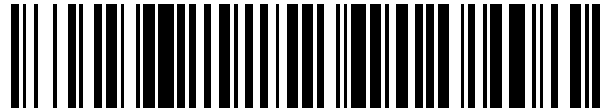


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 581**

51 Int. Cl.:

C07K 5/02 (2006.01)
C07C 237/12 (2006.01)
C07C 271/22 (2006.01)
C07C 323/59 (2006.01)
C07H 19/20 (2006.01)
C07K 1/13 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2004 E 04757475 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 1608688**

54 Título: **Polímeros solubles en agua ramificados y sus conjugados**

30 Prioridad:

14.03.2003 US 454993 P
29.05.2003 US 474094 P
07.10.2003 US 509752 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.08.2013

73 Titular/es:

BIOGENERIX GMBH (100.0%)
Graf-Arco-Str. 3
89079 Ulm, DE

72 Inventor/es:

DEFREES, SHAWN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 420 581 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

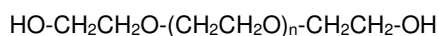
Polímeros solubles en agua ramificados y sus conjugados

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a polímeros solubles en agua ramificados y a conjugados formados a partir de estos polímeros ramificados.

Introducción

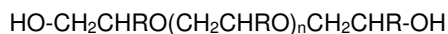
- 10 La conjugación de los polímeros hidrófilos, tales como poli(etilenglicol), abreviado PEG, también conocido como poli(óxido de etileno), abreviado PBO, a moléculas y superficies resulta de utilidad considerable en biotecnología y medicina. En su forma más común, el PEG es un polímero lineal con terminación, en cada extremo, de grupos hidroxilo:



- 15 en la que n varía normalmente desde aproximadamente 3 a aproximadamente 4000. Se conocen muchos derivados con funcionalidad terminal en la bibliografía y se encuentran disponibles en el mercado. Véase, por ejemplo, Shearwater Polymers, Inc. Catalog "Polyethylene Glycol Derivatives".

Las especies de PEG con un grupo diferente en cada uno de los dos extremos son compuestos particularmente útiles. Por ejemplo, los PEG heterobifuncionales se usan como agentes reticulantes. Además, las moléculas de PEG que están "protegidas" en un extremo, por ejemplo, un grupo alquilo, tal como metoxi, permiten que el extremo hidroxilo de la molécula se convierta en cualquiera de un gran número de grupos funcionales orgánicos reactivos.

- 20 Los copolímeros aleatorios o de bloque de óxido de etileno y de óxido de propileno, mostrados a continuación, se encuentran estrechamente relacionados con el PEG y su química, y pueden sustituirse por PEG en muchas de sus aplicaciones.



en la que cada R es independientemente H o CH₃.

- 25 Se ha demostrado que la formación de conjugados entre especies terapéuticamente activas y polímeros solubles en agua es una estrategia productiva para mejorar los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los agentes terapéuticos. Véase, por ejemplo, Dunn y Ottengrite, "Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems": ACS Symposium Series 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Por ejemplo, se ha demostrado el uso de PEG para derivatizar sustancias terapéuticas peptídicas con el fin de reducir la inmunogenicidad de los péptidos y prolongar el tiempo de eliminación de la circulación. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.179.337 (Davis et al.) se refiere a péptidos no inmunogénicos, tales como enzimas y hormonas peptídicas acopladas a polietilenglicol (PEG) o a polipropilenglicol. Se usan entre 10 y 100 moles de polímero por mol de péptido y se mantiene al menos el 15 % de la actividad fisiológica.

- 35 En la técnica se conocen otros muchos ejemplos de conjugados de PEG-péptido. El modo principal de unión del PEG, y sus derivados, a péptidos es un enlace no específico a través de un resto de aminoácido peptídico. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.088.538 desvela un conjugado de polímero-enzima enzimáticamente activo de una enzima unida covalentemente a PEG. De manera similar, la patente de Estados Unidos N° 4.496.689 desvela un complejo de un inhibidor de α -1 proteasa unido covalentemente con un polímero tal como PEG o metoxipoli(etilenglicol) ("mPEG"). Abuchowski y col., (J. Biol. Chem. 252:3578 (1977) desvela la unión covalente de mPEG a un grupo amina de albúmina de suero bovino. El documento WO 93/15189 (Veronese et al.) se refiere a un procedimiento para mantener la actividad de enzimas proteolíticas modificadas con polietilenglicol mediante el engarce de la enzima proteolítica a un inhibidor que cuenta con una macromolécula. Los conjugados se destinan a aplicaciones médicas. La patente de Estados Unidos N° 4.414.147 desvela un procedimiento que produce un interferón menos hidrófobo por conjugación del mismo con un anhídrido de un ácido dicarboxílico, tal como poli(anhídrido etilen succínico). El documento PCT WO 87/00056 desvela la conjugación de PEG y polioles poli(oxietilados) con proteínas tales como interferón- β , interleucina-2 e inmunotoxinas. El documento EP 154.316 desvela y reivindica linfocinas modificadas químicamente, tales como IL-2 que contienen PEG unido directamente a al menos un grupo amino primario de la linfocina. La patente de Estados Unidos N° 4.055.635 desvela composiciones farmacéuticas de un complejo soluble en agua de una enzima proteolítica unida covalentemente a una sustancia polimérica tal como un polisacárido.

Otro modo de unir PEG a péptidos es mediante la oxidación no específica de restos glucosilo en un péptido. Se utiliza el azúcar oxidado en forma de locus para unir un resto de PEG a una glucoproteína. Por ejemplo, M'Timkulu (documento 94/05332) desvela el uso de hidrazin- o amino-PEG para añadir PEG a una glucoproteína. Los restos

glucosilo se oxidan de forma aleatoria a los correspondientes aldehídos, que posteriormente se acoplan al amino-PEG.

5 En cada uno de los procedimientos descritos anteriormente, se añade poli(etilenglicol) de manera aleatoria, no específica a restos reactivos en una cadena principal peptídica. Frecuentemente, la derivatización con PEG produce una pérdida de actividad peptídica que puede atribuirse directamente a la naturaleza no selectiva de las químicas utilizadas para conjugar el polímero soluble en agua.

10 Otra dificultad asociada con la formación de conjugados entre polímeros solubles en agua y biomoléculas es la capacidad del reactivo polimérico soluble en agua para marcar la biomolécula en más de un sitio. Aunque con frecuencia es deseable incluir más de un resto polimérico soluble en agua por conjugado, con frecuencia el grado de disminución de la actividad de la biomolécula es proporcional al número de restos poliméricos unidos a la biomolécula. Por consiguiente, existe interés para obtener especies ramificadas, reactivas que incluyan dos o más restos poliméricos solubles en agua por molécula. A través del uso de moléculas ramificadas, puede conjugar más de un polímero soluble en agua con una biomolécula sin necesidad de interferir con más de un sitio en la biomolécula.

15 Los polímeros ramificados basados en poli(etilenglicol) son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Greenwald y col., (documento 98/41562) desvelan un PEG ramificado que está basado en un núcleo de 1,3-diamino-2-propanol. Morpurgo y colaboradores discuten el uso de PEG ramificado basado en un núcleo de lisina en Appl. Biotechnol. 56: 59-72 (1996). Guiotto y col., Bioorg. Med. Chem., Lett 12: 177-180 (2002) prepararon un PEG ramificado basado en lisina. Harris y col., (patente de Estados Unidos Nº 5.932.462) también prepararon un PEG ramificado que estaba
20 basado en lisina. Martínez y col. (documento de patente de Estados Unidos Nº 5.643.575) describen varias especies de PEG ramificado basadas en diversas estructuras núcleo y la conjugación de estas especies con un material biológicamente activo (patente de Estados Unidos Nº 6.113.906).

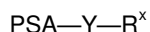
25 Se sabe que existen polímeros, tales como poli(etilenglicol), en forma de poblaciones heterodispersas, que incluyen una serie de longitudes de cadena polimérica y pesos moleculares. Cuando se preparan formulaciones terapéuticas, resulta claramente deseable utilizar polímeros con heterodispersidad mínima con el fin de garantizar la coherencia y la reproducibilidad entre las preparaciones. En la técnica se conocen pocos procedimientos de preparación de muestras de PEG mono-disperso. Loiseau y col., han publicado una síntesis de moléculas de PEG bien definidas. El procedimiento utiliza una estrategia de protección/desprotección que es menos que óptima para la preparación de grandes cantidades de PEG sustancialmente mono-dispersos. Por tanto, además de los polímeros de
30 poli(etilenglicol) ramificados, sería muy deseable un procedimiento para la preparación de PEG mono-disperso y la incorporación de material mono-disperso en los polímeros ramificados.

35 La presente invención responde a la necesidad de polímeros solubles en agua, ramificados, abriendo una vía a nuevos conjugados terapéuticos, por ejemplo conjugados peptídicos y abordando la necesidad de especies terapéuticas más estables y terapéuticamente eficaces. Todavía existe la necesidad de un procedimiento práctico, desde el punto de vista industrial, para la modificación de biomoléculas terapéuticas con grupos de modificación tales como polímeros solubles en agua. De particular interés son los procedimientos en los cuales el conjugado presenta propiedades mejoradas con respecto al agente terapéutico no modificado.

Breve resumen de la invención

40 El alcance de la presente invención viene definido por las reivindicaciones adjuntas. También se desvelan polímeros solubles en agua, ramificados que se basan en núcleos de diversa estructura. Los polímeros ramificados proporcionan un medio para unir dos o más restos poliméricos solubles en agua a otras especies a través de un solo locus de unión. El enfoque sobre PEG como un polímero soluble en agua representativo es por motivos de claridad de ilustración, y no debería interpretarse como limitante de la invención. Los expertos apreciarán que es posible preparar las especies ramificadas descritas en la en el presente documento esencialmente con cualquier polímero
45 soluble en agua. Además del PEG, otro polímero soluble en agua a modo de ejemplo incluye poli(propilenglicol).

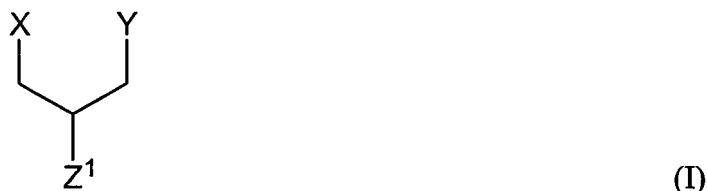
Se desvela un polímero soluble en agua ramificado que tiene la fórmula:



50 en la que PSA es un polímero soluble en agua. El símbolo Y representa un engarce, por ejemplo, un enlace, o un resto que comprende una amida, un éster de ácido carboxílico, uretano, mercaptano, alquilo sustituido o no sustituido y similares. Los engarces a modo de ejemplo incluyen: un enlace, $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_n\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_n\text{O}(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{CH}_2)_n$ y $(\text{CH}_2)_m\text{S}(\text{CH}_2)_n$ en las que m y n son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 6. R^x es un polímero soluble en agua, un resto alquilo sustituido o no sustituido engarzado a un polímero soluble en agua; un aminoácido o un dímero de un aminoácido engarzado a un polímero soluble en agua; o un azúcar o un nucleótido de azúcar engarzado a un
55 polímero soluble en agua. El PSA y el componente polimérico soluble en agua de R^x pueden ser el mismo polímero soluble en agua o polímeros solubles en agua diferentes.

Los polímeros solubles en agua a modo de ejemplo para su uso en los compuestos de la invención incluyen m-PEG, PEG, m-PPG, PPG, poli(ácido siálico), poliglutamato, poliaspartato, polilisina, polietilenimina, polímeros biodegradables (por ejemplo, poli-lactida, poliglicérido) y PEG funcionalizado, por ejemplo PEG funcionalizado en posición terminal.

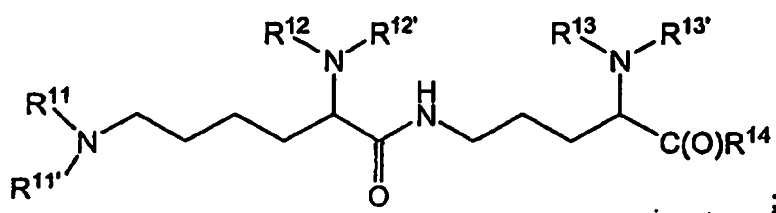
- 5 En una realización a modo de ejemplo, Y es un alquilo sustituido y la invención proporciona un polímero soluble en agua ramificado que tiene la fórmula:



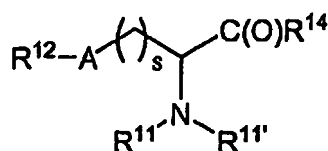
10 en la que X e Y son miembros seleccionados independientemente entre OR^1 , NR^2R^3 , SR^4 , $COOR^5$, $CONR^6R^7$, $OCOR^6R^7$, alquilo sustituido o no sustituido, y arilo sustituido o no sustituido. Z^1 es un miembro seleccionado entre OR^1 , NR^2R^3 , SR^4 , $COOR^5$, $CONR^6R^7$, alquilo sustituido o no sustituido, y arilo sustituido o no sustituido. Los símbolos R^1 , R^4 y R^5 representan un polímero soluble en agua. R^2 , R^3 , R^6 y R^7 son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un grupo funcional reactivo y un polímero soluble en agua con la condición de que estos grupos estén seleccionados de manera que el compuesto de acuerdo con la Fórmula I incluya al menos dos restos poliméricos solubles en agua. Los símbolos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y R^7 representan grupos que están seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un grupo funcional reactivo, una molécula portadora y un polímero soluble en agua.

20 En otra realización a modo de ejemplo, Z^1 comprende un resto sacarilo. El resto sacarilo puede ser un resto sacarilo activado, por ejemplo, un azúcar de nucleótido. Aún más, Z^1 puede comprender un resto sacarilo que se encuentra unido directamente a un aminoácido de un péptido, o que se encuentra unido indirectamente a un aminoácido de un péptido mediante su conjugación a un resto glucosilo unido al aminoácido.

25 También se desvela un polímero ramificado que está basado en un aminoácido o un oligo-aminoácido (por ejemplo, di-, tri-, tetra-péptido). Los polímeros ramificados basados en amino-ácidos a modo de ejemplo tienen la fórmula seleccionada entre:



y



30 en la que R^{11} , $R^{11'}$, R^{12} , $R^{12'}$, R^{13} y $R^{13'}$ están seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido y polímeros solubles en agua, con la condición de que los grupos estén seleccionados de manera que el compuesto explicado anteriormente incluya al menos dos restos poliméricos solubles en agua. R^{14} es un miembro seleccionado entre OH, grupos funcionales reactivos, un grupo que comprende un resto sacárido o un grupo que se encuentra engarzado a una molécula portadora. A es un miembro seleccionado entre NH, O y S. El índice "s" representa un número entero de 1 a 5.

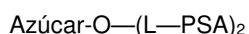
35 Cada uno de los compuestos explicados en la fórmula anterior se usa para el procedimiento de PEGilación química de otras especies (por ejemplo, ácido nucleico, péptido, sacarido, etc.). De manera general, los procedimientos de formación de conjugados entre PEG (y especies que contienen PEG) resultan conocidos en la técnica. Véase, por

ejemplo, Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney y col., MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C. 1982.

5 En otra realización a modo de ejemplo, R¹⁴ comprende un resto sacarilo. El resto sacarilo puede ser un resto sacarilo activado, por ejemplo, un azúcar de nucleótido. Aún más, R¹⁴ puede comprender un resto sacarilo que se encuentra directamente unido a un aminoácido de un péptido, o indirectamente unido a un aminoácido de un péptido mediante su conjugación a un resto glucosilo unido al aminoácido.

10 También se desvela un polímero soluble en agua ramificado que está basado en un núcleo de sacárido ("núcleo de ramificación"). Los expertos en la materia apreciarán que el núcleo de sacárido puede ser de cualquier estructura. Los sacáridos a modo de ejemplo para su uso incluyen GlcNAc, Gal, Sia, Fuc, Glc, GalNAc, GalNH₂ y similares.

Un compuesto a modo de ejemplo tiene la fórmula:

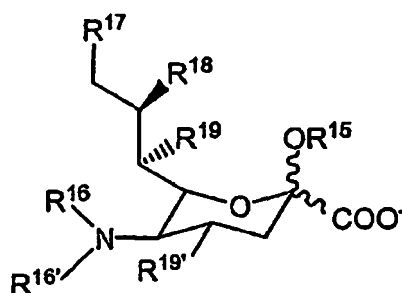


en la que L es un engarce y PSA es un polímero soluble en agua.

En otra realización a modo de ejemplo, el polímero soluble en agua ramificado basado en sacárido tiene la fórmula:

15 Nucleótido-Azúcar-O-(L-PSA)₂

Otro compuesto a modo de ejemplo, que está basado en un núcleo de ácido siálico tiene la fórmula:



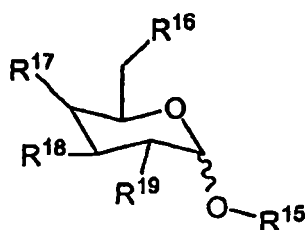
en la que R¹⁶ y R^{16'} son miembros seleccionados entre H, acetilo, y:



20 y R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹ y R^{19'} son miembros seleccionados independientemente entre H, OH, NH₂, NHAc y el resto de acuerdo con la Fórmula I. En la Fórmula I, Z² es un miembro seleccionado entre O, S, CH₂ y S. R¹¹ es como se ha descrito anteriormente, y el índice "a" representa un número entero entre 0 y 20, con la condición de que al menos dos de R¹⁶, R^{16'}, R¹⁷, R¹⁸ y R¹⁹ presenten una estructura de acuerdo con la Fórmula I. R¹¹ también puede ser un grupo engarzado a una molécula portadora o un enlace a una molécula portadora. R¹⁵ es un miembro seleccionado entre H y grupos activadores, por ejemplo, un fosfato de nucleótido.

25

En otro aspecto, el polímero ramificado está basado en galactosa o N-acetil galactosa y tiene la fórmula:

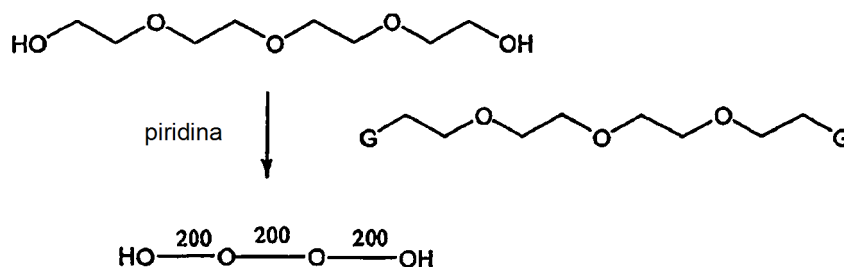


en la que R¹⁵-R¹⁹ son como se ha descrito anteriormente y al menos dos de R¹⁵-R¹⁹ son un resto de acuerdo con la Fórmula I.

Otras estructuras a modo de ejemplo derivadas de azúcar que tienen una fórmula tal como la anterior son polímeros solubles en agua ramificados basados en manosa y glucosa.

Aún más, R¹⁵ puede comprender un enlace a un aminoácido de un péptido o a un resto glucosilo que se encuentra directamente unido a un aminoácido o a un péptido, o indirectamente unido a un aminoácido de un péptido mediante su conjugación a un resto glucosilo unido al aminoácido.

También se desvela un procedimiento de preparación de una población esencialmente mono-dispersa de moléculas de poli(etilenglicol). El procedimiento incluye poner en contacto una molécula de PEG con un peso molecular bien definido, por ejemplo, PEG 200 con al menos dos equivalentes de un PEG activado bifuncional que también tiene un peso molecular bien definido, por ejemplo, PEG200, produciendo de este modo una muestra mono-dispersa de un PEG, por ejemplo, PEG600:

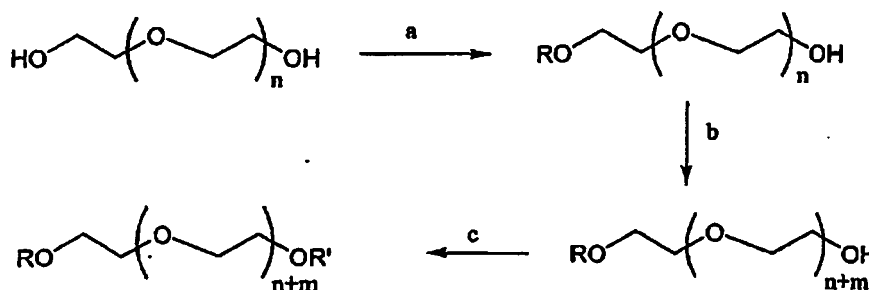


G es un grupo saliente, tal como un sulfonato o un éster de tresilato. Posteriormente, se puede poner en contacto la muestra mono-dispersa de PEG600 con el PEG200 activado bifuncional para formar un PBG100 mono-disperso. De manera alternativa, el PEG600 mono-disperso se puede convertir en el correspondiente derivado bifuncional y se hace reaccionar con al menos dos equivalentes de un di-hidroxi-PEG600 mono-disperso, produciendo un PEG 1800 mono-disperso. Se repite el procedimiento hasta que se obtiene un PEG mono-disperso del tamaño deseado. Se puede diseñar la síntesis de manera que las diferencias de peso molecular entre el material de partida y el producto permitan la separación de cualquier material sin reaccionar o parcialmente reaccionado mediante cromatografía de exclusión por tamaños.

Además, en respuesta a la necesidad de procedimientos mejorados de preparación de polímeros solubles en agua modificados, tal como poli(etilenglicol), se desvelan procedimientos para la activación química y el estiramiento de la cadena principal del polímero. Las moléculas de PEG mono-activadas se usan para conjugar PEG a una amplia variedad de especies, por ejemplo, restos de dirección, restos terapéuticos, fármacos anti-tumorales, citotoxinas, agentes radioactivos, aminoácidos, sacáridos y similares.

También se desvela un procedimiento para el ensamblado por etapas de polímeros activados solubles en agua, en particular poli(etilenglicol) y sus análogos estructurales. El procedimiento proporciona un acceso sencillo a moléculas de PEG mono- y bi-funcionalizadas.

También se desvela un procedimiento de preparación de un derivado de poli(etilenglicol). El procedimiento se muestra a continuación:



a. R-Y (ácido o base); b. Activación, por ejemplo, tosilación, halo-des-hidroxilación, por ejemplo, HX o SOX₂ y reacción con PEG_m; c. Activación (R'), por ejemplo, con p-nitro-fenilcloroformiato. en la que los índices m y n representan independientemente números enteros de 1 a 100.000.

En la etapa a. se pone en contacto el glicol de partida con un grupo activado (R-Y) que reacciona con un resto hidroxilo del glicol. De manera general, Y es un grupo saliente, que permite la colocación de R sobre uno de los restos hidroxilo de la molécula de PEG. En la etapa b, se activa el hidroxilo libre del aducto resultante mediante su conversión en un grupo tal como un éster de sulfonato. Se ponen en contacto las especies de PEG activado con otro resto de PEG del mismo grado de polimerización o diferente como el PEG de partida ("PEG_m"). Para permitir su

unión a otras especies, se activa opcionalmente RO-PEG_(n+m) en el resto hidroxilo libre.

Los compuestos de la invención se usan para formar conjugados poliméricos solubles en agua de un sustrato, tal como un agente terapéutico, por ejemplo, péptidos, lípidos, glucolípidos, a través de PEGilación química directa de uno o más restos reactivos disponibles en el agente terapéutico. Los compuestos de la invención también se incorporan fácilmente a los conjugados de azúcar activados que se pueden utilizar en la gluco-PEGilación con mediación enzimática de un sustrato, por ejemplo, un agente terapéutico.

La invención también proporciona formulaciones farmacéuticas de agentes terapéuticos sobre los que se conjugan uno o más polímeros solubles en agua ramificados de la invención. También se desvelan procedimientos para el tratamiento de enfermedades que se mejoran o se curan mediante la administración de un conjugado entre un agente terapéutico y un polímero soluble en agua ramificado de la invención.

Los aspectos adicionales, ventajas y objetos de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que se muestra a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Descripción detallada de la invención

15 Abreviaturas

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

Definiciones

20 A menos que se especifique lo contrario, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen, de manera general, el mismo significado que el que se entiende comúnmente por parte del experto en la materia a la cual pertenece la presente invención. De manera general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivos celulares, genética molecular, química orgánica, química de ácidos nucleicos e hibridación son los que resultan bien conocidos y se emplean de forma común en la técnica. Se usan técnicas convencionales para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. De manera general, las técnicas y procedimientos se realizan de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica y diferentes referencias generales (véase de forma general, Sambrook y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., que se proporcionan a lo largo del presente documento. La nomenclatura usada en el presente documento y en los procedimientos de laboratorio en química analítica y síntesis orgánica descritos anteriormente son los que resultan bien conocidos y se emplean de forma común en la técnica. Se usan técnicas convencionales, o sus modificaciones, para las síntesis químicas y los análisis químicos.

35 El término "glucoconjugación", como se usa en el presente documento, se refiere a conjugación con mediación enzimática de especies de azúcar modificadas hasta un resto de aminoácido o de glucosilo de un péptido. Un subgénero es la "gluco-PEG-ilación", en la que el grupo de modificación del azúcar modificado es poli(etilenglicol) y un derivado alquilo (por ejemplo, m-PEG) o uno de sus derivados reactivos (por ejemplo, H₂N-PEG, HOOC-PEG).

40 La expresión "ácido siálico" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia de ácido siálico es ácido N-acetil-neramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-dideoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico) (con frecuencia abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA). Un segundo miembro de la familia es ácido n-glicolilneuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetil de NeuAc se encuentra hidroxilado. Un tercer miembro de la familia de ácido siálico es ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori y col., J. Biol. Chem. 265:21811-21819 (1990)). También se incluyen ácidos siálicos con sustitución-9 tales como 9-O-acil C₁-C₆ Neu5Ac tal como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. A modo de revisión de la familia de ácido siálico, véase, por ejemplo, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, Nueva York (1992)). La síntesis y uso de compuestos de ácidos siálico en el procedimiento de sialilación se desvela en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.

50 "Péptido" se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen juntos a través de las uniones de amida, referidos de manera alternativa como polipéptido. De manera adicional, también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo, β-alanina, fenilglicina y homoarginina. También se pueden usar aminoácidos que no están codificados por genes en la presente invención. Además, también se pueden usar aminoácidos que han sido modificados para incluir grupos reactivos, sitios de glucosilación, polímeros, restos terapéuticos, biomoléculas y similares en la presente invención. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser el isómero D o el isómero L. De manera general, se prefiere el isómero L. Además, otras sustancias peptidomiméticas también resultan útiles en la presente invención. Como se usa en el presente documento,

"péptido" se refiere a péptidos tanto glucosilados como no glucosilados. También se incluyen péptidos que se encuentran glucosilados de forma incompleta por un sistema que expresa el péptido. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983).

- 5 La expresión "conjugado peptídico" se refiere a especies de la invención en las cuales se somete un péptido a glucosilación con un azúcar modificado como se explica en el presente documento. En un ejemplo representativo, el péptido es un péptido mutante que tiene un sitio de glucosilación con engarce-O no presente en el péptido natural.

La expresión "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como también a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar al de los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como también los aminoácidos que son posteriormente modificados, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que el aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que se encuentra unido a un hidrógeno, grupo carboxilo, grupo amino, un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos presentan grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales de péptidos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que el aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general del aminoácido, pero que funciona de manera similar al aminoácido de origen natural.

Como se usa en el presente documento, la expresión "azúcar modificado" se refiere a un carbohidrato natural o no natural, modificado con un polímero de la invención soluble en agua y modificado, que se puede añadir enzimáticamente sobre un aminoácido o un resto glucosilo de un péptido, lípido, glucolípido y similar. El azúcar modificado está seleccionado entre un número de sustratos enzimáticos que incluyen, aunque sin limitación, nucleótidos de azúcar (mono-, di- y tri-fosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glucosilo, mesilatos de glucosilo) y azúcares que ni están activados ni son nucleótidos. El "azúcar modificado" está funcionalizado de manera covalente con un "grupo de modificación" que es un polímero ramificado de la invención. El locus de funcionalización con el grupo de modificación está seleccionado de manera que no evite que el "azúcar modificado" se añada enzimáticamente al péptido u otro sustrato.

La expresión "soluble en agua" se refiere a restos que tienen cierto grado detectable de solubilidad en agua. Los procedimientos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua resultan bien conocidos en la técnica. Los polímeros solubles en agua a modo de ejemplo incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mixtas formadas por un aminoácido individual, por ejemplo, poli(lisina). Un polisacárido a modo de ejemplo es poli(ácido siálico). Un poli(éter) a modo de ejemplo es poli(etilenglicol), por ejemplo, m-PEG. La poli(etilen imina) es una poliamina a modo de ejemplo, y ácido poli(acrílico) es un poli(ácido carboxílico) representativo.

Los términos "poli(etilenglicol)", "PEG", "poli(propilenglicol)" y "PPG" se usan en sentido genérico y también engloban derivados de compuestos parentales, por ejemplo, especies mono-alquilo, por ejemplo, m-PEG, m-PPG, especies reactivas, N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenilcarbonato (p-NP), derivados de HOBt y aminas. También se incluyen en estos términos especies que incluyen dos o más modificaciones, por ejemplo, p-NP-PBG-OMe y similares.

La expresión "grupo de engarce de glucosilo" como se usa en el presente documento se refiere a un resto glucosilo al cual se une covalentemente un agente (por ejemplo, un polímero soluble en agua, un resto terapéutico, biomolécula). En los procedimientos desvelados en el presente documento, el "grupo de engarce de glucosilo" se une covalentemente a un péptido glucosilado o no glucosilado, engarzando de este modo el agente a un aminoácido y/o un resto glucosilo sobre el péptido. De manera general, "el grupo de engarce de glucosilo" procede de un "azúcar modificado" mediante la unión enzimática del "azúcar modificado" a un aminoácido y/o resto glucosilo del péptido. Un "grupo de engarce de glucosilo intacto" se refiere a un grupo de engarce que procede de un resto glucosilo en el que el monómero de sacárido individual que se engarza al conjugado no experimenta degradación, por ejemplo oxidación, por parte de metaperyodato de sodio. Los "grupos de engarce de glucosilo intactos" de la invención pueden proceder de un oligosacárido de origen natural mediante adición de una(s) unidad(es) de glucosilo o de la eliminación de una o más unidades de glucosilo de la estructura de sacáridos parental.

