

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 187**

51 Int. Cl.:

A01N 43/04 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2004 E 04813334 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1694274**

54 Título: **Factor estimulante de colonias de granulocitos glicopegilados**

30 Prioridad:

03.12.2003 US 526796 P

26.01.2004 US 539387 P

23.03.2004 US 555813 P

11.05.2004 US 570282 P

29.07.2004 US 592744 P

29.09.2004 US 614518 P

29.10.2004 US 623387 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.09.2013

73 Titular/es:

BIOGENERIX AG (100.0%)

JANDERSTRASSE 3

68199 MANNHEIM, DE

72 Inventor/es:

DEFREES, SHAWN;

CLAUSEN, HENRIK;

ZOPF, DAVID A.;

WANG, ZHI-GUANG;

SCHWARTZ, MARC;

WU, BINGYUAN y

BOWE, CARYN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 422 187 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

Factor estimulante de colonias de granulocitos glicopeglados

Antecedentes de la invención

- 5 EL factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una glicoproteína que estimula la supervivencia, proliferación, diferenciación y la función de células progenitoras de granulocitos neutrófilos y neutrófilos maduros. Las dos formas de G-CSF humano recombinante en uso clínico son estimulantes potentes de la granulopoyesis de neutrófilos y han demostrado eficacia en la prevención de complicaciones infecciosas de algunos estados neutropénica. Se pueden utilizar para acelerar la recuperación de neutrófilos de los tratamientos mielosupresores.
- 10 G-CSF disminuye la morbilidad de la quimioterapia del cáncer mediante la reducción de la incidencia de la neutropenia febril, la morbilidad de la quimioterapia de dosis alta con el apoyo de un trasplante de médula, y la incidencia y duración de la infección en pacientes con neutropenia crónica severa. Además, se ha demostrado recientemente que el G-CSF tiene acción terapéutica cuando se administra después del inicio del infarto de miocardio.
- 15 La forma humana de G-CSF fue clonada por grupos de Japón y Estados Unidos en 1986 (ver, por ejemplo, Nagata et al Nature 319: 415-418, 1986). La glicoproteína humana natural existe en dos formas, una de 175 y la otra de 178 aminoácidos. La forma más abundante y más activa de 175 aminoácidos se ha utilizado en el desarrollo de productos farmacéuticos por tecnología de ADN recombinante.
- 20 El G-CSF humano recombinante sintetizado en un sistema de expresión de E. coli se llama filgrastim. La estructura de filgrastim difiere ligeramente de la glicoproteína natural. La otra forma de G-CSF humano recombinante se llama lenograstim y se sintetiza en las células de ovario de hámster chino (CHO).
- 25 hG-CSF es una proteína monomérica que dimeriza el receptor de G-CSF por formación de un complejo 2:2 de 2 moléculas de G-CSF y 2 receptores (Horan et al Biochemistry, 35(15): 4886-96 (1996)). Los siguientes residuos de hG-CSF se han identificado mediante estudios cristalográficos de rayos X como partes de la interfaces de unión al receptor: G4, P5, A6, S7, 58, L9, P10, Q11, S12, L15, K16, E19, Q20, L108, D109, D112, TI 15, T116, Q119, E122, E123, y L124 (ver, por ejemplo, Aritomi et al., (1999) Nature 401: 713).
- 30 Las formas disponibles en el comercio de rhG-CSF tienen un efecto farmacológico a corto plazo y a menudo se deben administrar más de una vez al día durante el estado de leucopenia. Una molécula con una vida media de circulación más larga puede disminuir el número de administraciones necesarias para aliviar la leucopenia y prevenir las infecciones consiguientes. Otro problema con los productos rG-CSF disponibles en la actualidad es la aparición de dolor óseo dependiente de la dosis. Debido a que el dolor óseo es experimentado por los pacientes como un efecto secundario significativo del tratamiento con rG-CSF, sería deseable proporcionar un producto rG-CSF que no causa dolor óseo, ya sea por medio de un producto que inherentemente no tienen este efecto o que es efectivo en una dosis suficientemente pequeña que no causa dolor óseo. Por lo tanto, existe una clara necesidad de mejorar las moléculas recombinantes de G-CSF.
- 35 Se han informado variantes de proteínas manipuladas genéticamente de hG-CSF se han reportado (patentes US Nros. 5.581.476, US 5.214.132, US 5.362.853, US 4.904.584 y Riedhaar-Olson et al., Biochemistry 35: 9034 a 9041, 1996). La modificación de hG-CSF y otros polipéptidos a fin de introducir al menos una cadena de carbohidrato adicional en comparación con el polipéptido nativo también se ha descrito (patente US N.º 5.218.092). Además, se han informado y estudiado (ver, por ejemplo, Satake-Ishikawa et al. (1992) Cell Structure and Function 17: 157; Bowen et al. (1999) Experimental Hematology 27: 425; patentes US Nros. 5.824.778, US 5.824.784, WO 96/11953, WO 95/21629, y WO 94/20069).
- 40 La unión de polímeros sintéticos al esqueleto del péptido en un intento de mejorar las propiedades farmacocinéticas de la terapéutica con glicoproteína se conoce en la técnica. Un polímero ilustrativo que se ha conjugado con péptidos es poli(etilenglicol) ("PEG"). Se ha demostrado que el uso de PEG para derivatizar péptidos terapéuticos reduce la inmunogenicidad de los péptidos. Por ejemplo, la patente US. N.º 4.179.337 (Davis et al.) describe polipéptidos no inmunogénicos, tales como enzimas y hormonas peptídicas acopladas al polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol. Además de una inmunogenicidad reducida, el tiempo de depuración en la circulación se prolonga debido al aumento de tamaño del conjugado- PEG de los polipéptidos en cuestión.
- 45 El principal modo de unión de PEG, y sus derivados, a péptidos es una unión no específica a través de un residuo de aminoácido del péptido (ver, por ejemplo, la patente US N.º 4.088.538, patente US N.º 4.496.689, patente US N.º 4.414.147, patente US N.º 4.055.635, y PCT WO 87/00056). Otro modo de fijación de PEG a péptidos es a través de la oxidación no específica de los residuos de glicosilo en un glicopéptido (ver, por ejemplo, WO 94/05332).
- 50 En estos métodos no específicos, se añade poli(etilenglicol) de una manera no específica al azar a los residuos de reactivos en un esqueleto peptídico. Obviamente, la adición aleatoria de moléculas de PEG tiene sus desventajas, como la falta de homogeneidad del producto final, y la posibilidad de reducción en la actividad biológica o enzimática del péptido. Por lo tanto, para la producción de péptidos terapéuticos, una estrategia de derivación que produce la
- 55

formación de un producto esencialmente homogéneo, fácilmente caracterizable y marcado específicamente es superior. Tales métodos se han desarrollado.

- 5 Los agentes terapéuticos de péptidos homogéneos marcados se pueden producir in vitro a través de la acción de las enzimas. A diferencia de los típicos métodos no específicos para la unión de un polímero sintético u otra marca a un péptido, la síntesis basada en enzimas tiene las ventajas de regioselectividad y estereoselectividad. Dos clases principales de enzimas para usar en la síntesis de péptidos marcados son glicosiltransferasas (por ejemplo, sialiltransferasas, oligosacariltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas), y glicosidasas. Estas enzimas se pueden utilizar para la unión específica de los azúcares que se pueden modificar posteriormente para comprender un residuo terapéutico. Alternativamente, las glicosiltransferasas y glicosidasas modificadas se pueden usar para transferir directamente los azúcares modificados a un esqueleto peptídico (ver, por ejemplo, la patente US 6.399.336, y la solicitud de patente de publicaciones US 20030040037, 20040132640, 20040137557, 20040126838 y 20040142856). Los métodos que combinan elementos sintéticos químicos y enzimáticos también son conocidos (ver, por ejemplo, Yamamoto et al. Carbohydr, Res. 305: 415-422 (1998) y la publicación de la solicitud de patente de US 20040137557.
- 10 En respuesta a la necesidad de mejorar la terapia con G-CSF, la presente invención proporciona un G-CSF glicopeptilado que es terapéuticamente activo y que tiene parámetros y propiedades farmacocinéticas mejores con respecto a un péptido G-CSF idéntico, o estrechamente análogo, que no es glicopeptilado. Además, la invención proporciona un método para producir de manera rentable y en escala industrial los mejores péptidos de G-CSF de la invención.

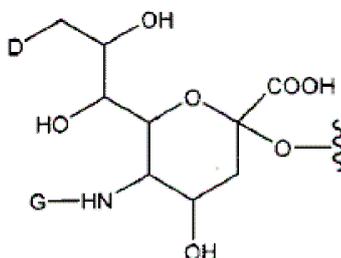
20 Síntesis de la invención

- Ahora se ha descubierto que la modificación controlada del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) con uno o más restos de poli(etilenglicol) proporciona un nuevo derivado de G-CSF con propiedades farmacocinéticas que son mejores con respecto al correspondiente G-CSF nativo (no pegilado) (FIGURA 3). Por otra parte, la actividad farmacológica del G-CSF glicopeptilado es aproximadamente el mismo que el filgrastim mono-pegilado disponible en el comercio (Figura 4).

- En una realización ilustrativa, las moléculas de G-CSF "glicopeptilado" de la invención se producen por la formación mediada por enzima de un conjugado entre un péptido G-CSF glicosilado o no glicosilado y un resto sacarilo enzimáticamente transferible que incluye un resto (etilenglicol) dentro de su estructura el resto de PEG está unido al resto sacarilo directamente (es decir, a través de un solo grupo formado por la reacción de dos grupos reactivos) o a través de un resto ligador, por ejemplo, alquilo alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, etc. Una estructura ilustrativa de PEG-sacarilo transferible se expone en la FIG. 5.

- Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un resto de PEG, por ejemplo, PEG y un péptido que tiene una actividad in vivo similar o de otro modo análoga a un G-CSF reconocido en la técnica. En el conjugado de la invención, el resto de PEG está unido covalentemente al péptido a través de un grupo de enlace glicosilo intacto. Los grupos de unión glicosilo intacto ilustrativo incluyen restos de ácido siálico que se derivan con PEG.

La presente invención proporciona un péptido G-CSF que incluye el resto:

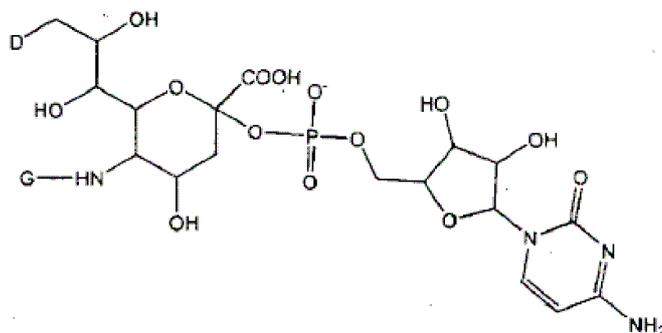


- 40 En la fórmula anterior, D es -OH o $R^1-L-NH-$. El símbolo G representa R^1-L- o $-C(O)alquilo$ (C1-C6). R^1 es un resto que comprende un residuo de polietilenglicol ramificado, como se define en las reivindicaciones y L es un ligador que es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

En general, cuando D es OH, G es R^1-L- , y cuando G es $-C(O)alquilo$ (C1-C6), D es $R^1-L-NH-$. En las estructuras de ácido siálico modificadas expuestas en la presente, COOH también representa $COO-$ y/o una sal de esta.

- 45 En otro aspecto, la invención proporciona un método de obtener un G-CSF PEG-ilado que comprende el resto anterior. El método de la invención incluye (a) poner en contacto un péptido G-CSF sustrato con un dador de PEG-ácido siálico y una enzima que transfiere el PEG-ácido siálico en un residuo aminoácido o glicosilo del GCSF, en las

condiciones apropiadas para la transferencia. Un resto dador de PEG-ácido siálico ilustrativo tiene la fórmula:



En una realización, el huésped es una célula de mamífero. En otras realizaciones la célula huésped es una célula de insecto, célula de planta, una bacteria o un hongo.

