-CSF, GM-CSF, M-CSF, y EPO (estimulación inmunitaria, cánceres, conjunto de la sangre, sobreproducción de eritrocitos, neuroprotección), albúmina (incremento de la semivida), y lipoproteína E.
40
45

Métodos

Además de los conjugados discutidos anteriormente, la presente descripción describe métodos para la preparación de estos y otros conjugados. Así, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la formación de un conjugado covalente entre un resto seleccionado y un péptido. También se describen en la presente memoria métodos para dirigir los conjugados de la invención hacia un tejido o región particular del organismo. Además, la presente descripción proporciona un método para prevenir, curar, o mejorar un estado patológico administrando un conjugado de la invención a un sujeto que corre el riesgo de desarrollar la enfermedad o a un sujeto que tiene la enfermedad.
50
55

En las realizaciones ejemplares, el conjugado se forma entre un polímero hidrosoluble, un resto terapéutico, un resto

de selección del objetivo o una biomolécula, y un péptido glicosilado o no glicosilado. El polímero, resto terapéutico o biomolécula se conjugan con el péptido por medio de un grupo ligador de glicosilo intacto, que se interpone, y se une de manera covalente tanto al péptido como al grupo modificador (p.ej., polímero hidrosoluble). El método incluye poner en contacto el péptido con una mezcla que contiene un carbohidrato modificado y una glicosiltransferasa para la que el carbohidrato modificado es un sustrato. La reacción se lleva a cabo en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el carbohidrato modificado y el péptido. El resto de carbohidrato del carbohidrato modificado se selecciona preferiblemente de carbohidratos de nucleótidos, carbohidratos activados, y carbohidratos que no son de nucleótidos ni están activados.

El péptido aceptor (glicosilado o sin glicosilar) generalmente se sintetiza *de novo*, o se expresa de manera recombinante en una célula procariótica (p.ej., célula bacteriana, tal como *E. coli*) o en una célula eucariótica, tal como una célula de mamífero, de levadura, de insecto, fúngica o vegetal. El péptido puede ser una proteína de tamaño completo o un fragmento. Además, el péptido puede ser de tipo natural o un péptido mutado. En una realización ejemplar, el péptido incluye una mutación que añade uno o más sitios consenso de glicosilación a la secuencia del péptido.

El método de la invención también prevé la modificación de péptidos glicosilados de manera incompleta que se producen de forma recombinante. Muchas lipoproteínas producidas de forma recombinante están glicosiladas de manera incompleta, por lo que exponen residuos de carbohidratos que pueden tener propiedades indeseables, p.ej., inmunogenicidad, reconocimiento por parte del SRE. Mediante el empleo de un carbohidrato modificado en un método de la invención, el péptido se puede glicosilar adicionalmente de forma simultánea y derivatizar, por ejemplo, con un polímero hidrosoluble, agente terapéutico, o similares. El resto de carbohidrato del carbohidrato modificado puede ser el residuo que se conjugaría correctamente con el aceptor en un péptido completamente glicosilado, u otro resto de carbohidrato con propiedades deseables.

Los péptidos modificados mediante los métodos de la invención pueden ser péptidos sintéticos o de tipo natural, o pueden ser péptidos mutados, producidos mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida. La glicosilación de los péptidos es en general con unión en N o con unión en O. Una unión en N ejemplar es la unión del carbohidrato modificado a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de un resto de carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación con unión en O se refiere a la unión de un carbohidrato (p.ej., N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa) en la cadena lateral de hidroxilo de un hidroxiaminoácido, preferiblemente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación a un péptido u otra estructura se lleva a cabo de manera conveniente alterando la secuencia de aminoácidos, de forma que contenga uno o más sitios de glicosilación. La adición se puede realizar también mediante la incorporación de una o más especies que presentan un grupo OH, preferiblemente residuos de serina o treonina, en la secuencia del péptido (para los sitios de glicosilación con unión en O). La adición se puede realizar mediante mutación o mediante síntesis química completa del péptido. La secuencia de aminoácidos del péptido se altera preferiblemente por medio de cambios a nivel del ADN, en particular mutando el ADN que codifica el péptido en bases preseleccionadas, de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La(s) mutación(es) del ADN se realizan preferiblemente mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

En una realización ejemplar, el sitio de glicosilación se añade reordenando aleatoriamente polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican un péptido candidato se pueden modular con protocolos de reordenamiento aleatorio del ADN. El reordenamiento aleatorio del ADN es un procedimiento de recombinación y mutación recurrentes, llevado a cabo mediante la fragmentación aleatoria de un grupo de genes relacionados, seguido por la reconstrucción de los fragmentos mediante un procedimiento similar a la reacción en cadena de la polimerasa. Véase, p.ej., Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751 (1994); Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994); y las patentes de EE.UU. n°s 5.605.793, 5.837.458, 5.830.721 y 5.811.238.

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

La adición o eliminación de cualquier resto de carbohidrato presente en el glicopéptido se lleva a cabo de manera química o enzimática. La desglicosilación química se lleva a cabo preferiblemente mediante la exposición de la variante del polipéptido al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento

da como resultado la escisión de la mayor parte o de todos los carbohidratos excepto el carbohidrato de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), y al mismo tiempo deja el péptido intacto. La desglicosilación química se describe en Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **259**: 52 (1987) y en Edge *et al.*, *Anal. Biochem.* **118**: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de carbohidrato en variantes polipeptídicas se puede llevar a cabo mediante el uso de una diversidad de endo- y exo-glicosilasas tal como se describe en Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* **138**: 350 (1987).

La adición química de restos de glicosilo se lleva a cabo mediante cualquier método reconocido en la técnica. La adición enzimática de restos de carbohidrato se lleva a cabo preferiblemente mediante el uso de una modificación de los métodos expuestos en la presente memoria, sustituyendo las unidades de glicosilo nativas por los carbohidratos modificados usados en la invención. Otros métodos para añadir restos de carbohidratos se describen en las patentes de EE.UU. n°s 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554, y 5.922.577.

Los puntos de unión ejemplares para el residuo de glicosilo seleccionado incluyen, pero sin limitación: (a) sitios consenso para la glicosilación con unión en N y la glicosilación con unión en O; (b) restos de glicosilo terminales que son aceptores para una 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 para el uso en la presente invención se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de sep. de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC CRIT. REV. BIOCHEM.*, págs. 259-306 (1981).

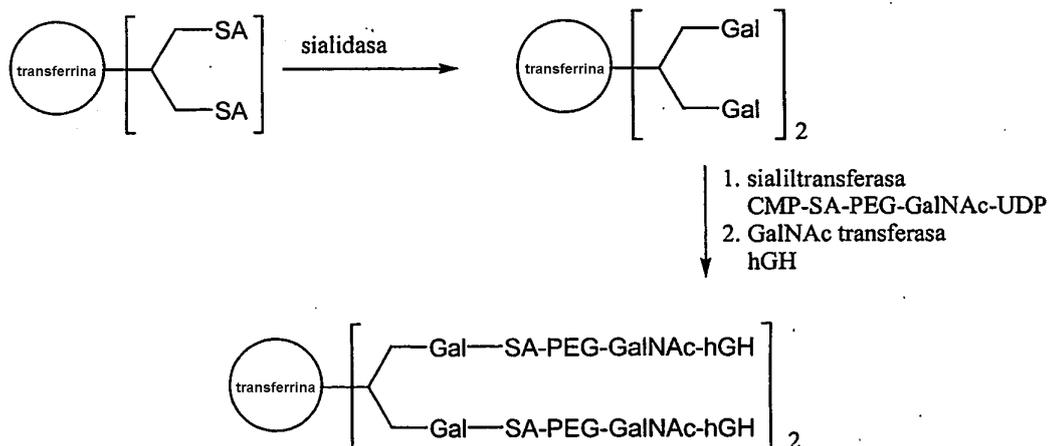
En una realización, la invención proporciona un método para unir hGH y uno o más péptidos por medio de un grupo ligador. El grupo ligador tiene cualquier estructura útil, y se puede seleccionar de estructuras de cadena lineal y de cadena ramificada. Preferiblemente, cada extremo del ligador, que está unido a un péptido, incluye un carbohidrato modificado (es decir, un grupo ligador de glicosilo intacto naciente).

En un método ejemplar de la invención, dos péptidos están unidos entre sí a través de un resto ligador que incluye un ligador de PEG. La estructura se ajusta a la estructura general expuesta en el dibujo anterior. Tal como se describe en la presente memoria, la construcción de la invención incluye dos grupos ligadores de glicosilo intactos (es decir, $s + t = 1$). El foco sobre un ligador de PEG que incluye dos grupos glicosilo es por motivos de claridad, y no se debería interpretar como limitante de la identidad de los brazos del ligador para el uso en esta realización de la invención.

Así, un resto de PEG se funcionaliza en un primer extremo con una primera unidad de glicosilo y en un segundo extremo con una segunda unidad de glicosilo. La primera y segunda unidades de glicosilo son preferiblemente sustratos para diferentes transferasas, lo que permite la unión ortogonal del primer y segundo péptido a la primera y segunda unidad de glicosilo, respectivamente. En la práctica, el ligador $(\text{glicosilo})^1\text{-PEG-(glicosilo)}^2$ se pone en contacto con el primer péptido y una primera transferasa para la que la primera unidad de glicosilo es un sustrato, por lo que se forma $(\text{péptido})^1\text{-(glicosilo)}^1\text{-PEG-(glicosilo)}^2$. Después, la glicosiltransferasa y/o el péptido sin reaccionar se eliminan opcionalmente de la mezcla de reacción. El segundo péptido y una segunda transferasa para la que la segunda unidad de glicosilo es un sustrato se añaden al conjugado $(\text{péptido})^1\text{-(glicosilo)}^1\text{-PEG-(glicosilo)}^2$, por lo que se forma $(\text{péptido})^1\text{-(glicosilo)}^1\text{-PEG-(glicosilo)}^2\text{-(péptido)}^2$. Los expertos en la técnica apreciarán que el método resumido anteriormente también es aplicable para la formación de conjugados entre más de dos péptidos, por ejemplo, mediante el uso de un PEG ramificado, dendrímero, poli(aminoácido), polisacárido o similares.

En una realización ejemplar, la hormona del crecimiento humana está conjugada a transferrina a través de un ligador bifuncional que incluye un grupo ligador de glicosilo intacto en cada extremo del resto de PEG (Esquema 1). El conjugado de hGH tiene una semivida *in vivo* que está incrementada respecto de la de hGH sola en virtud del tamaño molecular mayor del conjugado. Además, la conjugación de hGH a transferrina sirve para dirigir de manera selectiva el conjugado al cerebro. Por ejemplo, un extremo del ligador de PEG se funcionaliza con CMP-ácido siálico y el otro se funcionaliza con UDP-GalNAc. El ligador se combina con hGH en presencia de una GalNAc transferasa, lo que da como resultado la unión del GalNAc del brazo del ligador a un residuo de serina y/o treonina de la hGH.

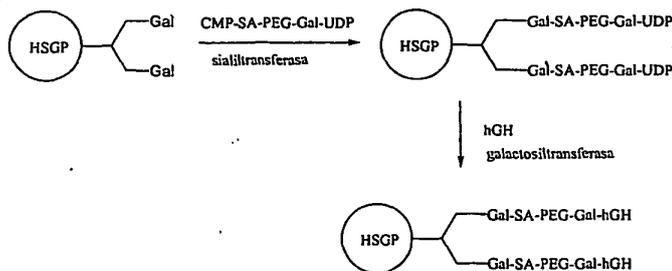
Esquema 1



El procedimiento descrito anteriormente se puede llevar a cabo por medio de tantos ciclos como se desee, y no se limita a la formación de un conjugado entre dos péptidos con un único ligador. Además, los expertos en la técnica apreciarán que las reacciones que funcionalizan los grupos ligadores de glicosilo intactos en los extremos del ligador de PEG (u otros) con el péptido se pueden dar de manera simultánea en el mismo recipiente de reacción, o se pueden llevar 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 la reacción (p.ej., enzimas, péptidos).

Otra realización ejemplar se expone en el Esquema 2. El Esquema 2 muestra un método para preparar un conjugado que dirige una proteína seleccionada, p.ej., la hormona del crecimiento humana, hacia el hueso e incrementa la semivida circulatoria de la proteína seleccionada.

Esquema 2



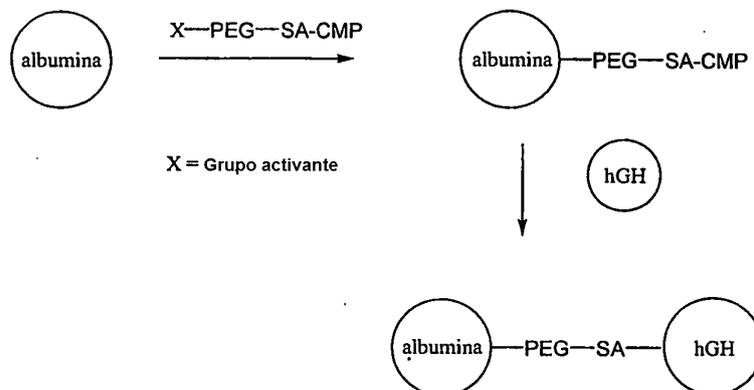
en el que G es un residuo de glicosilo en un resto de carbohidrato activado (p.ej., nucleótidos de carbohidratos) que se convierte en un grupo ligador de glicosilo intacto en el conjugado. Cuando s es mayor de 0, L es un grupo ligador de sacarilo tal como GalNAc, o GalNAc-Gal.

El uso de derivados reactivos de PEG (u otros ligadores) para unir uno o más restos de péptidos al ligador está dentro del alcance de la presente invención. La invención no se limita a la identidad del análogo de PEG reactivo. Muchos derivados activados de poli(etilenglicol) están disponibles comercialmente y en la biografía. Un experto en la técnica tiene capacidad para elegir, y sintetizar si es necesario, un derivado de PEG activado adecuado con el que preparar un sustrato útil en la presente invención. Véase, 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. Commun.*, **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, págs. 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.*, *ASAIJ Journal*, M649-M-653 (1992)) y epóxidos (pat. de EE.UU. n° 4.806.595, expedida a Noishiki *et al.*, (1989).

Otros grupos ligadores incluyen la unión uretano entre grupos amino y PEG activado. Véase, Veronese, et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **11**: 141-152 (1985).

En otra realización ejemplar, la invención proporciona un método para prolongar la semivida en la circulación sanguínea de un péptido seleccionado, básicamente dirigiendo el péptido hacia el conjunto de la sangre, conjugando el péptido con un polímero sintético o natural de un tamaño suficiente para retrasar la filtración de la proteína en el glomérulo (p.ej., albúmina). Véase el Esquema 3. Esta realización de la invención se ilustra en el Esquema 3, en el que la hGH se conjuga a albúmina por medio de un ligador de PEG mediante el uso de una combinación de modificaciones químicas y enzimáticas.

Esquema 3



Así, tal como se muestra en el Esquema 3, se modifica un residuo (p.ej., la cadena lateral de un aminoácido) de la albúmina con un derivado de PEG reactivo, tal como X-PEG-(CMP-ácido siálico), en el que X es un grupo activante (p.ej., éster activo, isotiocianato, etc.). El derivado de PEG y hGH se combinan y se ponen en contacto con una transferasa para la que CMP-ácido siálico es un sustrato. En una realización ilustrativa adicional, se hace reaccionar una ϵ -amina de lisina con el éster de N-hidroxisuccinimida del ligador de PEG para formar un conjugado con la albúmina. El CMP-ácido siálico del ligador se conjuga enzimáticamente con un residuo adecuado de hGH, p.ej., Gal o GalNAc, por lo que se forma el conjugado. Los expertos en la técnica apreciarán que el método anteriormente descrito no se limita a las moléculas de reacción expuestas en él. Además, el método se puede poner en práctica para formar conjugados que incluyen más de dos restos de proteína, por ejemplo, mediante la utilización de ligadores ramificados que tienen más de dos extremos.

Carbohidratos Modificados

Las especies donantes de glicosilo modificadas ("carbohidratos modificados") se seleccionan preferiblemente de nucleótidos de carbohidratos modificados, carbohidratos modificados activados y carbohidratos modificados que son sacáridos simples que no son nucleótidos ni están activados. Se puede añadir cualquier estructura de carbohidrato deseada a un péptido mediante el uso de los métodos de la invención. En general, la estructura será un monosacárido, pero la presente invención no se limita al uso de carbohidratos de monosacáridos modificados; los oligosacáridos y polisacáridos también son útiles.

El grupo modificador se une a un resto de carbohidrato por medios enzimáticos, medios químicos o una combinación de los mismos, por lo que se produce un carbohidrato modificado. Los carbohidratos se sustituyen en cualquier posición que permita la unión del resto modificador, y que todavía permita que el carbohidrato funcione como un sustrato para la enzima utilizada para ligar el sustrato modificado al péptido. En una realización preferida, cuando el ácido siálico es el carbohidrato, el ácido siálico se sustituye con el grupo modificador en la posición 9 de la cadena lateral de piruvilo, o en la posición 5 en el resto de amina que está acetilado normalmente en el ácido siálico.

En ciertas realizaciones de la presente invención, se utiliza un nucleótido de carbohidrato modificado para añadir el carbohidrato modificado al péptido. Los nucleótidos de carbohidrato ejemplares que se usan en la presente invención en su forma modificada incluyen los mono-, di- o trifosfatos de nucleótidos o los análogos de los mismos. En una realización preferida, el nucleótido de carbohidrato modificado se selecciona de un UDP-glicósido, CMP-glicósido, o un GDP-glicósido. Aún más preferiblemente, el nucleótido de carbohidrato modificado se selecciona de una 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 nucleótidos de carbohidrato también son útiles en el método de la invención.

La invención también proporciona métodos para sintetizar un péptido modificado mediante el uso de un carbohidrato modificado, p.ej., galactosa, fucosa, GalNAc, y ácido siálico modificados. Cuando se usa un ácido siálico modificado,

se puede usar una sialiltransferasa o una trans-sialidasa (para el ácido siálico unido en α 2,3 únicamente) en estos métodos.

En otras realizaciones, el carbohidrato modificado es un carbohidrato activado. Los carbohidratos modificados activados, que son útiles en la presente invención, son en general glicósidos que se han alterado sintéticamente para que incluyan un grupo saliente activado. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "grupo saliente activado" se refiere a los restos que se desplazan fácilmente en reacciones de sustitución nucleófila reguladas por enzimas. Se conocen muchos carbohidratos activados en la técnica. Véase, 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)).

Los ejemplos de grupos activadores (grupos salientes) incluyen fluoro, cloro, bromo, éster de tosilato, éster de mesilato, éster de triflato y similares. Los grupos salientes activados preferidos para el uso en la presente invención son aquellos que no dificultan estéricamente de manera significativa la transferencia enzimática del glicósido al aceptor. Por lo tanto, las realizaciones preferidas de los derivados de glicósido activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, y los fluoruros de glicosilo se prefieren especialmente. Entre los fluoruros de glicosilo, el fluoruro de α -galactosilo, fluoruro de α -manosilo, fluoruro de α -glucosilo, fluoruro de α -fucosilo, fluoruro de α -xilosilo, fluoruro de α -sialilo, fluoruro de α -N-acetilglucosaminilo, fluoruro de α -N-acetilgalactosaminilo, fluoruro de β -galactosilo, fluoruro de β -manosilo, fluoruro de β -glucosilo, fluoruro de β -fucosilo, fluoruro de β -xilosilo, fluoruro de β -sialilo, fluoruro de β -N-acetilglucosaminilo y fluoruro de β -N-acetilgalactosaminilo son los más preferidos.

A modo de ilustración, los fluoruros de glicosilo se pueden preparar a partir del carbohidrato libre, acetilando primero el carbohidrato y después tratándolo con HF/piridina. Esto genera el anómero termodinámicamente más estable del fluoruro de glicosilo protegido (acetilado) (es decir, el fluoruro de α -glicosilo). Si se desea el anómero menos estable (es decir, el fluoruro de β -glicosilo), se puede preparar convirtiendo el carbohidrato peracetilado con HBr/HOAc o con HCl para generar el bromuro o 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 se pueden desproteger mediante una reacción con una base suave (catalítica) en metanol (p.ej., NaOMe/MeOH). Además, muchos fluoruros de glicosilo están disponibles comercialmente.

Otros derivados de glicosilo activados se pueden preparar mediante el uso de métodos convencionales conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar mesilatos de glicosilo mediante el tratamiento de la forma hemiacetal completamente bencilada del carbohidrato con cloruro de mesilo, seguido de hidrogenación catalítica para eliminar los grupos bencilo.

En una realización ejemplar adicional, el carbohidrato modificado es un oligosacárido que tiene una estructura de antena. En una realización preferida, uno o más de los extremos de la antena albergan el resto modificador. Cuando hay unido más de un resto modificador a un oligosacárido que tiene una estructura de antena, el oligosacárido es útil para "amplificar" el resto modificador; cada unidad de oligosacárido conjugada al péptido une múltiples copias del grupo modificador del péptido. La estructura general de un quelato típico de la invención, tal como se expone en los dibujos anteriores, abarca especies multivalentes que son el resultado de preparar un conjugado de la invención mediante la utilización de una estructura de antena. Se conocen en la técnica muchas estructuras de sacáridos con forma de antena, y el presente método se puede poner en práctica con ellos sin limitación.

Los grupos modificadores ejemplares se discuten a continuación. Los grupos modificadores se pueden seleccionar en función de su capacidad de conferir a un polipéptido una o más propiedades deseables. Las propiedades ejemplares incluyen, pero sin limitación, farmacocinética incrementada, farmacodinámica incrementada, biodistribución mejorada, proporcionar una especie polivalente, solubilidad en agua mejorada, lipofilia aumentada o disminuida, y selección como objetivo de tejidos.