Como se usa en el presente documento, "vehículo aceptable farmacéuticamente" incluye cualquier material que, cuando se combina con el conjugado, retiene la actividad del conjugado y no se muestra como reactivo con los sistemas inmunológicos del sujeto. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, cualquier vehículo farmacéutico convencional tal como solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos que incluyen comprimidos revestidos y cápsulas. Normalmente, dichos vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, determinados tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sus sales, estearato de calcio o magnesio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles u otros excipientes conocidos. Dichos vehículos también pueden incluir aromas o aditivos de color u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante procedimientos convencionales bien conocidos.

Como se usa en el presente documento, "administrar" significa administración oral, administración en forma de supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, interaperitoneal, intramuscular, intralesional o sub-cutánea, administración por inhalación o implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una mini-bomba osmótica, al sujeto. La administración es por cualquier vía incluyendo parenteral o transmucosa (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica), en particular mediante inhalación. La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intradérmica, sub-cutánea, intraperitoneal, interventricular e intracraneal. Además, cuando la inyección es para tratar un tumor, por ejemplo, para inducir apoptosis, la administración puede ser directamente al tumor y/o los tejidos que rodean al tumor. Otros modos de administración incluyen, aunque sin limitación, el uso de formulaciones de liposomas, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

El término "aislado" se refiere a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes, que se usan para producir el material. Para los conjugados peptídicos de la invención, el término "aislado" se refiere al material que se encuentra sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan al material en la mezcla usada para prepara el conjugado peptídico. "Aislado" y "puro" se usan indistintamente. Normalmente, los conjugados peptídicos aislados de la invención presentan un nivel de pureza que preferentemente se expresa en forma de intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza para los conjugados peptídicos es de aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 % o aproximadamente el 80 %, y el extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 % o mayor de aproximadamente el 90 %.

Cuando los conjugados peptídicos tienen una pureza mayor de aproximadamente el 90 %, preferentemente sus purezas también vienen expresadas como intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza es de aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 96 % o aproximadamente el 98 %. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 96 % o aproximadamente el 100 % de pureza.

La pureza se determina por un procedimiento de análisis reconocido en la técnica (por ejemplo, intensidad de banda sobre plata teñida con un gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, HPLC, o medios similares).

"Esencialmente cada miembro de la población", como se usa en el presente documento, describe una característica de una población de conjugados peptídicos de la invención en la cual se añade un porcentaje seleccionado de azúcares modificados añadidos a un péptido sobre sitios de aceptor idénticos y múltiples del péptido.

"Esencialmente cada miembro de la población" versa sobre la "homogeneidad" de los sitios del péptido conjugado a un azúcar modificado y se refiere a los conjugados de la invención, que son al menos aproximadamente el 80 %, preferentemente al menos aproximadamente el 90 % y más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % homogéneos.


La "homogeneidad" se refiere a la consistencia estructural a través de una población de restos aceptores a los cuales se conjugan los azúcares modificados. De este modo, en un conjugado peptídico de la invención en el que cada resto de azúcar modificado se conjuga en un sitio de aceptor que tiene la misma estructura que el sitio de aceptor al cual se conjuga cualquier otro azúcar modificado, se dice que el conjugado peptídico es aproximadamente el 100 % homogéneo. Normalmente, la homogeneidad viene expresada en forma de intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad para los conjugados peptídicos es de aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 % o aproximadamente el 80 % y el extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 % o mayor de aproximadamente el 90 %.

Cuando los conjugados peptídicos son igual o más de aproximadamente el 90 % homogéneos, su homogeneidad también viene expresada preferentemente en forma de intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad es de aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 96 % o aproximadamente el 98 %. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 98 % o aproximadamente el 100 % de homogeneidad. Normalmente, la pureza de los conjugados peptídicos viene determinada por uno o más procedimientos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM), espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción mediante láser asistida por matriz (MALDITOF), electroforesis capilar y similares.

"Glucoforma sustancialmente uniforme" o "patrón de glucosilación sustancialmente uniforme", cuando se hace referencia a especies de gluco-péptido, se refiere al porcentaje de restos aceptores que son glucosilados por parte de la glucosiltransferasa de interés (por ejemplo, fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de una α 1,2 fucosiltransferasa, existe un patrón de fucosilación sustancialmente uniforme si todo (como se ha definido anteriormente) Gal β 1,4-Glc-Nac-R y sus análogos sialilados son fucosilados en el conjugado peptídico de la invención. El experto en la materia debe entender que el material de partida puede contener restos aceptores glucosilados (por ejemplo, restos fucosilados de Gal β 1,4-GlcNAc-R). De este modo, el porcentaje calculado de glucosilación incluirá restos aceptores que están glucosilados mediante los procedimientos desvelados en el presente documento, así como también los restos aceptores ya glucosilados del material de partida.

El término "sustancialmente" en las definiciones anteriores o "sustancialmente uniforme" generalmente significa que al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % e incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de los restos aceptores son glucosilados por la glucosiltransferasa particular.

- 5 Las expresiones "gran escala" y "escala industrial" se usan indistintamente y se refieren a un ciclo de reacción que produce al menos aproximadamente 250 mg, preferentemente al menos 500 mg y más preferentemente al menos aproximadamente 1 gramo de glucoconjugado en la finalización de un ciclo de reacción individual.

El símbolo , cuando se utiliza como un enlace o cuando se despliega perpendicular a un enlace indica el punto en el que el resto desplegado se encuentra unido al resto de la molécula, soporte sólido, etc.

- 10 Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como también en formas solvatadas, incluyendo las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y quedan englobadas dentro del alcance de la presente invención. Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas cristalina o amorfa. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretende que se encuentren dentro del
15 alcance de la presente invención.

Determinados compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; los racematos, diastereoisómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales quedan englobados dentro del alcance de la presente invención.

- 20 Los compuestos de la invención se pueden preparar como isómero individual (por ejemplo, enantiómero, cis-trans, de posición, diastereoisómero) o una mezcla de isómeros. En una realización preferida, los compuestos se preparan en forma de isómero sustancialmente individual. Los procedimientos de preparación de compuestos sustancialmente puros desde el punto de vista isomérico resultan conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar mezclas enantioméricamente enriquecidas y compuestos enantioméricos puros mediante el uso de intermedios sintéticos que son enantioméricamente puros en combinación con reacciones que por un lado pueden dejar la estequiometría en el
25 centro quiral sin modificación alguna o por otro, pueden dar lugar a la inversión completa. De manera alternativa, el producto final o los intermedios junto con la ruta sintética pueden resolverse en un estereoisómero individual. Las técnicas para invertir o dejar sin modificación un estereocentro particular, y esas otras para someter a resolución mezclas de estereoisómeros resultan bien conocidas en la técnica, la elección del procedimiento apropiado para una situación particular se encuentra dentro de la capacidad del experto en la materia. Véase, de manera general,
30 Furniss et al. (eds.), VOGEL'S ENCYCLOPEDIA OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY 5TH ED., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, págs. 809-816; y Heller, Acc. Chem. Res. 23: 128 (1990).

- Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos se pueden someter a radio-marcaje con isótopos radioactivos, tales como por ejemplo tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sean radioactivas o no, queden englobadas dentro del alcance de la presente invención.
35

Cuando los grupos sustituyentes quedan especificados por su fórmula química convencional, escrita de izquierda a derecha, igualmente engloban los sustituyentes químicamente idénticos, que resultarían de la escritura de la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, se pretende que $-\text{CH}_2\text{O}-$ también incluya $-\text{OCH}_2-$.

- 40 El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa, a menos que se afirme lo contrario, una cadena lineal o ramificada, o radical de hidrocarburo cíclico, o una de sus combinaciones, que puede estar completamente saturado, mono- o poli-insaturado y que puede incluir radicales divalentes ("alquileno") y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ significa de uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales de hidrocarburo saturados incluyen, aunque sin limitación, grupos tales como
45 metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene un o más enlaces dobles o enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, aunque sin limitación, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos superiores e isómeros. El término "alquilo", a menos que se afirme lo contrario, también incluye los derivados de alquilo definidos con más detalle a continuación, tales como
50 "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se encuentran limitados a grupos de hidrocarburos son denominados "homoalquilo".

- Los grupos alquilo a modo de ejemplo para su uso en la presente invención contienen entre aproximadamente uno y aproximadamente veinticinco átomos de carbono (por ejemplo, metilo, etilo y similares). Las cadenas de hidrocarburos lineales, ramificados o cíclicos que tienen ocho o menos átomos de carbono también son denominadas en el presente documento "alquilo inferior". Además, el término "alquilo" como se usa en el presente documento incluye además una o más sustituciones en uno o más átomos de carbono del fragmento de cadena de hidrocarburo.
55

Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional y se refieren a esos grupos alquilo unidos al resto de la molécula mediante un átomo de oxígeno, un grupo amino, o un átomo de azufre, respectivamente.

5 El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otros término, significa, a menos que se afirme lo contrario, una cadena lineal o ramificada, o un radical cíclico que contiene carbono, o sus combinaciones, que consiste en el número afirmado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado entre el grupo que consiste en O, N, Si, P y S, y en el que los átomos de nitrógeno, fósforo y azufre están oxidados opcionalmente, y el heteroátomo de nitrógeno se encuentra cuaternizado opcionalmente. El(los) heteroátomo(s) O, N, P, S y Si puede estar colocado en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la cual el grupo alquilo se encuentre unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tal como, por ejemplo, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. De manera similar, el término "heteroalquilenos", por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente procedente de heteroalquilo, como por ejemplo, aunque sin limitación, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$. Para los grupos heteroalquilenos, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxo, alquilenamino, alquilendiamino y similares). Aún más, para los grupos de engarce alquilenos y heteroalquilenos, ninguna orientación del grupo de engarce viene determinada por la dirección en la cual se escribe la fórmula del grupo de engarce. Por ejemplo, la fórmula $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ representa tanto $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}$ como $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$.

20 Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se afirme lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. De manera adicional, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la cual el heterociclo se encuentra unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, aunque sin limitación, ciclopropilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, aunque sin limitación, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares.

30 El término "arilo" significa, a menos que se afirme lo contrario, un resto aromático poli-insaturado que puede ser un anillo individual o de anillos múltiples (preferentemente de 1 a 3 anillos), que se encuentran condensados o engarzados de forma covalente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno o cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en el que los átomos de nitrógeno y azufre están oxidados opcionalmente, y el(los) átomo(s) de nitrógeno está(n) cuaternizado(s) opcionalmente. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 3-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo, tetrazolilo, benzo[b]furanilo, benzo[b]tienilo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-ilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilo y 6 quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los anteriores, comentados como sistemas de anillo arilo y heteroarilo, están seleccionados entre el grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación.

45 Por cuestiones de brevedad, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltoxi, arilalquilo) incluyen anillos tanto arilo como heteroarilo como se ha definido anteriormente. De este modo, el término "arilalquilo" incluye esos radicales en los que el grupo arilo se encuentra unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo los grupos alquilo en los cuales el átomo de carbono (por ejemplo, el grupo metileno) ha sido sustituido, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares).

Cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") incluye formas tanto sustituidas como no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

50 Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo los grupos frecuentemente denominados alquilenos, alquilenos, heteroalquilenos, heteroalquilenos, alquilenos, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilenos y heterocicloalquilenos) son denominados de forma genérica "sustituyentes del grupo alquilo" y pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados entre, aunque sin limitación: $-\text{OR}'$, $=\text{O}$, $=\text{NR}'$, $=\text{N}-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, $-\text{halógeno}$, $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{CO}_2\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''$, $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NRSO}_2\text{R}'$, $-\text{CN}$ y $-\text{NO}_2$ en un número que varía desde cero hasta $(2m'+1)$, donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. Preferentemente, R' , R'' , R''' y R'''' se refieren cada uno independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R es seleccionado independientemente como lo son cada uno de los grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' se encuentran unidos al

mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R" incluye, aunque sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de sustituyentes, el experto en la materia comprenderá que el término "alquilo" incluye grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes de los grupos hidrógeno, tal como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ y similares).

Igual que los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se denominan genéricamente como "sustituyentes del grupo arilo". Los sustituyentes están seleccionados entre, por ejemplo: halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R'R"', -OC(O)R', -CO₂R', -CONR'R", -OC(O)NR'R"', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR''R"', -NR'C(O)₂R', -NR-C(NR'R'R''')=NR''', -NR-C(NR'R')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R"', -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluoroalcoxi(C₁-C₄) y fluoroalquilo(C₁-C₄), en un número que varía desde cero hasta el número total de valencias abiertas sobre el sistema de anillo aromático; y en la que R', R'', R''' y R'''' están preferentemente seleccionados independientemente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R es seleccionado independientemente como lo son cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. En los esquemas siguientes, el símbolo X representa "R" como se ha descrito anteriormente.

De manera opcional, se pueden sustituir dos o más sustituyentes sobre átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo con un sustituyentes de la fórmula -T-C(O)-(CRR')_q-U-, en la que T y U son independientemente NR-, -O-, -CRR'o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 3. De manera alternativa, dos de los sustituyentes sobre átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar sustituidos opcionalmente por un sustituyente de la fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en la que A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O), -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4. De manera opcional, uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo formado de este modo puede estar sustituido por un doble enlace. De manera alternativa, dos de los sustituyentes sobre los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar sustituidos opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -(CRR')_s-X-(CR''R''')_d-, en la que s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂- o -S(O)₂NR'-. Los sustituyentes R, R', R'' y R''' están seleccionados independientemente entre hidrógeno o alquilo (C₁-C₆) sustituido o no sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P) y silicio (Si).

El término "amino" o la expresión "grupo amino" se refiere al grupo -NR'R" (o -N⁺RR'R") en la que R, R' y R'' están seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilo, alquilo, arilo sustituido, alquilo, heteroarilo y heteroarilo sustituido. Una amina sustituida es un grupo amina en el que R'o R" es diferente de hidrógeno. En un grupo amino primario, tanto R'como R" son hidrógeno, mientras en un segundo grupo amino, cualquiera de R'o R", pero no ambos, son hidrógeno. Además, los términos "amina" y "amino" pueden incluir versiones protonadas y cuaternizadas de nitrógeno, que comprenden el grupo -N⁺RR'R" y sus contra iones aniónicos compatibles biológicamente.

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se afirme lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. De manera adicional, los términos tales como "haloalquilo" incluyen monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo(C₁-C₄)" incluye, aunque sin limitación, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo y similares.

El término "engarce" o "L", como se usa en el presente documento, se refiere a un enlace covalente sencillo o a una serie de enlaces covalentes estables que incorporan 1-20 átomos que no son hidrógeno seleccionados entre el grupo que consisten en C, N, O, S y P que unen covalentemente polímeros solubles en agua o polímeros solubles en agua ramificados a otro resto tal como un grupo químicamente reactivo o sustancia conjugada que incluye sustancias biológicas y no biológicas. Los miembros de engarce a modo de ejemplo incluyen un resto que incluye -C(O)NH-, -C(O)O-, -NH-, -S-, -O-, y similares. Un "engarce escindible" es un engarce que tiene uno o más grupos escindibles que se pueden romper como resultado de una reacción o condición. La expresión "grupo escindible" se refiere a un resto que permite la liberación de una parte, por ejemplo, un polímero soluble en agua, de un conjugado procedente del resto del conjugado mediante la escisión de un enlace que une el resto liberado al resto del conjugado. Dicha escisión es de naturaleza química, o por mediación enzimática. Los grupos escindibles enzimática a modo de ejemplo incluyen aminoácidos naturales o secuencias peptídicas que terminan con un aminoácido natural.

Además de los grupos escindibles enzimática, está dentro del alcance de la presente invención incluir uno o más sitios que experimentan escisión mediante la acción de un agente diferente de una enzima. Los agentes de escisión no enzimáticos a modo de ejemplo incluyen, aunque sin limitación, ácidos, bases, luz (por ejemplo, derivados de nitrobenzilo, grupos fenacilo, ésteres de benzoína) y calor. Muchos grupos escindibles resultan conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Jung y col., Biochem. Biophys. Acta, 761: 152-162 (1983); Joshi y col., J. Biol. Chem., 265: 14518-14525 (1990); Zarling y col., J. Immunol., 124: 913-920 (1980); Bouizar y col., Eur. J. Biochem., 155, 141-147 (1986); Park y col., J. Biol. Chem., 261: 205-210 (1986); Browning y col., J. Immunol., 143: 1859-1867

(1989). Además, un amplio intervalo de brazos espaciadores bifuncionales (tanto homo- como hetero-bifuncionales) y escindibles se encuentra disponible en el mercado.

5 Un grupo escindible a modo de ejemplo, un éster, es un grupo escindible que se puede escindir mediante un reactivo, por ejemplo, hidróxido de sodio, dando como resultado un fragmento que contiene carboxilato y un producto que contiene hidroxilo.

El engarce se puede usar para unir el compuesto a otro componente del conjugado, tal como un resto de dirección (por ejemplo, un anticuerpo, ligando, grupo de unión a proteína no covalente, etc.), un analito, una biomolécula, un fármaco y similares.

10 Los "grupos de unión a proteína no covalentes" son restos que interaccionan con un polipéptido intacto o desnaturalizado de una manera asociativa. La interacción puede ser reversible o irreversible en un medio biológico. La incorporación del "grupo de unión a proteína no covalente" al compuesto fluorogénico de la invención proporciona el compuesto con la capacidad de interaccionar con un polipéptido de manera no covalente. Las interacciones no covalentes a modo de ejemplo incluyen interacciones hidrófobas-hidrófobas y electrostáticas. Los "grupos de unión a proteína no covalentes" a modo de ejemplo incluyen grupos aniónicos, por ejemplo, fosfato, tiosulfato, fosfonato, carboxilato, boronato, sulfato, tiosulfato y tiosulfonato.

15 Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" significa motivos de hibridación de ADN, ARN, monocatenario, bicatenario, o más altamente agregados, y cualquiera de sus modificaciones químicas. Las modificaciones incluyen, aunque sin limitación, las que proporcionan grupos químicos que incorporan una carga adicional, capacidad de polarización, enlace de hidrógeno, interacción electrostática y capacidad de flujo, a las bases de ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico en su conjunto. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos (ANP), modificaciones del grupo fosfodiéster (por ejemplo, fosforotioatos, metilfosfonatos), modificaciones del azúcar de la posición 2', modificaciones de la pirimidina de la posición 5, modificaciones de la purina de la posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo uracilo; modificaciones de la cadena principal, metilaciones, combinaciones de emparejamientos de base no usuales tales como isobases, isocitidina e isoguanidina y similares. Los ácidos nucleicos también pueden incluir bases no naturales, tales como, por ejemplo, nitroindol. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5' tales como terminaciones con un agente de interrupción, un fluoróforo u otro resto.

20 La expresión "grupo reactivo" como se usa en el presente documento se refiere a un grupo que es capaz de reaccionar con otro grupo químico para formar un enlace covalente, es decir, es reactivo desde el punto de vista covalente en condiciones de reacción apropiadas, y generalmente representa un punto de unión para otra sustancia. El grupo reactivo es un resto, tal como un ácido carboxílico o un éster de succinimidilo, sobre los compuestos de la presente invención que es capaz de reaccionar químicamente con un grupo funcional sobre un compuesto diferente para formar un engarce covalente que tiene como resultado un componente marcado fluorescente o fluorogénico. De manera general, los grupos reactivos incluyen nucleófilos, electrófilos y grupos fotoactivables.

25 Los grupos reactivos a modo de ejemplo incluyen, aunque sin limitación, olefinas, acetilenos, alcoholes, fenoles, éteres, óxidos, haluros, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, cianatos, isocianatos, tiocianatos, isotiocianatos, aminas, hidrazinas, hidrazonas, hidrazidas, diazo, diazonio, nitro, nitrilos, mercaptanos, sulfuros, disulfuros, sulfóxidos, sulfonas, ácidos sulfónicos, ácidos sulfínicos, acetales, cetales, anhídridos, sulfatos, ácidos sulfénicos, isonitrilos, amidinas, imidas, imidatos, nitronas, hidroxilaminas, oximas, ácidos hidroxámicos, ácidos tihidroxámicos, alenos, orto ésteres, sulfitos, enaminas, inaminas, ureas, seudoureas, semicarbidas, carbodiimidias, carbamatos, iminas, azidas, compuestos azo, compuestos axoxi y compuestos nitroso. Grupos funcionales reactivos también incluyen los usados para preparar bioconjugados, por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias y similares. Los procedimientos para preparar cada uno de estos grupos funcionales resultan bien conocidos en la técnica y su aplicación o modificación con una fin particular se encuentra dentro de la capacidad del experto en la materia (véase, por ejemplo, Sandler y Karo, eds. ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS, Academic Press, San Diego, 1989).

30 La expresión "grupo de dirección" se refiere a un resto que es: (1) capaz de dirigir de forma activa la entidad que se une (por ejemplo, un resto fluorogénico) a una región diana, por ejemplo, una célula; o (2) es absorbido preferentemente de forma pasiva por o queda retenido dentro de una región diana. El grupo de dirección puede ser una molécula pequeña, que se pretende que incluya tanto péptidos como sustancias que no son péptidos. El grupo de dirección también puede ser una macromolécula, que incluye, aunque sin limitación, sacáridos, lectinas, receptores, ligandos para receptores, proteínas tales como BSA, anticuerpos, poli(éteres), dendrímeros, poli(amido ácidos) y similares.

35 "Molécula portadora", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula a la cual se une cualquier compuesto de la invención. Las moléculas portadoras representativas incluyen una proteína (por ejemplo, enzima, anticuerpo), glucoproteína, péptido, sacárido (por ejemplo, mono-, oligo- y poli-sacáridos), hormona, receptor, antígeno, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, tinte, nutriente, factor de crecimiento, etc. sin limitación. "Molécula portadora" también se refiere a especies que se podría considerar

que no se encuentran dentro de la definición clásica de "molécula" por ejemplo un soporte sólido (por ejemplo, soporte de síntesis, soporte cromatográfico, membrana), virus y microorganismos.

Introducción

5 La presente invención proporciona polímeros solubles en agua ramificados y conjugados de los polímeros solubles en agua ramificados. Los conjugados se forman entre los polímeros solubles en agua ramificados de la invención y una especie que incluye un grupo reactivo al cual se puede conjugar el polímero soluble en agua ramificado. Los pares de conjugación a modo de ejemplo para los polímeros solubles en agua de la invención incluyen péptidos, glucopéptidos, lípidos y glucolípidos. Un conjugado a modo de ejemplo es uno en el que un azúcar modificado que porta un polímero soluble en agua ramificado de la invención se encuentra unido, de forma directa o indirecta (por ejemplo, a través de un resto glucosilo de intervención) a un sitio de glucosilación en el péptido. También se describen procedimientos para producir los conjugados de la invención.

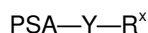
15 Los conjugados y los procedimientos de formación de los conjugados de la invención se ilustran en el presente documento haciendo referencia al péptido y los conjugados de glucopéptido. El foco de discusión es por motivos de claridad de ilustración y no debería interpretarse como limitante la utilidad de los polímeros solubles en agua ramificados desvelados en el presente documento para ser usados en la formación de dichos conjugados. Los expertos en la materia reconocerán que los polímeros solubles en agua ramificados de la presente invención se pueden usar en la formación de una amplia variedad de conjugados de polímero soluble en agua ramificado.

20 Tal y como se ha comentado en la sección anterior, los procedimientos químicos reconocidos en la técnica de PEGilación covalente están basados en la conjugación química a través de grupos reactivos sobre aminoácidos o carbohidratos. A través del diseño cuidadoso del conjugado y de las condiciones de reacción, se han preparado conjugados útiles usando estrategias de conjugación con mediación química. La mayor laguna de la conjugación química de polímeros a proteínas o glucoproteínas es la pérdida de selectividad de los polímeros activados que, con frecuencia, tiene como resultado la unión de los polímeros a los sitios implicados en la bioactividad de la proteína o de la glucoproteína. Se han desarrollado varias estrategias para abordar las químicas de conjugación selectivas en cuanto a sitio, no obstante, únicamente se ha desarrollado un procedimiento universal apropiado para una variedad de proteínas recombinantes.

25 Al contrario que con los procedimientos reconocidos en la técnica, se desvela una nueva estrategia para la glucosilación dirigida al sitio y altamente selectiva de polímeros solubles en agua ramificados, por ejemplo, glucosilación. En una realización a modo de ejemplo, la unión dirigida al sitio de polímeros solubles en agua ramificados se consigue mediante glucosilación enzimática *in vitro* de secuencias peptídicas específicas. La glucosilación se puede realizar de forma enzimática utilizando un glucosiltransferasa, por ejemplo, una sialiltransferasa, capaz de transferir las especies de glucosilo-polímero soluble en agua ramificado, por ejemplo, ácido PEG-sialico, a un sitio de glucosilación ("gluco-PEGilación").

Polímeros solubles en agua y ramificados

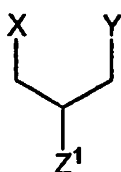
35 Se describe un polímero soluble en agua ramificado que tiene la fórmula:



40 en la que PSA es un polímero soluble en agua. El símbolo Y representa un engarce, por ejemplo, un enlace, o un resto que comprende una amida, un éster de ácido carboxílico, uretano, mercaptanos, alquilo sustituido o no sustituido y similares. Los grupos de engarce a modo de ejemplo incluyen un enlace, $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_m\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{CH}_2)_n$ y $(\text{CH}_2)_m\text{S}(\text{CH}_2)_n$ en las que m y n son números enteros que están seleccionados independientemente entre 0 y 6. R^x es un resto alquilo sustituido o no sustituido engarzado a un polímero soluble en agua; un aminoácido o dímero de un aminoácido engarzado a un polímero soluble en agua; o un azúcar o un nucleótido de azúcar engarzado a un polímero soluble en agua. PSA y el componente polimérico soluble en agua de R^x puede ser el mismo polímero soluble en agua o polímeros solubles en agua diferentes.

45 Los polímeros solubles en agua a modo de ejemplo para su uso en los compuestos de la invención incluyen m-PEG, PEG, m-PPG, PPG, poli(ácido siálico), poliglutamato, poliaspartato, polilisina, polietilenimina, polilactida, poliglicérido y PEG funcionalizado, por ejemplo, PEG con funcionalidad terminal.

50 En una realización a modo de ejemplo, Y es alquilo sustituido y un polímero soluble en agua ramificado tiene la fórmula:

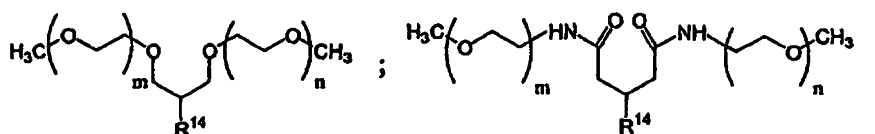


(I)

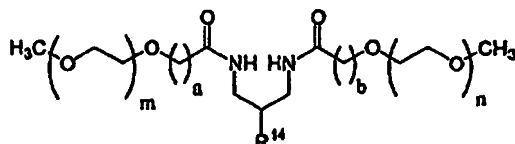
5 en la que X e Y son miembros seleccionados independientemente entre OR^1 , NR^2R^3 , SR^4 , $COOR^5$, $CONR^6R^7$, $OCONR^6R^7$, alquilo sustituido o no sustituido, y arilo sustituido o no sustituido. Z^1 es un miembro seleccionado entre OR^1 , NR^2R^3 , SR^4 , $COOR^5$, $CONR^6R^7$, alquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido. Los
 10 símbolos R^1 , R^4 y R^5 representan un polímero soluble en agua. R^2 , R^3 , R^6 y R^7 son miembros que están seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un grupo funcional reactivo, un polímero soluble en agua con la condición de que estos grupos están seleccionados de manera que el compuesto de acuerdo con la Fórmula I incluya al menos dos restos poliméricos solubles en agua. Los símbolos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y R^7 representan grupos que están seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, un grupo funcional reactivo, una molécula portadora y un polímero soluble en agua.

15 En otra realización a modo de ejemplo, Z^1 comprende un resto sacarilo. El resto sacarilo puede ser un resto sacarilo activado, por ejemplo, un azúcar de nucleótido. Aún más, Z^1 puede comprender un resto sacarilo que se encuentra directamente unido a un aminoácido de un péptido, o indirectamente unido a un aminoácido de un péptido, mediante su conjugación a un resto glucosilo unido al aminoácido.

Los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con la Fórmula I se explican a continuación:

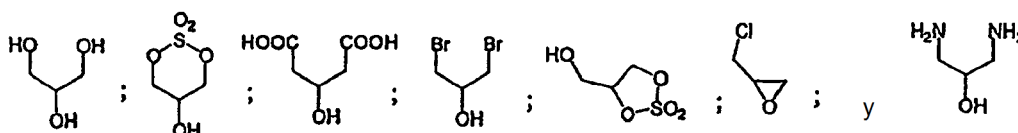


y

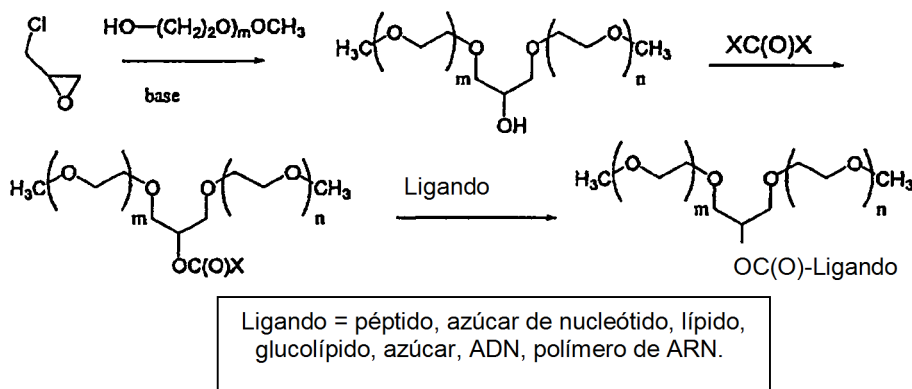


20 en las que R^{14} es OH o un grupo funcional reactivo. Un grupo funcional reactivo a modo de ejemplo es $C(O)Q'$, en el que Q' está seleccionado de forma que $C(O)Q'$ sea un grupo funcional reactivo. Q' también puede incorporar una molécula portadora ("Ligando"). Las especies a modo de ejemplo de Q incluyen halógeno, NHS, pentafluorofenilo, HOBT, HOAt y p-nitrofenilo. El índice "m" y el índice "n" son números enteros que están seleccionados
 25 independientemente entre 1 y 20.000.