- 5 Las propiedades farmacocinéticas de los compuestos de la invención varían fácilmente mediante la alteración de la estructura, número o posición del sitio de glicosilación del péptido. En consecuencia, está dentro del alcance de la presente solicitud añadir una o más mutaciones que inserta un sitio de glicosilación ligado en O o N en el péptido G-CSF que no está presente en el tipo salvaje. También se describen los anticuerpos para estas mutantes y sus productos finales e intermediarios glicosilados.
- 10 En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado G-CSF que tiene una población de restos del residuo PEG, por ejemplo, PEG, unido en forma covalente a este a través de un grupo de unión de glicosilo. En el conjugado de la invención, esencialmente cada miembro de la población se une por medio de un grupo de unión glicosilo a un residuo glicosilo del péptido, y cada residuo glicosilo tiene la misma estructura.

- 15 En una realización ilustrativa, la presente invención proporciona un conjugado de G-CSF que tiene una población de restos del residuo PEG, por ejemplo, PEG, unido de forma covalente a este a través de un grupo de unión glicosilo intacto. En el conjugado de la invención, esencialmente cada miembro de la población está unido a un residuo de aminoácido del péptido, y cada uno de los residuos de aminoácidos al que se une el polímero tiene la misma estructura. Por ejemplo, si un péptido incluye un residuo glicosilo unido a Thr, al menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 99,2%, 99,4%, 99,6%, o con más preferencia 99,8% de los péptidos en la población tendrán el mismo residuo glicosilo unido de modo covalente al mismo residuo Thr. La descripción anterior es igualmente relevante para ambos sitios de O-glicosilación y N-glicosilación.
- 20

También se proporciona una composición farmacéutica. La composición incluye un portador farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un residuo PEG no natural y un péptido G-CSF glicosilado o no glicosilado.

- 25 Otros objetivos y ventajas de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción de las figuras

La FIG. 1 es una estructura del G-CSF, que muestra la presencia y ubicación de una potencial glicosilación en Thr 133 (Thr 134 si está presente una metionina).

- 30 La FIG. 2 es un esquema que muestra una realización ilustrativa de la invención en que un residuo carbohidrato en un péptido G-CSF es remodelado por la adición enzimática de un resto GalNAc al residuo glicosilo en Thr 133 (Thr 134 es metionina presente) antes de añadir un resto sacarilo derivado con PEG.

La FIG. 3 es un gráfico que compara los tiempos de residencia in vivo de G-CSF no glicosilado, NeulastaTM y G-CSF glicopegilada enzimáticamente.

- 35 La FIG. 4 es un gráfico que compara las actividades de las especies mostradas en la FIG. 3.

La FIG. 5 es un esquema de síntesis para producir un ejemplo de precursor del grupo de unión de PEG-glicosilo (azúcar modificado) para usar en la preparación de los conjugados de la invención.

- 40 La FIG. 6 muestra secuencias de aminoácidos de G-CSF ilustrativas. La SEQ ID NO:1 es la variante de 175 aminoácidos, donde el primer aminoácido es metionina y existe un residuo de treonina en Thr 134. La SEQ ID NO:2 que tiene la misma secuencia de la variante de 175 aminoácidos excepto que falta la metionina guía, en consecuencia la secuencia comienza con T y existe un residuo de treonina en la posición 133.

La FIG. 7 ilustra algunos nucleótidos de azúcar modificados útiles en la práctica de la invención.

La FIG. 8 ilustra otros nucleótidos de azúcar modificados útiles ilustrativos en la práctica de la invención.

La FIG. 9 demuestra la producción de GCSF recombinante en las bacterias cultivadas en varios medios e inducidos con IPTG.

5 La FIG. 10 proporciona el análisis de transferencia Western de GCSF plegado de nuevo después de la cromatografía de SP-sefarosa.

La FIG. 11 es una tabla de sialil transferasas que se usar para transferir a un aceptor las especies de ácido siálico modificado expuestas en la presente y ácido siálico no modificado.

Descripción detallada de la invención y las realizaciones preferidas

10 Abreviaturas

PEG, poli(etilenglicol); PPG, poli(propilenglicol); Ara, arabinosilo; Fru, fructosilo; Fuc, fucosilo; Gal, galactosilo; GalNAc, N-acetilgalactosaminilo; Glc, glucosilo; GlcNAc, N-acetilglucosaminilo; Man, manosilo; ManAc, acetato de manosaminilo; Xil, xilosilo; y NeuAc, sialil(N-acetilneuraminilo); M6P, manosa-6-fosfato; Sia, ácido siálico, N-acetilneuraminilo, y sus derivados y análogos.

15 Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente invención generalmente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. En general, la nomenclatura utilizada en la presente y los procedimientos de laboratorio en el cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos y la hibridación son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para el ácido nucleico y la síntesis de péptidos. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con los métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (ver en general, Sambrook et al MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se proporcionan en este documento. La nomenclatura utilizada en la presente y los procedimientos de laboratorio en química analítica y síntesis orgánica descritos a continuación son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Las técnicas estándares, o modificaciones de los mismos, se utilizan para las síntesis químicas y análisis químicos.

20 Todos los oligosacáridos descritos en la presente se describen con el nombre o abreviatura para el sacárido no reductor (es decir, Gal), seguido por la configuración del enlace glicosídico (α o β), el enlace del anillo (1 o 2), la posición del anillo del sacárido reductor involucrado en el enlace (2, 3, 4, 6 u 8), y después el nombre o abreviatura del sacárido reductor (es decir, GlcNAc). Cada sacárido es con preferencia una piranosa. Para una revisión de la nomenclatura de glicobiología estándar ver, Essentials of Glycobiology Varki et al. eds. CSHL Press (1999).

30 Se considera que los oligosacáridos tienen un extremo reductor y un extremo no reductor, sea o no el sacárido en el extremo reductor es, de hecho, un azúcar reductor. De acuerdo con la nomenclatura aceptada, los oligosacáridos se representan en la presente con el extremo no reductor a la izquierda y el extremo reductor a la derecha.

35 El término "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 el ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc, o NANA). Un segundo miembro de la familia es ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en que el grupo N-acetilo de NeuAc está 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 et al., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). También se incluyen ácidos siálicos sustituidos en posición 9 tales como 9-O-acilo C1-C6-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para la revisión de familia de ácido siálico, ver, por ejemplo, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992)). La síntesis y el uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación se describen en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 octubre de 1992.

40 El término "factor estimulante de colonias de granulocitos" o "péptido del factor estimulante de colonias de granulocitos", o "G-CSF" o "péptido G-CSF" se refiere a cualquier péptido tipo salvaje o mutado, recombinante, o nativo, o cualquier fragmento de G-CSF que tiene una actividad que es o que imita la de GCSF nativo. El término también abarca generalmente miméticos de G-CSF no peptídicos. En una realización ilustrativa, un péptido G-CSF tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N °:1. En otras realizaciones ilustrativas un péptido G-CSF tiene una secuencia seleccionada de SEQ ID N °: 3-11.

El término "actividad de factor estimulante de colonias de granulocitos" se refiere a cualquier actividad de unión que

incluye la unión y activación del receptor, inhibición de la unión al receptor, o cualquier reacción bioquímica o fisiológica que normalmente es afectada por la acción del factor estimulante de colonias de granulocitos de tipo salvaje. La actividad del factor estimulante de colonias de granulocitos puede surgir de la acción de cualquier péptido factor estimulante de colonias de granulocitos, como se define anteriormente.

5 "Péptido" se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y están unidos entre sí a través de enlaces amida, denominados alternativamente como un polipéptido. Además, los aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina también están incluidos. Los aminoácidos que no son codificados por genes también se pueden usar en la presente invención. Además, los aminoácidos que se han modificado para incluir grupos reactivos, sitios de glicosilación, polímeros, biomoléculas y similares también se pueden usar en la
10 invención. Todos los aminoácidos utilizados en la presente invención puede ser la forma de isómero D o L. Generalmente, se prefiere el isómero L. Además, otros peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Como se usa en la presente, "péptido" se refiere a péptidos glicosilados y no glicosilados. También se incluyen péptidos que están incompletamente glicosilados por un sistema que expresa el péptido. Para una revisión general, ver, Spatola, A. F., in CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983).
15

El término "conjugado peptídico", se refiere a las especies de la invención en la que un péptido se conjuga con un azúcar modificado como se establece en la presente.

El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos naturales y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos
20 naturales son los codificados por el código genético, así como los s aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un
25 aminoácido natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido natural. Como se usa en la presente, "aminoácido", ya sea en un ligador o un componente de una secuencia de péptido se refiere tanto a los isómeros D y L de los aminoácidos, así como las mezclas de estos dos isómeros.
30

Como se usa en la presente, el término "azúcar modificado", se refiere a un carbohidrato natural o no, que se añade enzimáticamente en un aminoácido o un residuo de glicosilo de un péptido en un procedimiento de la invención. El
35 azúcar modificado se selecciona de diversos sustratos de enzimas que incluyen nucleótidos de azúcar (mono-, di- y tri-fosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo y azúcares que no son activados ni nucleótidos). El "azúcar modificado" se funcionaliza de modo covalente con un "grupo modificador". Los grupos modificadores útiles incluyen, pero sin limitación, restos de PEG, residuos de diagnóstico, biomoléculas y similares. El grupo modificador con preferencia es un hidrato de carbono natural o no modificado. El locus de funcionalización con el grupo de modificación se selecciona de manera tal que no impide que el "azúcar modificado" se agregue enzimáticamente a un péptido.

40 El término "soluble en agua" se refiere a restos que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. Los métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua son bien conocidos en la técnica. Los restos de PEG ilustrativos incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener o secuencias mixtas o estar compuestos de un solo aminoácido, por ejemplo, poli(lisina). Del mismo modo, los sacáridos pueden ser de secuencia mixta o compuesta de una sola subunidad de sacárido, por ejemplo, dextrano, amilasa, quitosano, y poli(ácido siálico). Un ejemplo de poli(éter) es poli(etilenglicol). Poli(etilenimina) es un ejemplo de poliamina, y el ácido poli(acrílico) es un ácido poli(carboxílico) representativo.
45

El término "grupo de unión glicosilo", como se usa en la presente, se refiere a un residuo de glicosilo al que se une covalentemente un agente (por ejemplo, resto de PEG resto, residuo terapéutico, biomolécula). En los métodos de la invención, el "grupo de unión glicosilo" se une de forma covalente a un péptido glicosilado o no glicosilado, de este modo el agente se une a un residuo de aminoácido y/o glicosilo en el péptido. Un "grupo de unión glicosilo" generalmente se deriva de un "azúcar modificado" por la unión enzimática del "azúcar modificado" a un residuo de aminoácido y/o glicosilo del péptido. Un "grupo de unión glicosilo intacto" se refiere a un grupo de unión que se deriva de un resto glicosilo en el que el monómero de sacárido individual que une el conjugado no se degrada, por ejemplo, oxida, por ejemplo, por metaperyodato de sodio. Los "grupos de unión glicosilo intactos" de la invención se
50 pueden derivar de un oligosacárido natural mediante la adición de la unidad de glicosilo o la eliminación de una o más unidades de glicosilo de una estructura de sacárido original.
55

El término "resto de direccionamiento", tal como se utiliza en la presente, se refiere a las especies que se localizarán selectivamente en un tejido o región particular del cuerpo. La localización está mediada por el reconocimiento específico de los determinantes moleculares, el tamaño molecular del agente dirigido o conjugado, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y similares. Otros mecanismos para dirigir un agente a un tejido o región particular,
60

son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de restos direccionamiento incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, transferrina, HS-glicoproteína, factores de coagulación, proteínas del suero, β -glicoproteína, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO y similares.

5 Como se usa en la presente, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material, que cuando se combina con el conjugado conserva la actividad de los conjugados y no es reactivo con los sistemas inmunitarios del sujeto. Los ejemplos incluyen alguno de los portadores farmacéuticos estándares tales como una solución salina regulada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Otros portadores también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos que incluyen comprimidos recubiertos y cápsulas. Típicamente, tales portadores contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, 10 ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de este, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros portadores conocidos. Tales portadores pueden también incluir aditivos de sabor y color u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden tales portadores se formulan por métodos convencionales bien conocidos.