Polímeros Hidrosolubles

La hidrofilia de un péptido seleccionado se incrementa mediante la conjugación con moléculas polares tales como moléculas que contienen amina, éster, hidroxilo y polihidroxilo. Los ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, polilisina, polietilenimina, y poliéteres, p.ej., poli(etilen glicol), m-poli(etilen glicol), poli(propilenglicol), m-poli(propilen glicol), y otros restos de O-alkil poli(alkilen glicol). Los polímeros hidrosolubles preferidos son esencialmente no fluorescentes, o emiten tal cantidad mínima de fluorescencia que son inadecuados para el uso como marcador fluorescente en un ensayo. Además, en general se prefiere usar polímeros que no sean carbohidratos que se den de manera natural. Una excepción a esta preferencia es el uso de un carbohidrato que por otra parte se da de manera natural que se modifica mediante la unión covalente de otra entidad (p.ej., poli(etilen glicol), poli(propilen glicol), biomolécula, resto terapéutico, resto de diagnóstico, etc.). En otra realización ejemplar, se conjuga un resto de carbohidrato terapéutico a un brazo ligador y el casete carbohidrato-brazo ligador se conjuga posteriormente a un péptido por medio de un método de la invención.

Los métodos y procedimientos químicos para la activación de polímeros hidrosolubles y sacáridos, así como los métodos para la conjugación de sacáridos y polímeros a diversas especies, se describen en la bibliografía. Los mé-

5 todos usados habitualmente para la activación de polímeros incluyen la activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclohidrina, divinilsulfona, carbodiimida, haluros de sulfonilo, triclorotriazina, etc. (véase, 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.*, Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

10 Los expertos en la técnica conocen muchos polímeros hidrosolubles, y son útiles en la práctica de la presente invención. La expresión polímero hidrosoluble abarca especies tales como sacáridos (p.ej., dextrano, amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poli (aminoácidos); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (p.ej., poli(ácido acrílico), poli(éteres), p.ej., poli(etilen glicol); péptidos, proteínas, y similares. La presente invención se puede poner en práctica con cualquier polímero hidrosoluble, con la única limitación de que el polímero debe incluir un punto en el que el resto del conjugado se pueda unir.

15 Los métodos para la activación de polímeros se pueden hallar también en el documento WO 94/17039, pat. de EE.UU. n° 5.324.844, documento WO 94/18247, documento WO 94/04193, pat. de EE.UU. n° 5.219.564, pat. de EE.UU. n° 5.122.614, documento WO 90/13540, pat. de EE.UU. n° 5.281.698, y documento WO 93/15189, y para la conjugación entre polímeros activados y péptidos, p.ej. el Factor de Coagulación VIII (documento WO 94/15625), hemoglobina (documento WO 94/09027), molécula portadora de oxígeno (pat. de EE.UU. n° 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese *et al.*, *App Biochem. Biotech.* **11**: 141-45 (1985)).

20 Los polímeros hidrosolubles preferidos son aquellos en los que una porción sustancial de las moléculas de polímero en una muestra del polímero tienen aproximadamente el mismo peso molecular; se dice que tales polímeros son "homodispersos" o "monodispersos".

25 La presente invención se ilustra además mediante referencia a un conjugado con poli(etilen glicol) o monometoxipoli(etilen glicol) (m-PEG). Hay disponibles varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG. Véase, 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 Bhadra, *et al.*, *Pharmazie*, **57**:5-29 (2002).

El poli(etilen glicol) útil en la formación del conjugado de la invención es lineal o ramificado.

30 La semivida *in vivo* o área bajo la curva (ABC) de los glicopéptidos terapéuticos se puede incrementar también con polímeros hidrosolubles tales como PEG, m-PEG, PPG, y m-PPG. Por ejemplo, la modificación química de proteínas con PEG (PEG-ilación) o m-PEG (m-PEG-ilación) incrementa su tamaño molecular y disminuye su accesibilidad superficial y su accesibilidad a grupos funcionales, cada una de las cuales depende del tamaño del PEG unido a la proteína. Esto da como resultado una mejora de las semividas plasmáticas o ABCs y de la estabilidad proteolítica, y una disminución de la inmunogenicidad y de la captación hepática (Chaffee *et al.* *J. Clin. Invest.* **89**: 1643-1651 (1992); Pyatak *et al.* *Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol.* **29**: 113-127 (1980)). Se ha informado que la PEGilación de la interleucina-2 incrementa su potencia antitumoral *in vivo* (Katre *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 1487-1491 (1987)) y la PEG-ilación de un F(ab')₂ derivado del anticuerpo monoclonal A7 ha mejorado su localización tumoral (Kitamura *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**: 1387-1394 (1990)). Así, en otra realización preferida, la semivida *in vivo* de un péptido derivatizado con un polímero hidrosoluble mediante un método de la invención se incrementa respecto de la semivida *in vivo* o ABC del péptido sin derivatizar.

35 El incremento de la semivida *in vivo* del péptido o de la ABC se expresa mejor en forma de un intervalo de incremento en porcentaje de esta cantidad. El extremo inferior del intervalo de incremento en porcentaje es de alrededor del 40%, alrededor del 60%, alrededor del 80%, alrededor del 100%, alrededor del 150% o alrededor del 200%. El extremo superior del intervalo es de alrededor del 60%, alrededor del 80%, alrededor del 100%, alrededor del 150%, o más de alrededor del 250%.

45 Los restos de PEG de cualquier peso molecular, p.ej., 5 kD, 10 kD, 20 kD, y 30 kD, son útiles en la presente invención.

Biomoléculas

50 En otra realización preferida, el carbohidrato modificado alberga una biomolécula. En otras realizaciones preferidas, la biomolécula es una proteína funcional, enzima, antígeno, anticuerpo, péptido, ácido nucleico (p.ej., nucleótidos o nucleósidos simples, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos monocatenarios o de cadenas superiores), lectina, receptores o una combinación de los mismos.

55 Las biomoléculas preferidas son esencialmente no fluorescentes, o emiten tal cantidad mínima de fluorescencia que son inadecuadas para el uso como marcador fluorescente en un ensayo. Además, se prefiere en general usar biomoléculas que no sean carbohidratos. Una excepción a esta preferencia es el uso de carbohidratos que por otra

parte se dan de manera natural que se modifican mediante la unión covalente de otra entidad (p.ej., PEG, biomolécula, resto terapéutico, resto de diagnóstico, etc.). En una realización ejemplar, se conjuga un resto de carbohidrato, que es una biomolécula, a un brazo ligador y el casete carbohidrato-brazo ligador se conjuga posteriormente a un péptido por medio de un método de la invención.

5 Las biomoléculas útiles en la práctica de la presente invención pueden proceder de cualquier fuente. Las biomoléculas se pueden aislar a partir de fuentes naturales o se pueden producir mediante métodos sintéticos. Los péptidos pueden ser péptidos naturales o péptidos mutados. Las mutaciones se pueden llevar a cabo mediante mutagénesis química, mutagénesis dirigida u otros medios para la introducción de mutaciones conocidas para los expertos en la técnica. 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.

10 Tanto los péptidos obtenidos de forma natural como los sintéticos y los ácidos nucleicos son útiles junto con la presente invención; estas moléculas se pueden unir a un componente de residuo de carbohidrato o a un agente ligador cruzado mediante cualquier grupo reactivo disponible. Por ejemplo, los péptidos se pueden unir por medio de un grupo amina, carboxilo, sulfhidrilo, o hidroxilo reactivo. El grupo reactivo puede hallarse en el extremo de un péptido o en un sitio interno en la cadena peptídica. Los ácidos nucleicos se pueden unir por medio de un grupo reactivo en una base (p.ej., amina exocíclica) o un grupo hidroxilo disponible en un resto de carbohidrato (p.ej., 3'- o 5'-hidroxilo). Las cadenas de péptido y de ácido nucleico se pueden derivatizar adicionalmente en uno o más sitios para permitir la unión de grupos reactivos adecuados en la cadena. Véase, Chrisey *et al.* *Nucleic Acids Res.* **24**: 3031-3039 (1996).

15 En una realización preferida adicional, la biomolécula se selecciona para dirigir el péptido modificado mediante los métodos de la invención a un tejido específico, por lo que se incrementa el transporte del péptido a ese tejido respecto de la cantidad de péptido sin derivatizar que se transporta al tejido. En otra realización preferida, la cantidad de péptido derivatizado transportado a un tejido específico en un periodo de tiempo seleccionado se incrementa mediante la derivatización de al menos alrededor del 20%, más preferiblemente, al menos alrededor del 40%, y más preferiblemente todavía, al menos alrededor del 100%. En la actualidad, las biomoléculas preferidas para las aplicaciones de selección de objetivos incluyen los anticuerpos, hormonas y ligandos para receptores de la superficie celular.

20 En una realización ejemplar adicional, se proporciona un conjugado con biotina. Así, por ejemplo, se elabora un péptido biotinilado de manera selectiva mediante la unión de un resto de avidina o estreptavidina que alberga uno o más grupos modificadores.

Restos Terapéuticos

En otra realización preferida, el carbohidrato modificado incluye un resto terapéutico. Los expertos en la técnica apreciarán que existe una coincidencia parcial entre la categoría de restos terapéuticos y biomoléculas; muchas biomoléculas tienen propiedades o potencial terapéutico.

25 Los restos terapéuticos pueden ser agentes ya aceptados para el uso clínico, o pueden ser fármacos cuyo uso es experimental, o cuya actividad o mecanismo de acción se está investigando. Los restos terapéuticos pueden tener una acción demostrada en un estado patológico dado, o se puede haber hecho solamente la hipótesis de que muestren una acción deseable en un estado patológico dado. En una realización preferida, los restos terapéuticos son compuestos que se están cribando en función de 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 fármacos que tienen una diversidad de actividades farmacológicas. Los restos terapéuticos preferidos son esencialmente no fluorescentes, o emiten tal cantidad mínima de fluorescencia que son inadecuados para el uso como marcador fluorescente en un ensayo. Además, se prefiere usar restos terapéuticos que no sean carbohidratos. Una excepción a esta preferencia es el uso de un carbohidrato que se modifica mediante la unión covalente de otra entidad, tal como un PEG, biomolécula, resto terapéutico, resto de diagnóstico y similares. En otra realización ejemplar, se conjuga un resto de carbohidrato terapéutico a un brazo ligador y el casete carbohidrato-brazo ligador se conjuga posteriormente a un péptido por medio de un método de la invención.

30 Los expertos en la técnica conocen los métodos para la conjugación de agentes terapéuticos y de diagnóstico a otras especies diversas. Véase, 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.

35 En una realización ejemplar, el resto terapéutico se une al carbohidrato modificado por medio de una unión que se escinde en condiciones seleccionadas. Las condiciones ejemplares incluyen, pero sin limitación, un pH seleccionado (p.ej., estómago, intestino, vacuola endocítica), la presencia de una enzima activa (p.ej., esterasa, reductasa, oxidasa), luz, calor y similares. Se conocen muchos grupos escindibles en la técnica. Véase, 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.*,

1261: 205-210 (1986); Browning *et al.*, *J. Immunol.*, **143**: 1859-1867 (1989).

Las clases de restos terapéuticos útiles incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS). Los NSAIDS se pueden seleccionar, por ejemplo, de las siguientes categorías: (p.ej., derivados de ácido propiónico, derivados de ácido acético, derivados de ácido fenámico, derivados de ácido bifenilcarboxílico y oxicams); fármacos antiinflamatorios esteroideos que incluyen hidrocortisona y similares; fármacos antihistamínicos (p.ej., clorfeniramina, triprolidina); fármacos antitusivos (p.ej., dextrometorfano, codeína, caramifeno y carbetapentano); fármacos antipruriginosos (p.ej., metildiazina y trimeprazina); fármacos anticolinérgicos (p.ej., escopolamina, atropina, homatropina, levodopa); fármacos anti-eméticos y anti-náusea (p.ej., ciclizina, meclizina, clorpromazina, buclizina); fármacos anoréxicos (p.ej., benzfetamina, fentermina, clorfentermina, fenfluramina); fármacos estimulantes centrales (p.ej., anfetamina, metanfetamina, dextroanfetamina y metilfenidato); fármacos antiarrítmicos (p.ej., propranolol, procainamida, disopiramida, quinidina, encainida); fármacos bloqueantes β -adrenérgicos (p.ej., metoprolol, acebutolol, betaxolol, labetalol y timolol); fármacos cardiotónicos (p.ej., milrinona, amrinona y dobutamina); fármacos antihipertensivos (p.ej., enalapril, clonidina, hidralazina, minoxidil, guanadrel, guanetidina); fármacos diuréticos (p.ej., amilorida e hidroclorotiazida); fármacos vasodilatadores (p.ej., diltiazem, amiodarona, isoxsuprina, nilidrina, tolazolina y verapamilo); fármacos vasoconstrictores (p.ej., dihidroergotamina, ergotamina y metilsergida); fármacos antiúlceras (p.ej., ranitidina y cimetidina); fármacos anestésicos (p.ej., lidocaína, bupivacaína, clorprocaína, dibucaína); fármacos antidepresivos (p.ej., imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina); fármacos tranquilizantes y sedantes (p.ej., clordiazepóxido, benacitizina, benzquinamida, flurazepam, hidroxizina, loxapina y promazina); fármacos antipsicóticos (p.ej., clorprotixeno, flufenazina, haloperidol, molindona, tioridazina y trifluoperazina); fármacos antimicrobianos (fármacos antibacterianos, antifúngicos, antiprotzoarios y antivirales).

Los fármacos antimicrobianos que se prefieren para la incorporación en la presente composición incluyen, por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de fármacos de β -lactamas, fármacos de quinolonas, ciprofloxacino, norfloxacino, tetraciclina, eritromicina, amikacina, triclosán, doxiciclina, capreomicina, clorhexidina, clortetraciclina, oxitetraciclina, clindamicina, etambutol, isotionato de hexamidina, metronidazol, pentamidina, gentamicina, kanamicina, lineomicina, metaciclina, metenammina, minociclina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomina, tobramicina, miconazol y amantadina.

Otros restos de fármacos para el uso en la presente invención incluyen los fármacos antineoplásicos (p.ej., antiantrógenos (p.ej., leuprolida o flutamida), agentes citocidas (p.ej., adriamicina, doxorubicina, taxol, ciclofosfamida, busulfano, cisplatino, β -2-interferón) anti-estrógenos (p.ej., tamoxifeno), antimetabolitos (p.ej., fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina). También se incluyen dentro de esta clase los agentes basados en radioisótopos tanto para el diagnóstico como para la terapia, y las toxinas conjugadas, tales como ricina, geldanamicina, mitansina, CC-1065, las duocarmicinas, caliqueamicina y las estructuras relacionadas y los análogos de los mismos.

El resto terapéutico también puede ser una hormona (p.ej., medroxiprogesterona, estradiol, leuprolida, megestrol, octreótido o somatostatina); fármacos relajantes musculares (p.ej., cinamedrina, ciclobenzaprina, flavoxato, orfenadrina, papaverina, mebeverina, idaverina, ritodrina, difenoxilato, dantroleno y azumoleno); fármacos antiespasmódicos; fármacos oseo-activos (p.ej., compuestos farmacológicos de difosfonato y fosfonoalquilfosfinato); fármacos moduladores endocrinos (p.ej., anticonceptivos (p.ej., etinodiol, etinil estradiol, noretindrona, mestranol, desogestrel, medroxiprogesterona), moduladores de la diabetes (p.ej., gliburida o clorpropamida), fármacos anabólicos, tales como testolactona o estanozolol, andrógenos (p.ej., metiltestosterona, testosterona o fluoximesterona), antidiuréticos (p.ej., desmopresina) y calcitoninas).

También son útiles en la presente invención los estrógenos (p.ej., dietilestilbesterol), los glucocorticoides (p.ej., triamcinolona, betametasona, etc.) y progestágenos, tales como noretindrona, etinodiol, noretindrona, levonorgestrel; agentes tiroideos (p.ej., liotironina o levotiroxina) o agentes anti-tiroideos (p.ej., metimazol); fármacos antihiperprolactinémicos (p.ej., cabergolina); y también se pueden emplear inhibidores de hormonas (p.ej., danazol o goserelina), agentes oxitócicos (p.ej., metilergonovina u oxitocina) y prostaglandinas, tales como mioprostol, alprostadiil o dinoprostona.

Otros grupos modificadores útiles incluyen los fármacos inmunomoduladores (p.ej., antihistaminas, estabilizadores de mastocitos, tales como lodoxamida y/o cromolina, esteroides (p.ej., triamcinolona, beclometazona, cortisona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, beclometazona, o clobetasol), antagonistas de histamina H2 (p.ej., famotidina, cimetidina, ranitidina), inmunosupresores (p.ej., azatioprina, ciclosporina), etc. También son útiles los grupos con actividad antiinflamatoria, tales como sulindac, etodolac, cetoprofeno y ceterolac. Otros fármacos útiles junto con la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

Preparación de Carbohidratos Modificados

En general, el resto de carbohidrato y el grupo modificador se unen por medio del uso de grupos reactivos, que se transforman generalmente mediante el procedimiento de unión hasta un grupo funcional orgánico nuevo o especie que no es reactiva en las condiciones fisiológicas relevantes. El/los grupo(s) funcional(es) reactivo(s) del carbohidrato se localiza(n) en cualquier posición del resto de carbohidrato. Los grupos reactivos y clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente aquellos que se conocen bien en la técnica de la

química de bioconjugados. Las clases de reacciones preferidas actualmente disponibles con restos de carbohidratos reactivos son aquellas que se desarrollan en condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, pero sin limitación, las sustituciones nucleófilas (p.ej., reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), las sustituciones electrófilas (p.ej., reacciones de enaminas) y adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (p.ej., reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se discuten, por ejemplo, en March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; 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.

Los grupos funcionales reactivos útiles que penden de un núcleo de carbohidrato o grupo modificador incluyen, pero sin limitación:

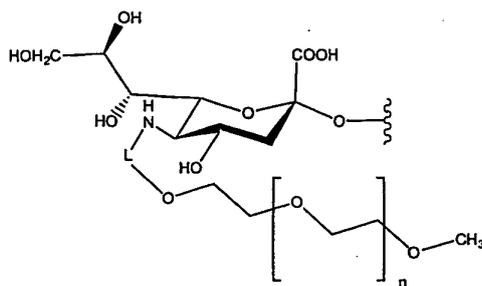
- (a) grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos que incluyen, pero sin limitación, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, acilimidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo y ésteres aromáticos;
- (b) grupos hidroxilo, que se pueden convertir, p.ej., en ésteres, éteres, aldehídos, etc.
- (c) grupos haloalquilo, en los que el haluro se puede desplazar más tarde con un grupo nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un ión carboxilato, anión tiol, carbanión, o un ión alcóxido, por lo que se da como resultado la unión covalente de un grupo nuevo al grupo funcional del átomo de halógeno;
- (d) grupos dienófilos, que son capaces de participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos maleimido;
- (e) grupos aldehído o cetona, de forma que la derivatización posterior es posible a través de la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de mecanismos tales como la adición de Grignard o la adición de alquil-litio;
- (f) grupos de haluro de sulfonilo para la reacción posterior con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas;
- (g) grupos tiol, que se pueden convertir, por ejemplo, en disulfuro o que se pueden hacer reaccionar con haluros de acilo;
- (h) grupos amina o sulfhidrilo, que, por ejemplo, se pueden acilar, alquilar u oxidar;
- (i) alquenos, que, por ejemplo, se pueden someter a cicloadiciones, acilación, adición de Michael, etc.; y
- (j) epóxidos, que pueden reaccionar, por ejemplo, con aminas y compuestos hidroxilo.

Los grupos funcionales reactivos se pueden elegir de manera que no participen, o interfieran, en las reacciones necesarias para construir el núcleo del carbohidrato reactivo o el grupo modificador. De manera alternativa, un grupo funcional reactivo se puede proteger de la participación en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica entienden cómo proteger un grupo funcional particular de manera que no interfiera con un grupo elegido de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores, véase, por ejemplo, Greene *et al.*, *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

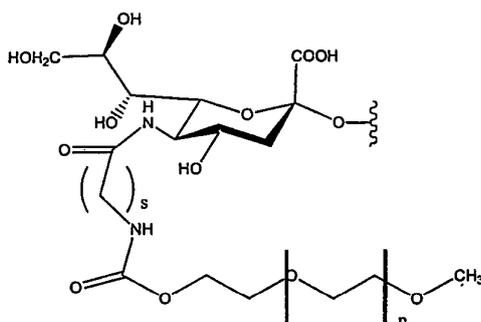
En la discusión siguiente, se exponen varios ejemplos específicos de carbohidratos modificados que son útiles en la práctica de la presente invención. En las realizaciones ejemplares, se utiliza un derivado de ácido siálico como núcleo de carbohidrato al que se une el grupo modificador. El foco de la discusión sobre los derivados de ácido siálico es por motivos de claridad de ilustración únicamente, y no se debería considerar como limitante del alcance de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden activar una diversidad de otros restos de carbohidrato y derivatizarlos de una manera análoga a la expuesta mediante el uso de ácido siálico como ejemplo. Por ejemplo, hay disponibles numerosos métodos para la modificación de galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y fucosa, por nombrar unos cuantos sustratos de carbohidratos, que se modifican fácilmente mediante métodos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Elhalabi *et al.*, *Curr. Med. Chem.* **6**: 93 (1999); y Schafer *et al.*, *J. Org. Chem.* **65**: 24 (2000).

En una realización ejemplar, el péptido que se modifica mediante un método de la invención es un glicopéptido que se produce en células procarióticas (p.ej., *E.coli*), células eucarióticas que incluyen levaduras y células mamíferas (p.ej., células CHO), o en un animal transgénico, y así, contiene cadenas de oligosacáridos unidas en N y/o O que están sialiladas de manera incompleta. Las cadenas de oligosacáridos del glicopéptido que carece de ácido siálico y que contiene un residuo de galactosa terminal se pueden PEG-ilar, PPG-ilar o modificar de otra manera con un ácido siálico modificado.