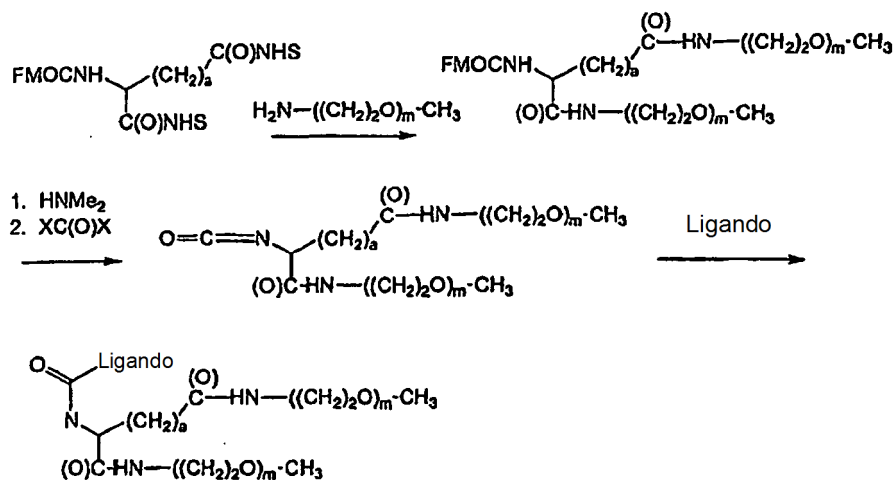
Los compuestos explicados anteriormente, y los compuestos adicionales se preparan fácilmente a partir de materiales de partida tales como:



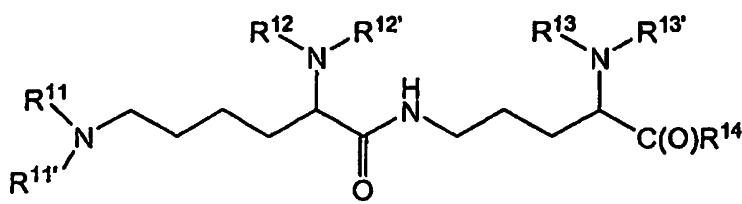
Una ruta a modo de ejemplo para un compuesto desvelado en el presente documento se explica a continuación:



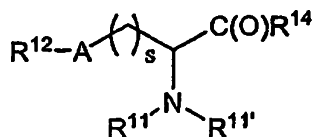
Otra ruta a modo de ejemplo para los compuestos desvelados en el presente documento se explica a continuación:



5 También se desvela un polímero ramificado que está basado en un aminoácido o un oligo-aminoácido (por ejemplo, di-, tri-, tetrapéptido). Los polímeros ramificados y basados en aminoácidos a modo de ejemplo tienen una fórmula seleccionada entre:



y



10 en las que R^{11} , $R^{11'}$, R^{12} , $R^{12'}$, R^{13} y $R^{13'}$ están seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido y polímeros solubles en agua, con la condición de que estos grupos están seleccionados de manera que el compuesto explicado anteriormente incluya al menos dos restos poliméricos solubles en agua. R^{14} es un miembro seleccionado entre OH, grupos funcionales reactivos, un grupo que comprende un resto sacárido o un grupo que se encuentra engarzado a una molécula portadora. A es un miembro seleccionado entre O y S. El índice "s" representa un número entero entre 1 y 5. A es un miembro seleccionado entre NH, O y S.

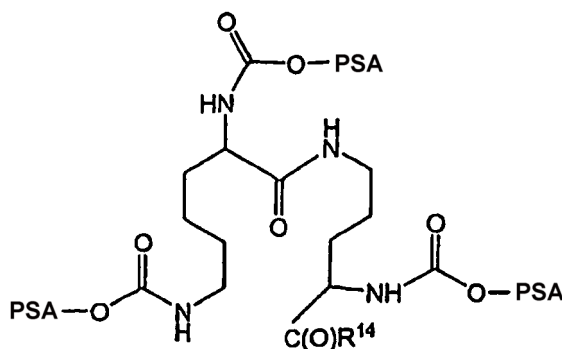
Cada uno de los compuestos explicados en las fórmulas anteriores se usa para la PEGilación química de otras

especies (por ejemplo, ácido nucleico, péptido, sacárido, etc.). De manera general, los procedimientos para la formación de los conjugados entre PEG (y especies que no contienen PEG) son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic, Press, San Diego, 1996; y Feeney y col., MODIFICATION OF PROTEINS; Advances en Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

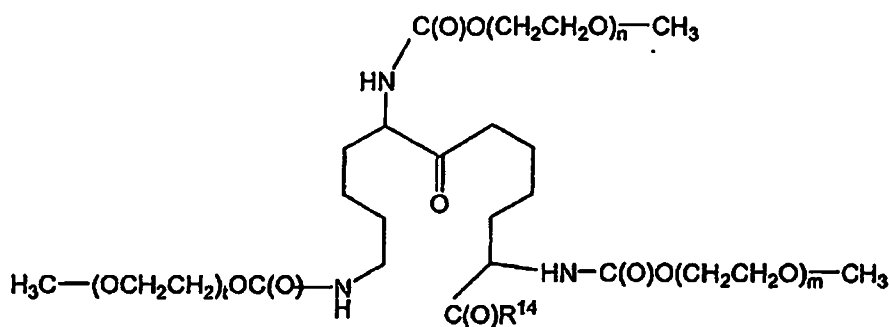
5

En otra realización a modo de ejemplo, R¹⁴ comprende un resto sacarilo. El resto sacarilo puede ser un resto sacarilo activado, por ejemplo, un azúcar de nucleótido. Aún más, R¹⁴ puede comprender un resto sacarilo que se encuentra unido directamente a un aminoácido de un péptido, o que se encuentra unido indirectamente a un aminoácido de un péptido mediante su conjugación a un resto glucosilo unido al aminoácido.

10 Las composiciones de la invención tienen la fórmula:



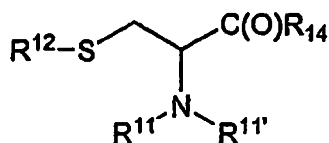
tal como:



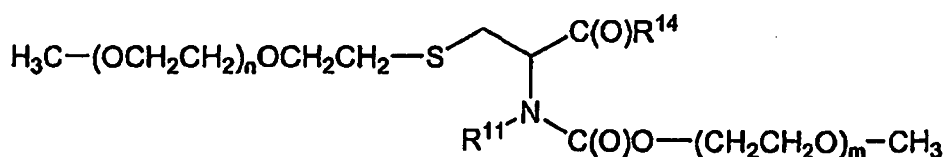
15

en la que "m", "n" y "t" son números enteros seleccionados independientemente entre 1 y 20.000; y R¹⁴ es como se ha comentado anteriormente.

Otros compuestos desvelados en el presente documento incluyen:

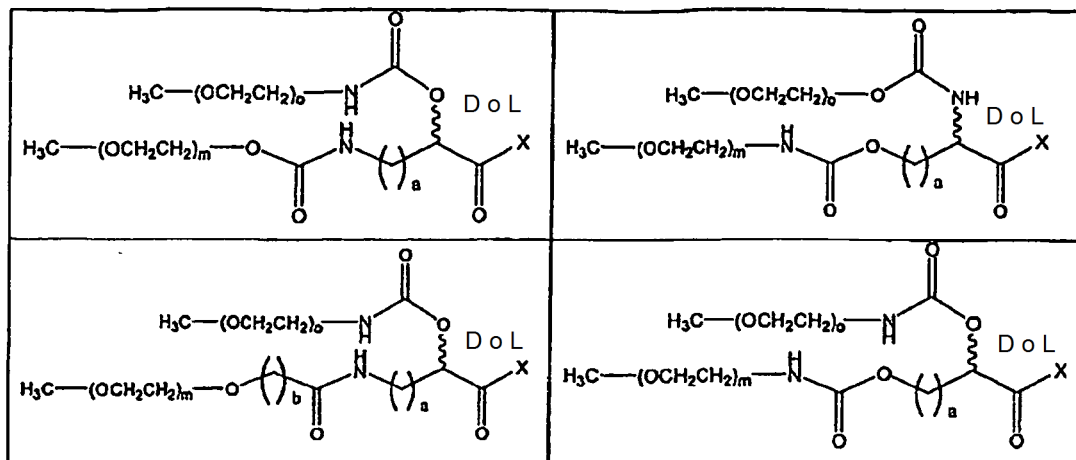


tal como:



20

Las composiciones adicionales basadas en las estructuras de aminoácido se explican en la siguiente tabla.



5 En las figuras que se explican en la tabla anterior, los símbolos a y b representan independientemente números entre 1 y 10. Los símbolos m y o representan independientemente números entre 1 y 10.000. El símbolo X representa OH, H, Q (un grupo de activación) y un resto biológico, tal como una proteína, azúcar, un lípido o un nucleótido.

10 En una realización a modo de ejemplo, R¹⁴ engloba un resto sacarilo. El resto sacarilo puede ser un resto sacarilo activado, por ejemplo, un azúcar de nucleótido. Aún más, R¹⁴ puede comprender un resto sacarilo que se encuentra directamente unido a un aminoácido de un péptido, o que se encuentre indirectamente unido a un aminoácido de un péptido mediante su conjugación a un residuo de glucosilo unido al aminoácido.

También se desvela un polímero soluble en agua ramificado que está basado en un núcleo de sacárido ("núcleo de ramificación"). Los expertos apreciarán que el núcleo de sacárido puede ser cualquier estructura. Los sacáridos a modo de ejemplo para su uso incluyen GlcNAc, Gal, Sia, Fuc, Glc, GalNAc, GalNH₂, GlcNH₂ y similares.

Un compuesto a modo de ejemplo tiene la fórmula:

15 Azúcar-O-(L-PSA)₂

en la que L es un engarce y PSA es un polímero soluble en agua.

Otro compuesto a modo de ejemplo tiene la fórmula:

(C₆H₁₀O₄)-(OC(O)-L-PSA)₂

20 en la que C₆H₁₀O₄ es un núcleo de ramificación de sacárido en el que dos de los restos OH del sacárido se convierten en OC(O)-engarce-PSA.

Otro compuesto a modo de ejemplo más tiene la fórmula:

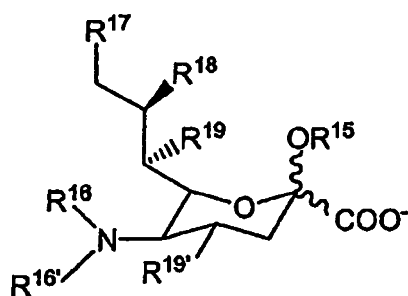
Nucleótido-Azúcar-O-(L-PSA)₂

En otra realización a modo de ejemplo, el polímero soluble en agua, ramificado y basado en sacárido tiene la fórmula:

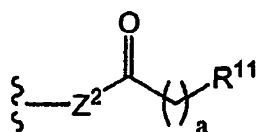
25 Nu-O-(C₆H₉O₃)-(OC(O)-L-PSA)₂

en la que Nu es un nucleótido.

Otro compuesto a modo de ejemplo, que está basado en un núcleo de ácido siálico tiene la fórmula:



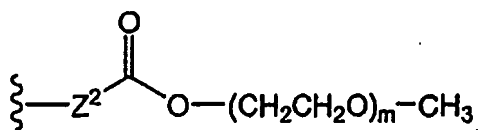
en la que R¹⁶ y R^{16'} son miembros seleccionados entre H, acetilo, y:



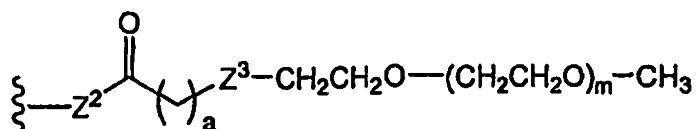
(I)

5 y R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹ y R^{19'} son miembros seleccionados independientemente entre H, OH, NH₂, NHAc y el resto de acuerdo con la Fórmula I. En la Fórmula I, Z² es un miembro seleccionado entre O, S, CH₂ y S. R¹¹ es como se ha descrito anteriormente, y el índice "a" representa un número entero de 0 a 20, con la condición de que al menos dos de R¹⁶, R^{16'}, R¹⁷, R¹⁸ y R¹⁹ presenten la estructura de acuerdo con la Fórmula I. R¹¹ puede ser un grupo unido a una molécula portadora o un enlace a una molécula portadora. R¹⁵ es un miembro seleccionado entre H y grupos de activación, por ejemplo, un fosfato de nucleótido.

10 En otra realización a modo de ejemplo, el engarce de Fórmula I tiene la estructura:



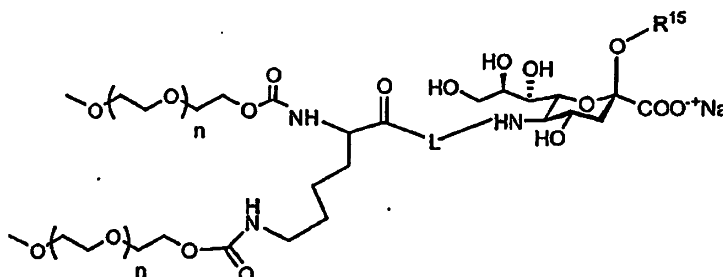
En otra realización a modo de ejemplo, el engarce de Fórmula I tiene la estructura:



en la que Z³ es un miembro seleccionado entre NH, O y S.

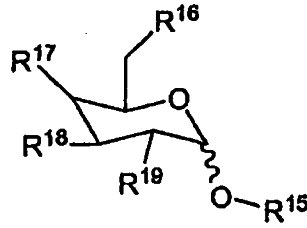
15 En una realización a modo de ejemplo, Z² es NH.

También se desvela un compuesto que tiene la estructura:



en la que L es un engarce como se ha definido en el presente documento.

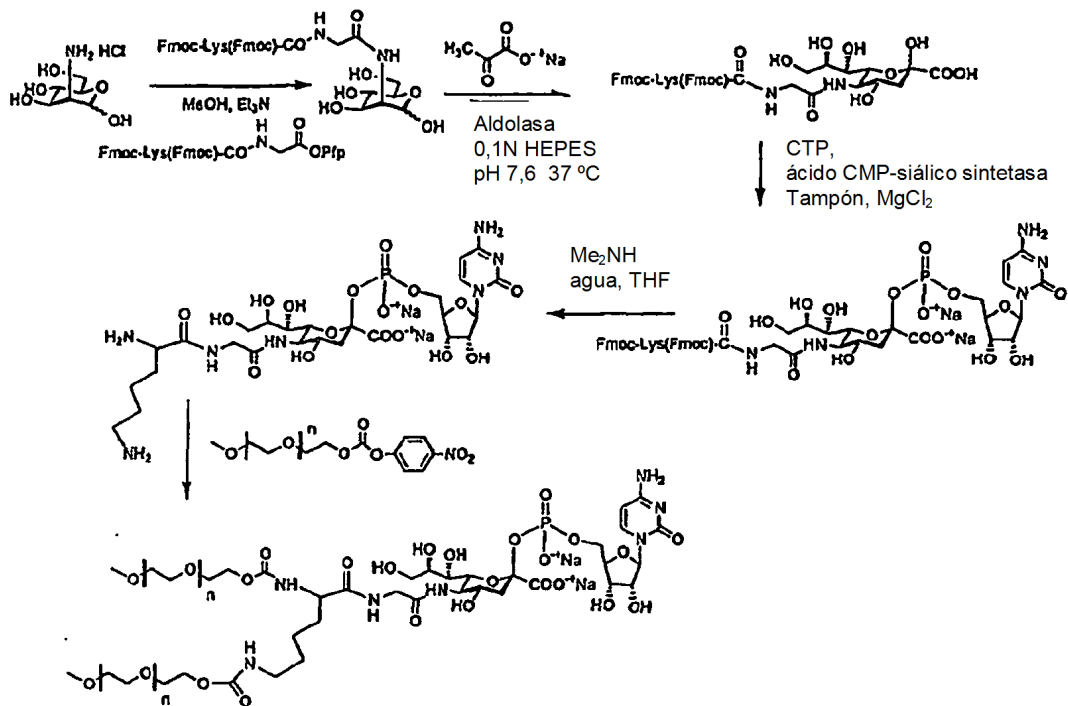
En otro aspecto, el polímero ramificado está basado en galactosa o N-acetil-galactosa y tiene la fórmula:



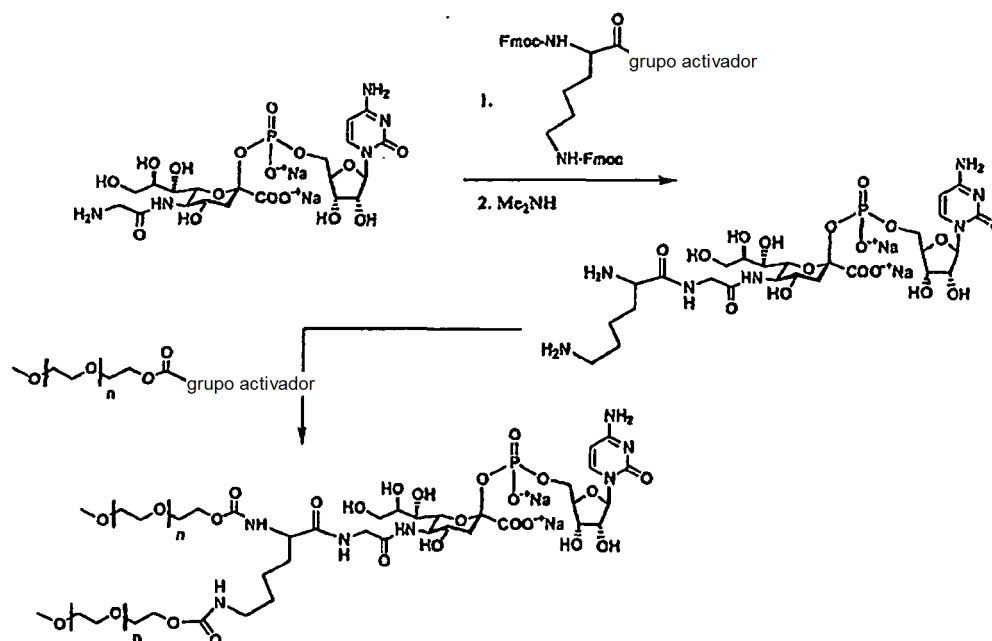
en la que R¹⁵-R¹⁹ son como se ha descrito anteriormente y al menos dos de R¹⁵-R¹⁹ son un resto de acuerdo con la Fórmula I.

5 Aún más, R¹⁵ puede comprender un enlace a un aminoácido de un péptido o a un resto glucosilo que está directamente unido a un aminoácido de un péptido, o indirectamente unido a un aminoácido de un péptido mediante su conjugación a un resto glucosilo unido al aminoácido.

A continuación, se proporciona un esquema a modo de ejemplo para preparar los polímeros solubles en agua con núcleo de sacárido ramificado:

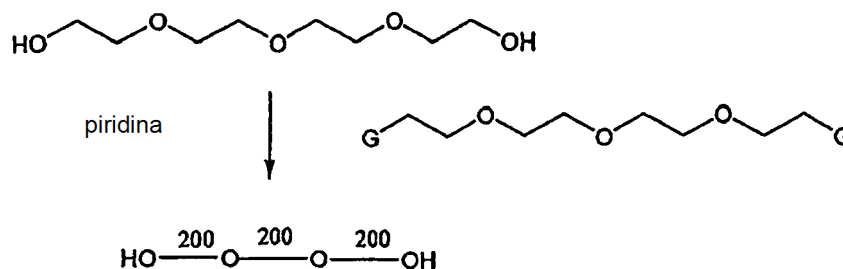


A continuación, se explica otro esquema a modo de ejemplo para preparar los polímeros solubles en agua ramificados con núcleo de sacárido:



Poli(Etilenglicol) Mono-Disperso

- 5 También se desvela un PEG de alto peso molecular mono-disperso y un procedimiento de preparación de una población esencialmente mono-dispersada de moléculas de poli(etilenglicol). El procedimiento incluye poner en contacto una molécula de PEG con un peso molecular bien definido, por ejemplo, PEG200, con al menos dos equivalentes de un PEG activado bifuncional que también tiene un peso molecular bien definido, por ejemplo, PEG200, produciendo de este modo una muestra mono-dispersa de un PEG, por ejemplo, PEG600:



- 10 G es un grupo saliente, tal como sulfonato o un éster de tresilato. A continuación, se puede poner en contacto la muestra mono-dispersa de PEG600 con PEG200 activado bifuncional para formar un PEG100 mono-disperso. De manera alternativa, PEG600 mono-disperso se puede convertir en el correspondiente derivado bifuncional y se puede hacer reaccionar con al menos dos equivalentes de un di-hidroxi-PEG600 mono-disperso, produciendo un PEG 1800 mono-disperso. El procedimiento se repite hasta obtener un PEG mono-disperso de tamaño deseado. Se puede diseñar la síntesis de manera que las diferencias de peso molecular entre el material de partida y el producto permitan la separación de cualquier material que no haya reaccionado, o que haya reaccionado de forma parcial, mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

- 20 Además, en respuesta a la necesidad de procedimientos mejorados de preparación de polímeros solubles en agua modificados, tales como poli(etilenglicol), se desvelan procedimientos para la activación química y el estiramiento de la cadena principal del polímero. Las moléculas de PEG mono-activadas se usan para conjugar PEG a una amplia variedad de especies, por ejemplo, restos de dirección, restos terapéuticos, fármacos anti-tumorales, citotoxinas, agentes radioactivos, aminoácidos, sacáridos y similares.

- 25 También se desvela un procedimiento para el ensamblado por etapas de polímeros activados solubles en agua, en particular poli(etilenglicol) y sus análogos estructurales. El procedimiento proporciona un acceso sencillo a moléculas de PEG tanto mono-funcionalizadas como bi-funcionalizadas.

En la etapa a, se pone en contacto el glicol de partida con un grupo activado (R-Y) que reacciona con un resto hidroxilo del glicol. De manera general, Y es un grupo saliente, que permite la colocación de R sobre uno de los restos hidroxilo de la molécula de PEG. En la etapa b, se activa el hidroxilo libre del aducto resultante mediante su conversión en un grupo tal como un éster de sulfonato. La especie de PEG activada se pone en contacto con otro resto de PEG del mismo grado de polimerización o de un grado de polimerización diferente del PEG de partida ("PEG_m"). Para permitir su unión a otra especie, opcionalmente, se activa el RO-PEG_(n+m) en el resto hidroxilo libre.

Los PEG mono-dispersos se activan fácilmente mediante procedimientos reconocidos en la técnica y los derivados activados se pueden usar para formar los conjugados. De manera alternativa, se incorpora el PEG mono-disperso al PEG ramificado de la invención, que se usa para formar un conjugado.

10 **Polímeros Solubles en Agua**

Se mejora la naturaleza hidrófila del péptido seleccionado mediante conjugación con moléculas polares tales como amina-, éster-, hidroxilo- y moléculas que contienen polihidroxilo. Los ejemplos representativos incluyen, aunque sin limitación, polilisina, polietilenimina y poliéteres, por ejemplo, poli(etilenglicol), m-poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), m-poli(etilenglicol) y otros restos de poli(alquilenglicol) de O-alquilo. Los polímeros preferidos solubles en agua son esencialmente no fluorescentes o emiten tal cantidad de fluorescencia que resulta inapropiada para su uso como marcador fluorescente en un ensayo. Además, generalmente es preferible usar polímeros que no sean azúcares de origen natural. Una excepción a esta preferencia consiste en usar un azúcar de origen natural que esté modificado por una unión covalente de otra entidad (por ejemplo, poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), biomolécula, resto terapéutico, resto diagnóstico, etc.). En otra realización a modo de ejemplo, se conjuga un resto de azúcar terapéutico a un brazo de engarce y el módulo azúcar-brazo de engarce se conjuga posteriormente hasta un péptido mediante un procedimiento desvelado en el presente documento.

Los procedimientos y la química para la activación de los polímeros solubles en agua y los sacáridos así como también los procedimientos para la conjugación de sacáridos y polímeros a varias especies se describen en la bibliografía. Los procedimientos usados comúnmente para la activación de polímeros incluyen los grupos de activación y los grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorhidrina, 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 y col., (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L., y col., Eds POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. (1991).

Muchos polímeros solubles en agua resultan conocidos por parte del experto en la materia y resultan útiles para la práctica de la presente invención. La expresión polímero soluble en agua engloba especies tales como sacáridos (por ejemplo, dextrano, amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poli(aminoácidos); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(éteres), por ejemplo, poli(etilenglicol); péptidos, proteínas y similares. La presente invención se puede poner en práctica con cualquier polímero soluble en agua con la única limitación de que el polímero debe incluir un punto en el cual se pueda unir el resto del conjugado.

Los procedimientos para la activación de polímeros también se pueden encontrar en el documento WO 94/17039, la patente de Estados Unidos N° 5.324.844, el documento WO 94/18247, el documento WO 94/04193, la patente de Estados Unidos N° 5.219.564, la patente de Estados Unidos N° 5.122.614, el documento WO 90/13540, la patente de Estados Unidos N° 5.281.698 y más el documento WO 93/15189, y para la conjugación entre los polímeros activados y los péptidos, por ejemplo, Coagulation Factor VIII (documento WO 94/15625), hemoglobina (el documento WO 94/09027), molécula portadora de oxígeno (la patente de Estados Unidos N° 4.412.989), ribonucleasa y dismutasa superóxido (Veronese y col., Ap. Biochem. Biotech. 11: 141-45 (1985)).

Los polímeros solubles en agua preferidos son aquellos en los cuales una parte sustancial de las moléculas de polímero de la muestra de polímero es de aproximadamente el mismo peso molecular; dichos polímeros son "mono-dispersos".

La presente invención se ilustra adicionalmente haciendo referencia a un conjugado de poli(etilenglicol) o monometoxi-poli(etilenglicol) (m-PEG). Varias revisiones y monografías sobre funcionalización y conjugación de PEG se encuentran disponibles. Véase, por ejemplo, Harris, Macromol. Chem. Phys. C25: 325-383 (1985); Scouten, Methods in Enzymology 135: 30-65 (1987); Wong y col., Enzyme Microb. Technol. 14: 866-874 (1992); Delgado y col., Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249-304 (1992); Zalipsky, Bioconjugate Chem. 6: 150-165 (1995); y Bhadra, y col., Pharmazie, 57:5-29 (2002).

El poli(etilenglicol) útil en la formación del conjugado de la invención es lineal o ramificado. Los restos de PEG de cualquier peso molecular, por ejemplo, 5 Kd, 10 Kd, 20 Kd y 30 Kd se usan en la presente invención.

Grupos Funcionales Reactivos

El uso de derivados reactivos de PEG (u otros engarces) para unir uno o más restos de péptido al engarce está

- dentro del alcance de la presente invención. La invención no se encuentra limitada por la identidad del análogo de PEG reactivo. Muchos derivados activados de poli(etilenglicol) se encuentran disponibles en el mercado y en la bibliografía. Se encuentra dentro de las capacidades del experto en la materia el hecho de escoger, y sintetizar si resultara necesario, un derivado de PEG activado apropiado con el cual preparar un sustrato útil en la presente invención. Véase, Abuchowski et al, *Cancer Biochem. Biophys.* 7: 175-186 (1984); Abuchowski y col., *J. Biol. Chem.*, 252: 3582-3586 (1977); Jackson y col., *Anal. Biochem.*, 165: 114-127 (1987); Koide y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111:659-667 (1983), tresilato (Nilsson y col., *Methods Enzymol.*, 104: 56-69 (1984); Delgado y col., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12: 119-128 (1990)); N-hidroxisuccinimida derivados de ésteres activos (Buckmann y col., *Makromol. Chem.* 182: 1379-1384 (1981); Joppich y col., *Makromol. Chem.*, 180: 1381-1384 (1979); Abuchowski y col., *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984); Katre y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 84: 1487-1491 (1987); Kitamura y col., *Cancer Res.*, 51: 4310-4315 (1991); Boccu y col., *Z. Naturforsch.*, 38C: 94-99 (1983), carbonatos (Zalipsky y col., *POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS*, Harris, Ed., Plenum Press, Nueva York, 1992, pág. 347-370; Zalipsky y col., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15: 100-114 (1992); Veronese y col., *Appl. Biochem. Biotech.* 11: 141-152 (1985)), formiatos de imidazol (Beauchamp y col., *Anal. Biochem.*, 131: 25-33 (1983); Berger y col., *Blood*, 71: 1641-1647 (1988)), 4-ditiopiridinas (Woghiren y col., *Bioconjugate Chem.*, 4: 314-318 (1993)), isocianatos (Byun y col., *ASAIO Journal*, M649-M653 (1992)) y epóxidos (patente de Estados Unidos N^o 4.806.595, expedida a Noishiki y col., (1989). Otros grupos de engarce incluyen el engarce de uretano entre grupos amino y PEG activado. Véase, Veronese, y col., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11: 141-152 (1985).
- De manera general, los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son los que resultan bien conocidos en la técnica de la química de bioconjugados. Clases de reacciones actualmente favorecidas disponibles con restos glucídicos reactivo son la que transcurren en condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, aunque sin limitación, sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrófilas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones se comentan, por ejemplo, en March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3^a ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney y col., *MODIFICATION OF PROTEINS: Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.
- Los grupos funcionales reactivos útiles que cuelgan del núcleo de azúcar o grupo de modificación incluyen, aunque sin limitación:
- (a) grupos carboxilo y diferentes derivados de los mismos que incluyen, aunque sin limitación, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, acil imidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, alquilo, alquenilo, alquinilo y ésteres aromáticos;
 - (b) grupos hidroxilo, que se pueden convertir en, por ejemplo, ésteres, éteres, aldehídos, etc.
 - (c) grupos haloalquilo, en los que el haluro puede ser posteriormente desplazado con un grupo nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, un anión tiol, un carbanión, o un ión alcóxico, dando lugar de este modo a la unión covalente de un nuevo grupo en el 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 manera que la derivación posterior es posible mediante la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o mediante mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquililitio;
 - (f) grupos haluro de sulfonilo para la reacción posterior con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas;
 - (g) grupos tiol, que pueden ser, por ejemplo, convertidos en disulfuros o que pueden reaccionar con haluros de acilo;
 - (h) grupos amina o sulfhidrilo, que pueden ser, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados;
 - (i) alquenos, que pueden experimentar, por ejemplo, cicloadiciones, acilación, adición de Michael, etc.; y
 - (j) epóxidos, que pueden reaccionar con, por ejemplo, aminas y compuestos de hidroxilo.
- Los grupos funcionales reactivos se puede escoger de manera que no participen en, o interfieran con, las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o el grupo de modificación. De manera alternativa, el grupo funcional reactivo puede estar protegido frente a la participación en la reacción mediante la presencia de un grupo de protección. El experto en la materia comprenderá el modo de proteger un grupo funcional particular de manera que no interfiera con un conjunto escogido de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos de protección útiles, véase, por ejemplo, Greene y col., *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, John Wiley & Sons,

Nueva York, 1991.