15 Como se usa en la presente, “administración”, significa la administración oral, administración como un supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal o subcutánea, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una mini-bomba osmótica, al sujeto. La administración es por cualquier ruta, que incluye parenteral, y transmucosa (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal, o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraarterial, 20 intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Por otra parte, cuando la inyección es para tratar un tumor, por ejemplo, para inducir apoptosis, la administración puede ser directamente en el tumor y/o en los tejidos que rodean al tumor. Otros modos de administración incluyen, pero no sin limitación, el uso de formulaciones liposómicas, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

25 Los términos “mejoría” o “mejorar” se refieren a cualquier indicio de éxito en el tratamiento de una patología o afección, que incluye cualquier parámetro objetivo o subjetivo como abatimiento, remisión o disminución de los síntomas o una mejoría del bienestar físico o mental del paciente. La mejoría de los síntomas se pueden basar en parámetros objetivos o subjetivos, incluyendo los resultados de un examen físico y/o una evaluación psiquiátrica.

30 El término “terapia” se refiere a “tratar” o “tratamiento” de una enfermedad o afección, que incluye evitar la aparición de enfermedad o afección en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no experimenta o exhibe síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), inhibir la enfermedad (lentificar o detener su desarrollo), proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (que incluye el tratamiento paliativo), y aliviar la enfermedad (lo que provoca la regresión de la enfermedad).

El término “cantidad efectiva” o “una cantidad efectiva para” o una “cantidad terapéuticamente efectiva” o cualquiera de los términos gramaticalmente equivalente significa la cantidad que, cuando se administra a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el tratamiento para esa enfermedad.

35 El término “aislado” se refiere a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes, que se utilizan para producir el material. Para los conjugados peptídicos de la invención, el término “aislado” se refiere al material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan al material en la mezcla usada para preparar el conjugado peptídico. “Aislado” y “puro” se usan indistintamente. Típicamente, los conjugados peptídicos aislados de la invención tienen un nivel de pureza con preferencia expresados como un 40 rango. El extremo inferior del rango de pureza para los conjugados peptídicos es de aproximadamente 60%, aproximadamente el 70% o aproximadamente el 80% y el extremo superior de la gama de pureza es de aproximadamente 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% o más de aproximadamente 90%.

45 Cuando los conjugados peptídicos son más de aproximadamente 90% pura, sus purezas también se expresan con preferencia como un rango. El extremo inferior del rango de pureza es de aproximadamente 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 96% o aproximadamente 98%. El extremo superior del rango de pureza es de aproximadamente 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 98% o aproximadamente 100% de pureza.

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

50 “Esencialmente cada miembro de la población”, como se usa en la presente, describe una característica de una población de conjugados peptídicos de la invención en la que un porcentaje seleccionado de los azúcares modificados añadido a un péptido se añade a múltiples sitios aceptores, idénticas en el péptido. “Esencialmente cada miembro de la población”, se refiere a la “homogeneidad” de los sitios en el péptido conjugado a un azúcar modificado y se refiere a los conjugados de la invención, que son al menos aproximadamente 80%, con preferencia 55 al menos aproximadamente 90% y con más c preferencia al menos aproximadamente 95% homogénea.

“Homogeneidad” se refiere a la consistencia estructural en la población de los restos aceptores a los que se conjugan los azúcares modificados. En consecuencia, en un conjugado peptídico de la invención en que cada resto de azúcar modificado se conjuga a un sitio aceptor que tiene la misma estructura que el sitio aceptor al cual se

conjugan todos los otros azúcares modificados, se dice que el conjugado peptídico es aproximadamente 100% homogéneos. La homogeneidad se expresa normalmente como un rango. El extremo inferior del rango de homogeneidad para los conjugados peptídicos es aproximadamente 60%, aproximadamente 70% o aproximadamente 80% y el extremo superior del rango de pureza es aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90% o más de aproximadamente 90%.

Cuando los conjugados peptídicos son más de o igual a aproximadamente 90% homogéneos, su homogeneidad con preferencia también se expresa como un rango. El extremo inferior del rango de homogeneidad es aproximadamente 90%, aproximadamente 92%, aproximadamente 94%, aproximadamente 96% o aproximadamente 98%. El extremo superior del rango de pureza es aproximadamente 92%, aproximadamente 94%, aproximadamente 96%, aproximadamente 98% o aproximadamente 100% homogeneidad. La pureza de los conjugados peptídicos se determina típicamente por uno o más métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), *espectrometría de masa con análisis de tiempo de vuelo por desorción láser asistida por matriz* y (MALDITOF), electroforesis capilar y similares.

“Glicoforma sustancialmente uniforme” o un “patrón de glicosilación sustancialmente uniforme”, cuando se refiere a una especie de glicopéptido, se refiere al porcentaje de restos aceptores que están glicosilados por la glicosiltransferasa de interés (por ejemplo, fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de una unidad α ,1,2-fucosiltransferasa, existe un patrón fucosilación sustancialmente uniforme si sustancialmente todo (como se define más adelante) de la Gal β 1,4-GlcNAc-R y sus análogos sialilados están fucosilados en un conjugado peptídico de la invención. Los expertos en la técnica entenderán, que el material de partida puede contener restos aceptores glicosilados (por ejemplo, restos Gal β 1,4-GlcNAc-R fucosilados). En consecuencia, el porcentaje de glicosilación calculado incluirá restos aceptores que son glicosilados por los métodos de la invención, así como los restos aceptores ya glicosilados en el material de partida.

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

Cuando los grupos sustituyentes se especifican con sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, igualmente abarcan los sustituyentes químicamente idénticos, que pueden resultar de la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{O}-$ se considera que también nombra $-\text{OCH}_2$.

El término “alquilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada, o radical hidrocarbonado cíclico, o combinación de estos, que puede estar completamente saturado, mono- o poliinsaturado y puede incluir radicales di- y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designados (es decir, C1-C10 significa uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarbonatos saturados incluyen, pero sin limitación, grupos tales como 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, nheptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero 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 e isómeros superiores. El término “alquilo”, a menos que se indique lo contrario, también significa que incluye los derivados de alquilo definidos con mayor detalle a continuación, tales como “heteroalquilo”. Los grupos alquilo que se limitan a los grupos hidrocarbonatos se denominan como “homoalquilo”.

El término “alquileo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ejemplifica, pero sin limitación, por $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, y también incluye los grupos descritos a continuación como “heteroalquileo”. Normalmente, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, en la presente invención se prefieren los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Un “alquilo inferior” o “alquileo inferior” es una de grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, en general que tiene ocho o menos átomos de carbono.

Los términos “alcoxi”, “alquilamino” y “alquiltio” (o tialcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a los grupos alquilo unidos al resto de la molécula por medio de un átomo de oxígeno, un grupo amino, o un átomo de azufre, respectivamente.

El término “heteroalquilo” por sí mismo o en combinación con otro término significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena lineal o ramificada estable, o radical hidrocarbonado cíclico, o combinaciones de estos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y donde los átomos de nitrógeno y azufre se pueden oxidar opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los heteroátomos O, N y S y Si se pueden colocar en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en que el grupo alquilo se une al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero 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, tales como, por ejemplo,

–CH₂–NH–OCH₃ y –CH₂–O–Si(CH₃)₃. De modo similar, el término “heteroalquileo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero sin limitación con, –CH₂–CH₂–S–CH₂–CH₂– y –CH₂–S–CH₂–CH₂–NH–CH₂–. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también puede ocupar uno o ambos extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilenodioxi, alquilenamino, alquilendiamino, y similares). Aún más, en los grupos de unión alquileo y heteroalquileo, ninguna orientación del grupo de unión está implicada en la dirección en que se escribe la fórmula del grupo de unión. Por ejemplo, la fórmula –C(O)₂R¹– representa –C(O)₂R¹– y –R¹C(O)₂–.

Los términos “cicloalquilo” y “heterocicloalquilo”, por sí mismos o en combinación con otros términos representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de “alquilo” y “heteroalquilo”, respectivamente. En forma adicional, para el heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en que el heterociclo se une al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopentilo, ciclohexilo, 1–ciclohexenilo, 3–ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero 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.

Los términos “halo” o “halógeno” por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Adicionalmente, los términos tales como “haloalquilo” significan que incluyen monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término “haloalquilo (C1–C4)” significa que incluyen pero sin limitación, trifluorometilo, 2,2,2–trifluoroetilo, 4–clorobutilo, 3–bromopropilo, y similares.

El término “arilo” significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente aromático, poliinsaturado que puede ser un anillo único o múltiples anillos (con preferencia de 1 a 3 anillos), que se fusionan entre sí o se ligan de modo covalente. El término “heteroarilo” se refiere a los grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O, y S, donde los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo se puede unir al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1–naftilo, 2–naftilo, 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, 2–tiazolilo, 4–tiazolilo, 5–tiazolilo, 2–furilo, 3–furilo, 2–thienilo, 3–thienilo, 2–piridilo, 3–piridilo, 4–piridilo, 2–pirimidilo, 4–pirimidilo, 5–benzotiazolilo, purinilo, 2–benzimidazolilo, 5–indolilo, 1–isoquinolilo, 5–isoquinolilo, 2–quinoxalinilo, 5–quinoxalinilo, 3–quinolilo, tetrazolilo, berizo[b]furanilo, benzo[b]tienilo, 2,3–dihidrobenczo[1,4]dioxin–6–ilo, benzo[1,3]dioxo1–5–ilo y 6–quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas anulares arilo y heteroarilo mencionados anteriormente se seleccionan del grupo de los sustituyentes aceptables que se describen a continuación.

Para abreviar, el término “arilo” cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye anillos arilo y heteroarilo definidos anteriormente. En consecuencia, el término “arilalquilo” significa que incluye los radicales en que el grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) que incluyen los grupos alquilo en que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) ha sido reemplazado, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2–piridiloximetilo, 3–(1–naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los término anteriores (por ejemplo, “alquilo”, “heteroalquilo”, “arilo” y “heteroarilo”) significa que incluye las formas sustituidas y no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (que incluyen los grupos a menudo denominados como alquileo, alqueno, heteroalquileo, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno, y heterocicloalqueno) se denominan genéricamente como “sustituyentes del grupo alquilo” y pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de, pero sin limitación –OR', =O, =NR', =N–O', –NR'R', –SR', –halógeno, –SiR'R'R'', –OC(O)R', –C(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'R'')=NR'', –S(O)R', –S(O)₂R', –S(O)₂NR'R'', –NRSO₂R', –CN y –NO₂ en número que varía de cero a (2m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. R', R'', R''' y R'''' con preferencia se refieren de modo independiente 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 uno o más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona de modo independiente como cada grupos R', R'', R''' y R'''' cuando uno o más de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' se unen al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, –NR'R'' significa que incluye, pero sin limitación, 1–pirrolidinilo y 4–morfolinilo. A partir de la discusión anterior de los sustituyentes, los expertos en la técnica entenderán que el término “alquilo” significa que incluye grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes de los grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, –CF₃ y –CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, –C(O)CH₃, –C(O)CF₃, –C(O)CH₂OCH₃, y similares).