El derivado ejemplar de PEG-ácido siálico incluye:



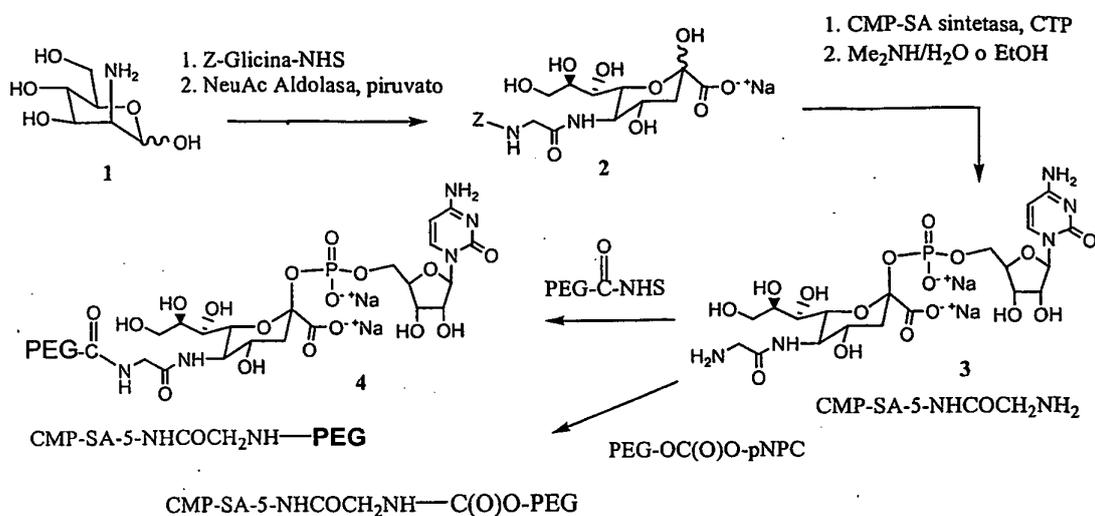
en el que L es un resto ligador de alquilo sustituido o sin sustituir o de heteroalquilo sustituido o sin sustituir que une el resto de ácido siálico y el resto de PEG, y "n" es 1 o mayor; y



5 en el que el índice "s" representa un número entero de 0 a 20, y "n" es 1 o mayor.

En el Esquema 4, el amino glicósido **1** se trata con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (p.ej., glicina), por lo que se convierte el residuo de amina del carbohidrato en el aducto de amida-aminoácido protegido correspondiente. El aducto se trata con una aldolasa para formar el α -hidroxi carboxilato **2**. El compuesto **2** se convierte en el derivado de CMP correspondiente mediante la acción de una CMP-SA sintetasa, seguido de hidrogenación catalítica del derivado de CMP para producir el compuesto **3**. La amina introducida por medio de la formación del aducto de glicina se utiliza como lugar para la unión de PEG haciendo reaccionar el compuesto **3** con un derivado de PEG o PPG activado (p.ej., PEG-C(O)NHS, PEG-OC(O)O-p-nitrofenilo), que produce especies tales como **4** ó **5**, respectivamente.

Esquema 4

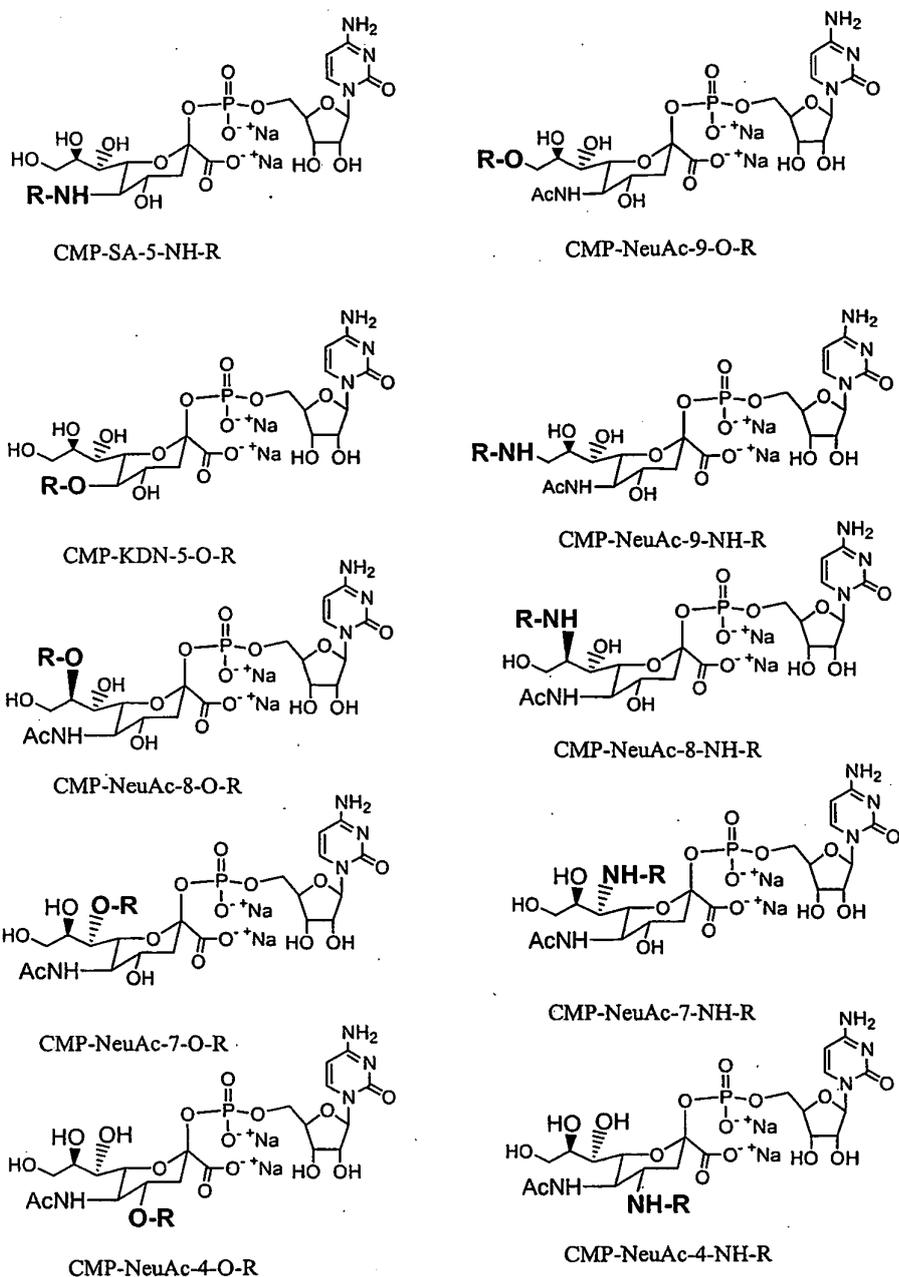


15

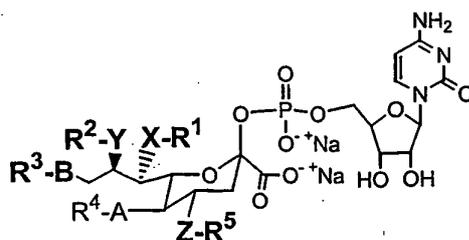
La Tabla 1 enumera ejemplos representativos de monofosfatos de carbohidratos que se derivatizan con un resto de PEG o PPG. Los mutantes de la hormona del crecimiento humana se pueden modificar mediante el método del Esquema 1. Se preparan otros derivados mediante métodos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Keppler

et al., *Glycobiology* **11**: 11R (2001); y Charter *et al.*, *Glycobiology* **10**: 1049 (2000)). Otros análogos de PEG y PPG amino-reactivos están disponibles comercialmente, o se pueden preparar mediante métodos fácilmente accesibles para los expertos en la técnica.

Tabla 1



Los fosfatos de carbohidratos modificados útiles en la práctica de la presente invención se pueden sustituir en otras posiciones, así como en las expuestas anteriormente. Las sustituciones preferidas actualmente del ácido siálico se exponen en la Fórmula I:



(I)

en la que X es un grupo ligador, que se selecciona preferiblemente de -O-, -N(H)-, -S, CH₂-, y -N(R)₂, en la que cada R es un miembro seleccionado independientemente de R¹-R⁵. 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 R¹, R², R³, R⁴, y R⁵ representan H, un polímero hidrosoluble, resto terapéutico, biomolécula u otro resto. De manera alternativa, estos símbolos representan un ligador que se une a un polímero hidrosoluble, resto terapéutico, biomolécula u otro resto.

Los restos ejemplares unidos a los conjugados descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, derivados de PEG (p.ej., alquil-PEG, acil-PEG, acil-alquil-PEG, alquil-acil-PEG carbamoil-PEG, aril-PEG), derivados de PPG (p.ej., alquil-PPG, acil-PPG, acil-alquil-PPG, alquil-acil-PPG carbamoil-PPG, aril-PPG), restos terapéuticos, restos de diagnóstico, manosa-6-fosfato, heparina, heparano, SLe_x, manosa, manosa-6-fosfato, Sialil-Lewis X, FGF, VFGF, proteínas, condroitina, queratano, dermatano, albúmina, integrinas, oligosacáridos con estructura de antena, péptidos y similares. Los métodos para la conjugación de los diversos grupos modificadores a un resto de sacárido son fácilmente accesibles para los expertos en la técnica (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 No. 680, American Chemical Society, 1997; 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).

20 Grupos Ligadores Cruzados

La preparación del carbohidrato modificado para el uso en los métodos de la presente invención incluye la unión de un grupo modificador a un residuo de carbohidrato y la formación de un aducto estable, que es un sustrato para una glicosiltransferasa. El carbohidrato y el grupo modificador se pueden acoplar mediante un agente ligador cruzado de orden cero o superior. Los compuestos bifuncionales ejemplares que se pueden usar para unir grupos modificadores a restos de carbohidrato incluyen, pero sin limitación, poli(etilenglicoles) bifuncionales, poliamidas, poliéteres, poliésteres y similares. Las aproximaciones generales para la unión de carbohidratos a otras moléculas se conocen en la bibliografía. Véase, 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, los grupos reactivos se consideran favorables para el resto de carbohidrato del carbohidrato modificado naciente. El foco de la discusión es por motivos de claridad de ilustración. Los expertos en la técnica apreciarán que la discusión también es relevante para los grupos reactivos del grupo modificador.

Una estrategia ejemplar implica la incorporación de un sulfhidrilo protegido en el carbohidrato mediante el uso del ligador cruzado heterobifuncional SPDP (n-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato y después la desprotección del sulfhidrilo para la formación de un enlace disulfuro con otro sulfhidrilo en el grupo modificador.

Si SPDP afecta perjudicialmente a la capacidad del carbohidrato modificado de actuar como un sustrato para la glicosiltransferasa, se usa uno de una serie de otros ligadores cruzados tales como 2-iminotiolano o S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) para formar un enlace disulfuro. El 2-iminotiolano reacciona con aminas primarias, que incorporan instantáneamente un sulfhidrilo desprotegido en la molécula que contiene amina. SATA también reacciona con aminas primarias, pero incorpora un sulfhidrilo protegido, que se desacetila más tarde mediante el uso de hidroxilamina para producir un sulfhidrilo libre. En cada caso, el sulfhidrilo incorporado está libre para reaccionar con otros sulfhidrilos o sulfhidrilos protegidos, como SPDP, por lo que se forma el enlace disulfuro necesario.

La estrategia anteriormente descrita es ejemplar, y no limitante, de los ligadores útiles en la invención. Hay disponibles otros ligadores cruzados que se pueden usar en diferentes estrategias para el ligamiento cruzado del grupo modificador con el péptido. Por ejemplo, TPCH (S-(2-tiopiridil)-L-cisteín-hidrazida) y TPMPH (S-(2-tiopiridil)mercapto-propionohidrazida) reaccionan con restos de carbohidrato que se han oxidado previamente mediante tratamiento suave con peryodato, por lo que forman así un enlace hidrazona entre la porción de hidrazida del ligador cruzado y los aldehídos generados por el peryodato. TPCH y TPMPH introducen un grupo sulfhidrilo protegido con 2-piridiltiona en el carbohidrato, que se puede desproteger con DTT y usarlo posteriormente para la conjugación, tal como mediante la formación de enlaces disulfuro entre los componentes.

Si se descubre que la formación de enlaces disulfuro es inadecuada para la producción de carbohidratos modifica-

dos estables, se pueden usar otros ligadores cruzados que incorporan enlaces más estables entre los componentes. Los ligadores cruzados heterobifuncionales GMBS (N-gamma-malimidobutiriloxi)succinimida y SMCC (succinimidil-4-(N-maleimido-metil)ciclohexano) reaccionan con las aminas primarias, por lo que introducen un grupo maleimida en el componente. El grupo maleimida puede reaccionar posteriormente con sulfhidrilos del otro componente, que se pueden introducir mediante los ligadores cruzados mencionados previamente, por lo que se forma un enlace tioéter estable entre los componentes. Si el impedimento estérico entre componentes interfiere con la actividad del componente o con la capacidad del carbohidrato modificado de actuar como sustrato para la glicosiltransferasa, se pueden usar ligadores cruzados que introducen brazos espaciadores largos entre los componentes y que incluyen derivados de algunos de los ligadores cruzados mencionados previamente (es decir, SPDP). Así, existe gran abundancia de ligadores cruzados adecuados, que son útiles y que se seleccionan dependiendo del efecto que tienen sobre la producción óptima del conjugado peptídico y del carbohidrato modificado.

Se usa una diversidad de reactivos para modificar los componentes del carbohidrato modificado con uniones cruzadas químicas intramoleculares (para revisiones de los reactivos de ligadura cruzada y de procedimientos de ligadura cruzada véase: Wold, F., *Meth. Enzymol.* **25**: 623-651, 1972; Weetall, H. H., y Cooney, D. A., En: ENZYMES AS DRUGS. (Holcenberg, y Roberts, eds.) págs. 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 en la presente memoria como referencia). Los reactivos de ligadura cruzada preferidos derivan de diversos reactivos de ligadura cruzada de longitud cero, homobifuncionales y heterobifuncionales. Los reactivos de ligadura cruzada de longitud cero incluyen la conjugación directa de dos grupos químicos intrínsecos sin la introducción de material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de un enlace disulfuro pertenecen a esta categoría. Otro ejemplo son los reactivos que inducen la condensación de un carboxilo y de un grupo amino primario para formar un enlace amida, tales como carbodiimidas, cloroformiato de etilo, reactivo K de Woodward (3'-sulfonato de 2-etil-5-fenilisoaxolio), y carbonildimidazol. Además de estos reactivos químicos, la enzima transglutaminasa (glutamil-péptido γ -glutamyltransferasa; EC 2.3.2.13) se puede usar como reactivo ligador cruzado de longitud cero. Esta enzima cataliza reacciones de transferencia de acilo en grupos carboxamida de residuos de glutamilo unidos a proteínas, normalmente con un grupo amino primario como sustrato. Los reactivos homo- y hetero-bifuncionales preferidos contienen dos sitios idénticos o dos sitios diferentes, respectivamente, que pueden ser reactivos para grupos amino, sulfhidrilo, guanidino, indol, o inespecíficos.

Grupos Amino-Reactivos

En una realización preferida, los sitios del ligador cruzado son grupos amino-reactivos. Los ejemplos no limitantes útiles de grupos amino-reactivos incluyen ésteres de carbonato, ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), imidoésteres, isocianatos, acilhaluros, arilazidas, ésteres de p-nitrofenilo, aldehídos, y cloruros de sulfonilo.

Los ésteres de NHS reaccionan de manera preferente con los grupos amino primarios (que incluyen los grupos aromáticos) de un componente de carbohidrato modificado. Se sabe que los grupos imidazol de las histidinas compiten con las aminas primarias por la reacción, pero los productos de la reacción son inestables y se hidrolizan fácilmente. La reacción implica el ataque nucleófilo de una amina en el carboxilo del ácido de un éster de NHS para formar una amida, liberando la N-hidroxisuccinimida. Así, se pierde la carga positiva del grupo amino original.

Los imidoésteres son los reactivos acilantes más específicos para la reacción con los grupos amina de los componentes de carbohidratos modificados. A un pH entre 7 y 10, los imidoésteres reaccionan solamente con las aminas primarias. Las aminas primarias atacan los imidatos de manera nucleófila para producir un intermedio que se descompone hasta amidina a pH elevado o hasta un imidato nuevo a pH bajo. El imidato nuevo puede reaccionar con otra amina primaria, por lo que liga de forma cruzada dos grupos amino, un caso de un 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 conserva la carga positiva del grupo amino original.

Los isocianatos (e isotiocianatos) reaccionan con las aminas primarias de los componentes de carbohidratos modificados para formar enlaces estables. Sus reacciones con grupos sulfhidrilo, imidazol, y tirosilo proporcionan productos relativamente inestables.

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

Los haluros de arilo, tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno, reaccionan de manera preferente con los grupos amino y los grupos fenólicos de tirosina de los componentes de carbohidratos modificados, pero también con los grupos sulfhidrilo e imidazol.

Los ésteres de p-nitrofenilo de ácidos mono- y dicarboxílicos también son grupos amino-reactivos útiles. Aunque la especificidad del reactivo no es muy elevada, los grupos α - y ϵ -amino parecen reaccionar más rápidamente.

Los aldehídos tales como glutaraldehído reaccionan con las aminas primarias del carbohidrato modificado. Aunque

se forman bases de Schiff inestables tras la reacción de los grupos amino con los grupos aldehído de los aldehídos, el glutaraldehído es capaz de modificar el carbohidrato modificado con ligaduras cruzadas estables. A pH 6-8, el pH de las condiciones típicas de ligadura cruzada, los polímeros cíclicos experimentan una deshidratación para formar polímeros de aldehído α - β insaturados. Las bases de Schiff, sin embargo, son estables, cuando se conjugan a otro enlace doble. La interacción resonante de ambos enlaces dobles impide la hidrólisis de la unión de Schiff. Además, las aminas a concentraciones locales elevadas pueden atacar el enlace doble etilénico para formar un producto de adición de Michael estable.

Los cloruros de sulfonilo aromáticos reaccionan con una diversidad de sitios de los componentes del carbohidrato modificado, pero la reacción con los grupos amino es la más importante, y da como resultado una unión sulfonamida estable.

Grupos Sulfhidril-Reactivos

En otra realización preferida, los sitios son grupos sulfhidril-reactivos. Los ejemplos útiles, no limitantes de grupos sulfhidril-reactivos incluyen maleimidas, haluros de alquilo, disulfuros de piridilo, y tioftalimidas.

Las maleimidas reaccionan de manera preferente con el grupo sulfhidrilo de los componentes del carbohidrato modificado para formar enlaces tioéter estables. También reaccionan a una velocidad mucho más lenta con grupos amino primarios y los grupos imidazol de las histidinas. Sin embargo, a pH 7 el grupo maleimida se puede considerar un grupo específico de sulfhidrilos, ya que a este pH la velocidad de reacción de los tioles simples es 1000 veces mayor que la de la amina correspondiente.

Los haluros de alquilo reaccionan con grupos sulfhidrilo, sulfuros, imidazoles, y grupos amino. A un pH neutro a ligeramente alcalino, sin embargo, los haluros de alquilo reaccionan principalmente con grupos sulfhidrilo para formar enlaces tioéter estables. A un pH más elevado, está favorecida la reacción con los grupos amino.

Los disulfuros de piridilo reaccionan con sulfhidrilos libres por medio del intercambio de disulfuro para proporcionar disulfuros mixtos. Como resultado, los disulfuros de piridilo son los grupos sulfhidril-reactivos más específicos.

Las tioftalimidas reaccionan con grupos sulfhidrilo libres para formar disulfuros.

Residuo Carboxil-Reactivo

En otra realización, se usan carbodiimidas solubles tanto en agua como en disolventes orgánicos, como reactivos carboxil-reactivos. Estos compuestos reaccionan con grupos carboxilo libres formando una pseudourea que después se puede acoplar a las aminas disponibles, por lo que se produce una unión amida. Se enseña cómo modificar un grupo carboxilo con carbodiimida (Yamada *et al.*, *Biochemistry* **20**: 4836-4842, 1981).

Además del uso de restos reactivos específicos de sitio, la presente invención contempla el uso de grupos reactivos inespecíficos para unir el carbohidrato al grupo modificador. Los ligadores cruzados inespecíficos ejemplares incluyen grupos fotoactivables, completamente inertes en la oscuridad, que se convierten en especies reactivas tras la absorción de un fotón de energía adecuado. En una realización preferida, los grupos fotoactivables se seleccionan de precursores de nitrenos generados en el calentamiento o la fotólisis de azidas. Los nitrenos deficientes de electrones son extremadamente reactivos, y pueden reaccionar con una diversidad de enlaces químicos que incluyen N-H, O-H, C-H, y C=C. Aunque se pueden emplear tres tipos de azidas (derivados de arilo, alquilo, y acilo), actualmente se prefieren las arilazidas. La reactividad de las arilazidas en la fotólisis es mejor con los enlaces N-H y O-H que con los enlaces C-H. Los arilnitrenos deficientes de electrones expanden el anillo rápidamente para formar deshidroazepinas, que tienden a reaccionar con nucleófilos, en vez de formar productos de inserción en C-H. La reactividad de las arilazidas se puede incrementar mediante la presencia de sustituyentes atractores de electrones tales como grupos nitro o hidroxilo en el anillo. Tales sustituyentes llevan el máximo de absorción de las arilazidas a una longitud de onda más larga. Las arilazidas sin sustituir tienen el máximo de absorción en el intervalo de 260-280 nm, mientras las hidroxi y nitroarilazidas absorben la luz de manera significativa más allá de 305 nm. Por lo tanto, se prefieren más las hidroxi y nitroarilazidas, ya que permiten emplear condiciones de fotólisis menos perjudiciales para el componente de afinidad que las arilazidas sin sustituir.

En otra realización preferida, los grupos fotoactivables se seleccionan de arilazidas fluoradas. Los productos de fotólisis de las arilazidas fluoradas son arilnitrenos, todos los cuales experimentan las reacciones características de este grupo, que incluyen la inserción en el enlace C-H, con una eficacia elevada (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 proporcionan en general rendimientos de ligadura cruzada mayores que los reactivos de arilazida.

En otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan de diazo-compuestos, que forman un carbeno deficiente de electrones tras la fotólisis. Estos carbenos experimentan una diversidad de reacciones que incluyen la inserción en enlaces C-H, la adición a enlaces dobles (lo que incluye los sistemas aromáticos), la atracción de hidrógeno y la

coordinación con centros nucleófilos para proporcionar los iones de carbono.

En otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan de diazopiruvatos. Por ejemplo, el éster de p-nitrofenilo del diazopiruvato de p-nitrofenilo reacciona con aminas alifáticas para proporcionar amidas del ácido diazopirúvico que se someten a fotólisis ultravioleta para formar aldehídos. El componente de afinidad modificado mediante diazopiruvato sometido a fotólisis reaccionará como un formaldehído o glutaraldehído que forma ligaduras cruzadas.

Ligadores cruzados homobifuncionales reactivos con aminas primarias

La síntesis, propiedades, y aplicaciones de los ligadores cruzados amino-reativos se describen comercialmente en la bibliografía (para revisiones de los procedimientos de ligadura cruzada y reactivos, véase lo anteriormente mencionado). Muchos reactivos están disponibles (p.ej., 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), bis(sulfosuccinimidil)-suberato (BS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis-2-(succinimidooxicarbonilo)etilsulfona (BSOCOES); bis-2-(sulfosuccinimidooxi-carbonilo)etilsulfona (sulfo-BSOCOES), etilen glicol-bis(succinimidilsuccinato) (EGS), etilen glicol-bis(sulfosuccinimidilsuccinato) (sulfo-EGS), ditiobis(succinimidil)-propionato (DSP), y ditiobis(sulfosuccinimidil)-propionato (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), 3,3'-(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: diisotiocianato de p-fenileno (DITC), y ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico-estilbeno (DIDS).

Los ejemplos preferidos no limitantes de isocianatos homobifuncionales incluyen diisocianato de xileno, 2,4-diisocianato de tolueno, 2-isocianato-4-isotiocianato de tolueno, 4,4'-diisocianato de 3-metoxidifenilmetano, diisocianato de 2,2'-dicarboxi-4,4'-azofenilo, y diisocianato de hexametileno.

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

Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos de aldehídos 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-disulfonilo, y cloruro de α -naftol-2,4-disulfonilo.

Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos homobifuncionales amino-reativos adicionales incluyen biscarbonato de eritritol, que reacciona con aminas para proporcionar los biscarbamatos.

Ligadores Cruzados Homobifuncionales Reactivos con Grupos Sulfhidrilo Libres

La síntesis, propiedades, y aplicaciones de tales reactivos se describen en la bibliografía (para revisiones de procedimientos de ligadura cruzada y reactivos, véase lo anteriormente mencionado). Muchos de los reactivos están disponibles comercialmente (p.ej., Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

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

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

Los ejemplos preferidos no limitantes de haluros de alquilo homobifuncionales incluyen 2,2'-dicarboxi-4,4'-diyodocetamidoazobenceno, ácido α,α' -diyodo-p-xilenosulfónico, ácido α,α' -dibromo-p-xilenosulfónico, N,N'-bis(bromocetil)encilamina, N,N'-di(bromoacetil)fenilhidrazina, y 1,2-di(bromoacetil)amino-3-fenilpropano.

Ligadores Cruzados Fotoactivables Homobifuncionales

La síntesis, propiedades, y aplicaciones de tales reactivos se describen en la bibliografía (para revisiones de procedimientos de ligadura cruzada y reactivos, véase lo anteriormente mencionado). Algunos de los reactivos están dis-

ponibles comercialmente (p.ej., Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Los ejemplos preferidos no limitantes de ligadores cruzados fotoactivables homobifuncionales incluyen disulfuro de bis- β -(4-azidosalicilamido)etilo (BASED), S,S-dióxido de di-N-(2-nitro-4-azidofenil)-cistamina (DNCO), y 4,4'-ditiobisfenilazida.

Reactivos Heterobifuncionales Amino-Reactivos con un Resto de Disulfuro de Piridilo

La síntesis, propiedades, y aplicaciones de tales reactivos se describen en la bibliografía (para revisiones de procedimientos de ligadura cruzada y reactivos, véase lo anteriormente mencionado). Muchos de los reactivos están disponibles comercialmente (p.ej., Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Los ejemplos no limitantes de reactivos heterobifuncionales con un resto de disulfuro de piridilo y un éster de NHS amino-reactivo 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- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (SMPT), y 6- α -metil- α -(2-piridilditio)toluamidohexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT).

Reactivos Heterobifuncionales Amino-Reactivos con un Resto de Maleimida

La síntesis, propiedades, y aplicaciones de tales reactivos se describen en la bibliografía. Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos heterobifuncionales con un resto de maleimida y un éster de NHS amino-reactivo incluyen maleimidilacetato de succinimidilo (AMAS), 3-maleimidilpropionato de succinimidilo (BMPS), éster de N- γ -maleimidobutiriloxisuccinimida (GMBS), éster de N- γ -maleimidobutiriloxisulfo-succinimida (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 sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB), y 4-(p-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMPB).

Reactivos Heterobifuncionales Amino-Reactivos con un Resto de Haluro de Alquilo

La síntesis, propiedades, y aplicaciones de tales reactivos se describen en la bibliografía. Los ejemplos preferidos no limitantes de reactivos heterobifuncionales con un resto de haluro de alquilo y un éster de NHS amino-reactivo 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).

Un ejemplo preferido de un reactivo heterobifuncional con un éster de NHS amino-reactivo y un resto de dihaluro de alquilo es 2,3-dibromopropionato de N-hidroxisuccinimidilo (SDBP). SDBP introduce ligaduras cruzadas intramoleculares en el componente de afinidad mediante la conjugación de sus grupos amino. La reactividad del resto de dibromopropionilo hacia los grupos amina primarios se controla mediante la temperatura de la 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 éster de p-nitrofenilo amino-reactivo incluyen el yodoacetato de p-nitrofenilo (NPIA).

Los expertos en la técnica conocen otros agentes de ligadura cruzada. Véase, por ejemplo, Pomato *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.965.106. Dentro de la capacidad de un experto en la técnica está elegir un agente de ligadura cruzada adecuado para una aplicación particular.

Grupos Ligadores Escindibles

En una realización adicional, el grupo ligador está provisto de un grupo que se puede escindir para liberar el grupo modificador del residuo de carbohidrato. Se conocen muchos grupos escindibles en la técnica. Véase, 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). Además, una amplia diversidad de grupos ligadores escindibles bifuncionales (tanto homo- como hetero-bifuncionales) están disponibles comercialmente de proveedores tales como Pierce.

Los restos escindibles ejemplares se pueden escindir mediante el uso de luz, calor o reactivos tales como tioles, hidroxilamina, bases, peryodato y similares. Además, ciertos grupos preferidos se escinden *in vivo* en respuesta a

haber sido endocitados (p.ej., 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 que consiste en grupos disulfuro, éster, imida, carbonato, nitrobenzilo, fenacilo y benzoína.

Conjugación de Carbohidratos Modificados a Péptidos

5 Los carbohidratos modificados se conjugan a un péptido glicosilado o sin glicosilar mediante el uso de una enzima adecuada para mediar en la conjugación. Preferiblemente, las concentraciones de el/los carbohidrato(s) donante(s) modificado(s), enzima(s) y péptido(s) aceptor(es) se seleccionan de tal manera que la glicosilación continúa hasta que se consume el aceptor. Las consideraciones discutidas más adelante, aunque se exponen en el contexto de una sialiltransferasa, son aplicables en general a otras reacciones de glicosiltransferasas.

10 Se conocen varios métodos de uso de glicosiltransferasas para sintetizar estructuras de oligosacáridos deseadas, y son aplicables en general a la presente invención. Los métodos ejemplares se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/32491, Ito *et al.*, *Pure Appl. Chem.* **65**: 753 (1993), y en las pat. de EE.UU. n°s 5.352.670, 5.374.541, y 5.545.553.

15 La presente invención se pone en práctica mediante el uso de una única glicosiltransferasa o una combinación de glicosiltransferasas. Por ejemplo, se puede usar una combinación de una sialiltransferasa y una galactosiltransferasa. En las realizaciones que usan más de una enzima, las enzimas y sustratos se combinan preferiblemente en una mezcla de reacción inicial, o las enzimas y reactivos para una segunda reacción enzimática se añaden al medio de reacción una vez que la primera reacción enzimática se ha completado o casi se ha completado. Llevando a cabo
20 dos reacciones enzimáticas secuencialmente en un único recipiente, los rendimientos globales mejoran respecto de los procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Además, se reduce la limpieza y eliminación de los disolventes y subproductos adicionales.

En una realización preferida, la primera y la segunda enzima son una glicosiltransferasa. En otra realización preferida, una enzima es una endoglicosidasa. En una realización preferida adicional, se usan más de dos enzimas para
25 construir la glicoproteína modificada de la invención. Las enzimas se usan para alterar una estructura de sacárido en el péptido en cualquier punto antes o después de la adición del carbohidrato modificado al péptido.

En otra realización, el método utiliza una o más exo- o endoglicosidasas. La glicosidasa es generalmente un mutante, que se modifica para formar enlaces glicosilo en vez de escindirlos. La glicanasa mutante incluye en general una sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido ácido en el sitio activo. Por ejemplo,
30 cuando la endoglicanasa es endo-H, los residuos del sitio activo sustituidos serán en general Asp en la posición 130, Glu en la posición 132 o una combinación de los mismos. Los aminoácidos se sustituyen en general con serina, alanina, asparagina, o glutamina.

La enzima mutante cataliza la reacción, normalmente mediante una etapa de síntesis que es análoga a la reacción inversa de la etapa de hidrólisis de la endoglicanasa. En estas realizaciones, la molécula donante de glicosilo (p.ej.,
35 una estructura de oligo- o mono-sacárido deseada) contiene un grupo saliente, y la reacción se desarrolla con la adición de la molécula donante en un residuo de GlcNAc de 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 Asn-péptido. En otras realizaciones adicionales, el residuo de GlcNAc de la molécula donante de glicosilo está modificado. Por ejemplo, el residuo de GlcNAc puede comprender un resto de 1,2-oxazolina.

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

La temperatura a la que se lleva a cabo el proceso anterior puede oscilar desde justo por encima de la temperatura de congelación hasta la temperatura a la que la enzima más sensible se desnaturaliza. Los intervalos de temperatura preferidos son de alrededor de 0 °C a alrededor de 55 °C, y más preferiblemente alrededor de 20 °C a alrededor de 30 °C. En otra realización ejemplar, uno o más componentes del método presente se llevan a cabo a una temperatura elevada mediante el uso de la enzima termófila.

La mezcla de reacción se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para que el aceptor se glicosile, por lo que se forma el conjugado deseado. Algunos de los conjugados se pueden detectar a menudo tras unas cuantas horas, con cantidades recuperables que se obtienen normalmente en 24 horas o menos. Los expertos en la técnica entienden que la velocidad de la reacción depende de varios factores variables (p.ej., la concentración de la enzima, la concentración del donante, la concentración del aceptor, la temperatura, el volumen del disolvente), que se optimizan para un sistema seleccionado.

55 La presente invención también prevé la producción a escala industrial de los péptidos modificados. Tal como se usa en la presente memoria, una escala industrial produce en general al menos alrededor de 250 mg, preferiblemente al

menos alrededor de 500 mg, y más preferiblemente al menos alrededor de 1 gramo de conjugado purificado, acabado, preferiblemente tras un ciclo de reacción simple, es decir, el conjugado no es una combinación de los productos de reacción de ciclos de síntesis idénticos, repetidos de manera consecutiva.

5 En la discusión siguiente, la invención se ejemplifica mediante la conjugación de restos de ácido siálico modificados a un péptido glicosilado. El ácido siálico modificado ejemplar está marcado con m-PEG. El foco de la discusión siguiente en el uso de PEG-ácido siálico modificado y péptidos glicosilados es por motivos de claridad de ilustración, y no pretende implicar que la invención se limite a la conjugación de estas dos moléculas. Un experto entiende que la discusión es aplicable en general a las adiciones de restos de glicosilo modificados diferentes de ácido siálico. Además, la discusión es igualmente aplicable a la modificación de una unidad de glicosilo con agentes diferentes de m-PEG, que incluyen otros polímeros hidrosolubles, restos terapéuticos, y biomoléculas.

10 Se puede usar una aproximación enzimática para la introducción selectiva de carbohidratos m-PEG-ilado o m-PPG-ilado en un péptido o glicopéptido. El método utiliza carbohidratos modificados que contienen PEG, PPG, o un grupo funcional reactivo protegido, y se combina con la glicosiltransferasa o glicosintasa adecuada. Mediante la selección de la glicosiltransferasa que producirá la unión de carbohidrato deseada y la utilización del carbohidrato modificado como sustrato donante, el PEG o PPG se puede introducir directamente en el esqueleto del péptido, en residuos de carbohidrato existentes de un glicopéptido o en residuos de carbohidrato que se han añadido a un péptido.

15 Un aceptor para la sialiltransferasa está presente en el péptido a modificar mediante los métodos de la presente invención en forma de una estructura que se da de manera natural o una colocada ahí de manera recombinante, enzimática o química. Los aceptores adecuados incluyen, por ejemplo, aceptores de galactosilo tales como Gal β 1,4GlcNAc, Gal β 1,4GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, lacto-N-tetraosa, Gal β 1,3GlcNAc, GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,4Glc (lactosa), y otros aceptores conocidos para los expertos en la técnica (véase, p.ej., Paulson *et al.*, *J. Biol. Chem.* **253**: 5617-5624 (1978)).

20 En una realización, un aceptor para la sialiltransferasa está presente en el glicopéptido a modificar tras la síntesis *in vivo* del glicopéptido. Tales glicopéptidos se pueden sialilar mediante el uso de los métodos reivindicados sin la modificación previa del patrón de glicosilación del glicopéptido. De manera alternativa, los métodos de la invención se pueden usar para sialilar un péptido que no incluye un aceptor adecuado; primero se modifica el péptido para que incluya un aceptor mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. En una realización ejemplar, se añade un residuo de GalNAc mediante la acción de una GalNAc transferasa.

25 En una realización ejemplar, el aceptor de galactosilo se construye uniendo un residuo de galactosa a un aceptor adecuado unido al péptido, p.ej., una GalNAc. El método incluye incubar el péptido a modificar con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de una galactosiltransferasa (p.ej., Gal β 1,3 o Gal β 1,4), y un donante de galactosilo adecuado (p.ej., UDP-galactosa). La reacción se deja transcurrir sustancialmente hasta la finalización o, de manera alternativa, la reacción se finaliza cuando se añade una cantidad preseleccionada del residuo de galactosa. Otros métodos para construir un aceptor de sacárido seleccionado serán evidentes para los expertos en la técnica.

30 En otra realización, los oligosacáridos unidos a glicopéptidos se "recortan" primero, completamente o en parte, para exponer un aceptor para la sialiltransferasa o un resto en el que se pueden añadir uno o más residuos adecuados para obtener un aceptor adecuado. Las enzimas tales como glicosiltransferasas y endoglicosidasas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.716.812) son útiles para las reacciones de unión y de recorte.

35 En la discusión siguiente, el método de la invención se ejemplifica mediante el uso de carbohidratos modificados que tienen un polímero hidrosoluble unido a ellos. El foco de la discusión es por motivos de claridad de ilustración. Los expertos apreciarán que la discusión es igualmente relevante para aquellas realizaciones en las que el carbohidrato modificado alberga un resto terapéutico, biomolécula o similar.

40 En una realización ejemplar, un residuo de carbohidrato con unión en O se "recorta" antes de la adición del carbohidrato modificado. Por ejemplo, se recorta un residuo de GalNAc-Gal hasta GalNAc. Se conjuga un carbohidrato modificado que alberga un polímero hidrosoluble a uno o más de los residuos de carbohidrato expuestos por el "recorte". En un ejemplo, se "recorta" un glicopéptido y se añade un polímero hidrosoluble al aminoácido de cadena lateral con O o glicano de glicopéptido por medio de un resto de sacarilo, p.ej., resto de Sia, Gal, o GalNAc conjugado al polímero hidrosoluble. El resto de sacarilo modificado se une a un sitio aceptor del glicopéptido "recortado". De manera alternativa, se puede añadir un resto sacarilo sin modificar, p.ej., Gal, al extremo del glicano unido en O.

45 En otra realización ejemplar, se añade un polímero hidrosoluble a un residuo de GalNAc por medio de un carbohidrato modificado que tiene un resto de galactosa. De manera alternativa, se puede añadir una Gal sin modificar al residuo de GalNAc terminal.

50 En un ejemplo adicional, se añade un polímero hidrosoluble a un residuo de Gal mediante el uso de un ácido siálico modificado.

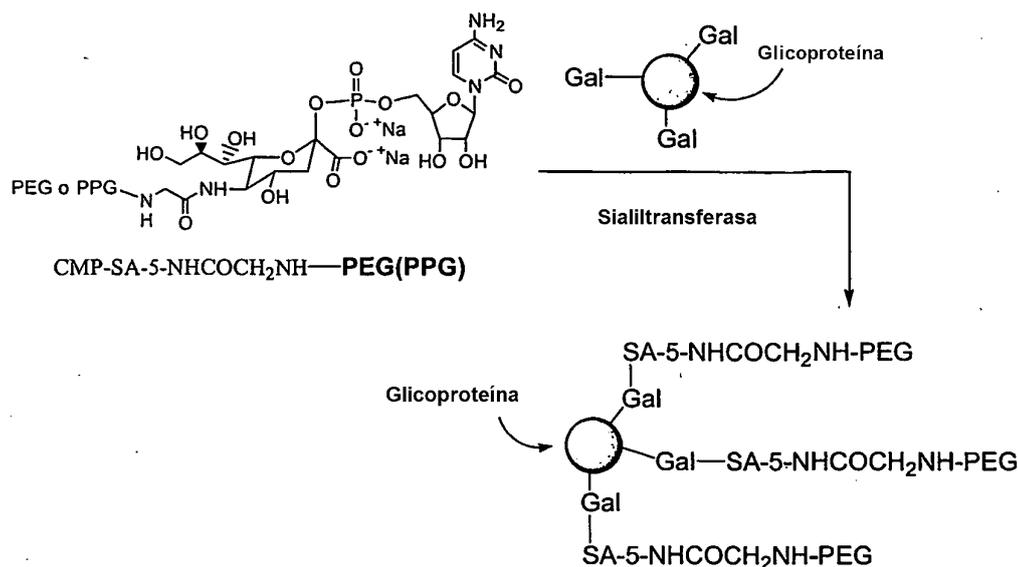
55 En otra realización ejemplar, se "recorta" un residuo de glicosilo con unión en O hasta el GalNAc unido al aminoá-

cido. En un ejemplo, se añade un polímero hidrosoluble por medio de una Gal modificada con el polímero. De manera alternativa, se añade una Gal sin modificar a la GalNAc, seguido de una Gal con un polímero hidrosoluble unido. En otra realización, se añade uno o más residuos de Gal sin modificar a GalNAc, seguido de un resto de ácido siálico modificado con un polímero hidrosoluble.

5 Mediante el uso de los métodos de la invención, es posible "recortar" y construir un residuo de carbohidrato sustancialmente de cualquier estructura deseada. El carbohidrato modificado se puede añadir a los extremos del resto de carbohidrato como se expuso anteriormente, o se puede insertar entre el núcleo del péptido y el extremo del carbohidrato.

10 En una realización ejemplar, el polímero hidrosoluble se añade a un residuo de Gal terminal mediante el uso de un ácido siálico modificado polimérico. Se usa una sialiltransferasa adecuada para añadir un ácido siálico modificado. La aproximación se resume en el Esquema 5.

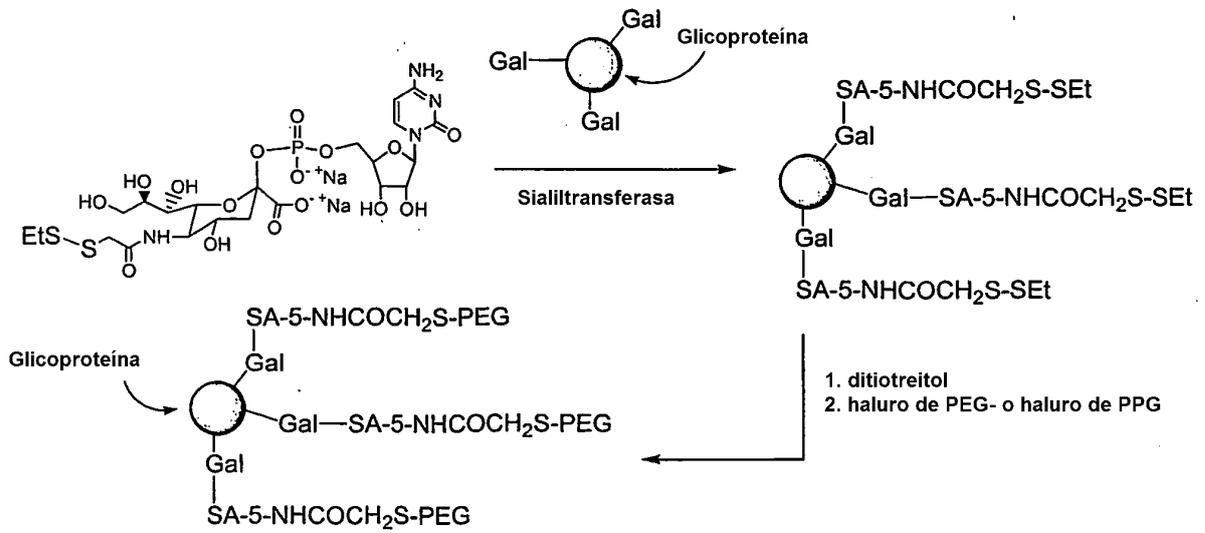
Esquema 5



15 En una aproximación adicional, resumida en el Esquema 6, hay una función reactiva protegida en el ácido siálico. El grupo reactivo protegido no se ve afectado preferiblemente por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al péptido. Tras la unión covalente del ácido siálico modificado al péptido, la protección se elimina y el péptido se conjuga con un agente tal como PEG, PPG, un resto terapéutico, biomolécula u otro agente. El agente se conjuga al péptido de una manera específica mediante su reacción con el grupo reactivo desprotegido en el residuo de carbohidrato modificado.