Conjugados Peptídicos

5 El uso de los compuestos de la invención se ejemplifica mediante el uso en la formación de conjugados peptídicos de polímeros solubles en agua ramificados. El foco de la discusión es por motivos de claridad de ilustración. Los expertos apreciarán que la discusión resulta relevante para la formación de una variedad de conjugados que usan los polímeros solubles en agua ramificados de la invención. En una realización a modo de ejemplo, se conjuga un polímero soluble en agua, ramificado y químicamente reactivo con un grupo reactivo complementario sobre el péptido, mediante un procedimiento conocido en la técnica o una de sus modificaciones.

10 En otra realización a modo de ejemplo, se une el polímero soluble en agua ramificado a un sacárido. El sacárido es un sustrato para una enzima que transfiere el polímero soluble en agua, ramificado y basado en sacárido (o el conjugado de polímero soluble en agua, ramificado y basado en sacárido) sobre un aminoácido o resto glucosilo del péptido. Los expertos en la materia apreciarán que los procedimientos explicados anteriormente no están limitados para la puesta en práctica con péptidos, sino que resultan ampliamente aplicables a otras especies, por ejemplo, lípidos, glucolípidos, sacáridos y otros restos terapéuticos.

15 Los conjugados de la invención se forman mediante la unión enzimática de un polímero soluble en agua ramificado-azúcar modificado a un péptido glucosilado o no glucosilado. El azúcar modificado se añade directamente a un sitio de glucosilación, o a un resto glucosilo unido directa o indirectamente (por ejemplo, a través de uno o más restos glucosilo) a un sitio de glucosilación.

20 El polímero soluble en agua ramificado-azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido (o resto glucosilo) y el grupo de modificación sobre el azúcar se convierte en lo que se denomina "grupo de engarce de glucosilo". El grupo de engarce de glucosilo puede "interaccionar" o puede verse alterado durante la unión del polímero soluble en agua ramificado al azúcar, por ejemplo, puede verse oxidado o aminado de forma reductora. Usando la selectividad exquisita de las enzimas, tales como glucosiltransferasas, el presente procedimiento proporciona péptidos que portan un polímero soluble en agua ramificado en una o más ubicaciones específicas. De este modo, de acuerdo con la presente invención, se une un azúcar modificado directamente a un locus seleccionado de la cadena del péptido o, de manera alternativa, el azúcar modificado queda anexo al resto de carbohidrato de un glucopéptido. Los péptidos en los cuales los azúcares modificados se encuentran unidos por un lado al carbohidrato de glucopéptido y de manera directa a un resto de aminoácido de la cadena principal del péptido también se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

30 Al contrario que las estrategias conocidas de elaboración química y enzimática de péptidos, la invención proporciona conjugados-péptidos y conjugados-glucopéptidos que tienen un patrón de derivatización sustancialmente homogéneo; las enzimas usadas en la invención son generalmente selectivas para un resto de aminoácido particular o combinación de restos de aminoácido del péptido. Los conjugados de la invención también se pueden preparar a gran escala. De este modo, los procedimientos desvelados en el presente documento proporcionan un medio práctico para la preparación de glucopéptidos a gran escala, que tienen patrones de derivatización uniformes preseleccionados. Los procedimientos se adaptan particularmente bien a la modificación de péptidos terapéuticos, incluyendo aunque sin limitación, glucopéptidos que se encuentran glucosilados de manera incompleta durante la producción en células de cultivo celular (por ejemplo, células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, células de hongos, células de levaduras o células procariotas) o animales o plantas transgénicos.

40 De manera general, los conjugados peptídicos de polímero soluble en agua ramificado se caracterizan por presentar una semivida terapéutica mayor debido, por ejemplo, a una menor tasa de eliminación, o una tasa menor de captación por parte del sistema inmunológico o reticulo-endotelial (RES). Además, los determinantes antigénicos sobre el componente de péptido de los conjugados de la invención están enmascarados por el polímero soluble en agua ramificado, reduciendo o eliminando la respuesta inmune del huésped frente al péptido. También se puede usar la unión selectiva de agentes de dirección a un péptido, usando un azúcar modificado apropiado, para dirigir un péptido a un tejido particular o un receptor superficial celular que resulta específico para el agente de dirección particular.

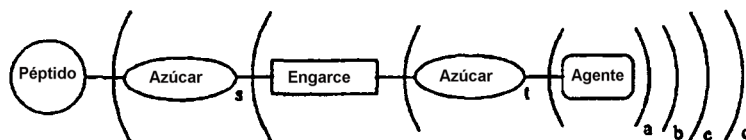
50 La semivida *in vivo* de los glucopéptidos terapéuticos también se puede mejorar con polímeros solubles en agua y modificados que incluyen polietilenglicol (PEG, m-PEG) y polipropilenglicol (PPG). Por ejemplo, la modificación química de proteínas con PEG ramificado (PEG-ilación, m-PEG-ilación) aumenta su tamaño molecular y disminuye su accesibilidad superficial y de grupo funcional, dependiendo cada una de ellas del tamaño del PEG unido a la proteína. De manera general, se reconoce la modificación de péptidos con polímeros solubles en agua como estrategia prometedora para la mejora de semividas en plasma y de la estabilidad proteolítica, y una disminución de la inmunogenia de la captación hepática (Chaffe et al. J. Clin. Invest. 89: 1643-1651 (1992); Pyatak y col., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 29: 113-127 (1980)). La PEGilación de interleucina 2 ha sido presentada por aumentar su potencia antitumoral *in vivo* (Katre y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84: 1487-1491 (1987)) y la PEG-ilación de F(ab')₂ procedente del anticuerpo monoclonal A7 ha mejorado su localización tumoral (Kitamura y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 1387-1393 (1990)). De este modo, en otra realización preferida, mediante el procedimiento desvelado en el presente documento, aumenta la semivida *in vivo* de un péptido

derivatizado con un polímero soluble en agua, con respecto a la semivida *in vivo* del péptido no derivatizado.

El aumento de la semivida *in vivo* del péptido de los conjugados de la invención se expresa mejor en forma de intervalo de aumento de porcentaje de esta cantidad. El extremo inferior del intervalo del aumento en porcentaje es de aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 100 %, aproximadamente el 150 % o aproximadamente el 200 %. El extremo superior del intervalo es de aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 100 %, aproximadamente el 150 % o mayor de aproximadamente el 250 %.

En una realización a modo de ejemplo, el engarce entre el péptido y el resto seleccionado incluye un grupo de engarce de glucosilo intacto interpuesto entre el péptido y el polímero soluble en agua. Como se ha comentado en el presente documento, la unión del polímero soluble en agua al resto de azúcar (o el uso de un núcleo de ramificación de azúcar) proporciona un "azúcar modificado" que es reconocido por una enzima transferasa apropiada, que provoca el anexado del azúcar modificado sobre el péptido. El componente de sacárido del azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido y un resto seleccionado, se convierte en un "grupo de engarce de glucosilo", por ejemplo, un "grupo de engarce de glucosilo intacto". El grupo de engarce de glucosilo está formado a partir de cualquier mono- u oligo-sacárido que, tras la modificación con el polímero soluble en agua, es un sustrato para una transferasa apropiada.

Normalmente, los conjugados desvelados en el presente documento corresponden a la estructura general:



en la que los símbolos a, b, c, d y s representan un número entero positivo y que no es cero; y t es 0 o un número entero positivo. El "agente" es un polímero soluble en agua ramificado desvelado en el presente documento. De manera alternativa, el azúcar-agente es proporcionado por un polímero soluble en agua ramificado basado en un núcleo de ramificación de sacárido. El engarce puede ser cualquiera de un amplio conjunto de grupos de engarce, *infra*. De manera alternativa, el engarce puede ser un enlace sencillo o un "engarce de orden cero". La identidad del péptido es sin limitación.

En una realización a modo de ejemplo, el polímero soluble en agua es PEG, m-PEG, PPG o m-PPG y el polímero soluble en agua ramificado está unido covalentemente al péptido mediante un grupo de engarce de glucosilo intacto. El grupo de engarce de glucosilo se encuentra unido covalentemente a un resto de amino o a un resto glucosilo del péptido. De manera alternativa, el grupo de engarce de glucosilo se encuentra unido a una o más unidades de glucosilo de un glucopéptido. También se desvelan conjugados en los cuales el grupo de engarce de glucosilo (por ejemplo, GalNAc) se encuentra unido a un resto de aminoácido (por ejemplo, Thr o Ser).

Además de proporcionar conjugados que están formados a través de un grupo de engarce de glucosilo intacto añadido de forma enzimática, el procedimiento desvelado en el presente documento proporciona conjugados que son altamente homogéneos en sus patrones de sustitución. Usando los procedimientos desvelados en el presente documento, es posible formar los conjugados peptídicos en los cuales esencialmente todos los restos glucídicos modificados a través de la población de conjugados desvelados en el presente documento se encuentran unidos a un resto glucosilo o aminoácido estructuralmente idéntico. También se desvela un conjugado peptídico que tiene una población de restos de polímeros solubles en agua, ramificados, que se encuentran unidos covalentemente al péptido a través de un grupo de engarce de glucosilo, por ejemplo, un grupo de engarce de glucosilo intacto. En un conjugado preferido, esencialmente cada miembro de la población se encuentra unido mediante un grupo de engarce de glucosilo a un resto glucosilo del péptido, y cada resto de glucósido del péptido al cual se encuentra unido el grupo de engarce de glucosilo presenta la misma estructura.

También se desvela un conjugado peptídico que tiene una población de restos de polímeros solubles en agua ramificados unidos covalentemente al mismo a través de un grupo de engarce de glucosilo intacto. En una realización preferida, esencialmente cada miembro de la población de restos de polímeros solubles en agua ramificados se encuentra unido a un resto de aminoácido del péptido mediante un grupo de engarce de glucosilo intacto, y cada resto de aminoácido que tiene un grupo de engarce de glucosilo intacto unido al mismo presenta la misma estructura.

También se desvelan conjugados análogos a los descritos anteriormente en los cuales el péptido se conjuga de manera adicional con un resto terapéutico, resto diagnóstico, resto de dirección, resto de toxina o similar mediante un grupo de engarce de glucosilo intacto. Cada uno de los restos citados anteriormente puede ser una molécula pequeña, polímero natural (por ejemplo, polipéptido) o un polímero sintético.

En otra realización más, la invención proporciona conjugados que se ubican de forma selectiva en un tejido particular debido a la presencia de un agente de dirección como componente del conjugado. En una realización a

modo de ejemplo, el agente de dirección es una proteína. Las proteínas a modo de ejemplo incluyen transferrina (cerebro, acumulaciones de sangre), HS-glucoproteína (hueso, cerebro, acumulaciones de sangre), anticuerpos (cerebro, tejido con anticuerpo-antígeno específico, acumulaciones de sangre), factores de coagulación V-XII (tejidos dañados, coágulos, cáncer, acumulaciones de sangre), proteínas de suero, por ejemplo, glucoproteína α -ácida, fetuína, proteína α -fetal (cerebro, acumulaciones de sangre), glucoproteína- β 2 (hígado, placas ateroscleróticas, cerebro, acumulaciones de sangre), G-CSF, GM-CSF, M-CSF y EPO (estimulación inmunológica, cáncer, acumulaciones de sangre, sobreproducción glóbulos rojos sanguíneos, neuroprotección), albúmina (aumento de la semivida), IL-2 y IFN- α .

En realizaciones a modo de ejemplo, el conjugado se forma entre un polímero soluble en agua ramificado y un péptido glucosilado o no glucosilado. El polímero, resto terapéutico o biomolécula se conjuga al péptido mediante un grupo de engarce de glucosilo intacto, que se interpone entre, y que se une covalentemente tanto al péptido como al grupo de modificación (por ejemplo, polímero soluble en agua). El procedimiento incluye poner en contacto el péptido con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una glucotransferasa para la cual el azúcar modificado constituye un sustrato. La reacción se realiza en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido. El resto de azúcar del azúcar modificado está preferentemente seleccionado entre azúcares de nucleótido, azúcares activados y azúcares, que ni son nucleótidos ni están activados.

El péptido aceptor (glucosilado o no glucosilado) se sintetiza normalmente *de novo*, o se expresa de manera recombinante en una célula procariota (por ejemplo, célula bacteriana, tal como *E. coli*) o una célula eucariota tal como una célula de mamífero, levadura, insecto, hongo o planta. El péptido puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento. Además, el péptido puede ser natural o un péptido mutado. En una realización a modo de ejemplo, el péptido incluye una mutación que añade uno o más sitios de glucosilación de consenso a la secuencia peptídica.

El procedimiento desvelado en el presente documento también proporciona la modificación de los péptidos glucosilados de forma incompleta que se producen de forma recombinante. Muchas glucoproteínas producidas de forma recombinante están glucosiladas de forma incompleta, exponiendo restos de carbohidrato que pueden tener propiedades no deseadas, por ejemplo, inmunogenia, reconocimiento por parte de RES. Por medio del empleo de un azúcar modificado en el procedimiento desvelado en el presente documento, el péptido se puede someter a glucosilación y derivatización de forma simultánea con, por ejemplo, un polímero soluble en agua, un agente terapéutico o similares. El resto azúcar del azúcar modificado puede ser el resto que se conjugaría de forma apropiada con el aceptor en un péptido completamente glucosilado, u otro resto de azúcar con propiedades deseables.

La Tabla 1 muestra componentes peptídicos a modo de ejemplo de los conjugados de la invención.

Tabla 1

<u>Hormonas y Factores de Crecimiento</u>	<u>Receptores y Quiméricos</u>
<ul style="list-style-type: none"> • G-CSF • GM-CSF • M-CSF • TPO • EPO • Variantes de EPO • Alfa-TNF • Leptina 	<p><u>Receptores</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • CD4 • Receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) • Alfa-CD20 • MAb-CD20 • MAb-alfa-CD3 • Receptor MAb-TNF • MAb-CD4 • PSGL-1 • MAb-PSGL-1 • Complemento • GlyCAM o su quimera
<p><u>Enzimas e Inhibidores</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • t-PA • Variantes de t-PA • Uroquinasa • Factores VII, VIII, IX, X • Dnasa • Glucocerebrosidasa • Hirudina • Antitripsina α1 • Antitrombina III 	<p><u>Anticuerpos monoclonales</u></p> <p>(Inmunoglobulinas)</p> <ul style="list-style-type: none"> • MAb-anti-RSV • MAb-anti-receptor-IL-2 • MAb-anti-CEA • MAb-anti-plaqueta IIb/receptor IIIa • MAb-anti-EGF • MAb-anti-receptor Her-2
<p><u>Citocinas y Citocinas Quiméricas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Interleucina-1 (IL-1), 1B, 2, 3, 4 • Interferon-alfa (IFN-alfa) • INF-alfa-2b • IFN-beta 	<p><u>Células</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Eritrocitos • Leucocitos (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos, linfocitos NK,

		neutrófilos, monocitos y similares)
•	IFN-gamma	
•	Toxina diftérica quimérica-IL-2	• Células madre

Otros componentes peptídicos a modo de ejemplo de los conjugados de la invención incluyen miembros de la familia de las inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos, moléculas MHC, receptores de linfocitos T y similares), receptores intercelulares (por ejemplo, integrinas, receptores de hormonas o factores de crecimiento y similares), lectinas y citocinas (por ejemplo, interleucinas). Ejemplos adicionales incluyen el activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA), renina, factores de coagulación, tales como factores V-XII, bombesina, trombina, factor de crecimiento hematopoyético, factores estimuladores de colonias, antígenos virales, proteínas del complemento, antitripsina- α 1, eritropoyetina, ligando-1 de glucopéptido de P-selectina (PSGL-1), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, anti-trombina III, interleucinas, interferones, proteínas A y C, fibrinógeno, herceptina, leptina, glucosidasas, HS-glucoproteína, proteínas séricas (por ejemplo, glucoproteína α -ácida, fetuína, proteína fetal- α), glucoproteína- β 2, entre muchos otros. Este listado de polipéptidos es a modo de ejemplo, no exclusivo. El componente peptídico del conjugado también puede incluir proteínas de fusión y quiméricas, incluyendo, pero sin limitación, proteínas quiméricas que incluyen un resto de una inmunoglobulina, tal como IgG, o un fragmento de una inmunoglobulina, por ejemplo, FAb (dominio Fc). En el Apéndice 1, se muestran péptidos aún más a modo de ejemplo, que pueden estar modificados mediante los procedimientos desvelados en el presente documento. Se pretende que los péptidos a modo de ejemplo proporcionados en el presente documento proporcionen una selección de péptidos con la cual se pueda llevar a la práctica la presente invención; de manera que no sean limitantes. Los expertos apreciarán que la invención se puede llevar a la práctica usando sustancialmente cualquier péptido procedente de cualquier fuente.

Los componentes peptídicos de los conjugados de la invención pueden ser péptidos sintéticos o naturales o pueden ser péptidos mutados, producidos mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida. Normalmente, la glucosilación de péptidos es bien con engarce-N o con engarce-O. Un engarce-N a modo de ejemplo es la unión del azúcar modificado a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias del tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en la 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 asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en el polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación con engarce-O se refiere a la unión de un azúcar (por ejemplo, N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa) a la cadena lateral hidroxilo de un hidroxiaminoácido, preferentemente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

De manera adicional, además de los péptidos, el componente del conjugado que se conjuga con el polímero soluble en agua, ramificado de la presente invención puede ser una estructura biológica distinta de un péptido (por ejemplo, glucolípidos, lípidos, esfingolípidos, ceramidas, células completas y similares).

La adición de sitios de glucosilación a un péptido u otra estructura se consigue de manera apropiada modificando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga uno o más sitios de glucosilación. La adición se puede realizar mediante mutación o mediante síntesis química completa del péptido. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos del péptido se modifica realizando cambios en la cantidad de ADN, en particular mediante mutación del ADN que codifica el péptido en las bases preseleccionadas de manera que los codones generados se traducirán en los aminoácidos deseados. Preferentemente, la(s) mutación(es) de ADN se realizan usando procedimientos conocidos en la técnica.

En una realización a modo de ejemplo, el sitio de glucosilación se añade redistribuyendo polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican un péptido candidato se pueden modular con protocolos de redistribución de ADN. La redistribución de ADN es un procedimiento de recombinación repetitiva y mutación, realizada por fragmentación aleatoria de un grupo de genes relacionados, seguido de re-ensamblado de los fragmentos mediante un procedimiento de tipo reacción en cadena de polimerasa. Véase, por ejemplo, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 10747-10751 (1994); Stemmer, Nature 370:389-391 (1994); y las patentes de Estados Unidos N^o 5.605.793, 5.837.458, 5.830.721 y 5.811.238.

Los conjugados de la invención también pueden incluir un péptido al que se ha añadido, o del cual se ha eliminado, uno o más restos glucosilo seleccionados, después de lo cual se conjuga un azúcar modificado con al menos uno de los restos glucosilo seleccionados del péptido. La presente realización resulta útil, por ejemplo, cuando se desea conjugar el azúcar modificado con un resto glucosilo seleccionado que no se encuentra presente en un péptido o que no se encuentra presente en la cantidad deseada. De este modo, antes del acoplamiento del azúcar modificado al péptido, se conjuga el resto glucosilo seleccionado con el péptido mediante acoplamiento enzimático o químico. En otra realización, se modifica el patrón de glucosilación de un glucopéptido antes de la conjugación del azúcar modificado mediante la eliminación de un resto de carbohidrato del glucopéptido. Véase, por ejemplo, el documento WO 98/31826.

La adición o la eliminación de cualquier resto carbohidrato presente en el glucopéptido se realiza de modo químico o

enzimático. Preferentemente, la desglucosilación química se realiza mediante exposición de la variante de polipéptido al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento tiene como resultado la escisión de la mayoría de los azúcares excepto el azúcar de engarce (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), al tiempo que deja el péptido intacto. La desglucosilación química es descrita por Hakimuddin y col., Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) y por parte de Edge y col., Anal. Biochem. 118: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de carbohidrato sobre variantes de polipéptido se puede conseguir mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas como se describe por parte de Thotakura y col., Meth. Enzymol. 138: 350 (1987).

La adición química de restos glucosilo se realiza mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. La adición enzimática de restos glucídicos se consigue preferentemente usando una modificación de los procedimientos explicados en el presente documento, sustituyendo los azúcares modificados usados en la invención por unidades de glucosilo nativo. Otros procedimientos de adición de restos glucídicos se describen en las patentes de Estados Unidos Nº 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554 y 5.922.577.

Los puntos de unión a modo de ejemplo para los restos glucosilo seleccionados incluyen, aunque sin limitación: (a) sitios de consenso para glucosilación-O y -N; (b) restos glucosilo terminales que son aceptores para una glucosiltransferasa, (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) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (h) el grupo amida de glutamina. Los procedimientos a modo de ejemplo para ser usados en la presente invención se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM., pág. 259-306 (1981).

También se desvela un procedimiento para engarzar dos o más péptidos a través de un grupo de engarce. El grupo de engarce es cualquier estructura útil y puede estar seleccionado entre estructuras de cadena lineal o de cadena ramificada. Preferentemente, cada extremo del engarce, al cual se encuentra unido el péptido, incluye un azúcar modificado (es decir, un grupo de engarce de glucosilo intacto creciente).

En un procedimiento a modo de ejemplo, se engarzan dos péptidos juntos mediante un resto de engarce que incluye un engarce de polímero soluble en agua ramificado. La construcción conforma la estructura general que se explica en el dibujo anterior. Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, la construcción incluye dos grupos de engarce de glucosilo intactos (es decir, $s + t = 1$). El foco sobre el engarce de PEG que incluye dos grupos glucosilo es por motivos de claridad y no debería interpretarse como limitante de la identidad de los brazos del engarce para ser usado en la presente realización.

Azúcares Modificados

Preferentemente, las especies donadoras de glucosilo ("azúcares modificados") están seleccionadas entre nucleótidos de azúcar modificados, azúcares modificados activados y azúcares modificados que son sacáridos simples que ni son nucleótidos ni están activados. Se puede incorporar cualquier estructura de carbohidrato deseada en el conjugado de la invención. Normalmente, la estructura será un monosacárido, pero la presente invención no se encuentra limitada al uso de azúcares de monosacárido modificados; oligosacáridos y polisacáridos también resultan útiles.

El grupo de modificación se encuentra unido a un resto de azúcar por medios enzimáticos, medios químicos o una de sus combinaciones, produciendo de este modo un azúcar modificado. Los azúcares están sustituidos en cualquier posición que permita la unión del resto de modificación, y que también permita que el azúcar funcione como sustrato para la enzima usada para ligar el azúcar modificado al péptido. En una realización preferida, cuando el ácido siálico es el azúcar, el ácido siálico está sustituido con el grupo de modificación en la posición 9 de la cadena lateral de piruvilo o en la posición 5 del resto de amina que normalmente se encuentra acetilado del ácido siálico.

En determinadas realizaciones, se utiliza un nucleótido de azúcar modificado para añadir el azúcar modificado al péptido. Los nucleótidos de azúcar a modo de ejemplo que se usan en sus formas modificadas incluyen mono-, di- o trifosfatos de nucleótido o sus análogos. En una realización preferida, el nucleótido de azúcar modificado está seleccionado entre un UDP-glucósido, CMP-glucósido o un GDP-glucósido. Incluso más preferentemente, el nucleótido de azúcar modificado está seleccionado entre UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, GDP-manosa, GDP-fructosa, ácido CMP-siálico, o CMP-NeuAc. También se usan los derivados de acetilamina de los nucleótidos de azúcar en el procedimiento desvelado en la presente invención.

También se desvelan procedimientos para la síntesis de un péptido modificado usando un azúcar modificado, por ejemplo, galactosa modificada, -fucosa, -GalNAc y ácido siálico. Cuando se usa un ácido siálico modificado, se puede usar una sialiltransferasa o una trans-sialidas (únicamente para el ácido siálico con engarce- α 2,3) en los presentes procedimientos.

En otras realizaciones, el azúcar modificado es un azúcar activado. Los azúcares modificados activados, que resultan útiles son normalmente glucósidos que han sido modificados de forma sintética para incluir un grupo

saliente activado. Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo saliente activado" se refiere a los grupos que son fácilmente desplazados en las reacciones de sustitución nucleófila reguladas por enzimas. Se conocen muchos azúcares activados en la técnica. Véase, por ejemplo, Vocadlo y col., en CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOLOGY, Vol. 2, Ernst y col., Wiley-VCH Verlag; Weinheim, Alemania, 2000; Kodama y col., Tetrahedron Lett. 34: 6419 (1993); Loughedd y col., J. Biol. Chem. 274: 37717 (1999).

Los ejemplos de grupos de activación (grupos salientes) incluyen flúor, cloro, bromo, éster de tosilato, éster de mesilato, éster de triflato y similares. Los grupos salientes activados preferidos son los que no impiden estéricamente significativamente la transferencia enzimática de glucósido al aceptor. Por consiguiente, las realizaciones preferidas de derivados de glucósido activado incluyen fluoruros de glucosilo y mesilatos de glucosilo, siendo los fluoruros de glucosilo particularmente preferidos. Entre los fluoruros de glucosilo, los más preferidos son 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.

A modo de ilustración, se pueden preparar fluoruros de glucosilo a partir del azúcar libre en primer lugar acetilando el azúcar y posteriormente tratándolo con HF/piridina. Esto genera el anómero más estable termodinámicamente del fluoruro de glucosilo (acetilado) protegido (es decir, el fluoruro de α -glucosilo). Si se desea el anómero menos estable (es decir, el fluoruro de β -glucosilo), se puede preparar mediante conversión del azúcar para-acetilado con HBr/HOAc o con HCl para generar cloruro o bromuro anomérico. Este intermedio se hace reaccionar con una sal de fluoruro tal como fluoruro de plata para genera el fluoruro de glucosilo. Los fluoruros de glucosilo acetilados se pueden desproteger mediante reacción con una base suave (catalítica) en metanol (por ejemplo NaOMe/MeOH). Además, muchos fluoruros de glucosilo se encuentran disponibles en el mercado.

Se pueden preparar otros derivados de glucosilo activados usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden preparar los mesilatos de glucosilo mediante tratamiento de la forma de hemiacetal completamente bencilado del azúcar con cloruro de mesilo, seguido de hidrogenación catalítica para eliminar los grupos bencilo.

En otra realización a modo de ejemplo, el azúcar modificado es un oligosacárido que tiene una estructura de antena. En una realización preferida, uno o más de los extremos de la antena soportan el resto de modificación. Cuando más de un resto de modificación se encuentran unidos a un oligosacárido que tiene una estructura de antena, el oligosacárido resulta útil para "amplificar" el resto de modificación; cada unidad de oligosacárido conjugada al péptido une copias múltiples del grupo de modificación al péptido. La estructura general de un conjugado peptídico como se explica en el dibujo anterior, engloba especies multivalentes procedentes de la preparación de un conjugado de la invención utilizando una estructura de antena. Muchas estructuras de sacárido de antena resultan conocidas en la técnica, y el presente procedimiento se puede poner en práctica con ellas sin limitación.

En general, el resto de azúcar y el grupo de modificación se encuentran engarzados juntos a través del uso de grupos reactivos, que normalmente están transformados por el procedimiento de engarce para dar lugar a un grupo funcional orgánico o a especies no reactivas. El(los) grupo(s) funcional(es) reactivo(s) de azúcar está(n) ubicado(s) en cualquier posición sobre el resto de azúcar.