De modo similar a los sustituyentes descriptos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se denominan genéricamente como “sustituyentes del grupo arilo”. Los sustituyentes se seleccionan de, por ejemplo: halógeno, –O', =O, =NR', =N–O', –NR'R', –SR', –halógeno, –SiR'R'R'', –OC(O)R', –C(O)R', –CO₂R', –

- 5 CONR'R", - OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR'R"', -NR"C(O)₂R', -NRC(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(F)₂, fluoro(alcoxi (C1-C4), y fluoroalquilo (C1-C4), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema anular aromático y donde R', R'', R''' y R'''' con preferencia se seleccionan de modo independiente de 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 se selecciona de modo independiente como cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. En el esquema siguiente, el símbolo X representa "R" como se describió anteriormente.
- 10 Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo opcionalmente se pueden reemplazar con un sustituyente de la fórmula -T-C(O)-(CRR')_q-U-, donde T y U son de modo independiente -NR-, -O-, -CRR'- o un enlace simple y q es un número entero de 0 a 3. En forma alternativa, dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo opcionalmente pueden estar reemplazados con un sustituyente de la fórmula -A-(CH₂)_r-B-, donde A y B son de modo independiente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace simple, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces simples del nuevo anillo así
- 15 formado se pueden reemplazar opcionalmente con un enlace doble. En forma alternativa, dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo se pueden reemplazar opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -(CRR')_s-X-(CR''R''')_d-, donde s y d son de modo independiente 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''' con preferencia se seleccionan de modo independiente de hidrógeno o alquilo (C1-C6) sustituido o no sustituido.
- 20

Como se usa en la presente, el término "heteroátomo" significa que incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

Introducción

- 25 La presente invención abarca un método para la modificación de la estructura de glicano en el G-CSF. G-CSF es bien conocido en la técnica como una citoquina producida por células T activadas, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos estromales. G-CSF actúa principalmente en la médula ósea para aumentar la producción de leucocitos inflamatorios, y también funciona como una hormona endocrina para iniciar la reposición de los neutrófilos que se consumen durante las funciones inflamatorias. G-CSF también tiene aplicaciones clínicas en el reemplazo de médula ósea después de la quimioterapia.
- 30 La presente invención proporciona un conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). La invención proporciona conjugados de péptidos glicosilados y no glicosilados que tienen actividad estimulante de las colonias de granulocitos. Los conjugados además se pueden modificar por la conjugación posterior con diversas especies tales como residuos de diagnóstico, residuos de direccionamiento y similares.
- 35 La presente invención incluye además un método para la remodelación y/o modificación de G-CSF. G-CSF es una herramienta valiosa en el tratamiento de numerosas enfermedades, pero como se ha indicado, su eficacia clínica se ha visto obstaculizado por su farmacocinética relativamente mala.
- 40 Un péptido G-CSF de la invención se puede administrar a los pacientes para el propuesto de prevención de la infección en pacientes con cáncer sometidos a ciertos tipos de terapia de radiación, quimioterapia, y trasplantes de médula ósea, para movilizar las células progenitoras para la recolección en los trasplantes de células progenitoras de sangre periférica, para el tratamiento de la leucopenia relativa o crónica grave, independientemente de la causa, y para respaldar el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda. Además, el conjugado de polipéptido o composición de la invención se pueden usar para el tratamiento del SIDA u otras enfermedades de inmunodeficiencia, así como infecciones bacterianas.
- 45 G-CSF se ha clonado y secuenciado. En una realización ilustrativa, el G-CSF tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:
- 50 En consecuencia, la presente invención además abarca las variantes de G-CSF, como es bien conocido en la técnica. A modo de ejemplo, se ha descrito una variante de G-CSF en la patente US N.º 6.166.183, en que se describe un G-CSF que comprende el complemento natural de los residuos de lisina y además se une a una o dos moléculas de polietilenglicol. Adicionalmente, las patentes US Nros. 6.004.548, 5.580.755, 5.582.823 y 5.676.941 describe una variante de G-CSF en que uno o más de los residuos de cisteína de la posición 17, 36, 42, 64, y 74 se reemplazan con alanina o de modo alternativo serina. La patente US N.º 5.416.195 describe una molécula de G-CSF en que la cisteína de la posición 17, el ácido aspártico de la posición 27, y las serinas de las posiciones 65 y 66 están sustituidas con serina, serina, prolina, y prolina, respectivamente. Otras variantes son bien conocidas en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente US N.º 5.399.345. Otras variantes más tienen un aminoácido
- 55 seleccionado de las SEQ ID Nos:3-11.
- La expresión y la actividad de una molécula de G-CSF modificado de la presente invención se pueden ensayar usando métodos bien conocidos en la técnica, y como se describe en, por ejemplo, la patente US N.º 4.810.643. Como un ejemplo, la actividad puede medirse usando ensayos de captación de timidina radiomarcada. En resumen,

la médula ósea humana de donantes sanos se somete a un corte de densidad con Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml, Pharmacia, Piscataway, NJ) y las células de baja densidad se suspenden en medio de Iscove (GIBCO, La Jolla, CA) que contiene 10% de suero fetal bovino, glutamina y antibióticos. Aproximadamente 2×10^4 células de la médula ósea humana se incuban con medio de control o el G-CSF o la presente invención en placas de fondo plano de 96 pocillos a aproximadamente 37 °C en 5% de CO₂ en aire durante aproximadamente 2 días. Los cultivos luego se pulsan durante aproximadamente 4 horas con 0,51 µCi/pocillo de ³H timidina (New England Nuclear, Boston, MA) y la absorción se mide como se describe en, por ejemplo, Ventua, et al. (1983, Blood 61:781). Un aumento en ³H-timidina en las células de médula ósea humana en comparación con las células de médula ósea tratadas con un compuesto de control es una indicación de un compuesto G-CSF activo.

Como se discutió anteriormente, los conjugados de la invención se forman por la unión enzimática de un azúcar modificado al péptido G-CSF glicosilado o no glicosilado. El azúcar modificado, cuando se interpone entre el G-CSF péptido y el grupo de modificación en el azúcar se convierte en lo que se puede denominar en la presente ejemplo, como un "grupo de unión a glicosilo intacto". Mediante el uso de la exquisita selectividad de las enzimas, tales como glicosiltransferasas, el presente método proporciona péptidos que portan un grupo deseado en una o más ubicaciones específicas. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, un azúcar modificado está unido directamente en un lugar seleccionado en la cadena de péptido G-CSF o, alternativamente, el azúcar modificado se añade a un resto de carbohidrato de un glicopéptido. Los péptidos en los cuales los azúcares modificados se unen a un carbohidrato del glicopéptido y directamente a un residuo de aminoácido del esqueleto del péptido de G-CSF también están dentro del alcance de la presente invención.

En contraste con las conocidas estrategias de elaboración de péptidos químicos y enzimáticos, los métodos de la invención, hacen posible ensamblar péptidos y glicopéptidos que tienen un patrón de derivación sustancialmente homogéneo; las enzimas utilizadas en la invención son generalmente selectivas para un residuo de aminoácido particular o una combinación de residuos de aminoácidos del péptido G-CSF. Los métodos también son prácticos para la producción a gran escala de péptidos y glicopéptidos modificados. Por lo tanto, los métodos de la invención proporcionan un medio práctico para la producción en gran escala de glicopéptidos que tienen patrones de derivación uniformes preseleccionados. Los métodos son particularmente bien adecuados para la modificación de péptidos terapéuticos, incluyendo pero sin limitación, glicopéptidos que están glicosilados en forma incompleta durante la producción en células de cultivo celular (por ejemplo, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, células fúngicas, células de levadura, o células de procariontes) o plantas o animales transgénicos.

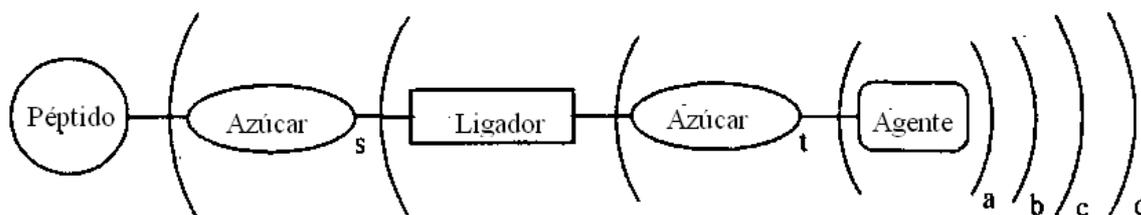
La presente invención también proporciona conjugados de péptidos de G-CSF glicosilados y no glicosilados con una mayor vida media terapéutica debido a, por ejemplo, la reducción de la tasa de depuración, o reducción de la tasa de absorción por el sistema inmunitario o reticuloendotelial (RES). Por otra parte, los métodos de la invención proporcionan un medio para enmascarar los determinantes antigénicos en los péptidos, de este modo se reduce o elimina una respuesta inmunitaria del huésped contra el péptido. La unión selectiva de los agentes de direccionamiento también se puede utilizar para dirigir un péptido a un receptor del tejido o superficie celular particular que es específica para el agente de direccionamiento particular.

Los conjugados

en un primer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un grupo modificador seleccionado y un péptido G-CSF.

La unión entre el péptido G-CSF y el resto seleccionado incluye un grupo de unión glicosilo intacto interpuesto entre el péptido y el resto seleccionado. Como se describe en la presente, el resto seleccionado es esencialmente cualquier especie que se puede unir a una unidad de sacárido, que produce un "azúcar modificado" que es reconocido por una enzima transferasa apropiada, que añade el azúcar modificado en el péptido G-CSF. El componente sacárido del azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido G-CSF y un resto seleccionado, se convierte en un "grupo de unión glicosilo intacto". El grupo de unión glicosilo se forma de algún mono- u oligosacárido que, después de la modificación con un resto seleccionado, es un sustrato para una transferasa apropiada.

Los conjugados de la invención se describen en las reivindicaciones y normalmente corresponderán a la estructura general:



50

en que los símbolos a, b, c, d y s representan un número entero positivo, distinto de cero; y t es 0 o un número entero positivo. El "agente" es normalmente un resto soluble en agua, por ejemplo, un resto de PEG. El ligador puede ser alguno de una amplia variedad de grupos de unión, infra. Alternativamente, el ligador puede ser un enlace simple o un "ligador de orden cero".

5 En una realización ilustrativa, el grupo modificador seleccionado es un polímero soluble en agua, por ejemplo, m-PEG. El polímero soluble en agua se une de modo covalente al péptido de G-CSF por medio de un grupo de unión glicosilo, que se une de modo covalente a un residuo de aminoácido o un residuo glicosilo del péptido G-CSF. La invención también proporciona conjugados en que un residuo de aminoácido y un residuo glicosilo se modifican con un grupo de unión glicosilo.

10 Un ejemplo de polímero soluble en agua es poli(etilenglicol), por ejemplo, metoxipoli(etilenglicol). T El poli(etilenglicol) usado en la presente invención no está restringido a ningún rango de peso molecular.

15 El poli(etilenglicol) o los conjugados de la invención son un PEG ramificado que tiene más de un resto PEG unido. Los ejemplos de PEG ramificados se describen en la patente US N.º 5.932.462; patente US N.º 5.342.940; patente US N.º 5.643.575; patente US N.º 5.919.455; patente US N.º 6.113.906; patente US N.º 5.183.660; WO 02/09766; Koderá Y., Bioconjugate Chemistry 5: 283-288 (1994); y Yamasaki et al., Agric. Biol. Chem., 52: 2125-2127, 1998. Las estructuras de PEG ramificadas de la invención se describen en la presente.

En una realización ilustrativa el peso molecular de cada poli(etilenglicol) del PEG ramificado es igual o mayor que aproximadamente 2.000, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 40.000 o 60.000 daltons.

20 Los péptidos de la presente invención incluyen al menos un sitio de glicosilación unido a N u O. Además de proporcionar los conjugados que se forman a través de un grupo de unión glicosilo añadido enzimáticamente, la presente invención proporciona conjugados que son muy homogéneos en sus patrones de sustitución. Usando los métodos de la invención, es posible formar conjugados peptídicos en que todo esencialmente de los restos del azúcar modificado en toda una población de conjugados de la invención se unen a múltiples copias de un residuo aminoácido o glicosilo estructuralmente idéntico. En consecuencia, en un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos de polímero soluble en agua, que están covalentemente unidos al péptido G-CSF a través de un grupo de unión glicosilo intacto. En un conjugado preferido de la invención, esencialmente cada miembro de la población se une por medio del grupo de unión glicosilo a un residuo glicosilo del péptido G-CSF, y cada residuo glicosilo del péptido G-CSF al que se fija el grupo de unión glicosilo tiene la misma estructura.

30 También se proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos de polímero soluble en agua unidos de forma covalente a este a través de un grupo de unión glicosilo. En una realización preferida, esencialmente cada miembro de la población de restos del polímero soluble en agua se une a un residuo de aminoácido del péptido G-CSF por medio de un grupo de unión glicosilo, y cada residuo de aminoácido que tiene un grupo de unión glicosilo unido a este tiene la misma estructura.

35 También se describen los conjugados análogos a los descritos anteriormente en que el péptido G-CSF se conjuga a un residuo terapéutico, residuo diagnóstico, residuo de direccionamiento, residuo de toxina o similares por medio de un grupo de unión glicosilo intacto. Cada uno de los residuos mencionados anteriormente puede ser una molécula pequeña, polímero natural (por ejemplo, polipéptido) o polímero sintético.