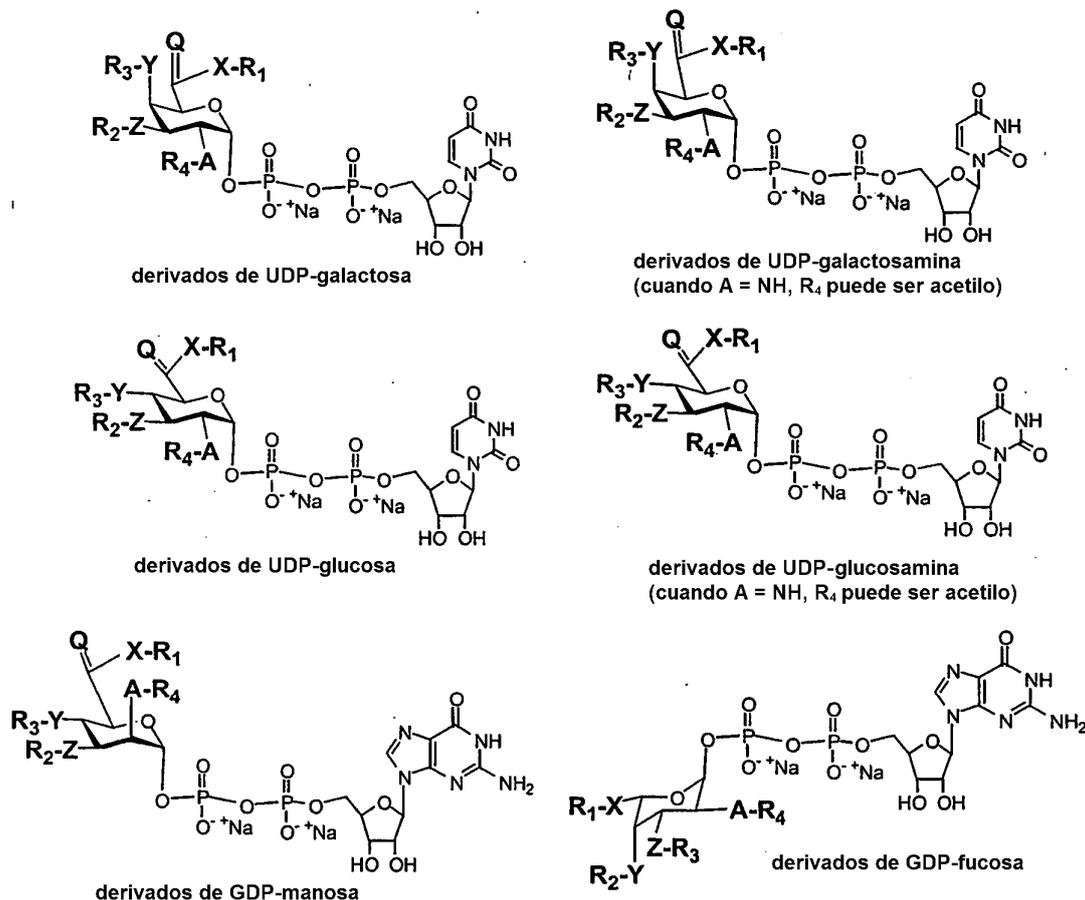
20

Esquema 6



5 Se puede usar cualquier carbohidrato modificado con su glicosiltransferasa adecuada, dependiendo de los carbohidratos terminales de las cadenas laterales del oligosacárido del glicopéptido (Tabla 2). Tal como se discutió anteriormente, el carbohidrato terminal del glicopéptido necesario para la introducción de la estructura PEG-ilada o PPG-ilada se puede introducir de manera natural durante la expresión, o se puede producir tras la expresión mediante el uso de la(s) glicosidasa(s) adecuada(s), glicosiltransferasa(s) o mezcla de glicosidasa(s) y glicosiltransferasa(s).

Tabla 2



X = O, NH, S, CH₂, N-(R₁₋₅)₂.

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

Q = H₂, O, S, NH, N-R.

R, R₁₋₄ = H, Ligador-M, M

M = Ligando de interés

Ligando de interés = acil-PEG, acil-PPG, alquil-PEG, acil-alquil-PEG, acil-alquil-PEG, carbamoil-PEG, carbamoil-PPG, PEG, PPG, acil-aril-PEG, acil-aril-PPG, aril-PEG, aril-PPG, Manosa-6-fosfato, heparina, heparano, SLex, Manosa, FGF, VFGF, proteína, condroitina, queratano, dermatano, albúmina, integras, péptidos, etc.

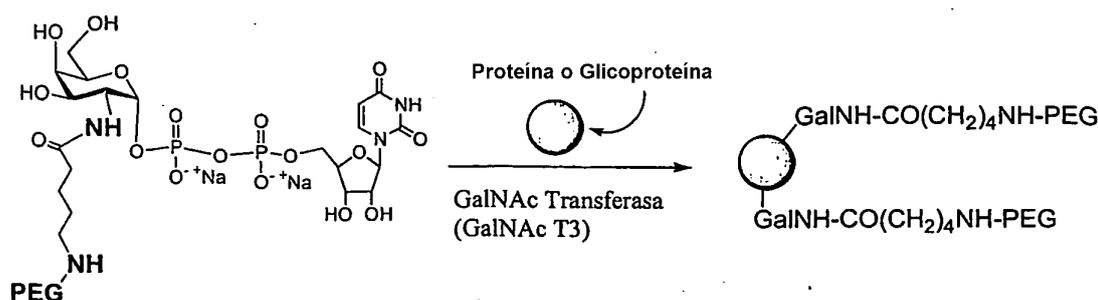
5 En otra realización ejemplar, se hace reaccionar UDP-galactosa-PEG con β1,4-galactosiltransferasa de leche de vaca, por lo que se transfiere la galactosa modificada a la estructura de N-acetilglucosamina terminal adecuada. Los residuos de GlcNAc terminales del glicopéptido se pueden producir durante la expresión, como puede ocurrir en sistemas de expresión tales como los de mamíferos, insectos, vegetales u hongos, pero también se pueden producir mediante el tratamiento del 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 GNT1-5, para transferir GlcN PEGilada a un residuo de manosa terminal en un glicopéptido. En una realización ejemplar adicional, las estructuras de glicano con unión en N y/o O se eliminan enzimáticamente de un glicopéptido para exponer un residuo de aminoácido o un residuo de glicosilo terminal que se conjuga posteriormente con el carbohidrato modificado. Por ejemplo, se usa una endoglicanasa para eliminar las estructuras con unión en N de un glicopéptido para exponer una GlcNAc terminal, como una Asn unida en GlcNAc del glicopéptido. Se usa UDP-Gal-PEG y la galactosiltransferasa adecuada para

introducir la función PEG- o PPG-galactosa en la GlcNAc expuesta.

En una realización alternativa, el carbohidrato modificado se añade directamente al esqueleto del péptido mediante el uso de una glicosiltransferasa que se sabe que transfiere residuos de carbohidrato al esqueleto del péptido. Esta realización ejemplar se expone en el Esquema 7. Las glicosiltransferasas ejemplares útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, GalNAc transferasas (GalNAc T1-20), GlcNAc transferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, xilosiltransferasas, manosiltransferasas y similares. El uso de esta aproximación permite la adición directa de carbohidratos modificados a los péptidos que carecen de carbohidratos o, de manera alternativa, a los glicopéptidos existentes. En ambos casos, la adición del carbohidrato modificado se da en posiciones específicas en el esqueleto del péptido, tal como lo define la especificidad del sustrato de la glicosiltransferasa, y no de una manera aleatoria como se da durante la modificación del esqueleto peptídico de una proteína mediante el uso de métodos químicos. Se puede introducir una serie de agentes en proteínas o glicopéptidos que carecen de la secuencia peptídica sustrato para la glicosiltransferasa modificando la secuencia de aminoácidos adecuada en la cadena del polipéptido.

Esquema 7



En cada una de las realizaciones ejemplares expuestas anteriormente, se pueden utilizar una o más etapas de modificación química o enzimática tras la conjugación del carbohidrato modificado al péptido. En una realización ejemplar, se usa una enzima (p.ej., fucosiltransferasa) para añadir una unidad de glicosilo (p.ej., fucosa) al carbohidrato modificado terminal unido al péptido. En otro ejemplo, se utiliza una reacción enzimática para "tapar" (p.ej., sialilar) sitios en los que el carbohidrato modificado no pudo conjugarse. De manera alternativa, se utiliza una reacción química para alterar la estructura del carbohidrato modificado conjugado. Por ejemplo, el carbohidrato modificado conjugado se hace reaccionar con agentes que estabilizan o desestabilizan su unión con el componente peptídico al que está unido el carbohidrato modificado. En otro ejemplo, se desprotege un componente del carbohidrato modificado tras su conjugación al péptido. Un experto apreciará que existe una serie de procedimientos enzimáticos y químicos que son útiles en los métodos de la invención en una etapa después de haber conjugado el carbohidrato modificado al péptido. La elaboración adicional del conjugado carbohidrato modificado-péptido está dentro del alcance de la invención.

Enzimas

Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas catalizan la adición de carbohidratos activados (NDP-carbohidratos donantes) por etapas a una proteína, glicopéptido, lípido o glicolípido o al extremo no reductor de un oligosacárido en crecimiento. Los glicopéptidos con unión en N se sintetizan por medio de una transferasa y un donante de oligosacárido unido a un lípido Dol-PP-NAG₂Glc₃Man₉ en una transferencia en bloque, seguido por el recorte del núcleo. En este caso, la naturaleza del sacárido del "núcleo" es algo diferente de las uniones posteriores. Se conoce en la técnica un gran número de glicosiltransferasas.

La glicosiltransferasa a usar en la presente invención puede ser cualquiera con tal de que utilice el carbohidrato modificado como donante de carbohidrato. Los ejemplos de tales enzimas incluyen glicosiltransferasas de ruta de Leloir, tales como galactosiltransferasa, N-acetilglucosaminiltransferasa, N-acetilgalactosaminiltransferasa, fucosiltransferasa, sialiltransferasa, manosiltransferasa, xilosiltransferasa, glucurononiltransferasa y similares.

Para la síntesis enzimática de sacáridos que implican reacciones de glicosiltransferasa, la glicosiltransferasa se puede clonar o aislar de cualquier fuente. Se conocen muchas glicosiltransferasas clonadas, al igual que sus secuencias polinucleotídicas. Véase, p.ej., "The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferases" (http://www.vei.co.uk/TGN/qt_guide.htm). Las secuencias de aminoácidos de las glicosiltransferasas y las secuencias nucleotídicas que codifican glicosiltransferasas de las que se pueden deducir las secuencias de aminoácidos también se hallan en diversas bases de datos disponibles públicamente, que incluyen GenBank, Swiss-Prot, EMBL, y otras.

Las glicosiltransferasas que se pueden emplear 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 oligosacriltransferasas. Las glicosiltransferasas adecuadas incluyen las obtenidas de eucariotas, así como de procariontas.

El ADN que codifica las enzimas glicosiltransferasas se puede obtener mediante síntesis química, mediante el cribado de transcritos inversos de mRNA de células adecuadas o de cultivos de líneas celulares, mediante el cribado de bibliotecas genómicas de células adecuadas, o mediante combinaciones de estos procedimientos. El cribado del mRNA o ADN genómico se puede llevar a cabo con sondas oligonucleotídicas generadas a partir de la secuencia génica de las glicosiltransferasas. Las sondas se pueden marcar con un grupo detectable, tal como un grupo fluorescente, un átomo radiactivo o un grupo quimioluminiscente de acuerdo con procedimientos conocidos y usado en los ensayos de hibridación convencionales. Como alternativa, se pueden obtener secuencias génicas de glicosiltransferasas mediante el uso del procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y los cebadores oligonucleotídicos para la PCR se producen a partir de la secuencia génica de las glicosiltransferasas. Véase la pat. de EE.UU. n° 4.683.195 de Mullis *et al.* y la pat. de EE.UU. n° 4.683.202 de Mullis.

La enzima glicosiltransferasa se puede sintetizar en células hospedadoras transformadas con vectores que contienen el ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa. Un vector es una construcción replicable de ADN. Los vectores se usan para amplificar el ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa y/o para expresar el ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa. Un vector de expresión es una construcción replicable de ADN en la que una secuencia de ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa está unida de forma operable a secuencias de control adecuadas capaces de llevar a cabo la expresión de la enzima glicosiltransferasa en un hospedador adecuado. La necesidad de tales secuencias de control variará dependiendo del hospedador seleccionado y del método de transformación elegido. En general, las secuencias de control incluyen un promotor transcripcional, una secuencia de un operador opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma adecuados para el mRNA, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de amplificación no requieren la expresión de dominios de control. Todo lo necesario es la capacidad de replicarse en un hospedador, conferida normalmente mediante un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

Fucosiltransferasas

En ciertas realizaciones, la glicosiltransferasa utilizada en el método de la invención es una fucosiltransferasa. Los expertos en la técnica conocen las fucosiltransferasas. Las fucosiltransferasas ejemplares incluyen enzimas que transfieren L-fucosa de GDP-fucosa a una posición de un grupo hidroxilo en un carbohidrato aceptor. Las fucosiltransferasas que transfieren carbohidratos que no son de nucleótidos a un aceptor también son útiles en la presente invención.

En ciertas realizaciones, el carbohidrato aceptor es, por ejemplo, GlcNAc de un grupo Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β en un glicósido de un oligosacárido. Las fucosiltransferasas adecuadas para esta reacción incluyen la Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β - α (1 \rightarrow 3,4)fucosiltransferasa (FTIII E.C. N° 2.4.1.65), que se caracterizó por primera vez a partir de la leche humana (véase, 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 las Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc β - α -fucosiltransferasas (FTIV, FTV, FTVI) que se hallan en el suero humano. También se ha caracterizado FTVII (E.C. N° 2.4.1.65), una sialil α (2 \rightarrow β)Gal β ((1 \rightarrow 3)GlcNAc β fucosiltransferasa. También se ha caracterizado una forma recombinante de la Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β - α (1 \rightarrow 3,4)fucosiltransferasa (véase, 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, α 1,2 fucosiltransferasa (E.C. N° 2.4.1.69). La fucosilación enzimática se puede llevar 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. Las células que se usan para producir una fucosiltransferasa también incluirán un sistema enzimático para sintetizar GDP-fucosa.

Galactosiltransferasas

En otro grupo de realizaciones, la glicosiltransferasa es una galactosiltransferasa. Las galactosiltransferasas ejemplares incluyen las α (1,3) galactosiltransferasas (E.C. N° 2.4.1.151, véase, p.ej., 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)), murina (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 α 1,3 galactosiltransferasa adecuada es la que está 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)).

También son adecuadas para el uso en los métodos de la invención las β (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)), mu-

rina (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, α 1,2 galactosiltransferasas (p.ej., de *Schizosaccharomyces pombe*, Chapell *et al.*, *Mol. Biol. Cell* **5**: 519-528 (1994)).

- 5 Se conoce bien la producción de proteínas tales como la enzima GalNAc T_{I-XIV} a partir de genes clonados mediante ingeniería genética. Véase, p.ej., la pat. de EE.UU. nº 4.761.371. Un método implica la recogida de muestras suficientes, y después se determina la secuencia de aminoácidos de la enzima mediante secuenciación N-terminal. Esta información se usa después para aislar un clon de cADN que codifica una transferasa de tamaño completo (asociada a la membrana) que tras la expresión en la línea celular de insecto Sf9 da como resultado la síntesis de una enzima completamente activa. La especificidad por el aceptor de la enzima se determina después mediante el uso de un análisis semicuantitativo de los aminoácidos que rodean los sitios de glicosilación conocidos en 16 proteínas diferentes, seguido por estudios de glicosilación in vitro de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que ciertos residuos de aminoácidos están muy representados en segmentos de péptidos glicosilados, y que los residuos en 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 de aminoácidos.

Sialiltransferasas

Las sialiltransferasas son otro tipo de glicosiltransferasas que son útiles en las células recombinantes y las mezclas de reacción de la invención. Las células que producen sialiltransferasas recombinantes producirán también CMP-ácido siálico, que es un donante de ácido siálico para las sialiltransferasas. Los ejemplos de sialiltransferasas que son adecuadas para el uso en la presente invención incluyen ST3Gal III (p.ej., 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 α (2,3)sialiltransferasa ejemplar denominada α (2,3)sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico a la Gal terminal no reductora de un disacárido o glicósido de Gal β 1 \rightarrow 3Glc. Véase, 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 α 2,3-sialiltransferasa ejemplar (EC 2.4.99.4) transfiere ácido siálico a la Gal terminal no reductora del disacárido o glicósido. véase, 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- β -1,4-GlcNAc α -2,6 sialiltransferasa (Véase, Kurosawa *et al.* *Eur. J. Biochem.* **219**: 375-381 (1994)).

- 30 Preferiblemente, para la glicosilación de carbohidratos de glicopéptidos la sialiltransferasa será capaz de transferir ácido siálico a la secuencia Gal β 1,4GlcNAc-, la penúltima secuencia más habitual que subyace detrás del ácido siálico terminal en las estructuras de carbohidratos completamente sialilados (véase la Tabla 3).

Tabla 3: Sialiltransferasas que usan la secuencia Gal β 1,4GlcNAc como sustrato aceptor

Sialiltransferasa	Fuente	Secuencia(s) formadas	Ref.
ST6Gal I	Mamífero	NeuAca α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	Mamífero	NeuAca α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAca α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	Mamífero	NeuAca α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAca α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST6Gal II	Mamífero	NeuAca α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	
ST6Gal II	fotobacteria	NeuAca α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	2
S13Gal V	<i>N. meningitides</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	NeuAca α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	3

- 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)

- 35 Un ejemplo de una sialiltransferasa que es útil en los métodos reivindicados es ST3Gal III, que también se denomina α (2,3)sialiltransferasa (EC 2.4.99.6). Esta enzima cataliza la transferencia de ácido siálico a la Gal de un glicósido Gal β 1,3GlcNAc o Gal β 1,4GlcNAc (véase, p.ej., 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 oligosacáridos unidos a asparagina en glico-

péptidos. El ácido siálico se une a una Gal con la formación de una unión α entre los dos sacáridos. El enlace (unión) entre los sacáridos es entre la posición 2 de NeuAc y la posición 3 de Gal. Esta enzima particular se puede aislar a partir de hígado de rata (Weinstein *et al.*, *J. Biol. Chem.* **257**: 13845 (1982)); se conocen secuencias de cADN humano (Sasaki *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 22782-22787; Kitagawa y Paulson (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 1394-1401) y genómicas (Kitagawa *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 931-938), que facilitan la producción de esta enzima mediante expresión recombinante. En una realización preferida, los métodos de sialilación reivindicados usan una ST3Gal III de rata.

Otras sialiltransferasas ejemplares útiles en la presente invención incluyen las aisladas a partir de *Campylobacter jejuni*, que incluyen la $\alpha(2,3)$. Véase, p.ej., el documento WO99/49051.

- 10 Otras sialiltransferasas diferentes de las enumeradas en la Tabla 3 también son útiles en un procedimiento a gran escala económico y eficaz de sialilación de glicopéptidos comercialmente importantes. Como ensayo simple para descubrir la utilidad de estas otras enzimas, se hacen reaccionar cantidades diversas de cada enzima (1-100 mU/mg de proteína) con asialo- α_1 AGP (a 1-10 mg/ml) para comparar la capacidad de la sialiltransferasa de interés de sialilar glicopéptidos respecto de las sialiltransferasas bovinas ST6Gal I, ST3Gal III o ambas. De manera alternativa, se pueden usar otros glicopéptidos, u oligosacáridos con unión en N, liberados enzimáticamente del esqueleto peptídico en lugar de asialo- α_1 AGP para esta determinación. Las sialiltransferasas con la capacidad de sialilar los oligosacáridos con unión en N de glicopéptidos de manera más eficaz que ST6Gal I son útiles en un procedimiento práctico a gran escala para la sialilación de péptidos (como se ilustra para ST3Gal III en esta descripción).

Otras glicosiltransferasas

- 20 Un experto en la técnica entenderá que se pueden sustituir otras glicosiltransferasas en ciclos de transferasa similares tal como se ha descrito con detalle para la sialiltransferasa. En particular, la glicosiltransferasa puede ser también, por ejemplo, glucosiltransferasa, p.ej., Alg8 (Stagljev *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5977 (1994)) o Alg5 (Heesen *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **224**: 71 (1994)).

- 25 Las N-acetilgalactosaminiltransferasas también son útiles en la práctica de la presente invención. Las N-acetilgalactosaminiltransferasas 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 polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa (Homa *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**: 12609 (1993)). Las N-acetilglucosaminiltransferasas adecuadas incluyen GnTI (2.4.1.101, Hull *et al.*, *BBRC* **176**: 608 (1991)), GnTII, GnTIII (Ihara *et al.*, *J. Biochem.* **113**: 692 (1993)), GnTIV, y GnTV (Shoreiban *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**: 15381 (1993)), N-acetilglucosaminiltransferasa con unión en O (Bierhuizen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9326 (1992)), N-acetilglucosamin-1-fosfato transferasa (Rajput *et al.*, *Biochem J.* **285**: 985 (1992), e hialuronano sintasa.

Las manosiltransferasas son útiles para transferir restos de manosa modificados. Las manosiltransferasas adecuadas 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)).

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

Otros ciclos de glicosiltransferasa adecuados se describen 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).

- 40 Las glicosiltransferasas procarióticas son útiles también en la práctica de la invención. Tales glicosiltransferasas incluyen enzimas implicadas en la síntesis de lipopoligosacáridos (LOS), que son producidos por muchas bacterias gramnegativas. Los LOS tienen generalmente secuencias de glicano terminales que imitan los glicoconjugados hallados en la superficie de las células epiteliales humanas o en secreciones del hospedador (Preston *et al.*, *Critical Reviews in Microbiology* **23(3)**: 139-180 (1996)). Tales enzimas incluyen, pero sin limitación, las proteínas de los operones *rfa* de especies tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, que incluyen una $\beta(1,6)$ galactosiltransferasa y una $\beta(1,3)$ galactosiltransferasa (véase, p.ej., los n°s de acceso de EMBL M80599 y M86935 (*E. coli*); N° de acceso de EMBL S56361 (*S. typhimurium*)), una glucosiltransferasa (N° de acceso de Swiss-Prot P25740 (*E. coli*)), una $\beta(1,2)$ -glucosiltransferasa (*rfaJ*) (N° de acceso de Swiss-Prot P27129 (*E. coli*)) y N° de acceso de Swiss-Prot P19817 (*S. typhimurium*)), y una $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa (*rfaK*) (N° de acceso de EMBL U00039 (*E. coli*)). Otras glicosiltransferasas para las que se conocen las secuencias de aminoácidos incluyen las codificadas 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 *rhl* de *Pseudomonas aeruginosa*.