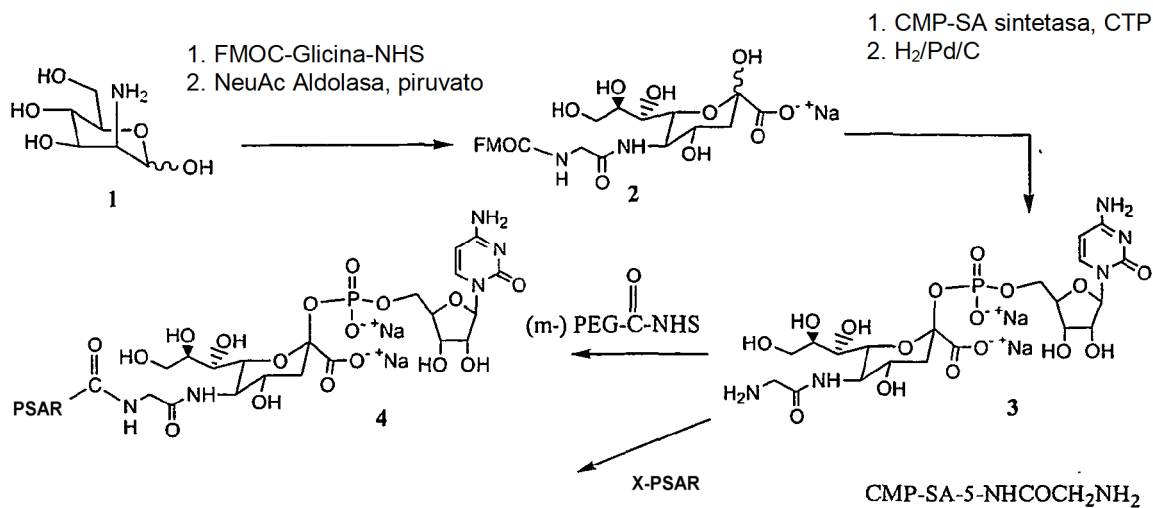
En la discusión que sigue, se explica un número de ejemplos específicos de azúcares modificados que resultan útiles en la práctica de la presente invención. En las realizaciones a modo de ejemplo, se utiliza un derivado de ácido siálico como núcleo de azúcar al cual se une el grupo de modificación. El foco de la discusión sobre los derivados de ácido siálico es únicamente por cuestiones de claridad de ilustración y no debe interpretarse como limitante del alcance de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que se puede activar una variedad de restos glucídicos y se puede derivatizar de una manera análoga a la explicada usando ácido siálico como ejemplo. Por ejemplo, numerosos procedimientos se encuentran disponibles para la modificación de galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y fucosa por nombrar unos pocos sustratos de azúcar, que se modifican fácilmente mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Elhalabi y col., Curr. Med. Chem. 6:93 (1999); y Schafer y col., J. Org. Chem. 64: 24 (2000).

En una realización a modo de ejemplo, el péptido que se modifica mediante el procedimiento desvelado en el presente documento es un glucopéptido que se produce en células procariotas (por ejemplo, *E. coli*), células eucariotas incluyendo levaduras y células de mamíferos (por ejemplo, células CHO) o en un animal transgénico y, de este modo, contiene cadenas de oligosacáridos con engarce-O y/o -N, que se encuentran completamente sialiladas. Las cadenas de oligosacáridos del glucopéptido que carecen de un ácido siálico y que contienen resto de galactosa terminal se pueden someter a gluco-PEG-ilación, gluco-PPG-ilación o, de lo contrario, se pueden modificar con un ácido siálico modificado.

En el Esquema 2, se trata el amino glucósido **1**, con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (por ejemplo, glicina), convirtiéndose el resto de amina del azúcar en el correspondiente aducto de amida de aminoácido protegido. Se trata el aducto con una aldolasa para formar un α -hidroxi carboxilato **2**. El compuesto **2** es convertido en el correspondiente derivado CMP mediante la acción de CMP-SA sintetasa, seguido de la hidrogenación

catalítica del derivado de CMP para producir el compuesto **3**. Se utiliza la amina introducida mediante la formación del aducto de glicina como locus de unión de PEG o PPG, haciendo reaccionar el compuesto **3** con un derivado de PPG (m-) o PEG (m-) activado (por ejemplo, PEG-C(O)NHS, PPG-C(O)NHS), produciendo **4** o **5**, respectivamente.

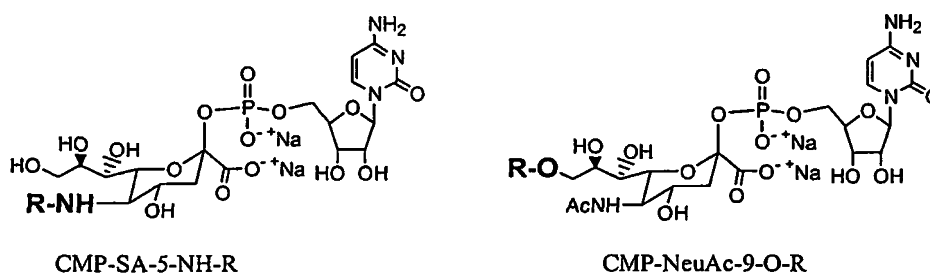
Esquema 2

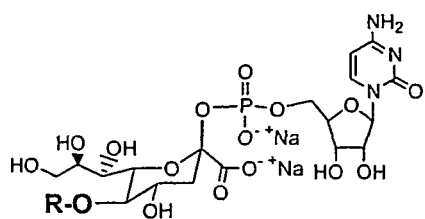


- 5 en el que X-PSAR es un polímero soluble en agua, ramificado y activado de la invención, y PSAR es un polímero soluble en agua ramificado.

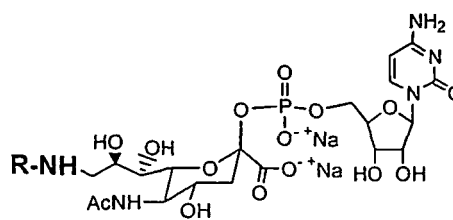
La Tabla 2 muestra los ejemplos representativos de monofosfatos de azúcar que son derivatizados con un resto de PEG o PPG. Determinados compuestos de la Tabla 2 se preparan mediante el procedimiento del Esquema 4. Se preparan otros derivados mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kepler y col., *Glycobiology* 11:11 R (2001); y Charter y col., *Glycobiology* 10: 1049 (2000). Otros análogos de PEG y PPG reactivos de amina se encuentran disponibles en el mercado, o se pueden preparar mediante procedimientos fácilmente accesibles por parte del experto en la materia.

Tabla 2

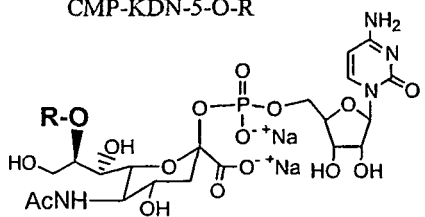




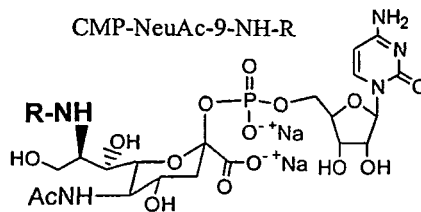
CMP-KDN-5-O-R



CMP-NeuAc-9-NH-R

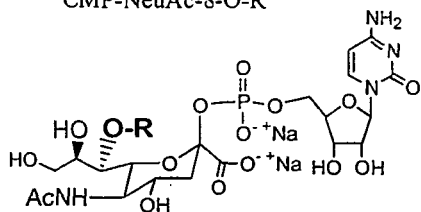


CMP-NeuAc-8-O-R

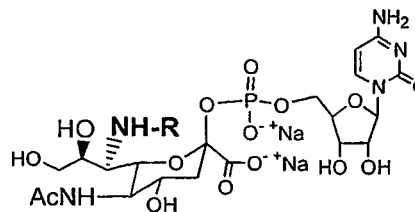


CMP-NeuAc-8-NH-R

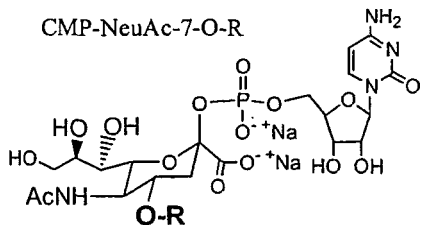
CMP-NeuAc-8-O-R



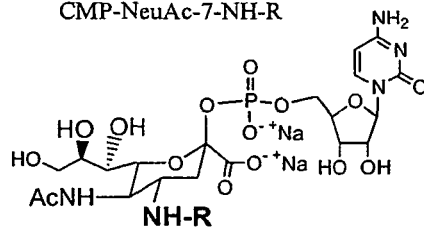
CMP-NeuAc-7-O-R



CMP-NeuAc-7-NH-R



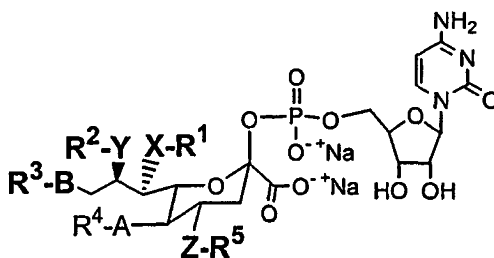
CMP-NeuAc-4-O-R



CMP-NeuAc-4-NH-R

en las que R es un polímero soluble en agua ramificado de la presente invención.

- 5 Los fosfatos de azúcar modificados para su uso en la práctica de la presente invención pueden estar sustituidos en otras posiciones así como también los mostrados anteriormente. Actualmente, las sustituciones preferidas de ácidos siálico se muestran a continuación:



- 10 en la que X es un grupo de engarce, que preferentemente está seleccionado entre -O-, -N(H)-, -S-, CH₂- y -N(R)₂ en el que cada R es un miembro que está seleccionado independientemente entre R¹-R⁵. Los símbolos Y, Z, A y B representan cada uno un grupo que está seleccionado entre el grupo mostrado anteriormente para la identidad de X. X, Y, Z, A y B están seleccionados cada uno independientemente y, por tanto, pueden ser iguales o diferentes. Los símbolos R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ representan H, o un polímero soluble en agua ramificado. De manera alternativa, estos

símbolos representan un engarce que se encuentra unido a un polímero soluble en agua ramificado.

Grupos de Reticulación

La preparación del azúcar modificado para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento incluye la unión de un grupo de modificación a un resto de azúcar y la formación de un aducto estable, que es un sustrato para glucosiltransferasa. El azúcar y el grupo de modificación se pueden acoplar mediante un agente de reticulación de orden cero o superior. Los compuestos bifuncionales a modo de ejemplo que se pueden usar para unir los grupos de modificación a los restos de carbohidrato incluyen, aunque sin limitación, poli(etilenglicoles) bifuncionales, poliamidas, poliéteres, poliésteres y similares. Los enfoques generales para el engarce de carbohidratos a otras moléculas resultan conocidos en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Lee y col., *Biochemistry* 28: 1856 (1989); Bhatia y col., *Anal. Biochem.* 178: 408 (1989); Janda y col., *J. Am. Chem. Soc.* 112: 8886 (1990) y Bednarski y col., documento WO 92/18135. En la discusión siguiente, los grupos reactivos son tratados como benignos en el resto azúcar del azúcar modificado creciente. El foco de la discusión es por cuestiones de claridad de ilustración. Los expertos en la materia apreciarán que la discusión también resulta relevante para los grupos reactivos del grupo de modificación.

Una estrategia a modo de ejemplo implica la incorporación de un sulfhidrilo protegido sobre el azúcar usando el SPDP de agente de reticulación heterobifuncional (n-succinimidil-3-(2-pirridil)propionato y posteriormente desprotegiendo el sulfhidrilo para la formación de un enlace de disulfuro con otro sulfhidrilo sobre el grupo de modificación.

Si SPDP afecta negativamente a la capacidad del azúcar modificado de actuar como sustrato de glucosiltransferasa, se usa uno de un conjunto de otros agentes de reticulación tal como 2-iminotiolano o N-succinimidil S-acetilacetato (SATA) para formar un enlace de disulfuro. El 2-iminotiolano reacciona con aminas primarias, incorporando de forma instantánea un sulfhidrilo no protegido en la molécula que contiene amina. SATA también reacciona con aminas primarias, pero incorpora un sulfhidrilo protegido, que posteriormente se somete a desacetilación usando hidroxilamina para producir un sulfhidrilo libre. En cada caso, el sulfhidrilo incorporado se encuentra libre para reaccionar con otros sulfhidrilos o sulfhidrilo protegido, tal como SPDP, formando el enlace disulfuro requerido.

La estrategia anteriormente descrita resulta a modo de ejemplo, y no limitante, en cuanto a engarces para ser usados en la invención. Otros agentes de reticulación se encuentran disponibles y se pueden usar en estrategias diferentes para la reticulación del grupo de modificación con el péptido. Por ejemplo, hidrazida de TPCH(S-(2-tiopiridil)-L-cisteína y TPMPH ((S-(2-tiopiridil) mercapto-propionohidrazida) reaccionan con restos de carbohidrato que han sido previamente oxidados mediante tratamiento suave con peryodato, formándose de este modo un enlace de hidrazina entre la parte de hidrazina del agente de reticulación y los aldehídos generados por el peryodato. TPCH y TPMPH introducen un grupo sulfhidrilo protegido por 2-piridiltiona en el azúcar, que se puede desproteger con DTT y posteriormente se puede usar para conjugación, tal como la formación de enlaces de disulfuro entre componentes.

Si se encuentra que el enlace de disulfuro resulta inapropiado para producir azúcares modificados estables, se pueden usar otros agentes de reticulación que incorporen enlaces más estables entre los componentes. Los agentes de reticulación heterobifuncionales GMBS (N-gama-malimidobutiriloxi)succinimida) y SMCC (succinimidil-4-(N-maleimido-metil)ciclohexano) reaccionan con aminas primarias, introduciendo de este modo un grupo maleimida en el componente. El grupo maleimida puede reaccionar posteriormente con sulfhidrilos del otro componente, que pueden haber sido introducidos mediante los agentes de reticulación mencionados anteriormente, formando de este modo un enlace de tioéter estable entre los componentes. Si el impedimento estérico entre los componentes interfiere con la actividad del componente o con la capacidad del azúcar modificado para actuar como sustrato de glucosiltransferasa, se pueden usar agentes de reticulación que introduzcan brazos espaciadores largos entre los componentes y que incluyan derivados de algunos de los agentes de reticulación previamente mencionados (por ejemplo, SPDP). De este modo, existe una abundancia de agentes de reticulación apropiados, que resultan útiles; cada uno de los cuales se encuentra seleccionado dependiendo de los efectos que tiene sobre el conjugado óptimo de péptido y la producción de azúcar modificado.

Se usa una variedad de reactivos para modificar los componentes del azúcar modificado con reticulaciones químicas intramoleculares (para revisión de los reactivos de reticulación y los procedimientos de reticulación véase: Wold, F., *Meth. Enzymol.* 25: 623-561, 1972; Weetall, H. H., y Cooney, D.A. en: *ENZYMES AS DRUGS* (Holcenberg y Roberts eds.) pág. 395-442, Wiley, Nueva York, 1981; Ji, T.H., *Meth. Enzymol.* 91: 580-609, 1983; Mattson y col., *Mol. Biol. Repág.* 17: 167-183-1993). Los reactivos de reticulación preferidos proceden de diferentes reactivos de reticulación homo-bifuncionales y hetero-bifuncionales de longitud cero. Los reactivos de reticulación de longitud cero incluyen la conjugación directa de dos grupos químicos intrínsecos sin introducción de material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de un enlace disulfuro pertenecen a esta categoría. Otro ejemplo son los reactivos que inducen la condensación de un grupo carboxilo y amino primario para formar un enlace de amida tal como las carbodiimidias, etilcloroformiato, reactivo de Woodward K (2-etil-5-fenilisoazolío-3'-sulfonato) y carbonildiimidazol. Además de estos reactivos químicos, se puede usar la enzima transglutaminas (glutamil-péptido- γ -glutamiltransferasa; EC 2.32.13) como reactivo de reticulación de longitud cero. Esta enzima cataliza las

reacciones de transferencia de acilo en los grupos carboxamida de restos de glutamilo unidos a proteína, normalmente con un grupo amino primario como sustrato. Los reactivos homo- y hetero-bifuncionales preferidos contienen dos sitios disimilares o idénticos, respectivamente, que pueden ser reactivos frente a amino, sulfhidrilo, guanidino, indol o grupos no específicos.

5 *i. Sitios Específicos Preferidos en los Reactivos de Reticulación*

1. *Grupos Reactivos con Amino*

En una realización preferida, los sitios del agente de reticulación son los grupos reactivos con amino. Ejemplos no limitantes útiles de grupos reactivos con amino incluyen ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), imidoésteres, isocianatos, haluros de acilo, arilazidas, ésteres de p-nitrofenilo, aldehídos y cloruros de sulfonilo.

10 Preferentemente, los ésteres de NHS reaccionan con los grupos amino primarios (incluyendo los aromáticos) de un componente de azúcar modificado. Se sabe que los grupos imidazol compiten con las aminas primarias en la reacción, pero los productos de reacción son inestables y se hidrolizan fácilmente. La reacción implica el ataque nucleófilo de una amina sobre el carboxilo ácido de un éster de NHS para formar una amida, liberando la N-hidroxisuccinimida. De este modo, se pierde la carga positiva del grupo amino original.

15 Los imidoésteres son los reactivos acilantes más específicos para la reacción con los grupos amina de los componentes de azúcar modificado. A un pH entre 7 y 10, los imidoésteres reaccionan únicamente con las aminas primarias. Las aminas primarias atacan a los imidatos de forma nucleófila para producir un intermedio que se rompe hasta dar una amidina a pH elevado o para dar un nuevo imidato a pH bajo. El nuevo imidato puede reaccionar con otra amina primaria, produciendo de este modo la reticulación de dos grupos amino, un caso de un imidato monofuncional en sentido supuesto que reacciona bifuncionalmente. El producto de reacción principal con las aminas primarias es una amidina que es una base más fuerte que la amina original. Por tanto, la carga positiva del grupo amino original queda retenida.

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

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

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

Los ésteres de p-nitrofenilo de ácidos mono- y dicarboxílicos también son grupos útiles reactivos con amino. Aunque la especificidad del reactivo no es muy elevada, parece que los grupos α - y ϵ -amino son los que más rápido reaccionan.

35 Los aldehídos tales como glutaraldehído reaccionan con las aminas primarias del azúcar modificado. Aunque se forman las bases de Schiff inestables tras la reacción de los grupos amino con los aldehídos de los aldehídos, el glutaraldehído es capaz de modificar el azúcar modificado con reticulaciones estables. A pH 6-8, el pH de las condiciones de reticulación típicas, los polímeros cíclicos experimentan deshidratación para formar polímeros de aldehído α,β -insaturados. No obstante, las bases de Schiff son estables, cuando se conjugan con otro doble enlace. La interacción resonante de ambos dobles enlaces evita la hidrólisis del engarce de Schiff. Además, las aminas a concentraciones locales elevadas pueden atacar el doble enlace etilénico para formar un producto de adición de Michael estable.

45 Los cloruros de sulfonilo aromáticos reaccionan con una variedad de sitios de los componentes de azúcar modificados, pero la reacción con los grupos amino es la más importante, dando lugar a un engarce de sulfonamida estable.

2. *Grupos Reactivos con Sulfhidrilo*

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

50 Preferentemente, las maleimidias reaccionan con el grupo sulfhidrilo de los componentes del azúcar 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. No obstante, a pH 7, el grupo maleimida puede ser considerado un grupo específico de sulfhidrilo, 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 los grupos sulfhidrilo, sulfuros, imidazoles y grupos amino. No obstante, a pH desde neutro hasta ligeramente alcalino, los haluros de alquilo reaccionan principalmente con grupos sulfhidrilo para formar enlaces tioéter estables. A pH más elevado, la reacción con los grupos amino se ve favorecida.

5 Los disulfuros de piridilo reaccionan con sulfhidrilos libres mediante intercambio de disulfuro para proporcionar disulfuros mixtos. Como resultado de ello, los disulfuros de piridilo son los grupos reactivos con sulfhidrilo más específicos.

Las tioftalimidias reaccionan con los grupos sulfhidrilos libres para formar disulfuros.

3. Resto Reactivo con Carboxilo

10 En otra realización, se usan las carbodiimidias solubles tanto en agua como en un disolvente orgánico, como reactivos que reaccionan con carboxilo. Estos compuestos reaccionan con los grupos carboxilo libres formando una pseudourea que, posteriormente, se puede acoplar a aminas viables dando lugar a un engarce de amina, lo que muestra el modo de modificación de un grupo carboxilo con una carbodiimida (Yamada y col., *Biochemistry* 20: 4836-4842, 1981).

ii. Sitios Preferidos No Específicos en los Reactivos de Reticulación

15 Además del uso de restos reactivos de sitio específico, la presente invención contempla el uso de grupos reactivos no específicos para engarzar el azúcar con el grupo de modificación.

20 Los agentes de reticulación no específicos a modo de ejemplo incluyen grupos fotoactivables, completamente inertes en la oscuridad, que se convierten en especies reactivas tras la absorción de un fotón de la energía apropiada. En una realización preferida, los grupos fotoactivables están seleccionados entre precursores de nitrenos generados tras calentamiento o fotólisis de azidas. Los nitrenos deficientes en electrones son extremadamente reactivos y pueden reaccionar con un variedad de enlaces químicos incluyendo N-H, O-H, C-H y C=C. Aunque se pueden emplear tres tipos de azidas (derivados arilo, alquilo y acilo), en la actualidad se prefieren las arilazidas. La reactividad de las arilazidas tras la fotólisis es mejor con enlaces N-H y O-H que con el enlace C-H. Los arilnitrenos deficientes en electrones experimentan expansión rápida de anillo para formar deshidroazepinas, que tienden a reaccionar con nucleófilos, en lugar de formar productos de inserción de C-H. Se puede aumentar la reactividad de las arilazidas mediante la presencia de sustituyentes de extracción de electrones, tales como grupos nitro o hidroxilo, en el anillo. Dichos sustituyentes fuerzan el máximo de absorción de las arilazidas hasta longitudes de onda más elevadas. Las arilazidas no sustituidas presentan un máximo de absorción dentro del intervalo de 260-280 nm, mientras que las hidroxil y nitroarilazidas absorben luz significativa más allá de 305 nm. Por tanto, las hidroxil y nitroarilazidas son las más preferidas ya que permiten el empleo de condiciones de fotólisis para el componente de afinidad menos nocivas que las arilazidas no sustituidas.

25 En otra realización preferida, los grupos fotoactivables están seleccionados entre arilazidas fluoradas. Los productos de fotólisis de arilazidas fluoradas son arilnitrenos, experimentando todos ellos las reacciones características de este grupo, incluyendo la inserción de enlace C-H, con elevada eficacia (Keana y col., *J. Org. Chem.* 55: 3640-3647, 1990).

30 En otra realización, los grupos fotoactivables están seleccionados entre restos de benzofenona. De manera general, los reactivos de benzofenona proporcionan rendimientos de reticulación más elevados que los reactivos de arilazida.

35 En otra realización, los grupos fotoactivables están seleccionados entre compuestos diazo, que forman un carbeno deficiente en electrones tras la fotólisis. Estos carbonos experimentan una variedad de reacciones que incluyen la inserción en enlaces C-H, la adición a dobles enlaces (incluyendo sistemas aromáticos), la atracción de hidrógeno y la coordinación a centros nucleófilos para dar iones de carbono.

40 En otra realización, los grupos fotoactivables están seleccionados entre diazopiruvatos. Por ejemplo, el éster de p-nitrofenilo de diazopiruvato de p-nitrofenilo reacciona con aminas alifáticas para dar amidas de ácido diazopirúvico que experimentan fotólisis ultravioleta para formar aldehídos. El componente de afinidad modificada de diazopiruvato fotolizado reaccionará como el formaldehído o el glutaraldehído dando lugar a la formación de reticulaciones.

iii. Reactivos Homobifuncionales

1. Agentes de reticulación homobifuncionales reactivos con aminas primarias

45 La síntesis, propiedades y aplicaciones de agentes de reticulación reactivos con amina se describen comercialmente en la bibliografía (para revisiones de los procedimientos de reticulación y reactivos, véase lo anterior). Muchos reactivos se encuentran disponibles (por ejemplo, Pierce Chemical Company, Rockford, I11; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Los ejemplos no limitantes y preferidos de ésteres NHS homobifuncionales incluyen glutarato de disuccinimidilo (DSG), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis-2-(succinimidoxicarboniloxi)etilsulfona (BSOCOES), bis-2-

- 5 (sulfosuccimidoxi-carboniloxi)etilsulfona (sulfo-BSOCOES), bis(succinimidilsuccinato) de etilenglicol (EGS), bis (sulfosuccinimidilsuccinato) de etilenglicol (sulfo-EGS), ditiobis(sulfosuccinimidil-propionato) (DSP), ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (sulfo-DSP). Los ejemplos no limitantes y preferidos 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'-(dimetilenoxi)dipropionimidato de dimetilo (DDDP), 3,3'-(tetrametilendioxi)-dipropionimidato de dimetilo (DTDP) y 3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo (DTBP).
- 10 Los ejemplos no limitantes y preferidos de isotiocianatos homobifuncionales incluyen: p-fenilendiisotiocianato (DITC) y estilbena de ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico (DIDS).
- Los ejemplos no limitantes y preferidos de isocianatos homobifuncionales incluyen xilendiisocianato, toluen-2,4-diisocianato, toluen-2-isocianato-4-isotiocianato, 3-metoxidifenilmetano-4,4'-diisocianato, 2,2'-dicarboxi-4,4'-azofenildiisocianato y hexametildiisocianato.
- 15 Los ejemplos no limitantes y preferidos de haluros de arilo homobifuncionales incluyen 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno (DFD-NB) y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenil-sulfona.
- Los ejemplos no limitantes y preferidos de reactivos de aldehído alifático homobifuncionales incluyen glioxal, malondialdehído y glutaraldehído.
- Ejemplos no limitantes preferidos de reactivos acilantes homobifuncionales incluyen ésteres de nitrofenilo de ácidos dicarboxílicos.
- 20

Los ejemplos no limitantes y preferidos de cloruros de sulfonilo aromáticos y homobifuncionales incluyen cloruro de fenol-2,4-disulfonilo y cloruro de α -nafatol-2,4-disulfonilo.

Los ejemplos no limitantes y preferidos de reactivos homobifuncionales reactivos con amino adicionales incluyen eritritolbiscarbonato que reacciona con aminas para dar biscarbamatos.

5 *2. Agentes de Reticulación Homobifuncionales Reactivos con Grupos Sulfhidrilo Libres*

La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía (para revisiones de los procedimientos de reticulación y reactivos, véase lo anterior). Muchos reactivos se encuentran disponibles en el mercado (por ejemplo, Pierce Chemical Company, Rockford, I11; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Moleculare Probes, Inc., Eugene, OR).

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

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

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

3. Agentes de Reticulación Homobifuncionales Fotoactivables

20 La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía (para revisiones de los procedimientos de reticulación y reactivos, véase lo anterior). Algunos reactivos se encuentran disponibles en el mercado (por ejemplo, Pierce Chemical Company, Rockford, I11; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Moleculare Probes, Inc., Eugene, OR).

Los ejemplos no limitantes y preferidos del agente de reticulación homobifuncional fotoactivable incluyen bis- β -(4-azidosalicilamido)etildisulfuro (BASED), di-N-(2-nitro-4-azidofenil)-cistamina-S,S-dióxido (DNCO) y 4,4'-ditiobisfenilazida.

25 *iv. Reactivos Heterobifuncionales*

1. Reactivos Heterobifuncionales Reactivos con Amino con un Resto Disulfuro de Piridilo

30 La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía (para revisiones de los procedimientos de reticulación y reactivos, véase lo anterior). Muchos reactivos se encuentran disponibles en el mercado (por ejemplo, Pierce Chemical Company, Rockford, I11; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Moleculare Probes, Inc., Eugene, OR).

35 Los ejemplos no limitantes y preferidos de reactivos hetero-bifuncionales con un resto disulfuro de piridilo y un éster NHS reactivo con amino incluyen N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP), 6-3-(2-piridiltio)propionamidohexanoato de succinimidilo (LC-SPDP), 6-3(2-piridiltio)propionamidohexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LCSPDP), 4-succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridiltio)tolueno (SMPT) y 6- α -metil- α -(2-piridiltio)toluamidohexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT).

2. Reactivos Heterobifuncionales Reactivos con Amino con un Resto Maleimida

40 La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía. Los ejemplos no limitantes y preferidos de los reactivos hetero-bifuncionales con un resto maleimida y un éster NHS reactivo con amino 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).

3. Reactivos Heterobifuncionales Reactivos con Amino con un Resto Haluro de Alquilo

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

Un ejemplo preferido de un reactivo hetero-bifuncional con un éster NHS reactivo con amino y un resto de dihaluro de alquilo es 2,3-dibromopropionato N-hidroxisuccinimidilo (SDBP). SDBP introduce reticulaciones intramoleculares en el componente de afinidad mediante conjugación con sus grupos amino. La reactividad del resto dibromopropilo frente a los grupos amino primarios está controlada por la temperatura de reacción (McKenzie y col., Protein Chem. 7: 581-592 (1988)).

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

Otros agentes de reticulación resultan conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pomato y col., patente de Estados Unidos N° 5.965.106. Se encuentra dentro de las capacidades del experto en la materia escoger el agente de reticulación apropiado para una aplicación particular.

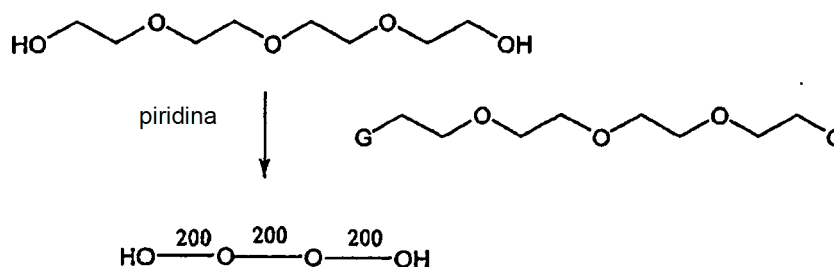
v. Grupos de Engarce Escindibles

En otra realización, el grupo de engarce está dotado con un grupo que se puede escindir para liberar el grupo de modificación a partir del resto de azúcar. Muchos grupos escindibles resultan conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Jung y col., Biochem. Biophys. Acta 761: 152-162 (1983); Joshi y col., J. Biol. Chem. 265: 14518-14525 (1990); Zarlino y col., J. Immunol. 124: 913-920 (1980); Bouiziar y col., Eur. J. Biochem. 155: 141-147 (1986); Park y col., J. Biol. Chem. 261: 205-210 (1986); Browning y col., J. Immunol. 143: 1859-1867 (1989). Además una amplia gama de grupos de engarce bifuncionales escindibles (tanto homo- como hetero-bifuncionales) se encuentra disponible en el mercado a partir de suministradores tales como Pierce.

Los restos escindibles a modo de ejemplo se pueden escindir usando luz, calor o reactivos tales como tioles, hidroxilamina, bases, peryodato y similares. Además, determinados grupos preferidos se escinden *in vivo* en respuesta al procedimiento de endocitosis (por ejemplo, cis-aconitilo, véase, Shen y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 1048 (1991)). Los grupos escindibles preferidos comprenden un resto escindible que es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en grupos disulfuro, éster, imida, carbonato, nitrobenzilo, fenacilo y benzoína.