40 Esencialmente cualquier péptido o agente del factor estimulante de colonias de granulocitos, que tiene cualquier secuencia, es de utilidad como componente de péptido de los conjugados de la presente invención. El factor estimulante de colonias de granulocitos se ha clonado y secuenciado. En una realización ilustrativa, el péptido G-CSF tiene la secuencia presentada en la SEQ ID NO:1:

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL
 CATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLA
 GCLSQLHSGFLFYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLD
 VADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAF
 QRRAGGVLVASHLQSFLEVSRYRHLAQP (SEQ
 ID NO: 1).

En otra realización ilustrativa, el péptido G-CSF tiene la secuencia presentada en la SEQ ID NO:2:

TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGC
LSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVA
DFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQR
RAGGVLVASHLQSFLEVSyrVLRHLAQP (SEQ ID
NO: 2).

En otra realización ilustrativas, el péptido G-CSF tiene una secuencia presentada en las siguientes SEQ ID Nos:3-11,

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL
VSECATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQAL
QLAGCLS QLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTL
QLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPFA
SAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSyrVLRHLAQP
(SEQ ID NO:3)

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGP
ASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATYKL
CHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QL
HSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFAT

TIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGG
VLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP (SEQ ID NO:4)

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGP
ASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSECAT
YKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCL
SQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAD
FATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRR
AGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP (SEQ ID
NO:5)

MVTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEK
LCATYKLCHEPEELVLLGHTLGIPWAPLSSCPSQALQL
AGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQL
DVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASA
FQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP(SEQ
ID NO:6);

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEK
CATYKLCHEPEELVLLGHTLGIPWAPLSSCPSQALQLA
GCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLD
VADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAF
QRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP(SEQ ID
NO:7);

MVTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEK
LCATYKLCHEPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQL
AGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQL
DVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASA
FQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP(SEQ
ID NO:8)

MQTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEK
 LCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQL
 AGCLSQLHSGFLFYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQL
 DVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASA
 FQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP(**SEQ
 ID NO:9**);

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL
 CATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLA
 GCLSQLHSGFLFYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLD
 VADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAF
 QRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP(QGAM
 P; (**SEQ ID NO:10**) y

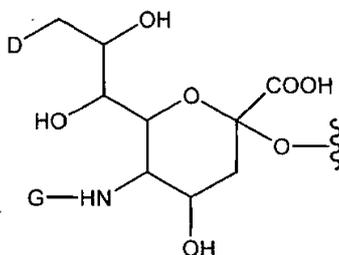
MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL
 CATYKLCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLA
 GCLSQLHSGFLFYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLD
 VADFATTIWQQMEELGMAPTTPTQTAMPASAF
 QRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP(**SEQ ID
 NO:11**)

5 En una realización ilustrativa, el péptido G-CSF de la invención incluye al menos un sitio de glicosilación unido a O, que está glicosilado con un residuo glicosilo que incluye un resto de PEG. El PEG se une de modo covalente al péptido G-CSF por medio de un grupo de unión glicosilo intacto. El grupo de unión glicosilo se une de modo covalente a un residuo de aminoácido o un residuo glicosilo del péptido G-CSF.

De modo alternativo, el grupo de unión glicosilo se une a una o más unidades de glicosilo de un glicopéptido. La invención también proporciona conjugados en que el grupo de unión glicosilo se une a un residuo de aminoácido y un residuo glicosilo.

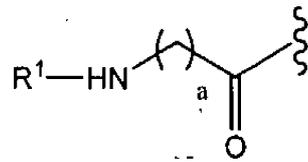
10 El resto de PEG se une a un ligador glicosilo intacto en forma directa, o por medio de un ligador no glicosilo, por ejemplo, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido.

El péptido G-CSF comprende un resto que tiene la fórmula I



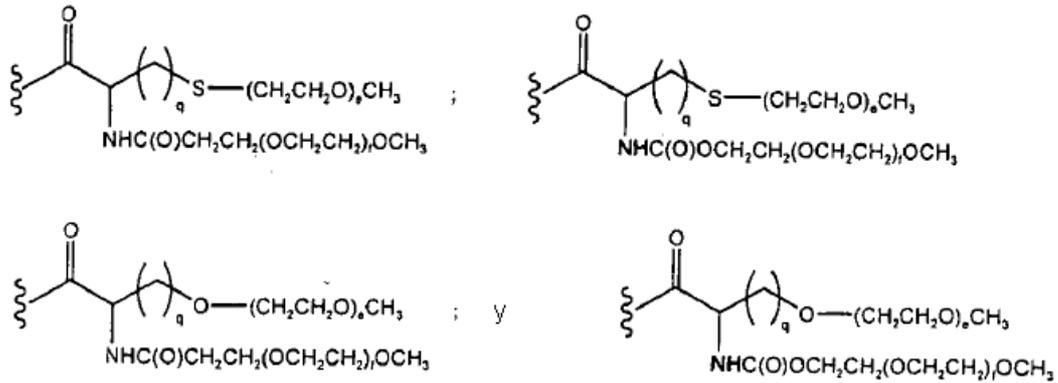
15 en que D es un miembro seleccionado de -OH y R¹-L-NH-; G es un miembro seleccionado de R¹-L- y -C(O)alquilo (C1-C6); R¹ es un resto como se describe en las reivindicaciones y L es un ligador que es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido, de modo que cuando D es OH, G es R¹-L-, y cuando G es -C(O)alquilo (C1-C6), D es R¹-L-NH-. En las estructuras de ácido siálico modificadas expuestas en la presente, COOH también representa COO⁻ y/o una sal de esta.

En una realización, un R¹-L tiene la fórmula:

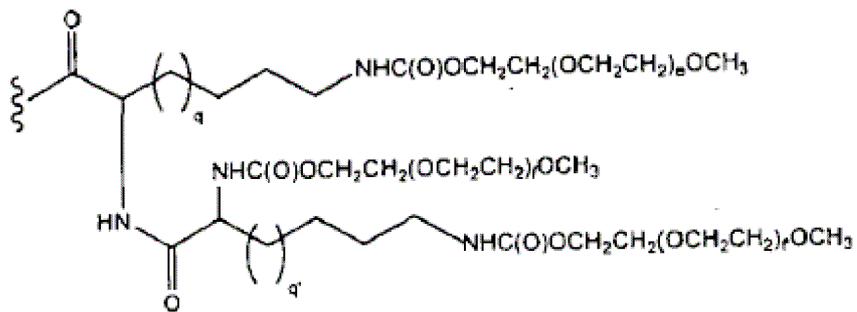
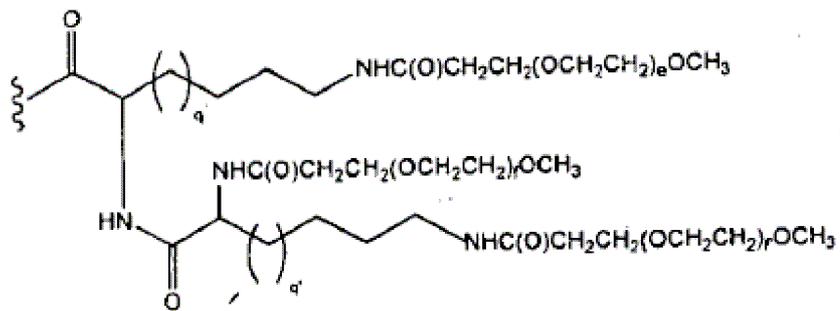
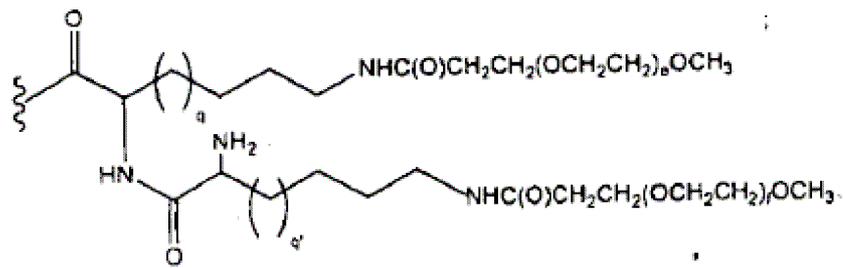
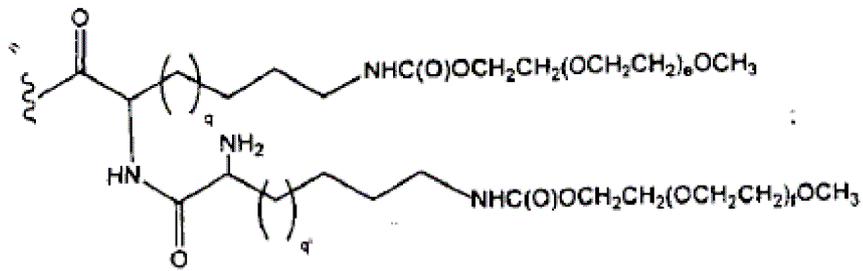


donde a es un número entero de 0 a 20.

R¹ tiene una estructura que es un miembro seleccionado de:

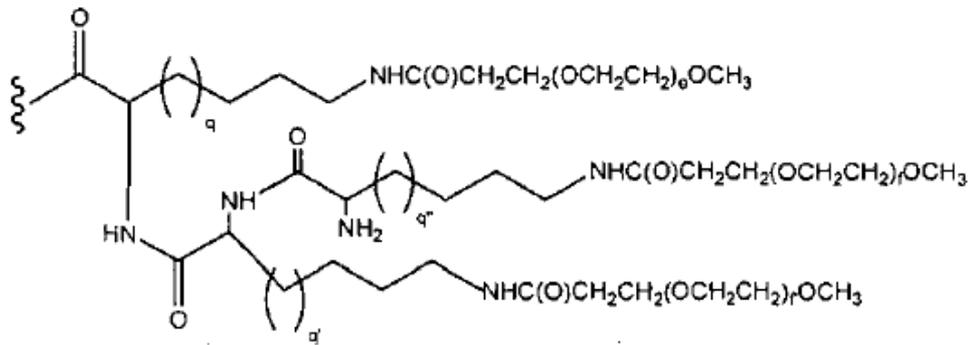
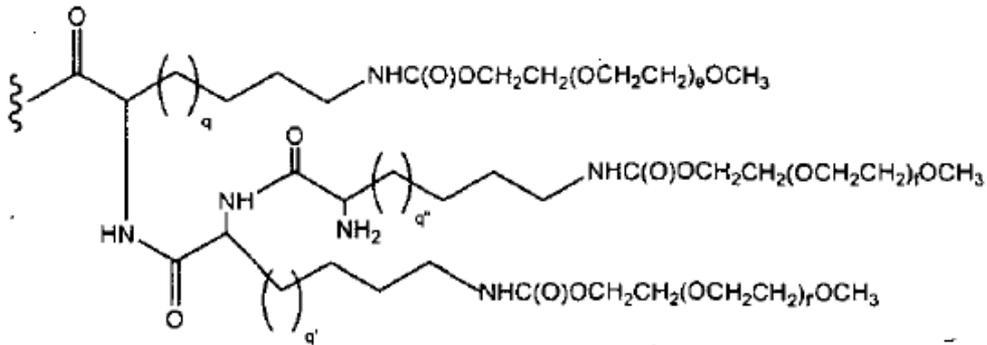


5 donde e y f son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 2500; y q es un número entero de 1 a 20. R¹ tiene una estructura que es un miembro seleccionado de:



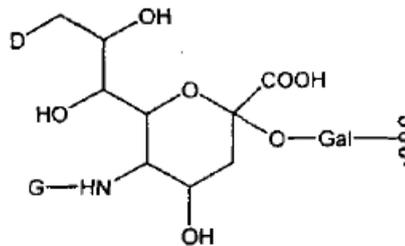
donde e y f son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 2500; y q es un número entero de 1 a 20. L

5 a invención proporciona un péptido del conjugado G-CSF donde R¹ tiene una estructura que es un miembro seleccionado de:



donde e, f y f son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 2500; y q, q' y q'' son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 20.