- 55 También están disponibles para el 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 de trisacárido de grupo sanguíneo P^K, D-galactosil- $\alpha(1,4)$ -D-galactosil- β

1,4-D-glucosa, que se han identificado en los LOS de los patógenos mucosos de *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 de *N. meningitidis* L3 y L1 (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 que consiste en tres genes, *IgtA*, *IgtB* e *IgE*, codifica las enzimas glicosiltransferasas necesarias para la adición de los tres últimos carbohidratos de la cadena de lacto-*N*-neotetraosa (Wakarchuk *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271**: 19166-73 (1996)). Recientemente, se ha demostrado la actividad enzimática del producto de los genes *IgtB* y *IgtA*, lo que proporciona la primera prueba directa de su función propuesta como glicosiltransferasa (Wakarchuk *et al.*, *J. Biol. Chem.* **271(45)**: 28271-276 (1996)). En *N. gonorrhoeae*, hay dos genes adicionales, *IgtD* que añade β -D-GalNAc en la posición 3 de la galactosa terminal de la estructura de lacto-*N*-neotetraosa y *IgtC* que añade una α -D-Gal terminal al elemento de lactosa de un LOS truncado, por lo que se crea así la estructura antigénica de grupo sanguíneo P^k (Gotshlich (1994), anteriormente mencionado). En *N. meningitidis*, un inmunotipo L1 distinto también expresa el antígeno de grupo sanguíneo P^k, y se ha demostrado que porta un gen *IgtC* (Jennings *et al.*, (1995), anteriormente mencionado). Las glicosiltransferasas de *Neisseria* y los genes asociados también se describen en el documento USPN 5.545.553 (Gotschlich). Los genes para α 1,2-fucosiltransferasa y α 1,3-fucosiltransferasa de *Helicobacter pylori* también se han caracterizado (Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* **272**: 21349-21356 (1997)). También son útiles en la presente invención las glicosiltransferasas de *Campylobacter jejuni* (véase, por ejemplo, http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/igt_42.html).

20 Sulfotransferasas

La invención también proporciona métodos para producir péptidos que incluyen moléculas sulfatadas, que incluyen, por ejemplo, polisacáridos sulfatados tales como heparina, sulfato de heparano, carragenano, y compuestos relacionados. Las sulfotransferasas adecuadas incluyen, por ejemplo, condroitina-6-sulfotransferasa (cADN de gallina descrito por Fukuta *et al.*, *J. Biol. Chem.* **270**: 18575-18580 (1995); N° de acceso de GenBank D49915), glicosaminoglicano N-acetilglucosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 1 (Dixon *et al.*, *Genomics* **26**: 239-241 (1995); UL18918), y glicosaminoglicano N-acetilglucosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 2 (cADN murino descrito en Orellana *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 2270-2276 (1994) y Eriksson *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 10438-10443 (1994); cADN humano descrito en el N° de acceso de GenBank U2304).

Glicosiltransferasas Asociadas a Células

30 En otra realización, las enzimas utilizadas en el método de la invención son glicosiltransferasas asociadas a células. Aunque se conocen muchas glicosiltransferasas solubles (véase, por ejemplo, la pat. de EE.UU. n° 5.032.519), las glicosiltransferasas generalmente están en forma asociada a membranas cuando están asociadas a células. Muchas de las enzimas asociadas a membranas estudiadas hasta ahora se consideran 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 las células de vertebrados e invertebrados, y también se ha reconocido que estas transferasas superficiales mantienen la actividad catalítica en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la función más reconocida de las glicosiltransferasas de la superficie celular es el reconocimiento intercelular (Roth, MOLECULAR APPROACHES TO SUPRACELLULAR PHENOMENA, 1990).

40 Se han desarrollado métodos para alterar las glicosiltransferasas expresadas por las células. Por ejemplo, Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8227-8231 (1989), informa de una aproximación genética para aislar secuencias de cADN clonadas que determinan la expresión de estructuras de oligosacáridos de la superficie celular y sus glicosiltransferasas afines. Una biblioteca de cADN generada a partir de mRNA aislado de una línea celular murina que se sabe que expresa UDP-galactosa: β -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida α -1,3-galactosiltransferasa se transfirió en células COS-1. Las células transfectadas se cultivaron después y se ensayó la actividad de α 1-3 galactosiltransferasa.

50 Francisco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2713-2717 (1992), describe un método de anclaje de β -lactamasa en la superficie externa de *Escherichia coli*. Se produce una fusión tripartita que consiste en (i) una secuencia señal de una proteína de la membrana externa, (ii) una sección que cruza la membrana de una proteína de la membrana externa, y (iii) una secuencia de β -lactamasa madura completa, lo que da como resultado una molécula de β -lactamasa activa asociada a la superficie. Sin embargo, el método de Francisco se limita solamente a sistemas de células procarióticas y, como reconocieron los autores, requiere la fusión tripartita completa para un funcionamiento adecuado.

Proteínas de Fusión

55 En otras realizaciones ejemplares, los métodos de la invención utilizan proteínas de fusión que pueden tener más de una actividad enzimática que está implicada en la síntesis de un conjugado de glicopéptido deseado. Los polipéptidos de fusión pueden estar compuestos, por ejemplo, de un dominio catalíticamente activo de una glicosiltransferasa que se une a un dominio catalíticamente activo de una enzima accesoria. El dominio catalítico de la enzima accesoria puede catalizar, por ejemplo, una etapa de la formación de un carbohidrato de nucleótido que es un donante para

la glicosiltransferasa, o puede catalizar una reacción implicada en un ciclo de la glicosiltransferasa. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica una glicosiltransferasa se puede unir, en el marco de lectura, a un polinucleótido que codifica una enzima implicada en la síntesis de carbohidratos de nucleótidos. La proteína de fusión resultante puede catalizar entonces no solamente la síntesis del carbohidrato de nucleótido, sino también la transferencia del resto de carbohidrato a la molécula aceptora. La proteína de fusión puede ser dos o más enzimas cíclicas unidas en una secuencia nucleotídica expresable. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye los dominios catalíticamente activos de dos o más glicosiltransferasas. Véase, por ejemplo, el documento 5.641.668. Los glicopéptidos modificados de la presente invención se pueden diseñar y fabricar fácilmente mediante la utilización de diversas proteínas de fusión adecuadas (véase, por ejemplo, la solicitud de patente PCT/CA98/01180, que se publicó como el documento WO 99/31224 el 24 de junio de 1999).

Enzimas Inmovilizadas

Además de las enzimas asociadas a células, la presente invención también prevé 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 a un PEG por medio de un ligador de glicosilo intacto según los métodos de la invención. El conjugado PEG-ligador-enzima está unido opcionalmente a un soporte sólido. El uso de enzimas en soportes sólidos en los métodos de la invención simplifica el tratamiento de la mezcla de reacción y la purificación del producto de la reacción, y también posibilita la recuperación sencilla de la enzima. El conjugado de glicosiltransferasa se utiliza en los métodos de la invención. Otras combinaciones de enzimas y soportes serán evidentes para los expertos en la técnica.

Glicosilación mediante Métodos Recombinantes

También se ha llevado a cabo la glicosilación de una hormona del crecimiento humana mutante de manera intracelular por medios recombinantes. Una secuencia polinucleotídica que codifica una hormona del crecimiento humana mutante, que comprende al menos un sitio de glicosilación con unión en N u O recién introducido, se puede transfectar en una línea celular hospedadora adecuada, p.ej., una línea celular eucariótica derivada de levadura, insecto, o mamífero. La hormona del crecimiento humana mutante producida de manera recombinante de tal línea celular se glicosila mediante la maquinaria de glicosilación de la célula hospedadora.

Purificación de hGH Mutante Glicosilada

La hormona del crecimiento humana glicosilada producida mediante los procedimientos anteriores preferiblemente se purifica antes del uso. Se pueden usar técnicas habituales muy conocidas, tales como cromatografía en capa fina o gruesa, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico, o filtración en membrana. Se prefiere el uso de la filtración en membrana, más preferiblemente con la utilización de una membrana osmótica inversa, o una o más técnicas cromatográficas en columna para la recuperación, tal como se discute más adelante en la presente memoria y en la bibliografía citada en el presente documento.

Si la hormona del crecimiento humana mutante glicosilada se produce de manera intracelular, como primera etapa, se eliminan los restos particulados, células hospedadoras o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, la proteína se puede concentrar con un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, seguido de la separación de la variante de polipéptido de otras impurezas mediante una o más etapas seleccionadas de cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (p.ej., con dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía con Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, lectina de lenteja-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Éter Toyopearl, Butil Toyopearl, Fenil Toyopearl, SP-Sepharose, o proteína A Sefarosa, cromatografía SDS-PAGE, cromatografía con sílice, cromatografía de exclusión por tamaño, HPLC de fase inversa (p.ej., gel de sílice con grupos alifáticos unidos), filtración en gel mediante el uso, p.ej., de tamices moleculares de Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en columnas que unen de manera selectiva el polipéptido, y precipitación con etanol o sulfato amónico.

Una hormona del crecimiento humana mutante glicosilada producida en cultivo se aísla normalmente mediante una extracción inicial de las células, lisado celular, medio de cultivo, etc., seguido de una o más etapas de concentración, precipitación a concentración salina elevada, intercambio iónico acuoso, o cromatografía de exclusión por tamaño. Además, la glicoproteína se puede purificar mediante cromatografía de afinidad. Finalmente, se puede emplear una HPLC para las etapas finales de purificación.

Se puede incluir un inhibidor de proteasas, p.ej., fluoruro de metilsulfonilo (PMSF) en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes casuales.

En ciertos casos, los sobrenadantes de los sistemas que producen la hormona del crecimiento humana glicosilada de la invención se concentran primero mediante el uso de un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, el

concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender un ligando para el péptido, una lectina o una molécula de anticuerpo unida a un soporte adecuado. De manera alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o susto que tiene grupos de DEAE que penden de ella. Las matrices adecuadas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano, 5 celulosa, u otros tipos empleados habitualmente en la purificación de proteínas. Además, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren en particular los grupos sulfopropilo.

Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de RP-HPLC que emplean medios de RP-HPLC hidrófobos, p.ej., 10 gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos pendientes, para purificar adicionalmente una hormona del crecimiento humana mutante glicosilada. También se pueden utilizar algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una glicoproteína.

La hormona del crecimiento humana mutante glicosilada de la invención que resulta de una fermentación a gran 15 escala se puede purificar mediante métodos análogos a los descritos por Urdal *et al.*, *J. Chromatog.* **296**: 171 (1984). Esta referencia describe dos etapas de RP-HPLC secuenciales para la purificación de IL-2 humana recombinante en una columna de HPLC preparativa. De manera alternativa, se pueden utilizar técnicas tales como la cromatografía de afinidad para purificar la glicoproteína.

Ensayos Funcionales para la hGH Mutante

Tras la producción y, preferiblemente, la purificación de una hormona del crecimiento humana mutante glicosilada, 20 se ensayan las funciones biológicas de la glicoproteína mediante el uso de varios métodos conocidos en la técnica. Los ensayos funcionales se basan en las diversas características de la hormona del crecimiento humana, tales como su unión específica al receptor de la hormona del crecimiento humana, la activación del receptor de hGH, y su actividad en la estimulación del crecimiento celular. En cada ensayo, la hormona del crecimiento humana de tipo natural se incluye como un control positivo.

Se puede llevar a cabo un ensayo de unión a un radioreceptor para medir la unión entre un receptor de hGH radio- 25 marcado y una hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención. Se puede hallar una descripción detallada de tal ensayo en la bibliografía, p.ej., Tsushima *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **37**: 334-337 (1973); Chin *et al.*, *Endocr. Meta.* **37**: 334 (1973); y las patentes de EE.UU. n°s 4.871.835, 5.079.230.

La capacidad de una hormona del crecimiento humana mutante de estimular el crecimiento celular se determina 30 mediante métodos tales como el ensayo de tibia (Parlow *et al.*, *Endocrinology* **77**: 1126 (1965); patente de EE.UU. n° 4.871.835). Brevemente, se extrae la hipófisis de ratas de 28-30 días de edad y se mantienen durante 10-14 días sin tratamiento. Después se administran a las ratas los mutantes de la hormona del crecimiento humana derivados de una fuente recombinante mediante inyecciones subcutáneas diarias. Los animales se sacrifican en el sexto día, se extraen los huesos de la rodilla de las patas delanteras y se mide la anchura de las placas epifisarias. También se 35 monitoriza el peso de estas ratas al inicio del experimento y antes de ser sacrificadas, y se compara entre los diferentes grupos que recibieron inyecciones diarias de la hormona del crecimiento humana mutante a concentraciones diferentes.

Además, se puede demostrar la actividad biológica de una hormona del crecimiento humana mutante por su capaci- 40 dad de provocar la fosforilación de tirosinas dependiente de la hGH en células IM-9, que proceden de un clon de linfoblastoma humano y que expresan el receptor de la hormona del crecimiento humana en la superficie celular. También pueden ser adecuados otros tipos de células, tales como las células MB-2 para los ensayos funcionales de hGH. El nivel de fosforilación de tirosinas de las proteínas celulares tras la exposición a la hormona del crecimiento humana mutante se demuestra mediante un anticuerpo monoclonal hacia la tirosina fosforilada, tal como describió 45 Silva *et al.*, *Endocrinology*, **132**: 101 (1993) y la patente de EE.UU. n° 6.238.915.

Composición Farmacéutica y Administración

La hormona del crecimiento humana mutante glicosilada que tiene los determinantes de oligosacáridos deseados 45 descrita anteriormente se puede usar como agente terapéutico para el tratamiento de una diversidad de enfermedades y afecciones relacionadas con una deficiencia de la hormona del crecimiento. Las afecciones relacionadas con el crecimiento que se pueden tratar con la hormona del crecimiento humana mutante de la presente invención incluyen: enanismo, estatura corta en niños y adultos, caquexia/debilidad muscular, atrofia muscular general, y anomalía 50 cromosómica sexual (p.ej., síndrome de Turner). Otras afecciones que se pueden tratar mediante el uso de la hGH mutante de la presente invención incluyen: síndrome de intestino corto, lipodistrofia, osteoporosis, uremia, quemaduras, infertilidad femenina, regeneración ósea, diabetes general, diabetes tipo II, osteo-artritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), e insomnio. La hGH mutante de la invención se puede usar también para estimular diversos procesos de cicatrización, p.ej., regeneración de tejido general, regeneración ósea, y cicatrización 55 de heridas, o como un adyuvante de vacuna. Así, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de la hormona del crecimiento humana mutante glicosilada, que se produce según los métodos descritos anteriormente.

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

5 Las composiciones farmacéuticas están destinadas a la administración parenteral, intranasal, tópica, oral, o local, tal como mediante inyección subcutánea, inhalación de aerosol, o adsorción transdérmica, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Normalmente, las composiciones farmacéuticas se administran de manera parenteral, p.ej., de manera subcutánea o intravenosa. Así, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden la hormona del crecimiento humana mutante glicosilada disuelta o suspendida en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso, p.ej., agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similares. Las composiciones también pueden contener detergentes tales como Tween 20 y Tween 80; estabilizantes tales como manitol, sorbitol, sacarosa, y trehalosa; y conservantes tales como EDTA y m-cresol. 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 agentes tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden filtrar de manera estéril. Las disoluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso tal como están, o liofilizadas, y la preparación liofilizada se combina con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones será en general de entre 3 y 11, más preferiblemente de 5 a 9, y lo más preferiblemente de 7 y 8.

20 Las composiciones que contienen la hormona del crecimiento humana mutante glicosilada se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad o afección relacionada con la deficiencia de la hormona del crecimiento, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad o afección y del peso y estado general del paciente, pero generalmente oscilan de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 2.000 mg de hormona del crecimiento humana mutante glicosilada por día para un paciente de 70 kg, y se usan más frecuentemente las dosis de alrededor de 5 mg a alrededor de 200 mg de los compuestos por día.

30 En las aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen la hormona del crecimiento humana mutante glicosilada de la invención se administran a un paciente susceptible a, o que de otro modo tiene riesgo de desarrollar, una enfermedad particular. Tal cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y del peso, pero generalmente oscilan de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 1,000 mg por paciente de 70 kilogramos, más habitualmente de alrededor de 5 mg a alrededor de 200 mg por 70 kg de peso corporal.

35 Se pueden llevar a cabo administraciones simples o múltiples de las composiciones con niveles y patrones de dosis seleccionados por el médico que aplica el tratamiento. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad de la hormona del crecimiento humana mutante glicosilada de esta invención suficiente para tratar de manera eficaz al paciente.

40 Los ejemplos siguientes se proporcionan a modo de ilustración únicamente, y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros que no son críticos que se podrían cambiar o modificar para producir resultados esencialmente similares.

Ejemplo 1

45 La hormona del crecimiento humana se da en una diversidad de diferentes isoformas y diferentes secuencias de aminoácidos. Las dos formas mejor caracterizadas incluyen la hGH derivada de placenta, que también se conoce como GH-V (PDB P01242) y la hGH derivada de hipófisis, que también se conoce como somatotropina o GH-N (P01241); véase la Figura 1. La hGH derivada de hipófisis no está glicosilada, y se produce en *Escherichia coli* como un compuesto terapéutico. La hGH derivada de placenta (GH-V) tiene un sitio de glicosilación en N en el aminoácido 140 (véase la Tabla 4 y la FIG. 1, véase la flecha).

Tabla 4. Hormona del Crecimiento Humana (GH-V), derivada de placenta; P01242 (SEQ ID N°:2)

50 fptiplsrldfnamlrarrlyqlaydtyqefeeayilkeqkysflqnpqtslcfesiptpsnrvtqkksnle
 llrisllliqswlepvlrsvfanslvygasdsnvyrhlkdleegiqlmwrlledgsprtqgfnqsyskfdt
 kshnddallknygllycfrkdmkvvetflrivqcrsvvegscgf ↑

La hGH derivada de hipófisis (GH-N) se puede modificar en la posición del aminoácido 140 para introducir un sitio de glicosilación con unión en N mutando la secuencia nucleotídica que codifica este polipéptido de manera que en vez de que codificar la lisina de tipo natural (abreviada como "k" en el aminoácido 140 de la secuencia polipeptídica de

GH-N de la Tabla 5 y la **FIG. 1**, véase la flecha), la secuencia nucleotídica codificará una asparagina (abreviada "n") en la posición del aminoácido 140 de GH-N (véase también la **FIG. 2**).

Tabla 5. Hormona del Crecimiento Humana (GH-N), derivada de hipófisis; P01241 (SEQ ID N°:1)

fptiplsrldfnamlrahrlhqlafdttyqefeeayipkeqkysflqnpqtslcfesiptpsnreetqqksnle
 llrisllliqswlepqvflrsvfanslvygasdsnvdydlkdleegiqlmgrpiledgsprtggqifkqtyskfdt
 nshnddallknygllycfrkdmdkvvetflrivqcrsvegscgf ↑

5 Esta hGH mutada derivada de hipófisis, independientemente del sistema de expresión utilizado para producir este polipéptido, se puede glicosilar después o glicoconjuguar (véase el documento WO 03/31464, incorporado en la presente memoria como referencia). Preferiblemente, la hGH mutada derivada de hipófisis se glicoPEGila, en donde un resto de polietilen glicol (PEG) se conjuga al polipéptido de la hGH mutada derivada de hipófisis por medio de una unión glicosilo (véase el documento WO 03/31464, incorporado en la presente memoria como referencia). LA **FIG. 3**
 10 describe la GlicoPEGilación de un mutante de hGH con glicano unido en N producido en células de insecto Sf9 o células de mamífero. Se espera que la glicoPEGilación de la hGH mutante derivada de hipófisis dé como resultado propiedades biofísicas mejoradas, que pueden incluir, pero sin limitación, una semivida mejorada, valores mejorados del área bajo la curva (ABC), una eliminación reducida, y una inmunogenicidad reducida.

Ejemplo 2

15 Una aproximación alternativa es crear un sitio de glicosilación con unión en O en el polipéptido de hGH derivada de hipófisis. Este sitio de glicosilación con unión en O se puede usar después como sitio en el que se puede glicoPEGilar el polipéptido de hGH mutada mediante el uso de una enzima GalNAc₂ o similar. Después se pueden usar una o más transferasas adicionales para añadir glicanos o glicoconjugados en ese sitio. Preferiblemente, el polipéptido de la hGH mutada derivada de hipófisis se glicoPEGila. La **FIG. 4** describe la glicoPEGilación de un mutante de hGH con glicano unido en O producido en *Escherichia coli*.
 20

Ejemplo 3

Tal como se identificó mediante la estructura cristalina de hGH y de su receptor, las regiones de giros de la proteína de la hGH derivada de hipófisis son las más adecuadas para que la mutación introduzca un sitio de glicosilación (**FIG. 5**). Específicamente, la secuencia nucleotídica que codifica los aminoácidos 1-6 (FPTIPL; SEQ ID N°:10), aminoácidos 48-52 (PQTSL; SEQ ID N°:11), aminoácidos 59-64 (PTPSNR; SEQ ID N°:12), aminoácidos 133-139 (PRTGQIF; SEQ ID N°:13), aminoácidos 133-145 (PRTGQIFKQTYSK; SEQ ID N°:14), o aminoácidos 139-142 (FKQT; SEQ ID N°:15) de la secuencia de aminoácidos de hGH derivada de hipófisis de tipo natural (véase la Tabla 5 y la **FIG. 1**) se pueden mutar de manera que se introduzca un sitio de glicosilación con unión en N o con unión en O en el polipéptido de la hGH mutada derivada de hipófisis resultante.
 25

30 La **FIG. 6** ilustra seis (6) de estos sitios de glicosilación con unión en O introducidos. Las flechas de la Figura 6 representan cada una el residuo de treonina en el que se dará la glicosilación con unión en O en el mutante de hGH GH-N con glicano unido en O.