Los Procedimientos

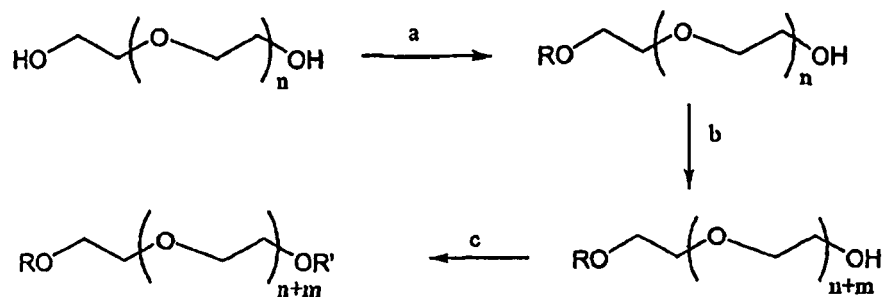
También se desvela un procedimiento para preparar una población esencialmente mono-dispersa de moléculas de poli(etilenglicol). El procedimiento incluye poner en contacto una molécula de PEG con un peso molecular bien definido, por ejemplo, PEG200 con al menos dos equivalentes de un PEG activado bifuncional que también tiene un peso molecular bien definido, por ejemplo, un PEG200, produciendo de este modo una muestra mono-dispersa de un PEG, por ejemplo, PEG600:



G es un grupo saliente, tal como un éster de tresilato o sulfonato. La muestra mono-dispersa de PEG600 se puede poner posteriormente en contacto con el PEG200 activado bifuncional para formar un PEG100 mono-disperso. De manera alternativa, el PEG600 mono-disperso se puede convertir en el correspondiente derivado bifuncional y se puede hacer reaccionar con al menos dos equivalentes de un di-hidroxi-PEG600 mono-disperso, produciendo un PEG 1800 mono-disperso. Se repite el procedimiento hasta que se obtiene un PEG mono-disperso del tamaño deseado. La síntesis se puede diseñar de manera que las diferencias de peso molecular entre el material de partida y el producto permitan la separación de cualquier material que no haya reaccionado o que haya reaccionado parcialmente mediante cromatografía de exclusión por tamaños.

Derivados de PEG Activados

También se desvela un procedimiento para preparar un derivado de poli(etilenglicol). El procedimiento se muestra en el Esquema I:



a. R-Y / (ácido o base), b. Activación, por ejemplo, tosilación, halo-
 deshioxilación, por ejemplo, HX o SOX₂ y reacción con PEG_m;
 c. Activación (R'), por ejemplo, con p-nitro-fenilcloroformiato.

en el que los índices m y n representan independientemente números enteros de 1 a 100.000. R es un miembro seleccionado entre alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, alquilamina, alquilamina protegida o un grupo de activación, por ejemplo, triflato, tosilato y similares.

- 5 R' está seleccionado entre alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando R no incluye un grupo saliente para la activación del resto CH₂-O al cual se encuentra unido, de manera general R' es, o incluye, un grupo saliente.

10 En una realización a modo de ejemplo, R es un alquilo inferior, tal como metilo. En otra realización a modo de ejemplo, R' es un alquilo sustituido, tal como cloroformiato de p-nitrofenilo.

15 En la etapa a, el glicol de partida se pone en contacto con un grupo activado (R-Y) que reacciona con el resto hidroxilo del glicol. De manera general, Y es un grupo saliente, que permite la colocación de R sobre uno de los restos hidroxilo de la molécula de PEG. En la etapa b, el hidroxilo libre del aducto resultante se activa mediante su conversión en un grupo tal como haluro, por ejemplo, cloro o éster de sulfonato, por ejemplo, tosilato. La especie de PEG activada se pone en contacto con otro resto PEG del mismo grado de polimerización o diferente que el PEG de partida ("PEG_m"). Para permitir su unión a la otra especie, opcionalmente, se activa el PEG_(n+m) en el resto hidroxilo libre.

20 En general, el grupo R se encuentra unido al resto de PEG mediante una especie que incluye un grupo funcional reactivo. Además, los dos fragmentos de poli(etilenglicol) están unidos juntos a través del uso de grupos funcionales reactivos, que normalmente se transforman mediante el procedimiento de engarce en un nuevo grupo funcional orgánico o especie no reactiva. El(los) grupo(s) funcional(es) reactivo(s) se encuentra(n) localizado(s) en cualquier posición del resto de poli(etilenglicol), pero preferentemente está(n) en uno de los extremos.

Conjugación con Péptidos de Azúcares Modificados con Polímeros Ramificados

25 Los azúcares modificados se conjugan con un péptido glucosilado o no glucosilado usando una enzima apropiada para mediar la conjugación. Preferentemente, las concentraciones del azúcar (o azúcares), enzima (o enzimas) y péptido (o péptidos) aceptor donante modificado se seleccionan de tal manera que la glucosilación transcurra hasta que se consume el aceptor. De manera general, las consideraciones comentadas a continuación, al tiempo que se explican en el contexto de una sialiltransferasa, son aplicables a otras reacciones glucosiltransferasa.

30 Se conocen varios procedimientos para usar glucosiltransferasas para sintetizar estructuras de oligosacáridos deseadas y, de manera general, resultan aplicables a la presente invención. Se describen procedimientos a modo de ejemplo, por ejemplo, en el documento WO 96/32491, lto y col., Pure Appl. Chem. 65: 753 (1993), y en las patentes de Estados Unidos N° 5.352.670, 5.374.541 y 5.545.553.

35 La presente invención se pone en práctica usando una sola glucosiltransferasa individual o una combinación de glucosiltransferasas. Por ejemplo, se puede usar una combinación de sialiltransferasa y galactosiltransferasa. En aquellas realizaciones que usan más de una enzima, preferentemente las enzimas y los sustratos se combinan en una mezcla de reacción inicial, o se añaden las enzimas y los reactivos, para una segunda reacción enzimática, al medio de reacción una vez que la primera reacción enzimática esta completada o casi completada. Llevando a cabo dos reacciones enzimáticas secuenciales en un solo recipiente, se mejoran los rendimientos totales con respecto a los procedimientos en los cuales se asila una especie intermedia. Además, se reduce la limpieza y la eliminación de disolventes extra y sub-productos.

En una realización preferida, tanto la primera como la segunda enzima son una glucosiltransferasa. En otra realización preferida, una enzima es una endoglucosidasa. En una realización preferida adicional, se usan más de

dos enzimas para ensamblar la glucoproteína utilizada de la invención. Las enzimas se usan para modificar la estructura sacárido sobre el péptido en cualquier punto, bien antes o después de la adición del azúcar modificado al péptido.

5 De manera general, los restos glucosilo con engarce-O de los conjugados de la invención se originan con un resto GalNAc que está unido al péptido. Se puede usar cualquier miembro de la familia de las GalNAc transferasas para unir un resto de GalNAc al péptido (Hasan H, Bennett EP, Mandel U, Hollinsworth MA, y Clausen H (2000). Control of Mucin-Type O-Glycosylation: O-Glycan Occupancy is Directed by Substrate Specificities of Polypeptide GalNAc-Transferases (Eds. Ernst, Hart y Sinay).Wiley-VCH Chapter "Carbohydrates in Chemistry and Biology - a Comprehension Handbook", 273-292).El propio resto GalNAc puede ser el engarce glucosilo intacto. De manera
10 alternativa, el resto sacárido se forma usando una enzima más y uno o más sustratos glucosilo apropiados para la enzima, añadiéndose el azúcar modificado al resto glucosilo formado.

En otra realización, el procedimiento utiliza una o más exo- o endoglucosidasa. Normalmente, la glucosidasa es un mutante, que se diseña para formar enlaces glucosílicos en lugar de producir su escisión. Normalmente, la
15 glucanasa mutante incluye una sustitución de un resto de aminoácido por un resto de aminoácido ácido de sitio activo Por ejemplo, cuando la endoglucanasa es endo-H, normalmente los restos de sitio activo sustituidos serán Asp en la posición 130, Glu en la posición 132 o una de sus combinaciones. De manera general los aminoácidos se sustituyen por serina, alanina, asparagina o glutamina.

La enzima mutante cataliza la reacción, normalmente mediante una etapa de síntesis que es análoga a la reacción
20 inversa de la etapa de hidrólisis de endoglucanasa. En estas realizaciones, la molécula donante de glucosilo (por ejemplo, una estructura de oligo- o mono-sacárido deseada) contiene un grupo saliente y la reacción transcurre con la adición de la molécula donante al resto GlcNAc de la proteína. Por ejemplo, el grupo saliente puede ser un halógeno, tal como flúor. En otras realizaciones, el grupo saliente es un resto de Asn, o un resto de Asn-péptido. En otras realizaciones adicionales, se modifica el resto de GlcNAc sobre la molécula donante de glucosilo. Por ejemplo, el resto de GlcNAc puede comprender un resto de 1,2-oxazolina.

25 En una realización preferida, cada una de las enzimas utilizadas para producir un conjugado de la invención se encuentran presentes en cantidad catalítica. La cantidad catalítica de la enzima particular varía de acuerdo con la concentración de ese sustrato enzimático así como con las condiciones de reacción, tales como la temperatura, tiempo y valor de pH. Los medios para determinar la cantidad catalítica para una enzima determinada en concentraciones de sustrato preseleccionadas y las condiciones de reacción son bien conocidas para los expertos
30 en la materia.

La temperatura a la cual se realiza el procedimiento anterior puede variar desde justo por encima de congelación hasta la temperatura a la cual la enzima más sensible se desnaturaliza. Los intervalos de temperatura preferidos son de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 55 °C, y más preferentemente de aproximadamente 20 °C hasta
35 aproximadamente 30 °C. En otra realización a modo de ejemplo, uno o más componentes del presente procedimiento se realizan a una temperatura elevada usando una enzima termófila.

Se mantiene la mezcla de reacción durante un período de tiempo suficiente como para que el aceptor experimente glucosilación, formando de este modo el conjugado deseado. Con frecuencia, parte del conjugado puede detectarse
40 después de unas algunas horas, obteniéndose normalmente cantidades recuperables a las 24 horas o menos. Los expertos en la materia comprenden que la velocidad de reacción depende de diversos factores variables (por ejemplo, la concentración de la enzima, la concentración del donante, la concentración del aceptor, la temperatura, el volumen de disolvente) que se optimizan para un sistema seleccionado.

También se desvela la producción a escala industrial de péptidos modificados. Como se usa en el presente documento, de manera general, una escala industrial produce al menos aproximadamente 250 mg, preferentemente
45 al menos aproximadamente 500 mg, y más preferentemente al menos aproximadamente 1 gramo de conjugado purificado, acabado, preferentemente tras un solo ciclo de reacción, es decir, el conjugado no es una combinación de los productos de reacción procedentes de ciclos de síntesis idénticos, repetidos de forma consecutiva.

En el siguiente análisis, esto se ilustra por la conjugación de restos de ácido siálico modificado con un péptido glucosilado. Se marca el ácido siálico modificado a modo de ejemplo con (m-)PEG. El enfoque del siguiente análisis sobre el uso de ácido siálico modificado con PEG y péptidos glucosilados es por motivos de claridad de ilustración.
50 Un experto comprende que, de manera general, el análisis resulta aplicable a las adiciones de restos glucosilo modificados diferentes de ácido siálico. Además, el análisis también puede aplicarse a la modificación de una unidad de glucosilo con agentes diferentes de PEG, que incluyen otros polímeros solubles en agua, restos terapéuticos y biomoléculas.

Se puede usar una estrategia enzimática para la introducción selectiva de carbohidratos modificados con polímeros ramificados sobre un péptido o glucopéptido. El procedimiento utiliza azúcares modificados que contienen un polímero soluble en agua, ramificado, y se combina con la glucosiltransferasa o glicosintasa apropiada. Seleccionando la glucosiltransferasa que proporcionará el engarce de carbohidrato deseado y utilizando, como sustrato donante, el azúcar modificado, puede introducirse el polímero soluble en agua, ramificado, directamente
55

sobre la cadena principal peptídica, sobre los restos glucídicos existentes de un glucopéptido o sobre los restos glucídicos que se han añadido a un péptido.

5 Un aceptor para la sialiltransferasa está presente en el péptido a modificar mediante los procedimientos develados en el presente documento, en forma de una estructura de origen natural o una colocada allí de forma recombinante, enzimática o química. Aceptores apropiados incluyen, por ejemplo, aceptores de galactosilo tales como GalNAc, Gal β 1,4GlcNAc, Gal β 1,4GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, lacto-N-tetraosa, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,3Ara, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,4Glc (lactosa), y otros aceptores conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Paulson y col., J. Biol. Chem. 253: 5617-5624 (1978)).

10 En una realización, un aceptor para la sialiltransferasa está presente en el glucopéptido a modificar tras la síntesis *in vivo* del glucopéptido. Dichos glucopéptidos se puede someter a sialilación usando los procedimientos reivindicados sin modificación previa del patrón de glucosilación del glucopéptido. De manera alternativa, se pueden usar los procedimientos develados en el presente documento para someter a sialilación un péptido que no incluye un aceptor apropiado; en primer lugar se modifica el péptido para que incluya un aceptor mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

15 En una realización a modo de ejemplo, el aceptor de galactosilo se ensambla mediante la unión de un resto de galactosa a un aceptor apropiado unido al péptido, por ejemplo, GalNAc. El procedimiento incluye incubar el péptido a modificar con una mezcla de reacción que contenga una cantidad apropiada de galactosiltransferasa (por ejemplo, Gal β 1,3 o Gal β 1,4) y un donante de galactosilo apropiado (por ejemplo, UDP-galactosa). Se permite que la reacción transcurra sustancialmente hasta que se complete o, de manera alternativa, la reacción concluye cuando se añade una cantidad preseleccionada del resto de galactosa. Otros procedimientos de ensamblaje de un aceptor de
20 sacárido apropiado resultarán obvios para los expertos en la materia.

En otra realización, primero se "recortan" los oligosacáridos con engarce glucopeptídico, bien en su totalidad o en parte, para exponer un aceptor para la sialiltransferasa o un resto al cual se añaden uno o más restos apropiados para obtener un aceptor apropiado. Las enzimas, tales como glucosiltransferasas y endoglucosidasas, (véase, por
25 ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.716.812) resultan útiles para las reacciones de unión y recorte.

En una realización a modo de ejemplo, se "recorta" un resto carbohidrato antes de la adición del azúcar modificado. Por ejemplo, un resto de GalNAc-Gal se recorta de nuevo para obtener GalNAc. Se conjuga un azúcar modificado que lleva el polímero soluble en agua con uno o más de los restos glucídicos expuestos al "recorte". En un ejemplo, se "recorta" un glucopéptido y al aminoácido de cadena lateral-O o glucopéptido glucano se le añade un polímero
30 soluble en agua mediante un resto sacarilo, por ejemplo, un resto de Sia, Gal o GalNAc conjugado con el polímero soluble en agua. El resto sacarilo modificado se puede unir a un sitio aceptor en el glucopéptido "recortado". De manera alternativa, se puede añadir un resto sacarilo no modificado, por ejemplo Gal, en el extremo del glicano con engarce-O.

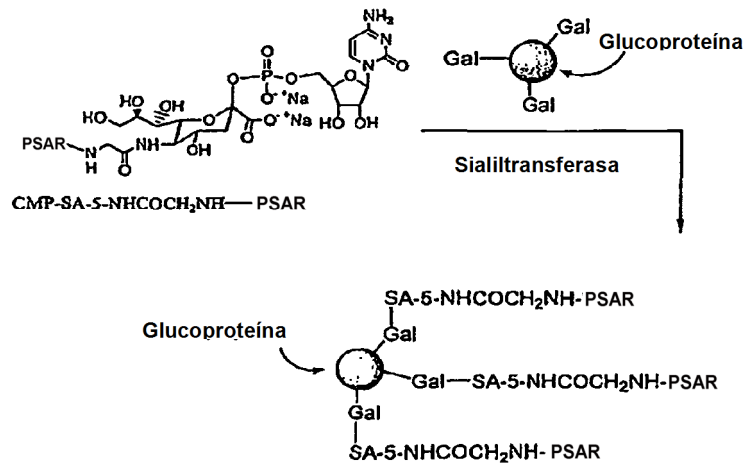
En otra realización a modo de ejemplo, se añade un polímero soluble en agua un resto de GalNAc mediante un
35 azúcar modificado que tiene un resto de galactosa. De manera alternativa, se puede añadir un Gal no modificado al resto de GalNAc terminal.

En otro ejemplo adicional, usando un ácido siálico modificado, se añade un polímero soluble en agua, ramificado sobre un resto de Gal.

40 Las realizaciones a modo de ejemplo analizadas anteriormente proporcionan una ilustración de la capacidad de los procedimientos expuestos en el presente documento. Usando los procedimientos develados en el presente documento, es posible un "recortar de nuevo" y formar un resto de carbohidrato de sustancialmente cualquier estructura deseada. El azúcar modificado puede añadirse a los extremos del resto de carbohidrato como se ha expuesto anteriormente, o este puede ser un producto intermedio entre el núcleo peptídico y el extremo del carbohidrato.

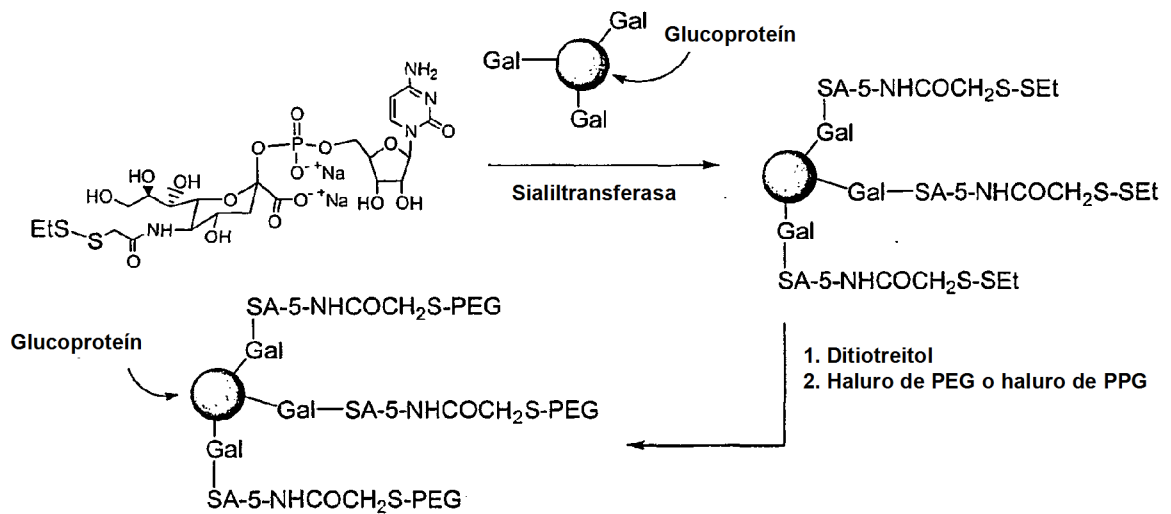
45 En una realización a modo de ejemplo, se añade el polímero soluble en agua, ramificado, a un resto de Gal terminal usando un ácido siálico modificado con polímero. Se usa una sialiltransferasa apropiada para añadir un ácido siálico modificado. La estrategia se resume en el Esquema 3.

Esquema 3



5 En otra estrategia adicional, resumida en el Esquema 4, se presenta una funcionalidad reactiva enmascarada en el ácido siálico. Preferentemente, el grupo reactivo enmascarado no se ve afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al péptido. Tras la unión covalente del ácido siálico modificado al péptido, se elimina el enmascaramiento y se conjuga el péptido con un agente tal como PEG, PPG, un resto terapéutico, una biomolécula u otro agente. El agente se conjuga con el péptido de una manera específica mediante su reacción con el grupo reactivo no enmascarado en el resto glucídico modificado.

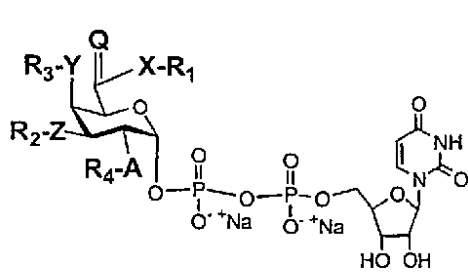
Esquema 4



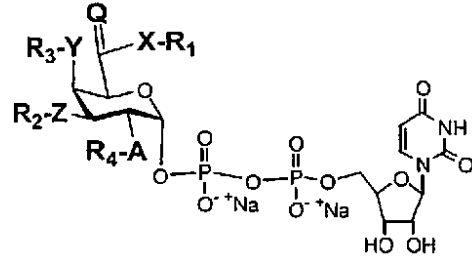
10 Se puede usar cualquier azúcar modificado con su glucosiltransferasa apropiada, dependiendo de los azúcares terminales de las cadenas laterales de oligosacárido del glucopéptido (Tabla 3). Como se ha comentado anteriormente, el azúcar terminal del glucopéptido necesario para la introducción de la estructura del polímero soluble en agua, ramificado, puede introducirse de forma natural durante la expresión o se puede producir después de la expresión usando la(s) glucosidasa (s), glucosiltransferasa(s) apropiada(s) o mezcla de glicosidasa(s) y glucosiltransferasa(s).

15

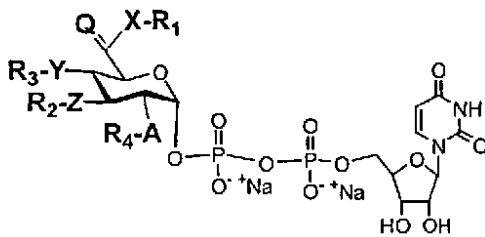
Tabla 3



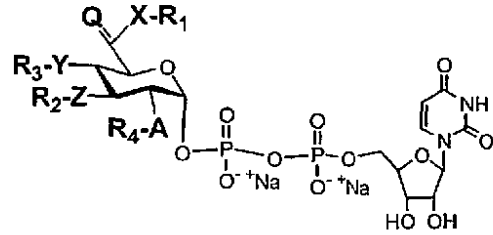
Derivados de UDP-galactosa



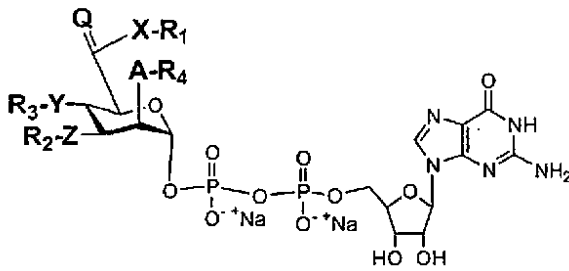
Derivados de UDP-galactosamina
(cuando A = NH, R₄ puede ser acetilo)



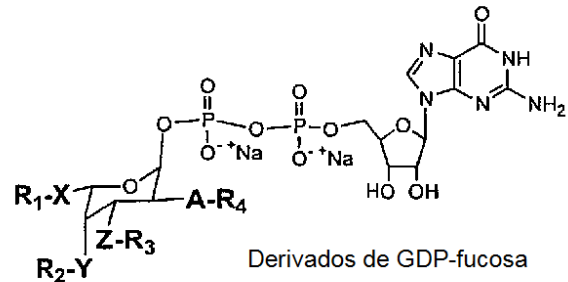
Derivados de UDP-Glucosa



Derivados de UDP-Glucosamina
(cuando A = NH, R₄ puede ser acetilo)



Derivados de GDP-Manosa

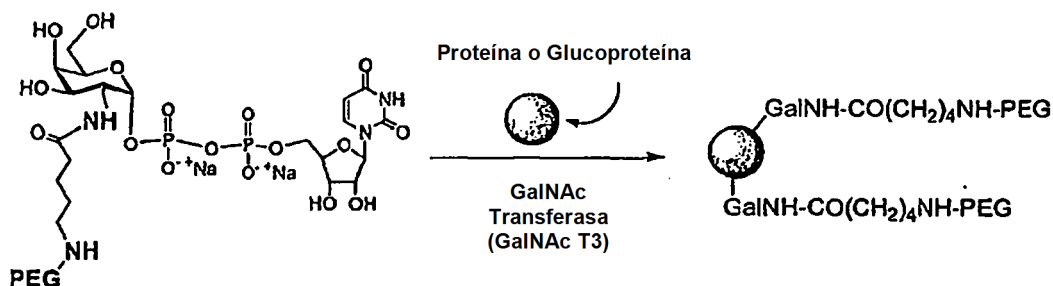


Derivados de GDP-fucosa

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, engarce-M, M
 M = péptido soluble en agua ramificado

En una realización alternativa, el azúcar modificado se añade directamente a la cadena principal peptídica usando una glucosiltransferasa que se sabe que transfiere restos glucídicos al sitio de glucosilación con engarce-O de la cadena principal peptídica. Esta realización a modo de ejemplo se explica en el Esquema 5. Las glucosiltransferasas a modo de ejemplo, útiles para la realización práctica de la presente invención, incluyen, aunque sin limitación, GalNAc transferasas (GalNAc T1-20), GlcNAc transferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, xilosiltransferasas, manosiltransferasas y similares. El uso de esta estrategia permite la adición directa de azúcares modificados sobre los péptidos que carecen de cualquier carbohidrato o, de manera alternativa, sobre los glucopéptidos existentes. En ambos casos, la adición del azúcar modificado se produce en las posiciones específicas de la cadena principal peptídica como viene definido por la especificidad del sustrato de la glucosiltransferasa y no de manera aleatoria como ocurre durante la modificación de una cadena principal peptídica de proteína usando procedimientos químicos. Se puede introducir una serie de agentes en las proteínas o glucopéptidos que carecen de la secuencia peptídica sustrato de glucosiltransferasa diseñando la secuencia de aminoácidos apropiada en la cadena polipeptídica.

Esquema 5



En cada una de las realizaciones a modo de ejemplo expuestas anteriormente, se pueden utilizar una o más etapas adicionales de modificación química o enzimática tras la conjugación del azúcar modificado con el péptido. En una realización a modo de ejemplo, se usa una enzima (por ejemplo, fucosiltransferasa) para anexar una unidad de glucosilo (por ejemplo, fucosa) al azúcar modificado terminal unido al péptido. En otro ejemplo, se utiliza una reacción enzimática para "proteger" sitios (por ejemplo, sialilato) a los cuales el azúcar modificado no se conjugó. De manera alternativa, se utiliza una reacción química para modificar la estructura del azúcar modificado conjugado. Por ejemplo, se hace reaccionar el azúcar modificado conjugado con agentes que estabilizan o desestabilizan su engarce con el componente peptídico al cual se une el azúcar modificado. En otro ejemplo, se desprotege un componente del azúcar modificado tras su conjugación con el péptido. Un experto apreciará que existe una serie de procedimientos químicos y enzimáticos que resultan útiles en los procedimientos desvelados en el presente documento, en una etapa posterior a la conjugación del azúcar modificado con el péptido.

En otra realización a modo de ejemplo, el glucopéptido se conjuga con un agente diana, por ejemplo, transferrina (para administrar el péptido a través de la barrera hematoencefálica, y a los endosomas), carnitina (para administrar el péptido a las células musculares; véase, por ejemplo, LeBorgne y col., *Biochem. Pharmacol.* 59: 1357-63 (2000) y fosfonatos, por ejemplo, bifosfonato (para dirigir el péptido a tejidos óseos y a otros tejidos calcíferos; véase por ejemplo, *Modern Drug Discovery*, agosto 2002, página 10). Para los expertos en la materia serán obvios otros agentes útiles para el direccionamiento. Por ejemplo, glucosa, glutamina e IGF son también útiles para dirigirse al músculo.

El resto diana y el péptido terapéutico se conjugan mediante cualquier procedimiento comentado en el presente documento o de otro modo conocido en la técnica. Los expertos apreciarán que también se pueden derivatizar péptidos además de los expuestos anteriormente como se explica en el presente documento. Los péptidos a modo de ejemplo se exponen en el Apéndice anexo a la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/328.523 relacionada del mismo solicitante, presentada el 10 de octubre de 2001.

En una realización a modo de ejemplo, se acoplan el agente diana y el péptido terapéutico mediante un resto de engarce. En la presente realización, se acopla al menos un péptido terapéutico o el agente diana al resto de engarce mediante un grupo de engarce glucosílico intacto de acuerdo con un procedimiento desvelado en el presente documento. En una realización a modo de ejemplo, el resto de engarce incluye un poli(éter) tal como poli(etilenglicol). En otra realización a modo de ejemplo, el resto de engarce incluye al menos un enlace que se degrada *in vivo*, liberando el péptido terapéutico del agente diana, tras la administración del conjugado al tejido o región diana del organismo.

En otra realización a modo de ejemplo, la distribución *in vivo* del resto terapéutico se modifica alterando una glucoforma del resto terapéutico sin conjugar el péptido terapéutico a un resto diana. Por ejemplo, se puede desviar el péptido terapéutico de la captación mediante el sistema reticuloendotelial protegiendo un resto de galactosa terminal de un grupo glucosilo con ácido siálico (o uno de sus derivados).

i. Enzimas

1. Glucosiltransferasas

Las glucosiltransferasas catalizan la adición de azúcares activados (azúcares-NDP donantes), de manera gradual, a una proteína, glucopéptido, lípido o glucolípido o al extremo no reductor de un oligosacárido en desarrollo. Los glucopéptidos con engarce-N se sintetizan mediante una transferasa y un DoI-PP-NAG₂Glc₃Man₉ donante de oligosacárido con engarce de lípido, en una transferencia de bloque seguido de recorte del núcleo. En este caso, la naturaleza del sacárido "núcleo" es algo diferente de las uniones posteriores. En la técnica se conoce un gran cantidad de glucosiltransferasas.

La glucosiltransferasa a usar puede ser cualquiera con tal de que se pueda utilizar el azúcar modificado como un donante de azúcar. Los ejemplos de tales enzimas incluyen glucosiltransferasa de la rura de Leloir, tales como galctosiltransferasa, N-acetilglucosaminiltransferasa, N-acetilgalactosaminiltransferasa, fucosiltransferasa,

sialiltransferasa, manosiltransferasa, xilosiltransferasa, glucuroniltransferasa y similares.