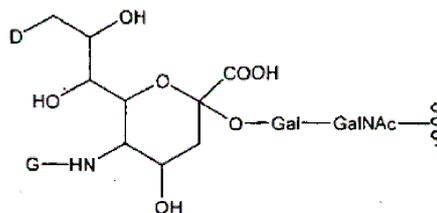
En otra realización ilustrativa, la invención proporciona un péptido que comprende un resto que tiene la fórmula:



5

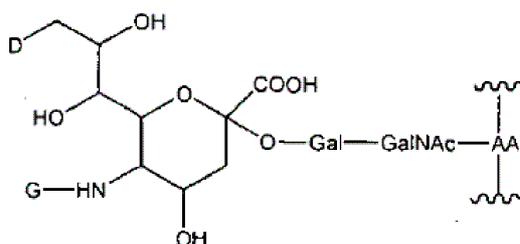
Gal se puede unir a un aminoácido o un residuo glicosilo que se une en forma directa o indirecta (por ejemplo, a través de un residuo glicosilo) a un aminoácido.

En otras realizaciones, el resto tiene la fórmula:



10 El GalNAc se puede unir a un aminoácido o un residuo glicosilo que se une en forma directa o indirecta (por ejemplo, a través de un residuo glicosilo) a un aminoácido.

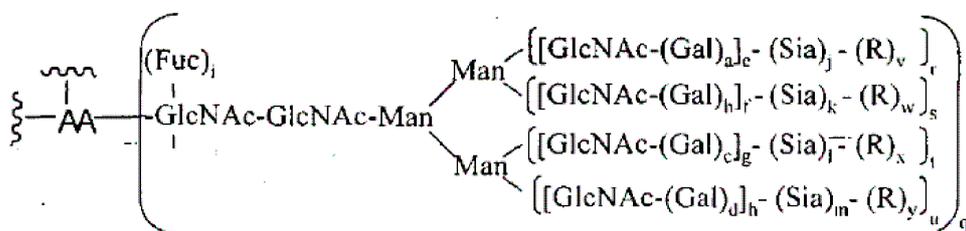
En otra realización ilustrativa más el péptido comprende un resto de acuerdo con la fórmula



donde AA es un residuo de aminoácido de dicho péptido y, en cada una de las estructuras anteriores, D y G son como se describen en la presente.

- 5 Un ejemplo de residuo de aminoácido del péptido G-CSF en que se puede conjugar una o más de las especies anteriores se incluyen serina y treonina, por ejemplo, treonina 133 de la SEQ ID NO.: 1.

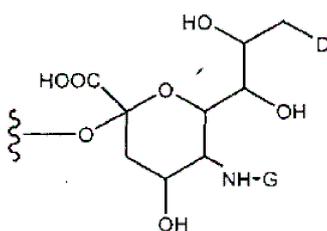
En otra realización ilustrativa, la invención proporciona un conjugado de G-CSF que incluye un residuo glicosilo que tiene la fórmula:



donde a, b, c, d, i, r, s, t, y u son números enteros seleccionados de modo independiente de 0 y 1.

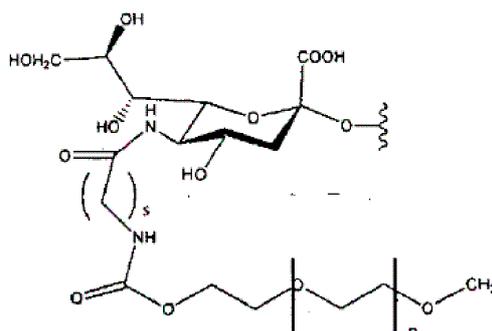
- 10 El índice q es 1. Los índices e, f, g, y h se seleccionan de modo independiente de los números enteros de 0 a 6. Los índices j, k, l, y m se seleccionan de modo independiente de los números enteros de 0 y 100. Los índices v, w, x, e y se seleccionan de modo independiente de 0 y 1, y al menos uno de v, w, x e y es 1. El símbolo AA representa un residuo de aminoácido del péptido G-CSF.

El símbolo Sia-(R) representa un grupo que tiene la fórmula:



- 15 donde D se selecciona de -OH y R¹-L-NH-. El símbolo G se representa R¹-L- o -C(O)alquilo (C1-C6). R¹ representa un resto como se describe en las reivindicaciones y L es un ligador which es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. En general, cuando D es OH, G es R¹-L-, y cuando G es -C(O)alquilo (C1-C6), D es R¹-L-NH-.

- 20 En otra realización ilustrativa, el resto de ácido siálico modificado con PEG en el conjugado de la invención tiene la fórmula:



en que el índice "s" representa un número entero de 0 a 20, y n es un número entero de 1 a 2500. En una realización preferida, s es igual a 1 y el resto de PEG-m tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kD.

5 En una realización preferida, al menos dos, con más preferencia tres, con más preferencia cuatro de los residuos de asparagina mencionados anteriormente están funcionalizados con la cadena de glicano unida a N que se mostró anteriormente.

Los conjugados de la invención incluyen grupos de unión glicosilo intactos que son mono o multivalentes (por ejemplo, estructuras antenarias). En consecuencia, los conjugados de la invención incluyen ambas especies en las que un resto seleccionado se une a un péptido por medio de un grupo de unión glicosilo monovalente y un grupo de unión multivalente. También se incluye dentro de la invención son conjugados en los que más de un resto seleccionado se une a un péptido por medio de un grupo de unión multivalente.

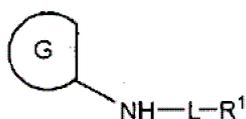
Azúcares modificados

15 La presente invención proporciona azúcares modificados, nucleótidos de azúcar modificado y conjugados de los azúcares modificados. En los compuestos de azúcar modificado de la invención, el resto azúcar con preferencia es un sacárido, a desoxi-sacárido, un aminosacárido, o un N-acil sacárido. El término "sacárido" y sus equivalentes, "sacarilo", "azúcar" y "glicosilo" se refieren a monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros. El resto azúcar también se funcionaliza con un grupo modificador. El grupo modificador se conjuga al resto azúcar, normalmente, a través de la conjugación con una amina, sulfhidrilo o hidroxilo, por ejemplo, hidroxilo primario, resto del azúcar. En una realización ilustrativa, el grupo modificador se une a través de un resto amina del azúcar, por ejemplo, a través de una amida, un uretano o una urea que se forma a través de la reacción de la amina con un derivado reactivo del grupo modificador.

25 Cualquier azúcar se puede utilizar en el núcleo de azúcar de los conjugados de la invención. Los ejemplos de núcleos de azúcar que son útiles en la formación de las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, y ácido siálico. Otros azúcares útiles incluyen amino azúcares tales como glucosamina, galactosamina, manosamina, el análogo de 5-amina de ácido siálico y similares. El núcleo de azúcar puede ser una estructura hallada en la naturaleza o se puede modificar para proporcionar un sitio para la conjugación del grupo modificador. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un conjugado peptídico que comprende un derivado de ácido siálico en que el resto 9-hidroxi se reemplaza con una amina. La amina se derivativa fácilmente con un análogo activado de un grupo modificador seleccionado.

30 En la siguiente descripción la invención se ilustra con referencia al uso de los derivados seleccionados de ácido siálico. Los expertos en la técnica reconocerán que el centro de la descripción es para clarificar la ilustración y que las estructuras y composiciones expuestas son generalmente aplicables en todo el género de los grupos sacáridos, grupos sacáridos modificados, grupos sacárido modificados activados y conjugados de grupos sacárido modificados.

35 En una realización ilustrativa, la invención proporciona un conjugado peptídico que comprende un amino azúcar modificado que tiene la fórmula:



40 en que G es un resto glicosilo, L es un enlace o un ligador y R^1 es el grupo modificador. Los enlaces ilustrativos son los que forman entre un NH_2 del resto glicosilo y un grupo de reactividad complementaria del grupo modificador. En consecuencia, los ejemplos de enlaces incluyen, pero sin limitación NHR^1 , OR^1 , SR^1 y similares. Por ejemplo, cuando R^1 incluye un resto de ácido, este resto se puede activar y acoplar con un resto NH_2 en el residuo glicosilo que proporciona un enlace que tiene la estructura $NHC(O)R^1$. De modo similar, los grupos OH y SH se pueden

convertir en los correspondientes derivados éter o tioéter, respectivamente.

Los ejemplos de ligadores incluyen restos alquilo y heteroalquilo. Los ligadores incluyen grupos de unión, por ejemplo grupos de unión basados en acilo, por ejemplo, $-C(O)NH-$, $-OC(O)NH-$, y similares. Los grupos de unión son enlaces formados entre los componentes de las especies de la invención, por ejemplo, entre el resto glicosilo y el ligador (L), o entre el ligador y el grupo modificador (R^1). Otros grupos de unión son éteres, tioéteres y aminas. Por ejemplo, en una realización, el ligador es un residuo de aminoácido, tales como un residuo de glicina. El resto de ácido carboxílico de la glicina se convierte a la correspondiente amida por la reacción con una amina en el residuo glicosilo, y la amina de la glicina se convierte a la correspondiente amida o uretano por la reacción con un ácido carboxílico activado o carbonato del grupo modificador.

- 5 Otro ejemplo de ligador es un resto de PEG o resto de PEG que está funcionalizado con un residuo de aminoácido. El PEG se une al grupo glicosilo a través del residuo del aminoácido en un extremo terminal PEG y se une al R^1 a través del otro extremo terminal PEG. De modo alternativo, el residuo del aminoácido se une al R^1 y el extremo terminal del PEG no unido al aminoácido se une al grupo glicosilo.

Un ejemplo de especie para $NH-L-R^1$ tiene la fórmula:

- 15 $-NH(C(O)CH_2)_aNH)_s(C(O)(CH_2)_cOCH_2CH_2)_cO(CH_2)_dNHR^1$, en que los índices s y t son de modo independiente 0 o 1. Los índices a, b y d son de modo independiente números enteros de 0 a 20, y c es un número entero de 1 a 2500. Otros ligadores similares se basan en las especies en que el resto $-NH$ se reemplaza con, por ejemplo, $-S$, $-O$ y $-CH_2$.

- 20 Más particularmente, la invención proporciona un conjugado peptídico que comprende los compuestos en que $NH-L-R^1$ es:

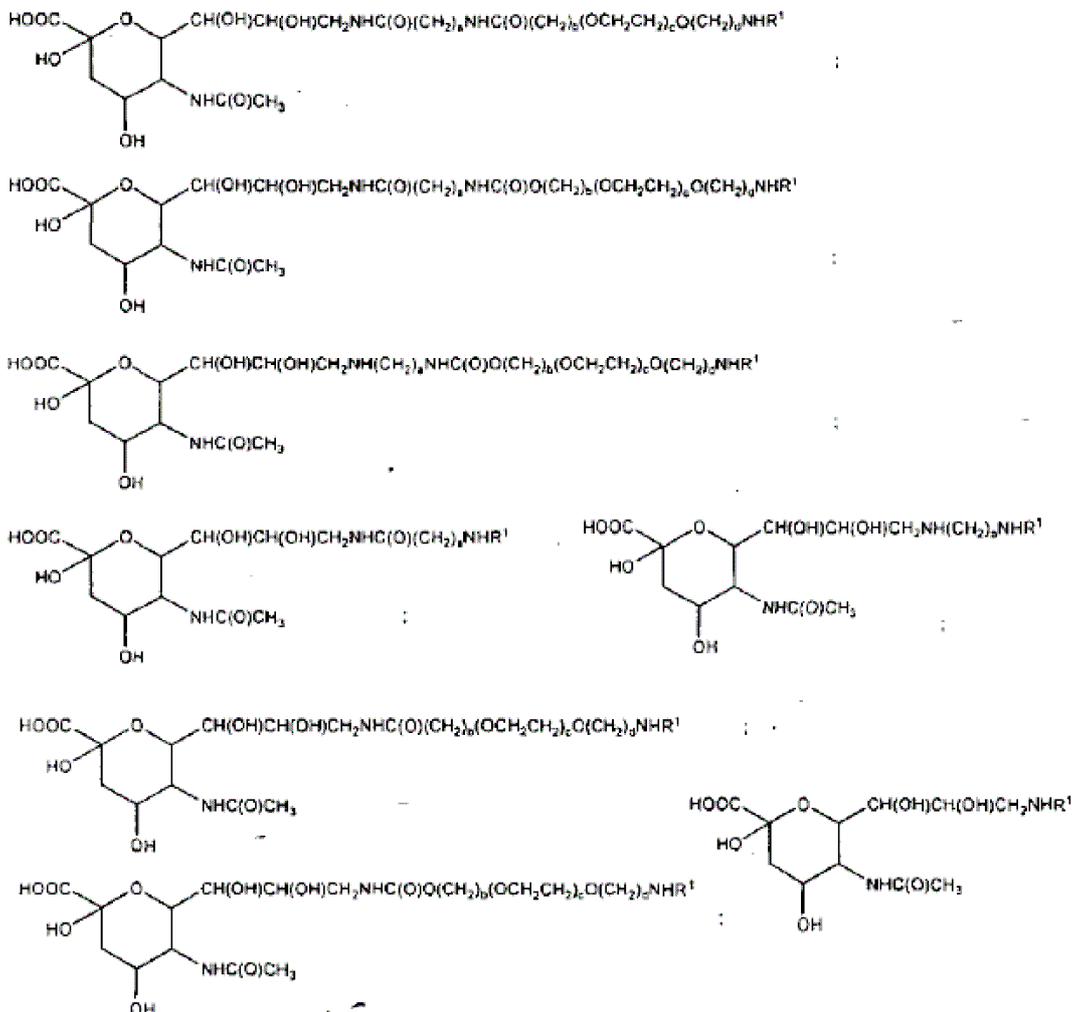


$NH(CH_2)_a NHR^1$, y NHR^1 . En estas fórmulas, los índices a, b y d se seleccionan de modo independiente de los números enteros de 0 a 20, con preferencia de 1 a 5. El índice c es un número entero de 1 a 2500.