Las **FIG. 7** y **FIG. 8** ilustran cada una dos mutantes de hGH GH-N con glicano unido en O.

Ejemplo 4

35 Este ejemplo describe mutaciones de la secuencia de aminoácidos que introducen sitios de glicosilación con unión en O, es decir, residuos de serina o treonina, en un sitio que contiene preferiblemente prolina de una secuencia de la hormona del crecimiento humana de tipo natural o cualquier versión modificada de la misma.

1. Mutaciones N-terminales

40 En los mutantes N-terminales, el extremo N-terminal de una hGH de tipo natural, **FP²TIP⁵LS**; SEQ ID N°:16, se sustituye con **MXnTP²TIP⁵LS** o **MAPTSSXnP²TIP⁵LS**. Los ejemplos preferidos incluyen:

- MVTPTIPLS; SEQ ID N°:17
- MQTPTIPLS; SEQ ID N°:18
- MAPTSSPTIPLS; SEQ ID N°:19
- MAPTSSSPTIPLS (extremo N-terminal de IL-2); SEQ ID N°:20
- 45 MPTTFPTIPLS; SEQ ID N°:21
- MPTSSPTIPLS; SEQ ID N°:22

MPTSSSPTIPLS; SEQ ID N°:23

2. Sitio 1 de Mutación Interna

En este tipo de mutantes, el extremo N-terminal de una hGH de tipo natural, **FP²TIP⁵LS**; SEQ ID N°:24, se sustituye con **ZmP²T XnBoP⁵LS**. Las mutaciones preferidas incluyen:

- 5 MFPTQIPLS; SEQ ID N°:25
 MFPTSIPLS; SEQ ID N°:26
 MFPTSSPLS; SEQ ID N°:27
 MTPTQIPLS; SEQ ID N°:28
 MFPTTTPLS; SEQ ID N°:29

10 3. Sitio 2 de Mutación Interna

En este tipo de mutantes, la secuencia de aminoácidos que rodea a P³⁷, **AYIP³⁷KEQKY**; SEQ ID N°:30, se sustituye con **AZmJqP³⁷OrXnBoΔpY**, en el que al menos uno de Z, J, O, X, y B se selecciona independientemente de Thr o Ser; Δ puede incluir Lys (K) y X puede ser Asp (D). Los ejemplos preferidos incluyen:

- AYIP³⁷TQGAY; SEQ ID N°:31
 15 AYIP³⁷TSSSY; SEQ ID N°:32
 AQITP³⁷TEQKY; SEQ ID N°:33
 AYIP³⁷TEQSY; SEQ ID N°:34

4. Sitio 3 de Mutación Interna

20 En este tipo de mutantes, la secuencia de aminoácidos que rodea a P⁴⁸, **LQNP⁴⁸QTSLC**; SEQ ID N°:35, se sustituye con **LZmJqP⁴⁸OrXnBoLC**, en el que al menos uno de Z, J, O, y X se selecciona independientemente de Thr o Ser. Los ejemplos preferidos incluyen:

- LQTP⁴⁸QTSLC; SEQ ID N°:36
 LQNP⁴⁸TTSLC; SEQ ID N°:37

5. Sitio 4 de Mutación Interna

25 En este tipo de mutantes, la secuencia de aminoácidos que rodea a P⁵⁹, **SESIP⁵⁹TPNREET**; SEQ ID N°:38, se sustituye con **SZmUsJqP⁵⁹TPOrXnBoΔrT**, en el que al menos uno de Z, J, O, B, Δ, U, y X se selecciona independientemente de Thr o Ser; B, Δ, y Z pueden incluir aminoácidos cargados. Los ejemplos preferidos incluyen:

- SESTP⁵⁹TPNREET; SEQ ID N°:39
 SSSTP⁵⁹TPNREET; SEQ ID N°:40
 30 SESIP⁵⁹TPNTEET; SEQ ID N°:41
 SESIP⁵⁹TPNTQET; SEQ ID N°:42
 SESIP⁵⁹TPTQGAT; SEQ ID N°:43
 SESIP⁵⁹TPTESST; SEQ ID N°:44
 SQSTP⁵⁹TPNREET; SEQ ID N°:45
 35 SQSTP⁵⁹TPNQEET; SEQ ID N°:46
 SESTP⁵⁹TPTSSST; SEQ ID N°:47

6. Sitio 5 de Mutación Interna

40 En este tipo de mutantes, la secuencia de aminoácidos que rodea a P⁸⁹, **SWLEP⁸⁹VQFLRS**; SEQ ID N°:48, se sustituye con **SZmUsJqP⁸⁹OrXnBoΔrλtS**, en el que al menos uno de Z, U, J, O, B, y X se selecciona independientemente de Thr o Ser; J y λ pueden incluir aminoácidos cargados. Los ejemplos preferidos incluyen:

SWLEP⁸⁹TQGLRS; SEQ ID N°:49

SWLEP⁸⁹TQGATS; SEQ ID N°:50

SSQTP⁸⁹VQFLRS; SEQ ID N°:51

SWLEP⁸⁹TSSLSS; SEQ ID N°:52

5 SMVTP¹⁹VQFLRS; SEQ ID N°:53

7. Sitio 6 de Mutación Interna

En este tipo de mutantes, la secuencia de aminoácidos que rodea a P¹³³, **EDGSP¹³³RTGQIF**; SEQ ID N°:54, se ha sustituido con **EZmUsJqP¹³³OrXnBoΔrΔtF**, en el que al menos uno de Z, U, J, O, B, y X se selecciona independientemente de Thr o Ser. Los ejemplos preferidos incluyen:

10 EDGSP¹³³TTGQIF; SEQ ID N°:55

EDGSP¹³³NTGQIF; SEQ ID N°:56

EDGSP¹³³TQGQIF; SEQ ID N°:57

EDGSP¹³³TVGQIF; SEQ ID N°:58

EDGSP¹³³TTTQIF; SEQ ID N°:59

15 EDGSP¹³³TSSQIF; SEQ ID N°:60

EDGSP¹³³TTQGIF; SEQ ID N°:61

EDGSP¹³³QTGQIF; SEQ ID N°:62

EDGTP¹³³NTGQIF; SEQ ID N°:63

EDQTP¹³³NTGQIF; SEQ ID N°:64

20 8. Sitio 7 de Mutación Interna

En este tipo de mutantes, la secuencia de aminoácidos que rodea a P¹⁴⁰, **GQIFK¹⁴⁰QTYS**; SEQ ID N°:65, se sustituye con **GZmUsJqΔr¹⁴⁰OrXnBoS**, en el que al menos uno de Z, U, J, O, B, y X se selecciona independientemente de Thr o Ser. Los ejemplos preferidos incluyen:

GQIFN¹⁴⁰QTYS; SEQ ID N°:66

25 GQIFN¹⁴⁰ITYS; SEQ ID N°:67

GQIFP¹⁴⁰QTSS; SEQ ID N°:68

GQIFP¹⁴⁰TTTS; SEQ ID N°:69

GQITP¹⁴⁰QTYS; SEQ ID N°:70

GQIFT¹⁴⁰QTYS; SEQ ID N°:71

30 GQIST¹⁴⁰QTYS; SEQ ID N°:72

GQIPT¹⁴⁰TTYS; SEQ ID N°:73

9. Mutaciones C-terminales

En este tipo de mutantes, la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de una hGH de tipo natural, **VEGSCG¹⁹⁰F**; SEQ ID N°:74, se sustituye con **VEGSCG¹⁹⁰PXnBoZmUsP**, en el que al menos uno de Z, U, B, y X se selecciona independientemente de Thr o Ser. Los ejemplos preferidos incluyen:

35 VEGSCGPTTTP; SEQ ID N°:75

VEGSCGPTSSP; SEQ ID N°:76

VEGSCGPTQGAMP; SEQ ID N°:77

VEGSCGPTTIP; SEQ ID N°:78

VEGSCGPMVTP; SEQ ID N°:79

5 En todos los casos anteriores, X, Z, B, Δ, J, U, O, y λ se seleccionan independientemente de E (glutamato), cualquier aminoácido sin carga o combinación de dipéptidos que incluye M, F, MF, y similares; m, n, o, p, q, r, s, y t se seleccionan independientemente de números enteros de 0 a 3. En todos los casos, la Met N-terminal puede estar presente o ausente en cualquier mutante de hGH. La numeración de los residuos de aminoácidos se basa en la secuencia inicial sin modificar en la que el residuo más a la izquierda se numera como 1. La numeración de los aminoácidos sin modificar permanece sin cambios tras la modificación. Puede haber presentes más de una de las modificaciones de secuencias anteriormente descritas en un mutante de hGH de la presente invención.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Neose Technologies, Inc.
DeFrees, Shawn
- 5 <120> Composiciones y métodos para la preparación de mutantes de glucosilación de la hormona del crecimiento humana.
<130> 040853-01-5101WO
- <150> US 60/469, 114
<151> 2003-05-09
- 10 <150> US 60/494, 751
<151> 2003-08-13
- <150> US 60/495, 076
<151> 2003-08-14
- <150> US 60/535,290
<151> 2004-01-08
- 15 <160> 79
- <170> Patent In versión 3.2
- <210> 1
<211> 191
<212> PRT
- 20 <213> Homo sapiens
- <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<223> hormona del crecimiento humana madura (GH-N)

<400> 1

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
 1 5 10 15
 Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
 20 25 30
 Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
 35 40 45
 Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
 50 55 60
 Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
 85 90 95
 Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
 100 105 110
 Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
 115 120 125
 Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
 130 135 140
 Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
 145 150 155 160
 Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
 165 170 175
 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 180 185 190

<210> 2

5 <211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

10 <223> hormona del crecimiento humana madura (GH-V)

<400> 2

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
 1 5 10 15
 Ala Arg Arg Leu Tyr Gln Leu Ala Tyr Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
 20 25 30
 Glu Ala Tyr Ile Leu Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
 35 40 45
 Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
 50 55 60
 Val Lys Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Leu Leu Arg Ser Val
 85 90 95
 Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Arg
 100 105 110
 His Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Trp Arg Leu
 115 120 125
 Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Asn Gln Ser Tyr Ser
 130 135 140
 Lys Phe Asp Thr Lys Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
 145 150 155 160
 Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
 165 170 175
 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 180 185 190

- 5 <210> 3
- <211> 191
- <212> PRT
- <213> Homo, sapiens

- <220>
- 10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <223> hormona del crecimiento humana, mutante 1

<400> 3

Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe	Asp	Asn	Ala	Met	Leu	Arg
1				5					10					15	
Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Phe	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu
			20					25					30		
Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys	Glu	Gln	Lys	Tyr	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro
		35					40					45			
Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg
	50					55					60				
Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu
65					70					75					80
Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val
				85					90					95	
Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp
			100					105					110		
Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu
		115					120					125			
Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Thr	Thr	Thr	Gln	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser
	130					135					140				
Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr
145					150					155					160
Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe
				165					170					175	
Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe	
			180					185					190		

<210> 4

<211> 194

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> hormona del crecimiento humana, mutante 2 (unida mediante O, terminada en N))

<400> 4

Pro Thr Thr Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala
 1 5 10 15
 Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln
 20 25 30
 Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu
 35 40 45
 Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro
 50 55 60
 Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg
 65 70 75 80
 Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu
 85 90 95
 Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn
 100 105 110
 Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met
 115 120 125
 Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln
 130 135 140
 Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu
 145 150 155 160
 Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val
 165 170 175
 Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys
 180 185 190

Gly Phe

<210> 5

5 <211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

10 <223> hormona del crecimiento humana, mutante 3

<400> 5

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
 1 5 10 15
 Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
 20 25 30
 Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
 35 40 45
 Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
 50 55 60
 Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
 85 90 95
 Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
 100 105 110
 Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
 115 120 125
 Glu Asp Gly Ser Pro Thr Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
 130 135 140
 Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
 145 150 155 160
 Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
 165 170 175
 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 180 185 190

<210> 6

5 <211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

10 <223> hormona del crecimiento humana, mutante 4 (unida mediante O, terminada en N)

<400> 6

Met Val Thr Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met
 1 5 10 15
 Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu
 20 25 30
 Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln
 35 40 45
 Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser
 50 55 60
 Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg
 85 90 95
 Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val
 100 105 110
 Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly
 115 120 125
 Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys
 145 150 155 160
 Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu
 165 170 175
 Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly
 180 185 190

Phe

5 <210> 7
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <223> hormona del crecimiento humana, mutante 5

<400> 7

Met Val Thr Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met
 1 5 10 15
 Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu
 20 25 30
 Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln
 35 40 45
 Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser
 50 55 60
 Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg
 85 90 95
 Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val
 100 105 110
 Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly
 115 120 125
 Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys
 145 150 155 160
 Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu
 165 170 175
 Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly
 180 185 190

Phe

<210> 8

5 <211> 192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

10 <223> hormona del crecimiento humana, mutante 6

<400> 8

Met	Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe	Asp	Asn	Ala	Met	Leu
1				5					10					15	
Arg	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Phe	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe
			20					25					30		
Glu	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys	Glu	Gln	Lys	Tyr	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn
		35					40					45			
Pro	Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn
	50					55					60				
Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser
65					70					75					80
Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser
				85					90					95	
Val	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	Asn	Val	Tyr
			100					105					110		
Asp	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg
		115					120					125			
Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Thr	Val	Gly	Gln	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr
	130					135					140				
Ser	Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn
145					150					155					160
Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr
				165					170					175	
Phe	Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe
			180					185					190		

<210> 9

<211> 192

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> hormona del crecimiento humana, mutante 7

<400> 9

Met Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu
 1 5 10 15
 Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe
 20 25 30
 Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn
 35 40 45
 Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn
 50 55 60
 Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser
 85 90 95
 Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr
 100 105 110
 Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg
 115 120 125
 Leu Glu Asp Gly Ser Pro Thr Thr Thr Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr
 130 135 140
 Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn
 145 150 155 160
 Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr
 165 170 175
 Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 180 185 190

<210> 10

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 1 5

<210> 11

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Pro Gln Thr Ser Leu
 1 5

15

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 12
Pro Thr Pro Ser Asn Arg
1 5

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 13
Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe
1 5

<210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 14
Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys
1 5 10

<210> 15
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 15
Phe Lys Gln Thr
1

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 16
Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser
1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> mutantes con N terminal

35 <400> 17
Met Val Thr Pro Thr Ile Pro Leu Ser
1 5

40 <210> 18
 <211> 9

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes con N terminal

5 <400> 18
Met Gln Thr Pro Thr Ile Pro Leu Ser
1 5

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> mutantes con N terminal

<400> 19
Met Ala Pro Thr Ser Ser Pro Thr Ile Pro Leu Ser
1 5 10

15 <210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> mutantes con N terminal

<400> 20
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Pro Thr Ile Pro Leu Ser
1 5 10

25 <210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes con N terminal

<400> 21
Met Pro Thr Thr Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser
1 5 10

30 <210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> mutantes con N terminal

<400> 22
Met Pro Thr Ser Ser Pro Thr Ile Pro Leu Ser
1 5 10

- <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> mutantes con N terminal
- <400> 23
Met Pro Thr Ser Ser Ser Pro Thr Ile Pro Leu Ser
1 5 10
- 10 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- <400> 24
Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser
1 5
- 15 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
 <223> mutantes
- <400> 25
Met Phe Pro Thr Gln Ile Pro Leu Ser
1 5
- 25 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> mutantes
- <400> 26
Met Phe Pro Thr Ser Ile Pro Leu Ser
1 5
- 30 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> mutantes
- <400> 27
Met Phe Pro Thr Ser Ser Pro Leu Ser
1 5
- 40 <210> 28
 <211> 9

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

5 <400> 28

Met Thr Pro Thr Gln Ile Pro Leu Ser
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 29

Met Phe Pro Thr Thr Thr Pro Leu Ser
1 5

15 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
1 5

20 <210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> mutantes

<400> 31

Ala Tyr Ile Pro Thr Gln Gly Ala Tyr
1 5

30 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

35 <400> 32

Ala Tyr Ile Pro Thr Ser Ser Ser Tyr
1 5

40 <210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 33

Ala Gln Ile Thr Pro Thr Glu Gln Lys Tyr
1 5 10

5 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> mutantes

<400> 34

Ala Tyr Ile Pro Thr Glu Gln Ser Tyr
1 5

15 <210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys
1 5

20 <210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

25 <400> 36
Leu Gln Thr Pro Gln Thr Ser Leu Cys
1 5

30 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 37

Leu Gln Asn Pro Thr Thr Ser Leu Cys
1 5

35 <210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Asn Arg Glu Glu Thr
1 5 10

<210> 39

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

<400> 39

Ser Glu Ser Thr Pro Thr Pro Asn Arg Glu Glu Thr
1 5 10

10

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> mutantes

<400> 40

Ser Ser Ser Thr Pro Thr Pro Asn Arg Glu Glu Thr
1 5 10

20

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

25

<400> 41

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Asn Thr Glu Glu Thr
1 5 10

30

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

<400> 42

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Asn Thr Gln Glu Thr
1 5 10

35

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 43

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Thr Gln Gly Ala Thr
1 5 10

5 <210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> mutantes

<400> 44

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Thr Glu Ser Ser Thr
1 5 10

15 <210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 45

20 **Ser Gln Ser Thr Pro Thr Pro Asn Arg Glu Glu Thr**
1 5 10

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> mutantes

<400> 46

Ser Gln Ser Thr Pro Thr Pro Asn Gln Glu Glu Thr
1 5 10

30 <210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

35 <400> 47

Ser Glu Ser Thr Pro Thr Pro Thr Ser Ser Ser Thr
1 5 10

40 <210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 49

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

<400> 49

10 **Ser Trp Leu Glu Pro Thr Gln Gly Leu Arg Ser**
1 5 10

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> mutantes

<400> 50

Ser Trp Leu Glu Pro Thr Gln Gly Ala Thr Ser
1 5 10

<210> 51

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

25 <400> 51

Ser Ser Gln Thr Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

<400> 52

Ser Trp Leu Glu Pro Thr Ser Ser Leu Ser Ser
1 5 10

35 <210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 53

Ser Met Val Thr Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser
1 5 10

5 <210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe
1 5 10

10 <210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> mutantes

<400> 55

Glu Asp Gly Ser Pro Thr Thr Gly Gln Ile Phe
1 5 10

20 <210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

25 <400> 56

Glu Asp Gly Ser Pro Asn Thr Gly Gln Ile Phe
1 5 10

30 <210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 57

Glu Asp Gly Ser Pro Thr Gln Gly Gln Ile Phe
1 5 10

35 <210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 58
Glu Asp Gly Ser Pro Thr Val Gly Gln Ile Phe
1 5 10

5 <210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> mutantes

<400> 59
Glu Asp Gly Ser Pro Thr Thr Thr Gln Ile Phe
1 5 10

15 <210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 60
Glu Asp Gly Ser Pro Thr Ser Ser Gln Ile Phe
1 5 10

20 <210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> mutantes

<400> 61
Glu Asp Gly Ser Pro Thr Thr Gln Gly Ile Phe
1 5 10

30 <210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

35 <400> 62
Glu Asp Gly Ser Pro Gln Thr Gly Gln Ile Phe
1 5 10

40 <210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

z00> 63

Glu Asp Gly Thr Pro Asn Thr Gly Gln Ile Phe
1 5 10

5 <210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 64

Glu Asp Gln Thr Pro Asn Thr Gly Gln Ile Phe
1 5 10

15 <210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
1 5

20 <210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

25 <400> 66
Gly Gln Ile Phe Asn Gln Thr Tyr Ser
1 5

30 <210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mutantes

<400> 67

Gly Gln Ile Phe Asn Ile Thr Tyr Ser
1 5

35 <210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> mutantes

<400> 68

Gly Gln Ile Phe Pro Gln Thr Ser Ser
1 5

<210> 69

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

<400> 69

Gly Gln Ile Phe Pro Thr Thr Thr Ser
1 5

10

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> mutantes

<400> 70

Gly Gln Ile Thr Pro Gln Thr Tyr Ser
1 5

20

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

25

<400> 71

Gly Gln Ile Phe Thr Gln Thr Tyr Ser
1 5

30

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

<400> 72

Gly Gln Ile Ser Thr Gln Thr Tyr Ser
1 5

35

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> mutantes

<400> 73

Gly Gln Ile Pro Thr Thr Thr Tyr Ser
1 5

<210> 74

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
1 5

<210> 75

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

15 <400> 75

Val Glu Gly Ser Cys Gly Pro Thr Thr Thr Pro
1 5 10

<210> 76

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

<400> 76

Val Glu Gly Ser Cys Gly Pro Thr Ser Ser Pro
1 5 10

25 <210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> mutantes

<400> 77

Val Glu Gly Ser Cys Gly Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro
1 5 10

<210> 78

<211> 11

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

<400> 78

Val Glu Gly Ser Cys Gly Pro Thr Thr Ile Pro
1 5 10

<210> 79

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> mutantes

<400> 79

Val Glu Gly Ser Cys Gly Pro Met Val Thr Pro
1 5 10

10

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una hormona del crecimiento humana mutante, en el que la hormona del crecimiento humana mutante comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente, en el que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en el que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15.
2. Un casete de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1.
3. Una célula que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1.
4. Una hormona del crecimiento humana mutante, que comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15.
5. La hormona del crecimiento humana mutante de la reivindicación 4, que comprende un polímero hidrosoluble unido a dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido por medio de un ligador de glicosilo, en el que dicho ligador de glicosilo es un ligador de glicosilo intacto.
6. La hormona del crecimiento humana mutante de la reivindicación 4 ó 5 para el uso como un medicamento.
7. Un método para producir una hormona del crecimiento humana mutante, que comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15, que comprende las etapas de:
 - (a) producir de manera recombinante la hormona del crecimiento humana mutante; y
 - (b) glicosilar la hormona del crecimiento humana mutante en el sitio de glicosilación recién introducido.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la hormona del crecimiento humana mutante comprende más de un sitio de glicosilación recién introducido.
9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una hormona del crecimiento humana mutante según la reivindicación 4 ó 5.
10. El uso de una hormona del crecimiento humana mutante, en el que la hormona del crecimiento humana mutante comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una deficiencia de la hormona del crecimiento humana en un paciente, en el que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en el que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15.
11. Un método para producir un glicoconjugado de una hormona del crecimiento humana mutante, que comprende un sitio de glicosilación con unión en O recién introducido que no existe en la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente, en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está en un residuo de treonina, y en la que dicho sitio de glicosilación con unión en O recién introducido está localizado en una región de la hormona del crecimiento mutante que corresponde a SEQ ID N°s: 10, 13, 14 ó 15, que comprende las etapas de:
 - (a) producir de manera recombinante la hormona del crecimiento humana mutante, y
 - (b) glicosilar enzimáticamente la hormona del crecimiento humana mutante con un carbohidrato modificado en el sitio de glicosilación recién introducido.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el carbohidrato modificado se modifica con un miembro seleccionado de poli(etilen glicol) y m-poli(etilen glicol).
13. El ácido nucleico de la reivindicación 1, la hormona del crecimiento mutante de la reivindicación 4 ó 5, el método de la reivindicación 7 ó 8, la composición de la reivindicación 9, el uso de la reivindicación 10, o el método de la

reivindicación 11 ó 12, en los que la hormona del crecimiento humana de tipo natural correspondiente tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 o SEQ ID N°: 2.