Para las síntesis enzimática de sacáridos que implican reacciones glucosiltransferasa, la glucosiltransferasa puede clonarse o aislarse de cualquier fuente. Se conocen muchas glucosiltransferasas clonadas, como lo son sus secuencias polinucleotídicas. Véase, por ejemplo, "The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferases," (<http://www.vei.co.uk/TGN/qtguide.htm>). Las secuencias de aminoácidos de las glucosiltransferasas y las secuencias de nucleótidos que codifican las glucosiltransferasas a partir de las cuales pueden deducirse las secuencias de aminoácidos también se encuentran en diferentes bases de datos disponibles al público, incluyendo GenBank, Swiss-Prot, EMBL, y otras.

Las glucosiltransferasas que pueden emplearse en los procedimientos desvelados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, galactosiltransferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, N-acetilgalctosaminiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas, glucuroniltransferasas, sialiltransferasas, manosiltransferasas, transferasas de ácido glucurónico, transferasas de ácido galacturónico y oligosacariltransferasas. Las glucosiltransferasas apropiadas incluyen las obtenidas a partir de eucariotas, así como de procariontes.

El ADN que codifica las glucosiltransferasas puede obtenerse por síntesis química, por exploración de transcripciones inversas de ARNm a partir de células o cultivos de líneas celulares apropiados, por exploración de bibliotecas genómicas a partir de células apropiadas, o mediante combinaciones de estos procedimientos. La exploración de ARNm o ADN genómico puede realizarse con sondas oligonucleotídicas generadas a partir de la secuencia génica de las glucosiltransferasas. Las sondas pueden marcarse con un grupo detectable tal como un grupo fluorescente, un átomo radioactivo o un grupo quimioluminiscente de acuerdo con procedimientos conocidos y usados en ensayos de hibridación convencionales. En una alternativa, pueden obtenerse secuencias génicas de glucosiltransferasas usando un procedimiento de reacción de cadena de la polimerasa (PCR), produciéndose los cebadores oligonucleotídicos de la PCR a partir de la secuencia génica de las glucosiltransferasas. Véase, la patente de Estados Unidos N° 4.683.195 de Mullis y col., y la patente de Estados Unidos N° 5.683.202 de Mullis.

Las glucosiltransferasas pueden sintetizarse en células huésped transformadas con vectores que contienen ADN que codifica la enzima glucosiltransferasa. Los vectores se usan bien para amplificar el ADN que codifica la enzima glucosiltransferasa y/o para expresar el ADN que codifica la enzima glucosiltransferasa. Un vector de expresión es una construcción de ADN que puede replicarse en la que la secuencia de ADN que codifica la enzima glucosiltransferasa se encuentra unida operativamente a secuencias de control apropiadas capaces efectuar la expresión de la enzima glucosiltransferasa en un huésped apropiado. La necesidad de dichas secuencias de control variará dependiendo del huésped seleccionado y del procedimiento de transformación seleccionado. De manera general, las secuencias de control incluyen un promotor transcripcional, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, un secuencia que codifica los sitios de unión al ARNm ribosómico apropiado y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción. Los vectores de amplificación no requieren dominios de control de la expresión. Todo lo que se necesita es poder replicarse en el huésped, lo que normalmente confiere un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

En una realización a modo de ejemplo, se utiliza una enzima procarionte. Dichas glucosiltransferasas incluyen enzimas implicadas en la síntesis de lipooligosacáridos (LOS), que producen muchas bacterias gram negativas (Preston y col., *Critical Reviews in Microbiology* 23(3): 139-180 (1996)). Dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, las proteínas de operones *rfa* de especies tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, que incluyen una β 1,6-galactosiltransferasa y una β 1,3 galactosiltransferasa (véase, por ejemplo, EMBL N° de registro M80599 y M86935 (*E. coli*); EMBL N° de registro S56361 (*S. typhimurium*), una glucosiltransferasa (Swiss-Prot N° de registro P25740 (*E. coli*), una β 1,2-glucosiltransferasa (*rfaJ*), (Swiss-Prot N° de registro P27129 (*E. coli*) y Swiss-Prot N° de registro P19817 (*S. typhimurium*) y una β 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (*rfaK*) (EMBL N° de registro U00039 (*E. coli*)). Otras glucosiltransferasas para las cuales se conocen secuencias de aminoácidos incluyen las que están codificadas por operones tales como *fraB*, que han sido caracterizadas en organismos tales como *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium leprosum* y el operón *rh1* de *Pseudomonas aeruginosa*.

También son apropiadas para su uso las glucosiltransferasas que están implicadas en la producción de estructuras que contienen lacto-N-neotetraosa, D-galactosil- β -1,4-N-acetil-D-glucosaminil- β -1,3-D-galactosil- β -1,4-D-glucosa, y la secuencia trisacárida del grupo sanguíneo P^k, D-galactosil- α -1,4-D-galactosil- β -1,4-D-glucosa, que se ha identificado en el LOS de los patógenos de mucosas *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Scholten y col., *J. Med. Microbiol.* 41: 236-243 (1994)). Los genes de *N. meningitidis* (Sholten y col., *J. Med. Microbiol.* 41: 236-243 (1994)). Se han identificado los genes de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* que codifican las glucosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de estas estructuras a partir de los inmunitipos de *N. meningitidis* L3 y L1 (Jennings y col., *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 glucosiltransferasas requeridas para la adición de al menos tres de los azúcares en la cadena de lacto-N-neotetraosa (Wakarchuk y col., *J. Biol. Chem.* 271: 19166-73 (1996)). Recientemente, se ha demostrado la actividad enzimática del producto génico de *IgtB* e *IgtA*, proporcionando la primera prueba directa de su función glucosiltransferasa propuesta (Wakarchuk y col., *J. Biol. Chem.* 271(45): 28271-276 (1996)). En *N. gonorrhoeae*,

5 existen dos genes adicionales, *IgtD* que añade β -D-GalNAc en la posición 3 de la galactosa terminal de la estructura lacto-N-neotetraosa e *IgtC* que añade una α -D-Gal terminal al elemento de galactosa de un LOS truncado, creando de este modo una estructura antigénica de grupo sanguíneo P^k (Gotschlich (1994), *supra*). En *N. meningitidis*, un L1 de inmunotipo distinto también expresa el antígeno de grupo sanguíneo P^k y se ha visto que transporta un gen *IgtC* (Jennings y col., (1995), *supra*). Las glucosiltransferasas de *Neisseria* y genes asociados también se describen en el documento USPN 5.545.553 (Gotschlich). También se han caracterizado los genes para α 1,2-fucosiltransferasa y α 1,3-fucosiltransferasa de *Helicobacter pylori* (Martin y col., J. Biol. Chem. 272:21349-21356 (1997)). También se usan las glucosiltransferasas de *Campylobacter jejuni* (véase, por ejemplo, http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gft_42.html).

10 a) Fucosiltransferasas

En algunas realizaciones, la glucosiltransferasa usada en el procedimiento desvelado en el presente documento es una fucosiltransferasa. Las fucosiltransferasas resultan conocidas por el experto en la materia. Las fucosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen enzimas que transfieren L-fucosa desde la GDP-fucosa hasta una posición hidroxilo de un azúcar aceptor. También se usan las fucosiltransferasas que transfieren azúcares que no son de nucleótido a un aceptor.

En algunas realizaciones, el azúcar aceptor es, por ejemplo, el GlcNAc en el grupo Ga1 β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β - en un glucósido de oligosacárido. Las fucosiltransferasas para esta reacción incluyen la Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β 1- α (1 \rightarrow 3,4)fucosiltransferasa (FTIII E.C., N^o 2.4.1.65) que se caracterizó en primer lugar a partir de leche humana (véase, Palcic, y col., Carbohydrate Res. 190:1-11 (1989); Prieels, y col., J. Biol. Chem. 256: 10456-10463 (1981); y Nunez y col., Can. J. Chem. 59: 2086-2095 (1981) y las Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc β - α fucosiltransferasas (FTIV, FTV, FTVI) que se encuentran en suero humano. Se ha caracterizado FTVII (B.C. N^o 2.4.1.65), una sialil α (2 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 3)GlcNAc β fucosiltransferasa. También se ha caracterizado una forma recombinante de Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β - α (1 \rightarrow 3,4) fucosiltransferasa (véase, Dumas, y col., Bioorg. Med. Letters 1: 425-428 (1991) y Kukowska-Latallo, y col., Genes and Development 4: 1288-1303 (1990)). Otras fucosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, α 1,2 fucosiltransferasa (B.C. N^o 2.4.1.69). Se puede realizar la fucosilación enzimática mediante los procedimientos descritos en Mollicone, y col., Eur. J. Biochem. 191: 169-176 (1990) o en la patente de Estados Unidos N^o 5.374.655. Las células que se usan para producir una fucosiltransferasa también incluirán un sistema enzimático para sintetizar GDP-fucosa.

b) Galactosiltransferasas

30 En otro grupo de realizaciones, la glucosiltransferasa es una galactosiltransferasa. La galactosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen α (1,3)galactosiltransferasas (E.C. N^o 2.4.1.151, véase, por ejemplo, Dabrowski y col., Transplant Proc. 25: 2921 (1993) y Yamamoto y col., Nature 345: 229-233 (1990), bovina (GenBank j04989, Joziassse y col., J. Biol. Chem., 264: 14290-14297 (1989)), murina (GenBank m26925; Larsen y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 86: 8227-8231 (1989)), porcina (GenBank L36152; Strahan y col., Immunogenetics 41: 101-105 (1995)). Otra α 1,3 galactosiltransferasa apropiada es la que se encuentra implicada en la síntesis del antígeno B del grupo sanguíneo (EC 2.4.1.37, Yamamoto et al, J. Biol. Chem. 265: 1146-1151 (1990) (humana). Otra galactosiltransferasa a modo de ejemplo es Gal-T1 nuclear.

También resultan apropiadas para su uso en los procedimientos desvelados en el presente documento 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 y col., Eur. J. Biochem. 183: 211-217 (1989)), humana (Masri y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 657-663 (1988)), murina (Nakazawa y col., J. Biochem. 104: 165-168 (1988)), así como también E.C. 2.4.1.38 y la galactosiltransferasa de ceramida (EC 2.4.1.45, Stahl y col., J. Neurosci. Res. 38: 234-242 (1994)). Otras galactosiltransferasas apropiadas incluyen, por ejemplo, α 1,2 galactosiltransferasas (por ejemplo, de *Schizosaccharomyces pombe*, Chapell y col., Mol. Biol. Cell. 5: 519-528 (1994)).

45 c) Sialiltransferasas

Las sialiltransferasas son otro tipo de glucosiltransferasas que resultan útiles en las células recombinantes y mezclas de reacción desveladas en el presente documento. Las células que producen las sialiltransferasas recombinantes también producirán ácido CMP-siálico, que es un donante de ácido siálico para sialiltransferasas. Los ejemplos de sialiltransferasas que resultan apropiadas para su uso en la presente invención incluyen ST3Gal III (por ejemplo, una ST3Gal III de rata o humana), ST3Gal IV, ST3Gal I, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II y ST6GalNAc III (la nomenclatura de sialiltransferasa usada en el presente documento es como se describe en Tsuji y col., Glycobiology 6: v-xiv (1996)). Una α (2,3)sialiltransferasa a modo de ejemplo denominada α (2,3)sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico al glucósido o disacárido Gal o Gal β 1 \rightarrow 3Glc terminal no reductor. Véase, Van den Eijnden y col., J. Biol. Chem. 256: 3159 (1981), Weinstein y col., J. Biol. Chem. 257: 13845 (1982) y Wen y col., Biol. Chem. 267: 21011 (1992). Otro α 2,3-sialiltransferasa a modo de ejemplo (EC 2.4.99.4) transfiere ácido siálico Gal terminal no reductor del disacárido o del glucósido, véase, Rearick y col., J. Biol. Chem. 254:4444 (1979) y Gillespie y col., J. Biol. Chem. 267: 21004 (1992). Enzimas a modo de ejemplo adicionales incluyen Gal- β -1,4-GlcNAc α -2,6-sialiltransferasa (Véase, Kurosawa y col., Eur. J. Biochem. 219:375-381 (1994)).

Preferentemente, para la glucosilación de carbohidratos de glucopéptidos, la sialiltransferasa será capaz de transferir ácido siálico a la secuencia Gal β 1,4GlcNAc-, la penúltima secuencia más común fundamental del ácido siálico terminal sobre las estructuras de carbohidrato completamente sialiladas (véase, Tabla 4).

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

Sialiltransferasa	Fuente	Secuencia(s) formada(s)	Ref.
ST6Gal I	Mamífero	NeuAc1,6Gal β 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	Mamífero	NeuAc1,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAc1,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	Mamífero	NeuAc1,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAc1,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST6Gal II	Mamífero	NeuAc1,6Gal β 1,4GlcNA	
ST6Gal II	Fotobacteria	NeuAc1,6Gal β 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitides</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	NcuAc1,3Gal β 1,4GlcNAc-	3
1) Goochee y col., BiolTechnology 9: 1347-1355 (1991)			
2) Yamamoto y col., J. Biochem. 120: 104-110 (1996)			
3) Gilbert y col., J. Biol. Chem. 271: 28271-28276 (1996)			

5

Un ejemplo de sialiltransferasa que resulta útil en los procedimientos descritos es ST3Gal III, también denominada α (2,3) sialiltransferasa (EC 2.4.99.6). Esta enzima cataliza la transferencia de ácido siálico al Gal de un glucósido de Gal β 1,3GlcNAc o Gal β 1,4GlcNAc (véase, por ejemplo, Wen y col., J. Biol. Chem. 267:21011 (1992); Van den Eijden y col., J. Biol. Chem. 256:3159 (1991)) y es responsable de la sialilación de oligosacáridos con engarce de asparagina en glucopéptidos). El ácido siálico se une a un Gal con la formación de un engarce- α entre los dos sacáridos. La unión (engarce) entre los sacáridos es entre la posición-2 de NeuAc y la posición-3 de Gal. Esta enzima particular se puede aislar de hígado de rata (Weinstein y col., J. Biol. Chem. 257: 13845 (1982)); se conocen las secuencias de ADNc humano (Sasaki y col., (1993) J. Biol. Chem. 268: 22782-22787; Kitagawa & Paulson (1994) J. Biol. Chem. 269: 1394-1401) y genómico (Kitagawa et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 931-938), que facilitan la producción de esta enzima por expresión recombinante. En una realización preferida, los procedimientos de sialilación reivindicados usan una ST3Gal III de rata.

10

15

Otras sialiltransferasas a modo de ejemplo para su uso en la presente invención incluyen las aisladas de *Campylobacter jejuni*, incluyendo la α (2,3). Véase, por ejemplo, el documento WO99/49051.

20

25

Otras sialiltransferasas diferentes de las enumeradas en la Tabla 5, también resultan útiles en un procedimiento a gran escala rentable y eficaz para la sialilación de glucopéptidos importantes desde el punto de vista comercial. Como un ensayo simple para descubrir la utilidad de estas otras enzimas, se hacen reaccionar diferentes cantidades 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 para sialilar glucopéptidos con respecto a la sialiltransferasa ST6Gal I, ST3Gal III bovinas a ambas. De manera alternativa, para esta evaluación pueden usarse otros glucopéptidos o glucopéptidos, u oligosacáridos con engarce-N liberados enzimáticamente de la cadena principal peptídica en lugar de asialo- α ₁ AGP. Las sialiltransferasas con capacidad de sialilar oligosacáridos con engarce-N de glucopéptidos de manera más eficaz que ST6Gal I resultan útiles en un procedimiento práctico a gran escala para la sialilación peptídica (como queda ilustrado por ST3Gal III en la presente divulgación).

d) GalNAc transferasas

30

35

Las N-acetilgalactosamiltransferasas se utilizan en la realización práctica de la presente invención, en particular para unir un resto de GalNAc a un aminoácido del sitio de glucosilación con engarce-O del péptido. Las N-acetilgalactosaminiltransferasas apropiadas incluyen, pero sin limitación, α (1,3) N-acetilgalactosaminiltransferasa, β (1,4) N-acetilgalactosaminiltransferasa (Nagata y col., J. Biol. Chem. 267: 12082-12089 (1992) y Smith y col., J. Biol. Chem. 269: 15162 (1994)) y polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa (Homa y col., J. Biol. Chem. 268: (1993)).

40

La producción de proteínas tales como la enzima GalNAc T_{I-XX} a partir de genes clonados por modificación mediante ingeniería genética es muy conocida. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N^o 4.761.371. Un procedimiento implica la recogida de muestras suficientes, para determinar después la secuencia de aminoácidos por secuenciación N-terminal. Después, esta información se usa para aislar el clon de ADNc que codifica una transferasa de longitud completa (unión a membrana) que, tras la expresión en la línea celular de insecto Sf9, produce la síntesis de una enzima completamente activa. Posteriormente, se determina la especificidad del aceptor

de la enzima usando un análisis semicuantitativo de los aminoácidos que rodean los sitios de glucosilación conocidos en 16 proteínas diferentes seguido de estudios de glucosilación *in vitro* de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que determinados restos de aminoácido se encuentran sobre-representados en los segmentos peptídicos glucosilados y que los restos en posiciones específicas que rodean a los restos de treonina y serina glucosilados pueden tener un influencia más destacada sobre la eficacia del aceptor que otros restos de aminoácidos.

2. Sulfotransferasas

También se desvelan procedimientos para producir péptidos que incluyen moléculas sulfatadas, que incluyen, por ejemplo polisacáridos sulfatados tales como heparina, sulfato de heparano, carragenina y compuestos relacionados. Las sulfotransferasas apropiadas incluyen, por ejemplo, condroitin-6-sulfotransferasa (ADNc de pollo descrito por Fukuta y col., J. Biol. Chem. 270: 18575-18580 (1995); GenBank N° de registro D49915), glucosaminoglucan N-acetilglucosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 1 (Dixon y col., Genomics 26: 239-241 (1995); UL 18918) y glucosaminoglucan N-acetilglucosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 2 (ADNc murino descrito por Orellana et al, M. Biol. Chem. 269: 2270-2276 (1994) y Eriksson y col., J. Biol. Chem. 269: 10438-10443 (1994); ADNc humano descrito en GenBank N° de registro U2304).

3. Glucosiltransferasas Unidas a Células

En otra realización, las enzimas utilizadas en el procedimiento desvelado en el presente documento son glucosiltransferasas unidas a células. Aunque se conocen muchas glucosiltransferasas solubles (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos. N° 5.032.519), generalmente, las glucosiltransferasas se encuentran en forma de unión a membrana cuando están asociadas con células. Se considera que muchas de las enzimas unidas a membrana estudiadas se encuentran lejos de ser proteínas intrínsecas; es decir, no se liberan de las membranas por tratamiento con ultrasonido y requieren detergentes para la solubilización. Se han identificado glucosiltransferasas de superficie sobre las superficies de células de vertebrados e invertebrados, y también se ha reconocido que estas transferasas de superficie conservan la actividad catalítica en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la función más reconocida de las glucosiltransferasas de superficie celular es para el reconocimiento intercelular (Roth, MOLECULAR APPROACHES to SUPRACELULAR PHENOMENA, 1990).

Se han desarrollado procedimientos para modificar las glucosiltransferasas expresadas mediante células. Por ejemplo, Larsen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:8227-8231 (1989), presentan una estrategia genética para aislar secuencias de ADNc clonado que determinan la expresión de estructuras de oligosacárido de superficie celular y sus glucosiltransferasas afines. Se transfectó una biblioteca de ADNc, generada a partir de ARNm aislado de una línea celular murina que se sabe que expresa UDG galactosa: β -galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida α -1,3-galactosiltransferasa, en células COS-1. Posteriormente, las células transfectadas se cultivaron y se sometieron a ensayo en cuanto a la actividad de α 1,3-galactosiltransferasa.

Francisco y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 2713-2717 (1992) desvelan un procedimiento para anclar la β -lactamasa a la superficie externa de *Escherichia coli*. Se produce una fusión tripartita que consiste en (i) una secuencia de señal de una proteína de membrana externa, (ii) una sección transmembrana de una proteína de membrana externa, y (iii) una secuencia β -lactamasa madura completa, dando lugar a una molécula de β -lactamasa unida a superficie activa. Sin embargo, el procedimiento de Francisco se encuentra limitado únicamente a sistemas de células procariontas y, tal y como reconocen los autores, requiere la fusión tripartita completa para un funcionamiento apropiado.

4. Proteínas de fusión

En otras realizaciones a modo de ejemplo, los procedimientos desvelados en el presente documento utilizan proteínas de fusión que tienen más de una actividad enzimática que se encuentra implicada en la síntesis de un conjugado de glucopéptido deseado. Los polipéptidos de fusión pueden estar constituidos, por ejemplo, por un dominio catalíticamente activo de una glucosiltransferasa que se encuentra unida a un dominio catalíticamente activo de una enzima accesoria. El dominio catalítico de la enzima accesoria puede, por ejemplo, catalizar una etapa en la formación de un azúcar de nucleótido que sea un donante de glucosiltransferasa, o catalizar una reacción implicada en un ciclo de glucosiltransferasa. Por ejemplo, se puede unir un polinucleótido que codifica una glucosiltransferasa, en fase, a un polinucleótido que codifica una enzima implicada en la síntesis de azúcar de nucleótido. La proteína de fusión resultante puede posteriormente catalizar no solo la síntesis del azúcar de nucleótido, sino también la transferencia del resto de azúcar hasta la molécula aceptora. La proteína de fusión puede ser dos o más enzimas de cíclicas unidas en una secuencia de nucleótido que puede expresarse. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye los dominios catalíticamente activos de dos o más glucosiltransferasas. Véase, por ejemplo, 5.641.668. Los glucopéptidos modificados de la presente invención pueden diseñarse fácilmente y fabricarse utilizando varias proteínas de fusión apropiadas (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente PCT/CA98/01180, que se publicó como documento WO 99/31224 el 24 de junio de 1999).

5. Enzimas Inmovilizadas

Además de enzimas unidas a células, se desvela el uso de enzimas que están inmovilizadas sobre un soporte sólido y/o soluble. En una realización a modo de ejemplo, se proporciona una glucosiltransferasa que está conjugada a un PEG mediante un engarce glucosílico intacto de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento. El conjugado PEG-engarce-enzima se une opcionalmente al soporte sólido. El uso de enzimas sobre un soporte sólido en los procedimientos desvelados en el presente documento simplifica el desarrollo de la mezcla de reacción y la purificación del producto de reacción, y también permite la recuperación fácil de la enzima. Se utiliza el conjugado de glucosiltransferasa en los procedimientos desvelados en el presente documento. Otras combinaciones de enzimas y soportes resultarán evidentes para los expertos en la materia.

10 Purificación de Conjugados Peptídicos

Se pueden usar los productos generados mediante los procedimientos anteriores sin purificación. Sin embargo, normalmente es preferible recuperar el producto. Se pueden usar técnicas convencionales bien conocidas para la recuperación de sacáridos glucosilados tales como cromatografía en capa fina o gruesa, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico o filtración con membrana. Es preferible usar filtración con membrana, más preferentemente utilizar una membrana osmótica inversa, o una o más técnicas cromatográficas de columna para la recuperación, como se ha comentado anteriormente y como se cita en la bibliografía del presente documento. Por ejemplo, se puede usar filtración con membrana en la que las membranas presentan un límite de peso molecular de aproximadamente 3000 a aproximadamente 10.000, para eliminar proteínas tales como glucosiltransferasas. Posteriormente, se puede usar nanofiltración u ósmosis inversa para eliminar las sales y/o purificar los sacáridos producto (véase, por ejemplo, el documento WO 98/15581). Las membranas de nanofiltro son una clase de membranas de ósmosis inversa que dejan pasar sales monovalentes pero retienen las sales polivalentes y solutos sin carga más grandes que aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Dalton, dependiendo de la membrana usada. De este modo, en una aplicación típica, los sacáridos preparados mediante los procedimientos desvelados en el presente documento quedarán retenidos en la membrana y las sales contaminantes pasarán a través de la misma.

Si se produce la glucoproteína modificada de forma intracelular, como una primera etapa, se eliminan los restos en forma de partícula, ya sean células huésped o fragmentos sometidos a lisis, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, se puede concentrar la proteína con un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, seguido de la separación de la variante polipeptídica de otras impurezas mediante una o más etapas seleccionadas entre cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (por ejemplo, sobre dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía sobre Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, lentil lectin-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Ether Toyopearl, Butyl Toyopearl, Phenyl Toyopearl, SP-Sepharose o Sepharose de proteína A, cromatografía de SDS-PAGE, cromatografía de sílice, cromatografía de fase inversa (por ejemplo, gel de sílice con grupos alifáticos anexados), filtración en gel, usando, por ejemplo, un tamiz molecular Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en columnas que une de forma selectiva el polipéptido, y precipitación con etanol o sulfato de amonio.

Normalmente, los glucopéptidos modificados producidos en cultivo se aíslan por extracción inicial de células, enzimas, etc., seguido de una o más etapas de concentración, precipitación por salinización, intercambio iónico acuoso, o cromatografía de exclusión por tamaño, por ejemplo SP Sepharose. De manera adicional, se puede purificar la glucoproteína modificada por cromatografía de afinidad. También se puede emplear HPLC para una o más etapas de purificación.

Se puede incluir un inhibidor de proteasa, por ejemplo, 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 accidentales.

En otra realización, primero se concentran los sobrenadantes a partir de los sistemas que producen el glucopéptido modificado de la invención, usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación apropiada. Por ejemplo, una matriz de afinidad apropiada puede comprender un ligando para el péptido, una lectina o una molécula de anticuerpo unida a un soporte apropiado. De manera alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que presente grupos DEAE colgantes. Las matrices apropiadas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano; celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. De manera alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos apropiados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Los grupos sulfopropilo resultan particularmente preferidos.

Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de HPLC que emplean medios de RR-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene un metilo colgante u otros grupos alifáticos, para purificar de manera adicional una composición variante de polipéptido. También se puede emplear parte o la totalidad de las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, para proporcionar un glucoproteína modificada homogénea.

Se puede purificar el glucopéptido modificado de la invención resultante de una fermentación a gran escala mediante procedimientos análogos a los desvelados por Urdal et al, J. Cromatog. 296: 171 (1984). Esta referencia describe dos etapas de RP-HPLC secuenciales para la purificación de la IL-2 humana recombinante sobre una columna de preparación de HPLC. De manera alternativa, se pueden utilizar técnicas tales como cromatografía de afinidad para purificar la glucoproteína modificada.

Además de los conjugados comentados anteriormente, se desvelan procedimientos para preparar estos y otros conjugados. Además, se desvelan procedimientos para prevenir, curar o mejorar una patología mediante la administración de un conjugado de la invención a un sujeto que está en riesgo de desarrollar de la enfermedad o a un sujeto que padece la enfermedad.

10 Composiciones Farmacéuticas

Los restos terapéuticos que se conjugan con polímeros solubles en agua, ramificados, de la presente invención presentan una amplia gama de aplicaciones farmacéuticas. Por ejemplo, se puede usar eritropoyetina (EPO) modificada para tratar anemia generalizada, anemia aplásica, lesiones quimio-inducidas (tales como lesiones de médula ósea), insuficiencia renal crónica, nefritis y talasemia. También se puede usar EPO modificada para tratar trastornos neurológicos tales como lesiones cerebrales/cervicales, esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer.

Un segundo a modo de ejemplo es el interferón- α (IFN- α), que se puede usar para tratar el SIDA y la hepatitis B o C, infecciones víricas provocadas por un variedad de virus tales como el papilomavirus (HBV), coronavirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes simple (HSV) y virus varicela-zoster (VZV), cánceres tales como leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, melanoma maligno, linfoma no-Hodgkins folicular, cromosoma de Filadelfia (Ph)-positivo, leucemia mielógena en fase crónica (CML), cáncer renal, mieloma, leucemia mielógena crónica, cánceres de la cabeza y el cuello, cánceres óseos, así como también displasia de cuello uterino y trastornos del sistema nervioso central (SNC) tales como esclerosis múltiple. Además, el IFN- α modificado de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento resulta útil para tratar diversas otras enfermedades y trastornos tales como el síndrome de Sjogren (un enfermedad autoinmunitaria), enfermedad de Behcet (una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria), fibromialgia (dolor musculoesquelético/trastorno de fatiga), úlcera aftosa (afta), síndrome de fatiga crónica y fibrosis pulmonar.

Otro ejemplo es el interferón- β , que resulta útil para tratar trastornos del SNC tales como esclerosis múltiple (ya sea recidivante/remitente o progresiva crónica), SIDA y hepatitis B o C, infecciones víricas provocadas por diversos virus tales como papilomavirus humano (HBV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes simple (HSV) y virus varicela-zoster (VZV), infecciones óticas, infecciones musculoesqueléticas, así como también cánceres que incluyen cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer colorrectal, cáncer no microcítico pulmonar, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de células basales, displasia de cuello uterino, melanoma, cáncer de piel y cáncer de hígado. También se puede usar IFN- β modificado de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para tratar otras enfermedades y trastornos tales como el rechazo de trasplantes (por ejemplo, trasplante de médula ósea), corea de Huntington, colitis, inflamación cerebral, fibrosis pulmonar, degeneración macular, cirrosis hepática y queratoconjuntivitis.

El factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) es otro ejemplo. Se puede usar el G-CSF modificado de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento como accesorio en quimioterapia para el tratamiento de cánceres, y para prevenir o aliviar trastornos o complicaciones asociadas con determinados procedimientos médicos, por ejemplo, lesiones de médula ósea quimio-inducidas; leucopenia (generalizada); neutropenia febril quimio-inducida; neutropenia asociada con trasplantes de médula ósea; y neutropenia grave y crónica. G-CSF modificado también se puede usar para trasplantes; movilización de células sanguíneas periféricas; movilización de células progenitoras sanguíneas periféricas para la recogida en pacientes que recibirán quimioterapia mieloablativa o mielosupresora; y reducción de la duración de neutropenia, fiebre, uso de antibióticos, hospitalización después de tratamiento de inducción/consolidación para leucemia mieloide aguda (LMA). Otras afecciones y trastornos que se pueden tratar con G-CSF modificado incluyen asma y rinitis alérgica.