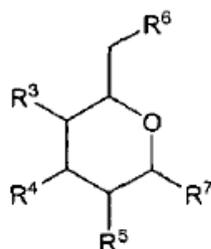
- 25 En una realización ilustrativa, G es ácido siálico y los compuestos seleccionados de la invención tienen las fórmulas:



En otra realización ilustrativa, un resto hidroxilo primario del azúcar está funcionalizado con el grupo modificador. Por ejemplo, el 9-hidroxilo del ácido siálico se puede convertir a la amina correspondiente y funcionalizar para proporcionar un compuesto de acuerdo con la invención. Las fórmulas de acuerdo con esta realización incluyen:



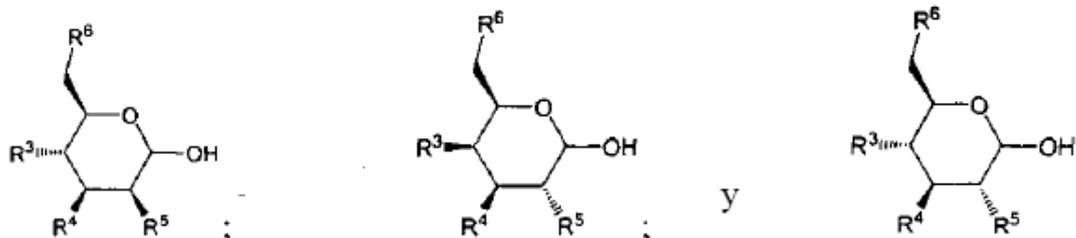
- 5 También se describe un conjugado peptídico que comprende azúcares modificados en los que la posición 6-hidroxilo se convierte en el resto amina correspondiente, que porta un casete de ligador-grupo modificador tal como los que expusieron anteriormente. Los ejemplos de grupos sacarilo que se pueden usar como el núcleo de estos azúcares modificados incluyen Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc, Fuc, Xil, Man, y similares. Un azúcar modificado representativo de acuerdo con esta estructura tiene la fórmula:



10

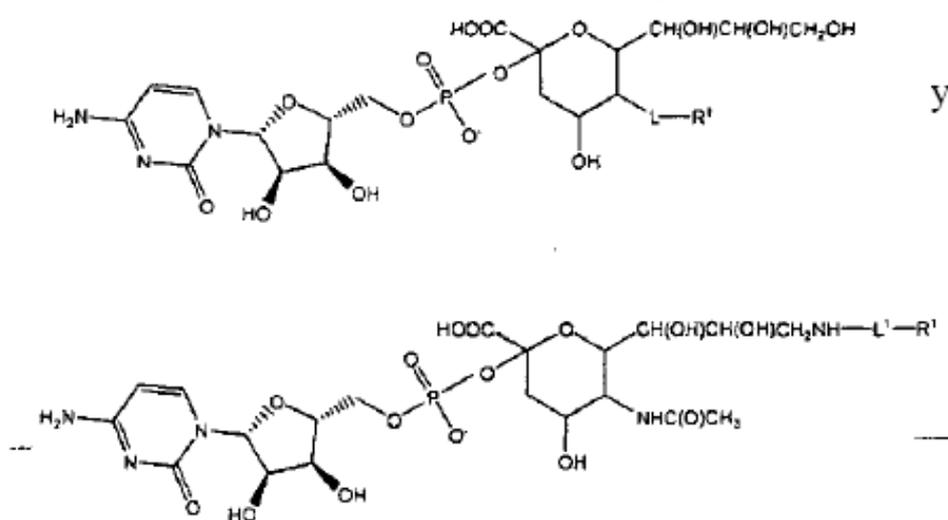
en que R^3-R^5 y R^7 son miembros seleccionados de modo independiente de H, OH, C(O)CH₃, NH, y NHC(O)CH₃, R^6 es OR¹, NHR¹ o NH-L-R¹, que es como se describió anteriormente.

También se describen conjugados basados en manosa, galactosa o glucosa, o en especies que tienen la estereoquímica de manosa, galactosa o glucosa. Las fórmulas generales de estos conjugados son:



5 En otra realización ilustrativa, la invención proporciona compuestos expuestos anteriormente que se activan como los correspondientes azúcares de nucleótidos. Los ejemplos de azúcares de nucleótidos que se usan en la presente invención en su forma modificada incluyen mono-, di- o trifosfatos de nucleótido o análogos de estos. En una realización preferida, el nucleótido de azúcar modificado se selecciona de un UDP-glicósido, CMP-glicósido, o un GDP-glicósido. Aun con más preferencia, la porción de nucleótido del azúcar del nucleótido de azúcar modificado es CMP-ácido siálico. En una realización ilustrativa, el fosfato de nucleótido se une al C-1.

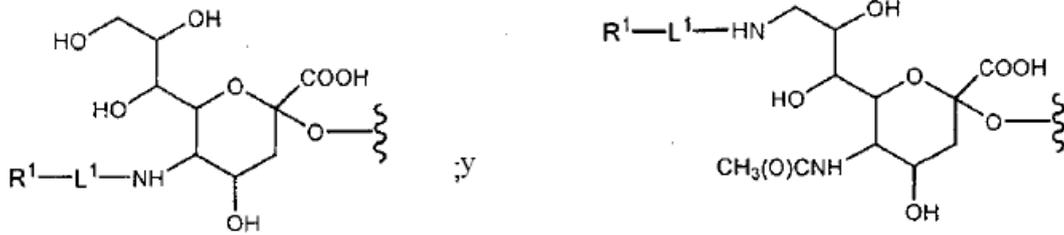
En consecuencia, en una realización ilustrativa en que el resto glicosilo es ácido siálico, la invención proporciona conjugados peptídicos que se forman usando los compuestos que tienen las fórmulas:



10 en que $L-R^1$ es como se describió anteriormente, y $L1-R^1$ represente un ligador unido al grupo modificador. De modo similar a L, las especies de ligador ilustrativas de acuerdo con L1 incluyen un enlace, restos alquilo o heteroalquilo. Los ejemplos de compuestos de nucleótidos de azúcar modificado de acuerdo con estas realizaciones se exponen en la FIG. 1 y FIG. 2.

15 En otra realización ilustrativa, la invención proporciona un conjugado formado entre un azúcar modificado de la invención y un sustrato, por ejemplo, un péptido, lípido, aglicona, etc., más particularmente entre un azúcar modificado y un residuo glicosilo de un glicopéptido o un glicolípido. En esta realización, el resto azúcar del azúcar modificado es un grupo de unión glicosilo interpuesto entre el sustrato y el grupo modificador. Un ejemplo del grupo de unión glicosilo es un grupo de unión glicosilo intacto, en que el resto o restos de glicosilo que forman el grupo de unión no son degradados por procesos químicos (por ejemplo, metaperyodato de sodio) o enzimáticos (por ejemplo, oxidasa). Los conjugados seleccionados de la invención incluyen un grupo modificador que se une al resto amina de un amino-sacárido, por ejemplo, manosamina, glucosamina, galactosamina, ácido siálico etc. El ejemplo del casete del grupo modificador-grupo de unión glicosilo intacto de acuerdo con este motivo se basa en una estructura de ácido siálico, tal como que tiene las fórmulas:

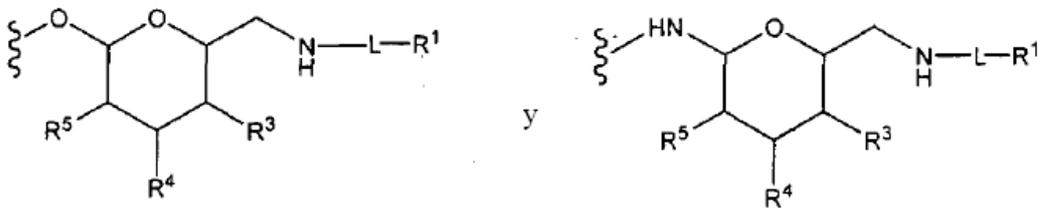
20



En las fórmulas anteriores, R¹, L1 y L2 son como se describieron anteriormente.

También se describen los conjugados formados entre un sustrato y la posición 1 de un resto sacarilo que en el grupo modificador se une a través de un ligador en la posición del carbono 6 del resto sacarilo. Los conjugados de acuerdo con esta estructura tienen las siguientes fórmulas:

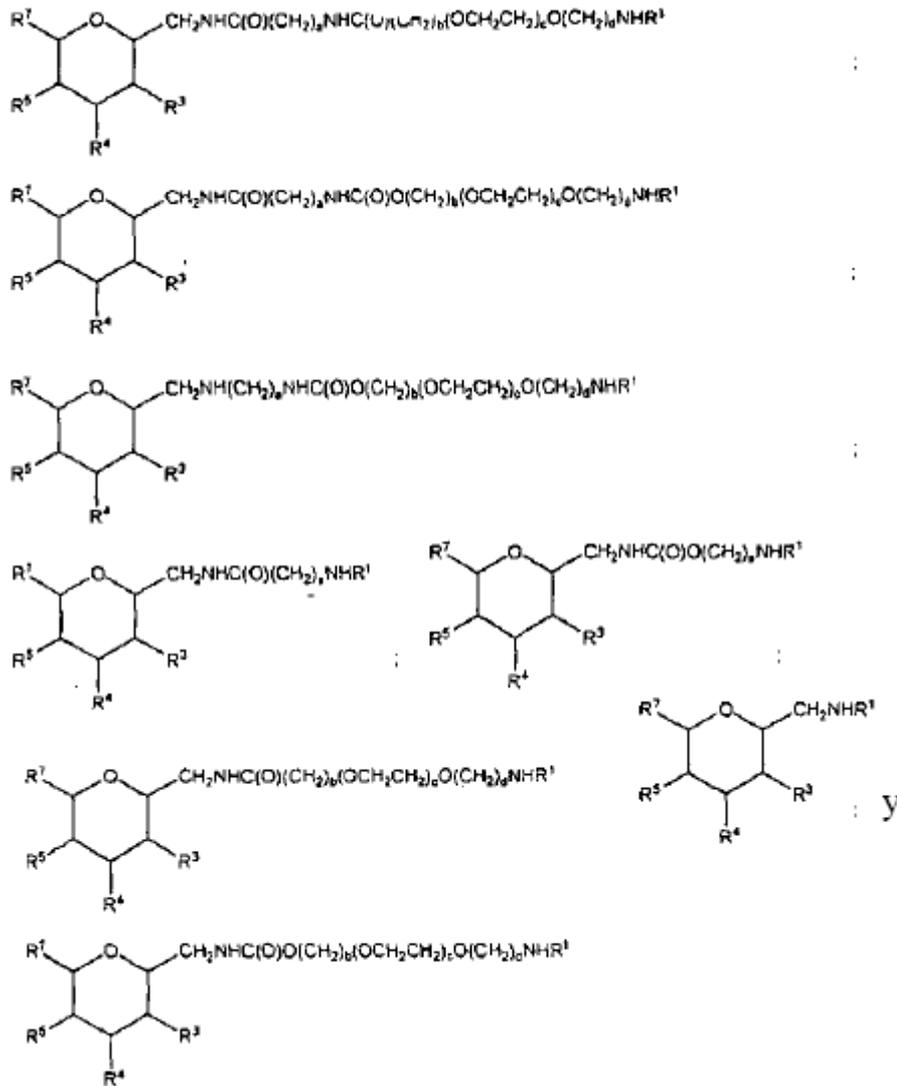
5



en que los radicales son como se describieron anteriormente. Los expertos apreciarán que los restos sacarilo modificados expuestos anteriormente también se pueden conjugar a un sustrato en los átomos de carbono 2, 3, 4 ó 5.