5 14. El ácido nucleico de la reivindicación 1, la hormona del crecimiento mutante de la reivindicación 4 ó 5, el método de la reivindicación 7 ó 8, la composición de la reivindicación 9, el uso de la reivindicación 10 o el método de la reivindicación 11 ó 12, en los que el sitio de glicosilación recién introducido está cerca de un residuo de prolina.

15. El ácido nucleico de la reivindicación 1, la hormona del crecimiento mutante de la reivindicación 4 ó 5, el método de la reivindicación 7 ó 8, la composición de la reivindicación 9, el uso de la reivindicación 10 o el método de la reivindicación 11 ó 12, en los que el sitio de glicosilación recién introducido está cerca de un residuo de prolina que está localizado en la posición 2, 5, 133 ó 140 de SEQ ID N°: 1 o SEQ ID NO:2.

10 16. El ácido nucleico de la reivindicación 1, la hormona del crecimiento mutante de la reivindicación 4 ó 5, el método de la reivindicación 7 ó 8, la composición de la reivindicación 9, el uso de la reivindicación 10, o el método de la reivindicación 11 ó 12, en los que la hormona del crecimiento humana mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

15 17. El ácido nucleico de la reivindicación 1, la hormona del crecimiento mutante de la reivindicación 4 ó 5, la composición de la reivindicación 9, el uso de la reivindicación 10 o el método de la reivindicación 11 ó 12, en los que la hormona del crecimiento humana mutante comprende más de un sitio de glicosilación recién introducido.

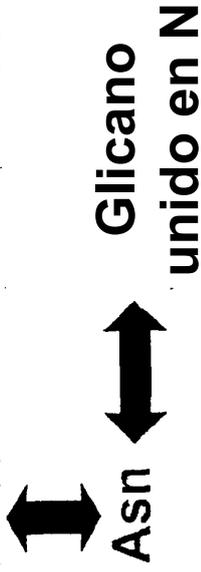
18. Un péptido de hGH codificado por el ácido nucleico de la reivindicación 1.

19. La hormona del crecimiento humana mutante de la reivindicación 4 ó 5 para el uso en el tratamiento de una deficiencia de la hormona del crecimiento humana en un paciente.

20

GH-N (hipótesis)

fpti plsrifdnam lrahrhqla fdtyqefeea yipkeqkysf lqnpqtslcf sesiptpsnr
eetqaksnle llrisllliq swlepqvflr svfanslvvg asdsnvvdll kdleeqiqtI mgrledgspr
tgqifkqtys kfdtnshndd allknygllly cfrkdmkve tflrivqcrs vegscgf



GH-V (placenta)

fpti plsrifdnam lrarriyqla ydtyqefeea yilkeqkysf lqnpqtslcf sesiptpsnr
vktqaksnle llrisllliq swlepqvflr svfanslvvg asdsnvyrhl kdleeqiqtI mwrledgspr
tgqifnqsys kfdtkshndd allknygllly cfrkdmkve tflrivqcrs vegscgf



Fig. 1



Fig. 2

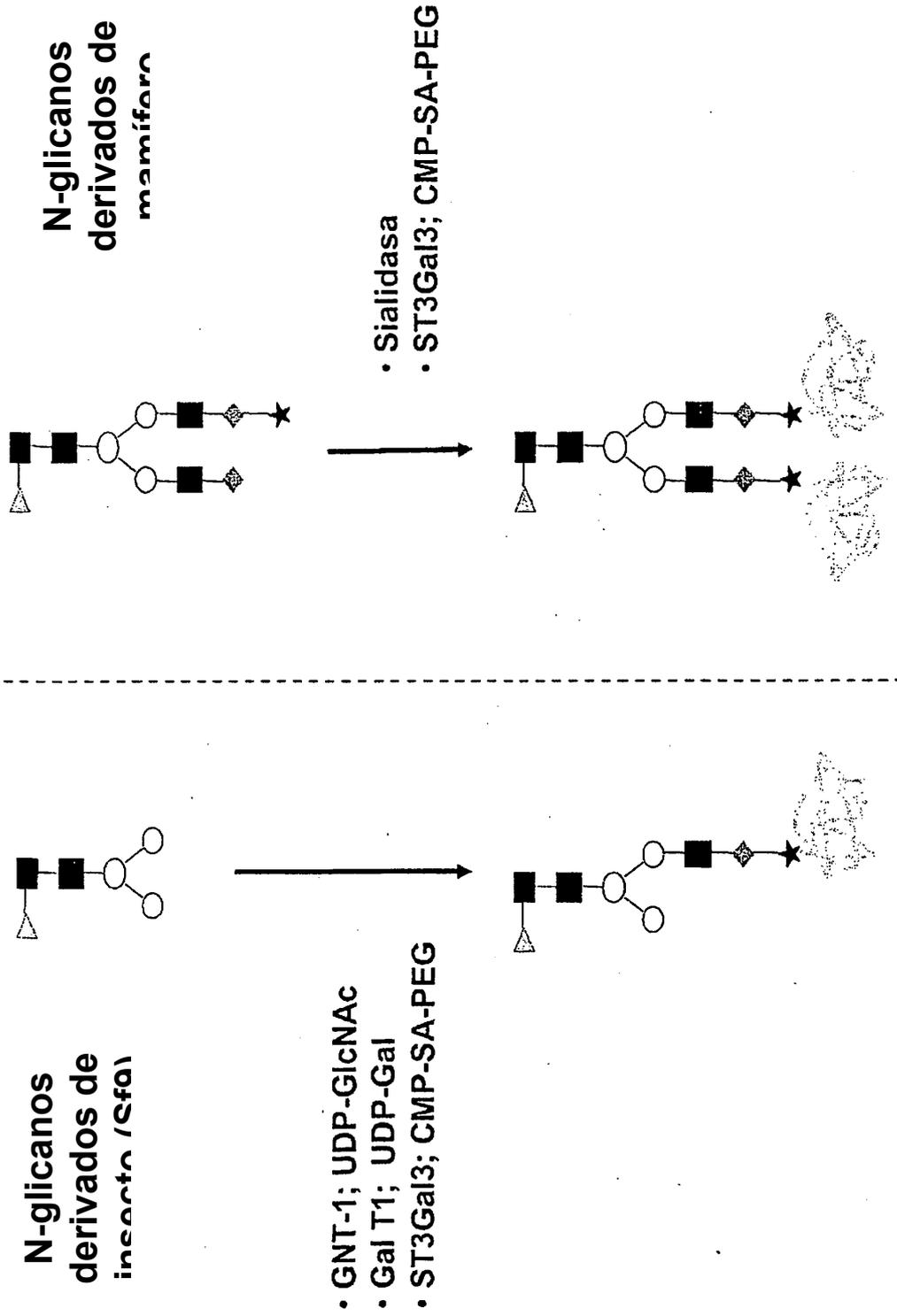


Fig. 3

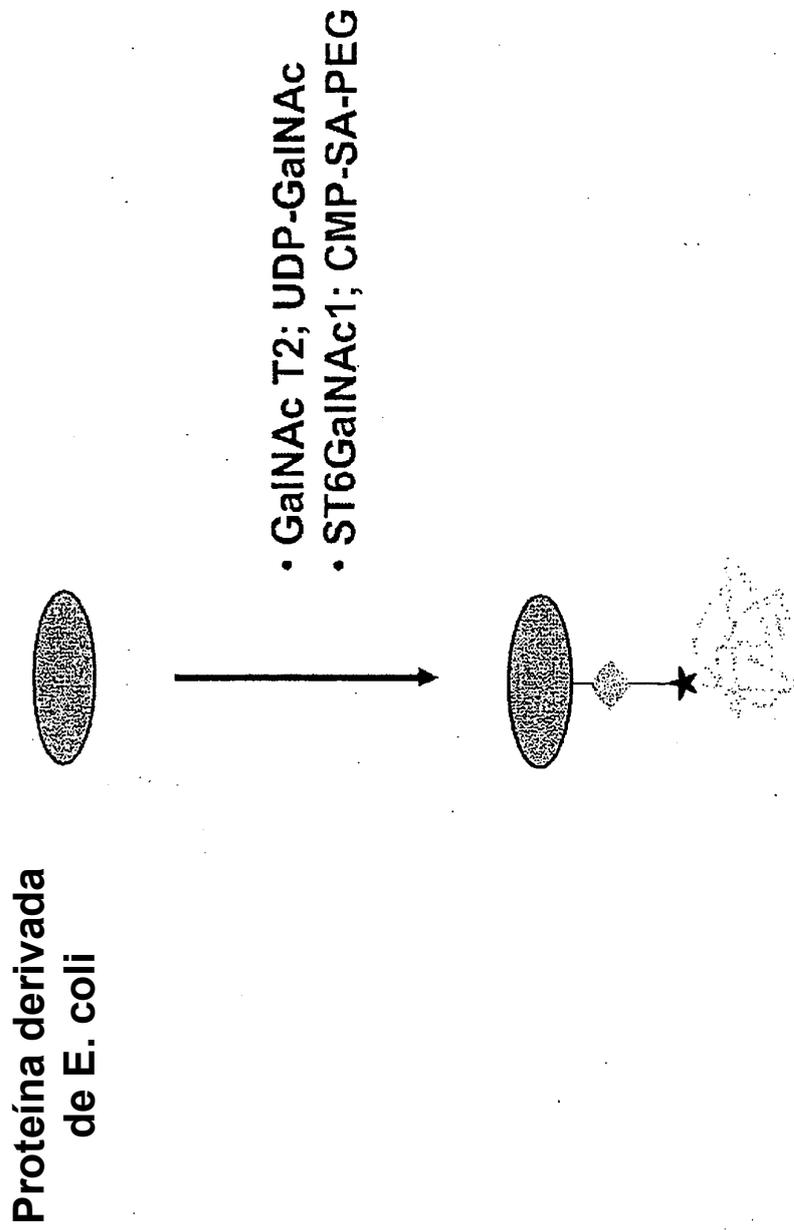


Fig. 4

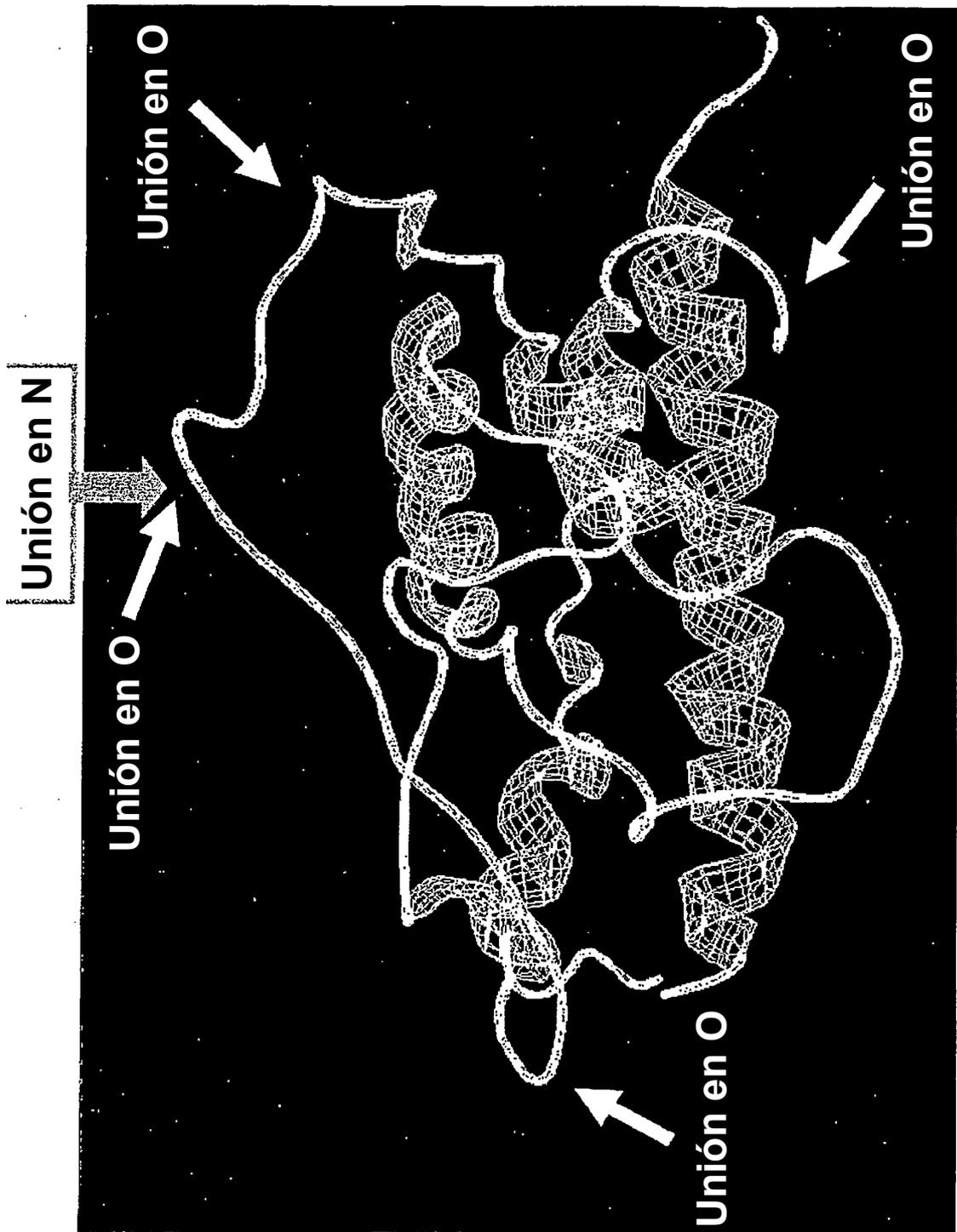


Fig. 5

GH-N (Glicosilación en

→ **ptt** f **pttp** |srifdnam lrahrlhqla fdtyqefeea yipkeqkysf lqn **ptts** |lcf sesij **ptp** **ttt** →
 →

eetqqksnle llrisllliq swlepvaqlr svfanslvyg asdsnvydll kdleegiqlt mgrledgs

ptt |qifk **ttts** |kfdtnshnodd allknygllly cfrkdmkve tflrivqcrs vegscgf

Fig. 6

GH-N (Hipótesis)

fpti plsrifdnam lrahrlhqla fdtyqefeea yipkeqkysf lqnqatslcf sesiptpsnr
 eetqqksnle llrisllliq swlepvaqlr svfanslvyg asdsnvydll kdleegiqlt mgrledgspr
 tgqifkqtys kfdtnshnodd allknygllly cfrkdmkve tflrivqcrs vegscgf

hGH 134 con unión en O (1) ---FPTIPLSRFLDNAMLRARHLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQN 50
hHG 5' con unión en O (1) PTTFPTIPLSRFLDNAMLRARHLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQN
hGH-N1 madura (1) ---FPTIPLSRFLDNAMLRARHLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQN
Consenso (1) FPTIPLSRFLDNAMLRARHLHQLAFDTYQEFEEAYIP KEQKYSFLQN 100
51
hGH 134 con unión en O (48) PQTSLCFSESIPTPSNREETQOKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF
hHG 5' con unión en O (51) PQTSLCFSESIPTPSNREETQOKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF
hGH-N1 madura (48) PQTSLCFSESIPTPSNREETQOKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF
Consenso (51) PQTSLCFSESIPTPSNREETQOKSNLELLRISLLLIQSWL EPVQFLRSVF 150
101
hGH 134 con unión en O (98) ANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEGGIQTLMGRLEDGSP TTTQIFKQTYSKFD
hHG 5' con unión en O (101) ANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEGGIQTLMGRLEDGSP RTGQIFKQTYSKFD
hGH-N1 madura (98) ANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEGGIQTLMGRLEDGSP RTGQIFKQTYSKFD
Consenso (101) ANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEGGIQTLMGRLEDGSPRTGQ IFKQTYSKFD 194
151
hGH 134 con unión en O (148) TNSHDDALLKNYGLLYCFRKMDKVE~~T~~FLRIVQCRSVEGSCGF
hHG 5' con unión en O (151) TNSHDDALLKNYGLLYCFRKMDKVE~~T~~FLRIVQCRSVEGSCGF
hGH-N1 madura (148) TNSHDDALLKNYGLLYCFRKMDKVE~~T~~FLRIVQCRSVEGSCGF
Consenso (151) TNSHDDALLKNYGLLYCFRKMDKVE~~T~~FLRIVQCRSVEG SCGF

Fig. 7

hGH 134 con unión en O (1) ---FPTIPLSR⁵⁰LFDNAMLR⁵⁰AHRLHQ⁵⁰LAFDTYQ⁵⁰EFEEAYI⁵⁰PKEQKYS⁵⁰FLQN

hHG 5' con unión en O (1) -⁵⁰MVT⁵⁰P⁵⁰T⁵⁰I⁵⁰P⁵⁰L⁵⁰S⁵⁰R⁵⁰L⁵⁰F⁵⁰D⁵⁰N⁵⁰A⁵⁰M⁵⁰L⁵⁰R⁵⁰A⁵⁰H⁵⁰R⁵⁰L⁵⁰H⁵⁰Q⁵⁰LA⁵⁰F⁵⁰D⁵⁰T⁵⁰Y⁵⁰Q⁵⁰E⁵⁰F⁵⁰E⁵⁰E⁵⁰A⁵⁰Y⁵⁰I⁵⁰P⁵⁰K⁵⁰E⁵⁰Q⁵⁰K⁵⁰Y⁵⁰S⁵⁰FLQN

hGH-N1 madura (1) ---FPTIPLSR⁵⁰LFDNAMLR⁵⁰AHRLHQ⁵⁰LAFDTYQ⁵⁰EFEEAYI⁵⁰PKEQKYS⁵⁰FLQN

Consenso (1) FPTIPLSR⁵⁰LFDNAMLR⁵⁰AHRLHQ⁵⁰LAFDTYQ⁵⁰EFEEAYI⁵⁰PKEQKYS⁵⁰FLQN

51 100

hGH 134 con unión en O (48) PQTSLCFSESIPTPSNRREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF

hHG 5' con unión en O (51) PQTSLCFSESIPTPSNRREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF

hGH-N1 madura (48) PQTSLCFSESIPTPSNRREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF

Consenso (51) PQTSLCFSESIPTPSNRREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF

101 150

hGH 134 con unión en O (98) ANSLVYGASDSNVYDLLKDL¹⁰¹EEGIQ¹⁰¹TLMGRLEDGSP¹⁰¹ITGQ¹⁰¹IFKQTYSKFD

hHG 5' con unión en O (101) ANSLVYGASDSNVYDLLKDL¹⁰¹EEGIQ¹⁰¹TLMGRLEDGSP¹⁰¹RTGQ¹⁰¹IFKQTYSKFD

hGH-N1 madura (98) ANSLVYGASDSNVYDLLKDL¹⁰¹EEGIQ¹⁰¹TLMGRLEDGSP¹⁰¹RTGQ¹⁰¹IFKQTYSKFD

Consenso (101) ANSLVYGASDSNVYDLLKDL¹⁰¹EEGIQ¹⁰¹TLMGRLEDGSP¹⁰¹RTGQ¹⁰¹IFKQTYSKFD

151 194

hGH 134 con unión en O (148) TNSHNDALLK¹⁵¹NYGLLYC¹⁵¹FRK¹⁵¹DM¹⁵¹KVET¹⁵¹FLR¹⁵¹IVQCRSVEGSCGF

hHG 5' con unión en O (151) TNSHNDALLK¹⁵¹NYGLLYC¹⁵¹FRK¹⁵¹DM¹⁵¹KVET¹⁵¹FLR¹⁵¹IVQCRSVEGSCGF

hGH-N1 madura (148) TNSHNDALLK¹⁵¹NYGLLYC¹⁵¹FRK¹⁵¹DM¹⁵¹KVET¹⁵¹FLR¹⁵¹IVQCRSVEGSCGF

Consenso (151) TNSHNDALLK¹⁵¹NYGLLYC¹⁵¹FRK¹⁵¹DM¹⁵¹KVET¹⁵¹FLR¹⁵¹IVQCRSVEGSCGF

Fig 8

9

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSE
SIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDL
LKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRK
DMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

FIG. 9A

FPTIPLSRLFDNAMLRRARLYQLAYDITYQEFEEAYILKEQKYSFLQNPQTSLCFSE
SIPTPSNRVKTQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQLLRSVFANSLVYGASDSNVYR
HLKDLEEGIQTLMWRELEDGSPRTGQIFNQSYSKFDTKSHNDDALLKNYGLLYCF
RKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

FIG. 9B

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSE
SIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDL
LKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTTQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRK
DMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

FIG. 9C

PTTFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLC
FSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNV
YDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLY
CFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

FIG. 9D

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSE
SIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDL
LKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRK
DMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

FIG. 9E

MVTPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDQYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCF
SESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVY
DLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCF
RKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

FIG. 9F

MVTPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDQYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCF
SESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVY
DLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCF
RKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

FIG. 9G

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDQYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFS
ESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYD
LLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPVTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFR
KDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

FIG. 9H

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDQYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFS
ESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYD
LLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPTTTQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFR
KDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

FIG. 9I