Como ejemplo adicional, se puede usar la hormona de crecimiento humana (hGH) modificada de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para tratar enfermedades relacionadas con el crecimiento tales como enanismo, estatura baja en niños y adultos, caquexia/debililitamiento muscular, atrofia muscular generalizada y anomalía cromosómica asociada al sexo (por ejemplo Síndrome de Turner). Otras afecciones que pueden tratarse usando la hGH modificada incluyen: síndrome del intestino corto, lipodistrofia, osteoporosis, uremia, quemaduras, infertilidad femenina, regeneración ósea, diabetes general, diabetes de tipo II, osteoartritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) e insomnio. Además, se puede usar también la hGH modificada para promover varios procedimientos, por ejemplo la regeneración tisular general, la regeneración ósea y la curación de heridas o como accesorio para vacunas.

De este modo, en otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un polímero soluble en agua de origen no natural, un resto terapéutico o biomolécula y un péptido glucosilado o no glucosilado. El polímero, resto terapéutico o biomolécula se conjuga con el péptido mediante un grupo engarzador glucosílico

interpuesto entre, y unido covalentemente al péptido y al polímero, resto terapéutico o biomolécula.

Las composiciones farmacéuticas de la invención resultan apropiadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Las formulaciones apropiadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, 17^a ed. (1985). Para una breve revisión de los procedimientos para la administración de fármacos, véase, Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier manera de administración apropiada, incluyendo por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, preferentemente el vehículo comprende agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, se puede emplear cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. También se pueden emplear matrices biodegradables, tales como microesferas (por ejemplo, poli(glucolato lactato), como vehículos para las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Se describen microesferas biodegradables apropiadas, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N^o 4.897.268 y 5.075.109.

Comúnmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía subcutánea o parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. De este modo, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden el compuesto disuelto o suspendido en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similares. Las composiciones también pueden contener detergentes tales como Tween 20 y Tween 80; estabilizadores tales como manitol, sorbitol, sacarosa y trehalosa; y conservantes tales como EDTA y m-cresol. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requieren para condiciones fisiológicas aproximadas, tales como agentes ajustadores de pH y tamponantes, agentes ajustadores de tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden filtrar de forma estéril. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso como tal, o se pueden liofilizar, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. Normalmente, el pH de las preparaciones se encontrará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9 y del modo más preferido de 7 a 8.

En algunas realizaciones, los glucopéptidos de la invención pueden incorporarse en liposomas formados a partir de lípidos convencionales formadores de vesículas. Se dispone de una variedad de procedimientos para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka y col., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), las patentes de Estados Unidos N^o 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028. El direccionamiento de los liposomas usando una variedad de agentes diana (por ejemplo, sialil galactósidos de la invención) es muy conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N^o 4.957.773 y 4.603.044).

Se pueden usar procedimientos convencionales para acoplar agentes diana a liposomas. De manera general, estos procedimientos implican la incorporación de componentes de lípidos en el interior de los liposomas, tal como fosfatidiletanolamina, que se pueden activar para la unión de los agentes diana, o de los compuestos lipófilos derivatizados, tal como glucopéptidos derivatizados con lípidos de la invención.

De manera general, los mecanismos diana requieren que los agentes diana se coloquen sobre la superficie del liposoma de tal forma que los restos diana se encuentren disponibles para la interacción con la diana, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Los carbohidratos desvelados en el presente documento se pueden unir a una molécula lipídica antes de que se forme el liposoma usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, alquilación o acilación de un grupo hidroxilo presente en el carbohidrato con un haluro de alquilo de cadena larga o con un ácido graso, respectivamente).

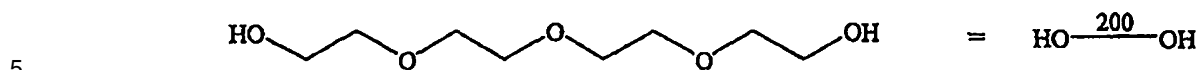
De manera alternativa, el liposoma se puede adaptar de manera que primero se incorpore una parte conectora en la membrana en el momento de la formación de la membrana. La parte conectora deber ser una parte lipófila, que se encuentra incluida y anclada firmemente en la membrana. También debe tener una parte reactiva, que se encuentra químicamente disponible sobre la superficie acuosa del liposoma. Se selecciona la parte reactiva de manera que resulta químicamente apropiada para formar un enlace químico estable con el agente diana o carbohidrato, que se añade posteriormente. En algunos casos, es posible unir el agente diana a la molécula conectora de forma directa, pero en la mayoría de los casos resulta más apropiado usar una tercera molécula que actúe como un puente químico, engarzando de este modo la molécula conectora que se encuentra en la membrana con el agente diana o carbohidrato que se extiende, tridimensionalmente, fuera de la superficie de la vesícula.

Los compuestos preparados por los procedimientos desvelados en el presente documento pueden también encontrar uso como reactivos para realizar diagnósticos. Por ejemplo, se pueden usar compuestos marcados para localizar áreas de inflamación o metástasis tumoral en pacientes que se sospecha que tienen una inflamación. Para este uso, los compuestos pueden marcarse con ¹²⁵I, ¹⁴C o tritio.

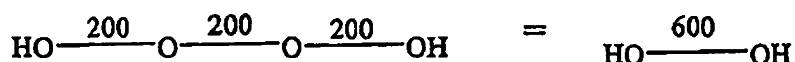
Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar los compuestos y los procedimientos desvelados en el presente documento:

Ejemplos

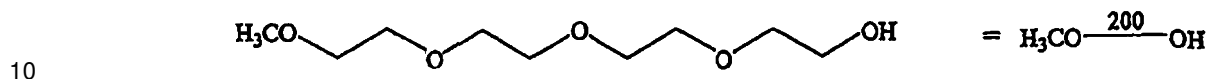
Se emplea la siguiente nomenclatura en los Ejemplo 1-3. La subunidad de PEG primario consiste en cuatro unidades de etilenglicol. Esta molécula tiene un peso molecular de 194, que ha sido redondeado a 200 en las figuras. Se usa la siguiente nomenclatura para representar la subunidad de PEG primario:



De manera alternativa, se pueden escribir combinaciones de subunidades de PEG primario con el peso molecular redondeado mostradas entre los extremos funcionalizados como se muestra a continuación.



Se usa la siguiente nomenclatura para representar una subunidad metoxi-PEG monofuncionalizada:

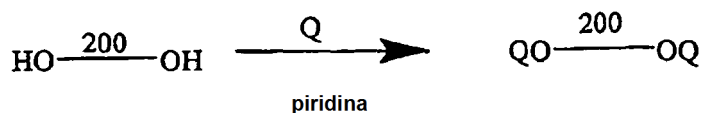


Ejemplo 1

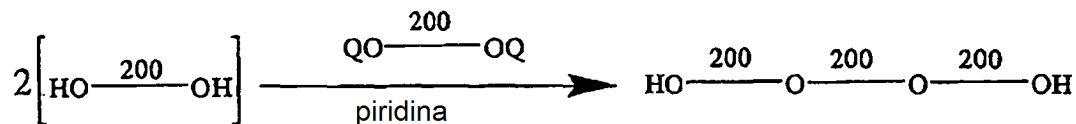
La Preparación de PEG Mono-Dispersos y Sus Formas Activadas

15 Se preparan PEG de peso molecular individual o mono-dispersos como se muestra a continuación. Se prepara PEG de cualquier tamaño mediante el ajuste del tamaño de los fragmentos generados. A continuación, los dioles se someten a mono-terminación mediante alquilación y se activan para la conjugación con un resto biológico tal como una proteína, azúcar, lípido o nucleótido.

20 Se pueden unir los grupos salientes a la subunidad de PEG primario con el fin de crear un PEG primario activado como se muestra a continuación. En esta reacción, Q puede ser cualquier grupo saliente que sea compatible con la química desvelada en el presente documento. Los grupos salientes a modo de ejemplo incluyen haluros, tresilatos, tosilatos y mesilatos.

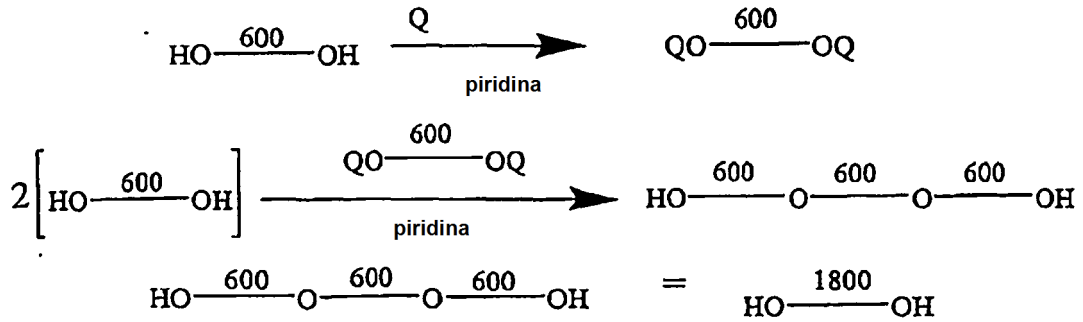


Tras crear el PEG primario activado, se hace reaccionar el compuesto con subunidades de PEG primario como se muestra a continuación. El producto es una extensión de PEG de primera generación.

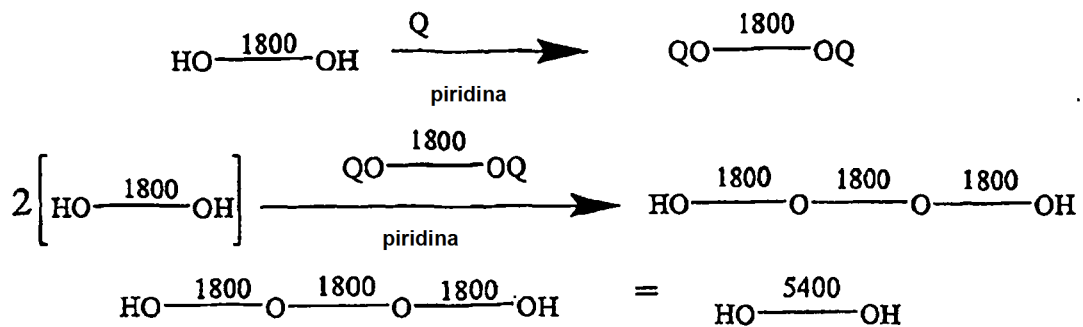


25

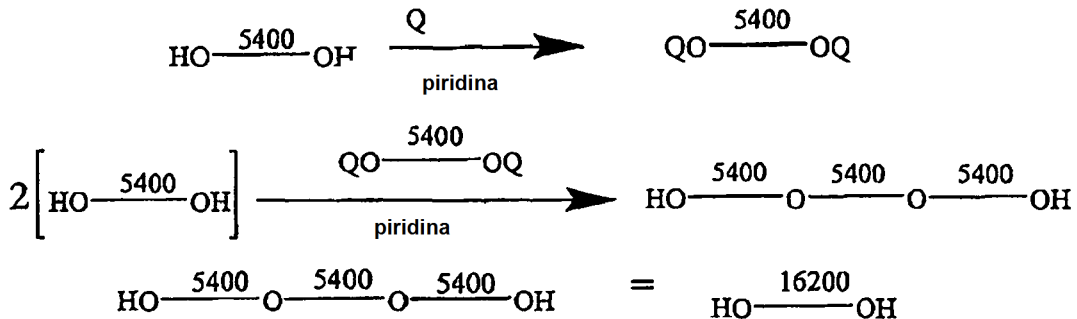
Se crea la extensión de PEG de segunda generación de manera similar a la de primera generación.



Se crea la extensión de PEG de tercera generación como se muestra a continuación:



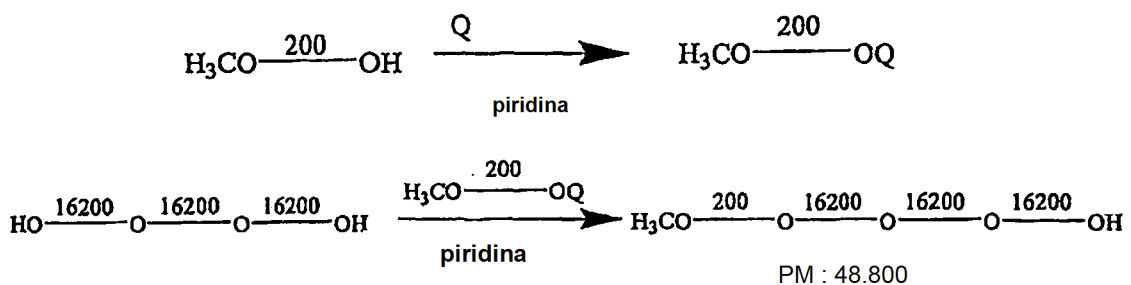
5 Se crea la extensión de PEG de cuarta generación como se muestra a continuación:



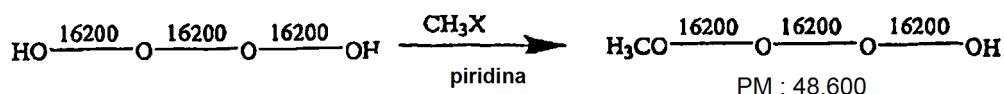
Se termina el procedimiento de extensión de PEG haciendo reaccionar un resto mono-funcionalizado con uno de los compuestos bi-funcionales. En esta reacción, el resto mono-funcionalizado es cualquier grupo que sea compatible con la química desvelada en el presente documento. Los grupos de terminación a modo de ejemplo incluyen alcoxi-PEG y alquilo.

10

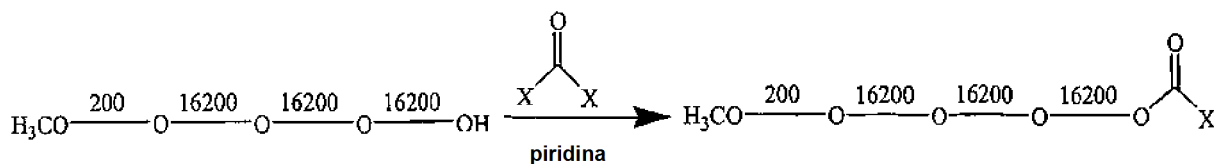
En la siguiente realización a modo de ejemplo, se añade un grupo saliente a una sub-unidad metoxi-PEG. Esta molécula se hace reaccionar posteriormente con una extensión de PEG de cuarta generación.



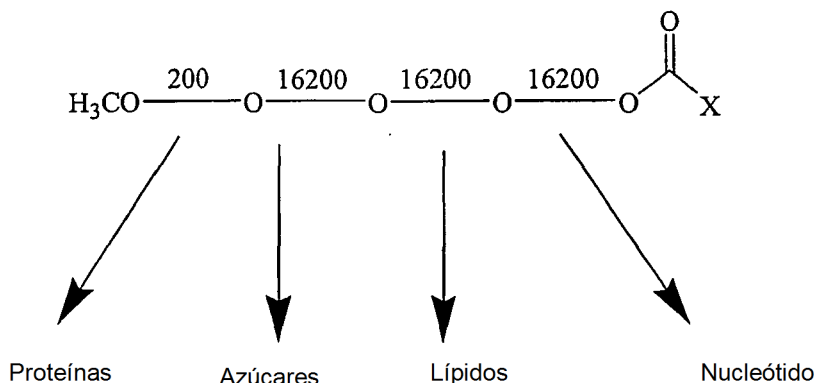
En otra realización a modo de ejemplo, se añade una subunidad de metilo a una extensión de PEG de cuarta generación.



5 Tras la terminación de un extremo, se activa el otro extremo de la extensión de PEG para la bioconjugación como se muestra a continuación. En esta reacción, X es cualquier grupo saliente que permita la formación de un éster. El símbolo X está seleccionado independientemente entre imidazolilo, HOBT, HOAt, NHS y un éster de p-nitrofenilo.



Finalmente, la molécula de extensión de PEG se conjuga hasta obtener un resto biológico como se muestra a continuación.

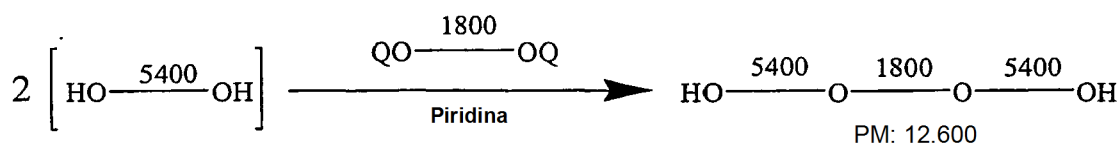


10

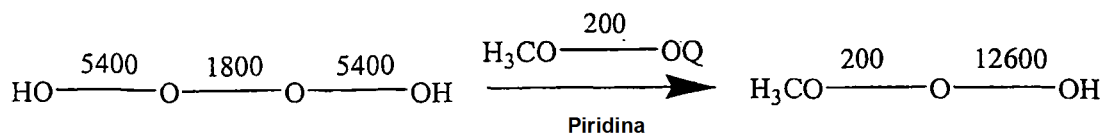
Ejemplo 2

No existe requisito de que PEG mono-disperso y activado deba presentar el mismo número de subunidades de PEG que las moléculas de extensión con las cuales reacciona. En una realización a modo de ejemplo, el PEG mono-disperso y activado presenta un número de subunidades de PEG mayor que la molécula de extensión con la cual reacciona. En otra realización a modo de ejemplo mostrada a continuación, el PEG mono-disperso y activado presenta un número de unidades de PEG menor que la molécula de extensión con la cual reacciona.

15



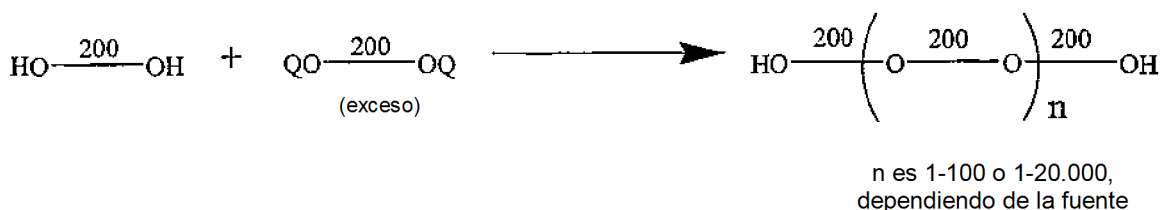
El procedimiento de terminación para estas moléculas es similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 1.



20

Ejemplo 3

Se puede añadir un exceso de subunidad de PEG activado para crear un PEG mono-disperso como se muestra a continuación:



Por medio de la variación de la proporción de los reaccionantes, la base usada, la temperatura, el disolvente y la concentración, se puede ajustar la reacción para dar el tamaño predominante (n) deseado.

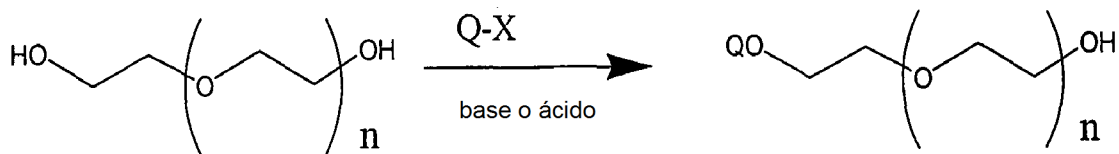
5 Este enfoque proporciona un modo simple, rápido y eficaz para preparar PEG mono-disperso de cualquier tamaño. La purificación se simplifica mediante este enfoque debido a las diferencias en cuanto a tamaño (y por tanto las características fisicoquímicas) de los PEG mono-dispersos. Esto permite el uso de técnicas de purificación simples y convencionales tales como gel de sílice, celulosa de fase inversa, filtración por membrana (nanofiltración y ultrafiltración). Los dioles de PEG purificado se someten posteriormente a derivatización para dar cualquier forma funcional que se desee.

10 **Ejemplo 4**

La Producción de Alcoxi PEG

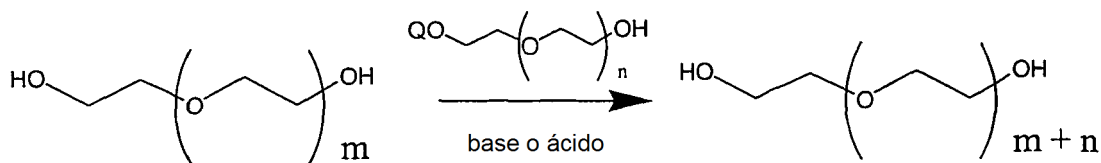
Se usa el enfoque general mostrado a continuación para prepara alcoxi-PEG u otros PEG mono-funcionalizados.

En una primera realización, se crea una molécula de PEG bifuncionalizada activada como se muestra a continuación.



15 en la que el símbolo n representa un número entre 1 y 100.000. El símbolo Q representa cualquier grupo saliente que sea compatible con la química de la presente invención. Grupos salientes a modo de ejemplo incluyen haluros, tresilatos, tosilatos y mesilatos. El símbolo X representa cualquier contraión que sea compatible con el grupo saliente.

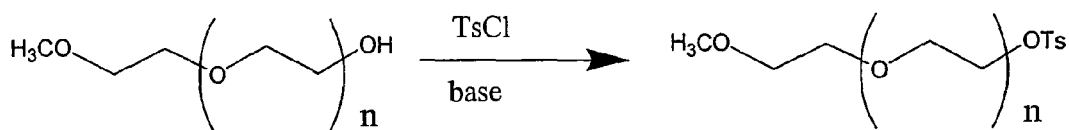
20 La molécula de PEG bifuncionalizado activado se usa para extender la longitud de la molécula de PEG como se muestra a continuación.



en la que el símbolo m representa un número entre 1 y 100.000.

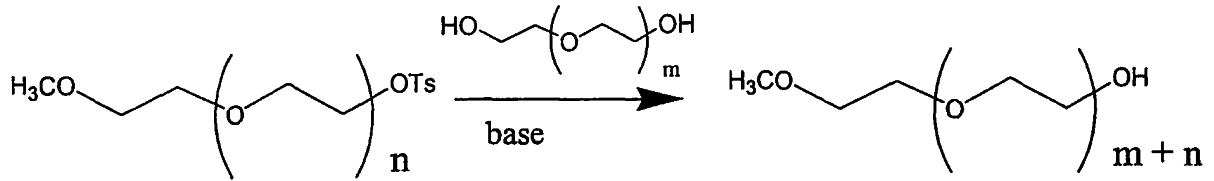
25 En una segunda realización, se extiende un PEG mono-funcionalizado y posteriormente se activa para su uso en la conjugación con un resto biológico como se muestra a continuación.

En una primera etapa, se somete a tosilación un PEG mono-funcionalizado.



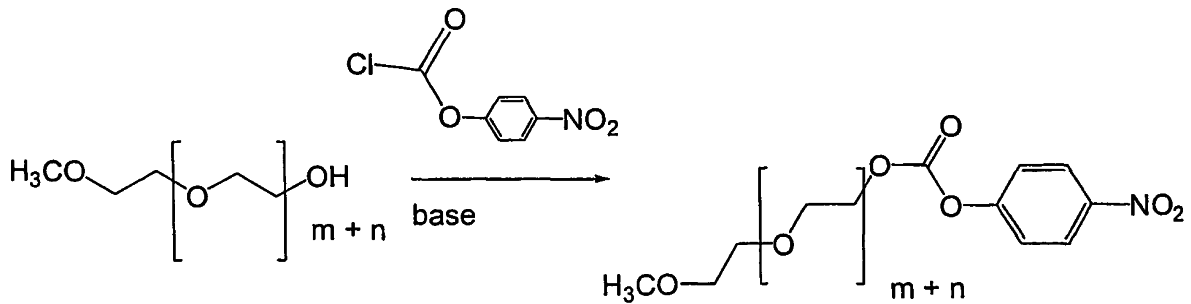
en la que el símbolo n representa un número entre 1 y 100.000.

En una segunda etapa, se extiende el PEG mono-funcionalizado



en la que el símbolo m representa un número entre 1 y 100.000.

En una etapa final, se activa el compuesto de PEG mono-funcionalizado y extendido para la conjugación con un resto biológico como se muestra a continuación.

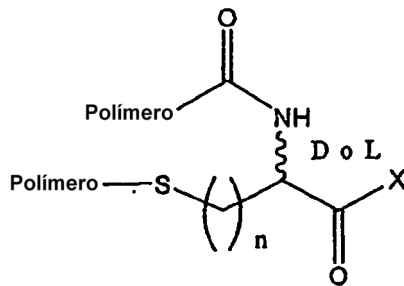


5

Ejemplo 5

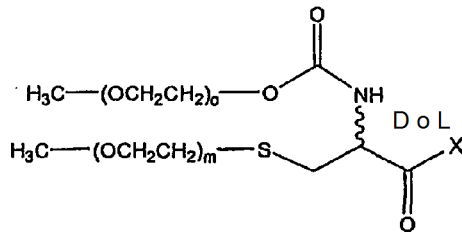
Composiciones Adicionales y Procedimientos para la Preparación de Polímeros de Bi-Antena

Las estructuras adicionales de bi-antena presentan la siguiente fórmula general:



10 en la que el símbolo X representa OH, H, Q (un grupo de activación) y un resto biológico, tal como una proteína, azúcar, lípido o nucleótido. El símbolo n representa un número entre 1 y 10. El término "polímero" puede ser un PEG, mPEG (metoxi polietilenglicol), PPG (polipropilenglicol), mPPG, poliglutamato, poliaspartato, polilactato y poli(ácido siálico).

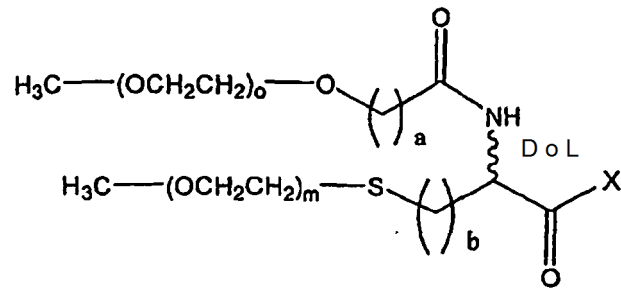
En una realización a modo de ejemplo, la estructura de bi-antena presenta la siguiente fórmula:



15

en la que los símbolos m y o representan independientemente números entre 1 y 10.000. El símbolo X representa OH, H, Q (un grupo de activación) y un resto biológico, tal como una proteína, un azúcar, lípido o nucleótido.

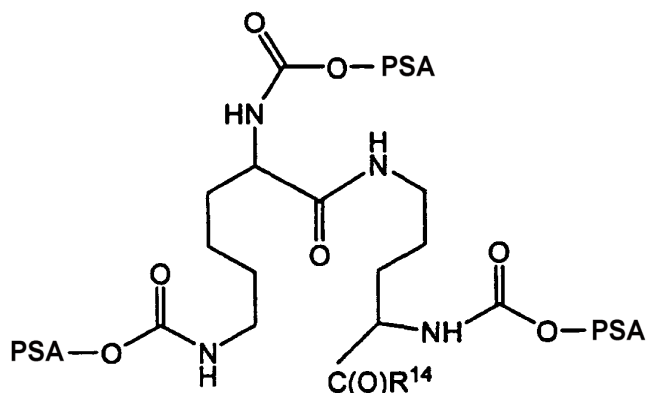
En otra realización a modo de ejemplo, la estructura de bi-antena presenta la siguiente fórmula:



en la que los símbolos a y b representan independientemente números entre 1 y 24. Los símbolos m y o representan independientemente números entre 1 y 10.000. El símbolo X representa OH, H, Q (un grupo de activación) y un resto biológico, tal como una proteína, un azúcar, lípido o nucleótido.

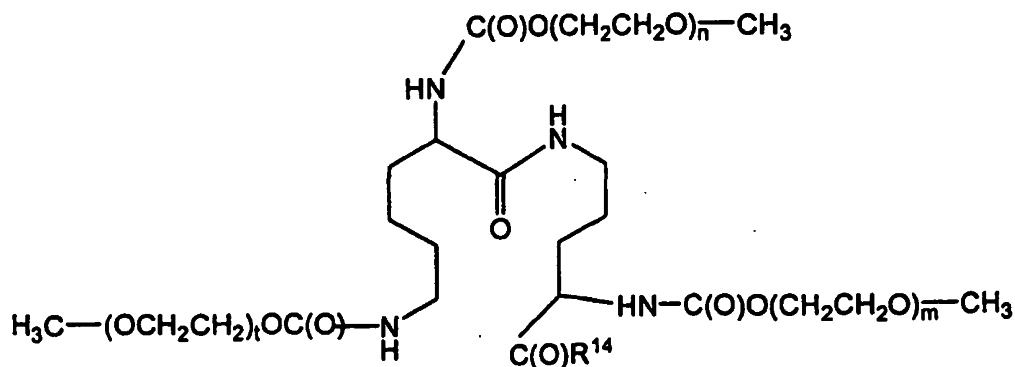
REIVINDICACIONES

1. Un péptido que tiene la fórmula:



en la que

- 5 PSA es un polímero soluble en agua y R^{14} es un miembro seleccionado entre OH, grupos funcionales reactivos, un grupo que comprende un resto sacárido o un grupo que se encuentra engarzado a una molécula transportadora.
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol).
- 10 3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que tiene la fórmula:



en la que

m, n y t son miembros que están seleccionados independientemente entre los números enteros de 1 a 20.000.

4. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que R^{14} comprende un resto sacárido.
- 15 5. El péptido de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho resto sacárido es un azúcar de nucleótido.
6. El péptido de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho resto sacárido está conjugado con un miembro seleccionado entre un segundo péptido y un lípido.
7. El péptido de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho resto sacárido está conjugado con un miembro seleccionado entre un aminoácido y un resto glucosilo de dicho segundo péptido.
- 20 8. El péptido de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho resto sacárido es un grupo de engarce de glucosilo entre dicho péptido y dicho segundo péptido.
9. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho resto sacárido es un grupo de engarce de glucosilo intacto entre dicho péptido y dicho segundo péptido.
- 25 10. Una formulación farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que R^{14} comprende una molécula transportadora que es un miembro seleccionado entre restos terapéuticos y un vehículo farmacéuticamente aceptable.