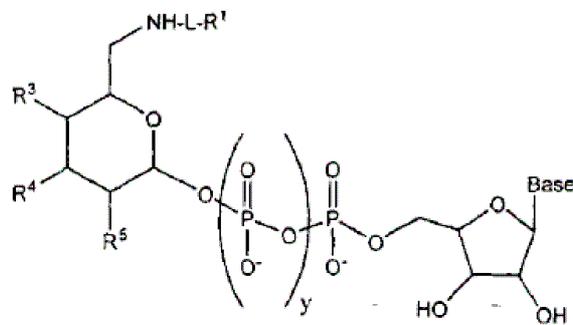
10

Los compuestos ilustrativos de acuerdo con esta estructura incluyen los compuestos que tienen las fórmulas:



en que los grupos R y los índices son los que se describieron anteriormente.

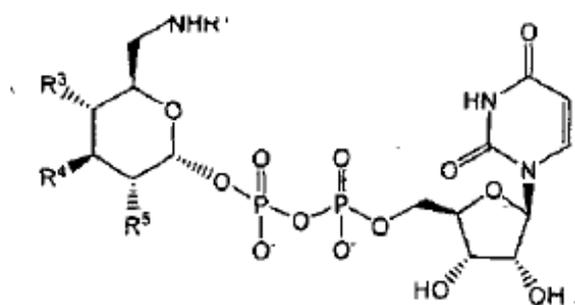
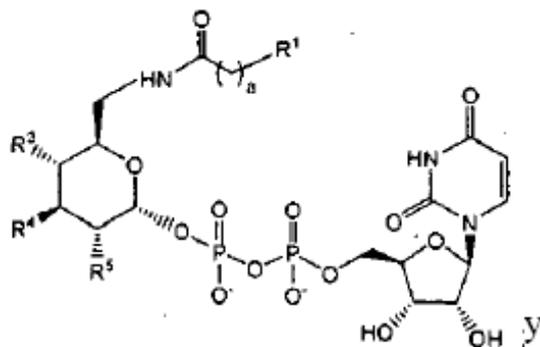
También se describen nucleótidos de azúcar modificados con L-R¹ en la posición del carbono 6. Los ejemplos de especies incluyen:



5

En que los grupos R y L representan los restos que se describieron anteriormente. El índice "y" es 1 ó 2.

También se describe un nucleótido de azúcar basado en especies que tienen la estereoquímica de GDP-manosa. Un ejemplo de especie tiene la estructura:



El grupo modificador, R^1 , es alguno de diversas especies que incluyen, pero sin limitación, polímeros solubles en agua, polímeros insolubles en agua, agentes terapéuticos, agentes diagnósticos y similares. La naturaleza de los grupos modificadores ilustrativos se describe en mayor detalle a continuación en la presente.

5 Grupo modificadores

Polímeros solubles en agua

Muchos polímeros solubles en agua son conocidos por los expertos en la técnica y son útiles en la práctica de la presente invención. El término polímero soluble en agua abarca las especies tales como sacáridos (por ejemplo, dextrano, amilasa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poli(aminoácidos), por ejemplo, poli(ácido aspártico) y poli(ácido glutámico); ácidos nucleicos, polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(éteres), por ejemplo, poli(etilenglicol); péptidos, proteínas, y similares.

Los métodos para la activación de los polímeros también se pueden hallar en WO 94/17039, patente US N.º 5.324.844, WO 94/18247, WO 94/04193, patente US N.º 5.219.564, patente US N.º 5.122.614, WO 90/13540, patente US N.º 5.281.698, y más WO 93/15189, y para la conjugación entre polímeros y péptidos activados, por ejemplo, Factor de coagulación VIII (WO 94/15625), hemoglobina (WO 94/09027), molécula portadora de oxígeno (patente US N.º 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese et al., App. Biochem. Biotech. 11: 141–45 (1985)).

Los polímeros solubles en agua preferidos son aquellos en que una proporción sustancial de las moléculas del polímero en una muestra del polímero son de aproximadamente el mismo peso molecular; tales polímeros son "homodispersos".

La presente invención también se ilustra con referencia a un conjugado de poli(etilenglicol). Varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación del PEG están disponibles. Ver, por ejemplo, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325–373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30–65 (1987); Wong et al., *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866–874 (1992); Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249–304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150–165 (1995); y Bhadra, et al., *Farmazie*, 57:5–29 (2002). Las vías para preparar moléculas de PEG reactivas y formar conjugados usando las moléculas reactivas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la patente US N.º 5.672.662 describe un conjugado soluble en agua y aislable de éster activo de un ácido polimérico seleccionado de poli(óxidos de alquilenos), poli(polioles oxietilados), poli(alcoholes olefinicos), y poli(acrilomorfolina) lineales o ramificados.

La patente US N.º 6.376.604 expone un método para preparar un éster de 1-benzotriazolilcarbonato soluble en agua

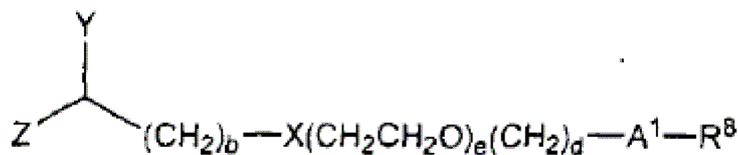
de un polímero soluble en agua y no peptídico mediante la reacción de un hidroxilo terminal del polímero con di(1-benzotriazolil)carbonato en un solvente orgánico. El éster activo se usa para formar conjugados con un agente biológicamente activo tal como una proteína o péptido.

- 5 WO 99/45964 describe un conjugado que comprende un agente biológicamente activo y un polímero soluble en agua activado que comprende un esqueleto del polímero que tiene al menos un extremo terminal ligado al esqueleto del polímero a través de una unión estable, donde al menos un extremo terminal comprende un resto de ramificación que tiene grupos reactivos proximales ligados al resto de ramificación, en que el agente biológicamente activo se liga a al menos uno de los grupos reactivos proximales. Otros poli(etilenglicoles) ramificados se describen en WO 96/21469, patente US N.º 5.932.462 describe un conjugado formado con una molécula de PEG ramificado que incluye un extremo terminal ramificado que incluye los grupos funcionales respectivos. Los grupos reactivos libres están disponibles para reaccionar con especies biológicamente activas, tales como una proteína o péptido, que forman conjugados entre el poli(etilenglicol) y las especies biológicamente activas. La patente US N.º 5.446.090 describe un ligador de PEG bifuncional y su uso para formar conjugados que tienen un péptido en cada uno de los extremos terminales del ligador PEG.
- 10
- 15 Los conjugados que incluyen uniones de PEG degradables se describen en WO 99/34833; y WO 99/14259, así como en la patente US N.º 6.348.558.

Los métodos reconocidos en la técnica de la activación de polímeros expuestos anteriormente son útiles en el contexto de la presente invención en la formación de los polímeros ramificados expuestos en la presente y también para la conjugación de estos polímeros ramificados con otras especies, por ejemplo, azúcares, nucleótidos de azúcar y similares.

20

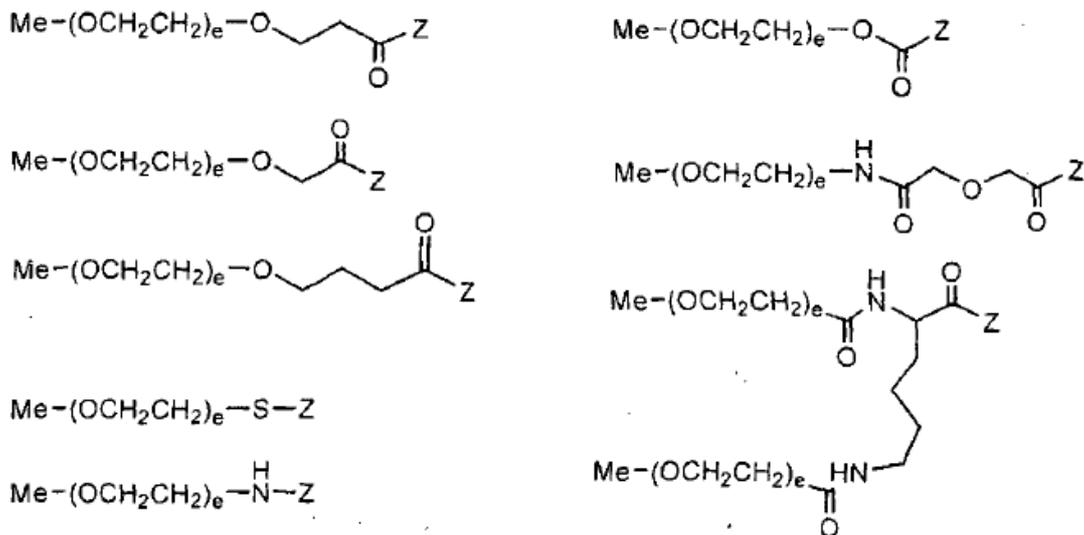
Las moléculas de poli(etilenglicol) ilustrativas descritas en la presente incluyen los que tienen la fórmula:



25 en que R^8 es H, OH, NH_2 , alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, acetal, $\text{OHC}-$, $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_q-$, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_q$, o $-(\text{CH}_2)_q\text{C}(\text{Y})\text{Z}1$. El índice "e" representa un número entero de 1 a 2500. Los índices b, d, y q de modo independiente representan números enteros de 0 a 20. Los símbolos Z y Z1 de modo independiente representan OH, NH_2 , grupos salientes, por ejemplo, imidazol, p-nitrofenilo, HOBT, tetrazol, haluro, $\text{S}-\text{R}^9$, la porción alcohol de los ésteres activados; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{Y}1)\text{V}$, o $-(\text{CH}_2)_p\text{U}(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{Y}1)_v$. El símbolo Y representa H(2), $=\text{O}$, $=\text{S}$, $=\text{N}-\text{R}^{10}$. Los símbolos X, Y, Y1, A1, y U de modo independiente representan los restos O, S, $\text{N}-\text{R}^{11}$. El símbolo V representa OH, NH_2 , halógeno, $\text{S}-\text{R}^{12}$. El componente alcohol de los ésteres activados, el componente amina de las amidas activadas, nucleótidos de azúcar y proteínas. Los índices p, q, s y v son miembros seleccionados de modo independiente de los números enteros de 0 a 20. Los símbolos R^9 , R^{10} , R^{11} y R^{12} representan de modo independiente H, 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.

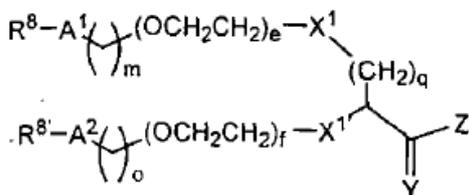
30

35 También se describen las moléculas de poli(etilenglicol) se selecciona de los siguientes:



de modo que se puedan formar conjugados peptídicos de las reivindicaciones.

El poli(etilenglicol) útil en la formación del conjugado de la invención está ramificado. Las moléculas de poli(etilenglicol) ramificadas adecuadas para el uso en la invención incluyen los descriptos en la siguiente fórmula:



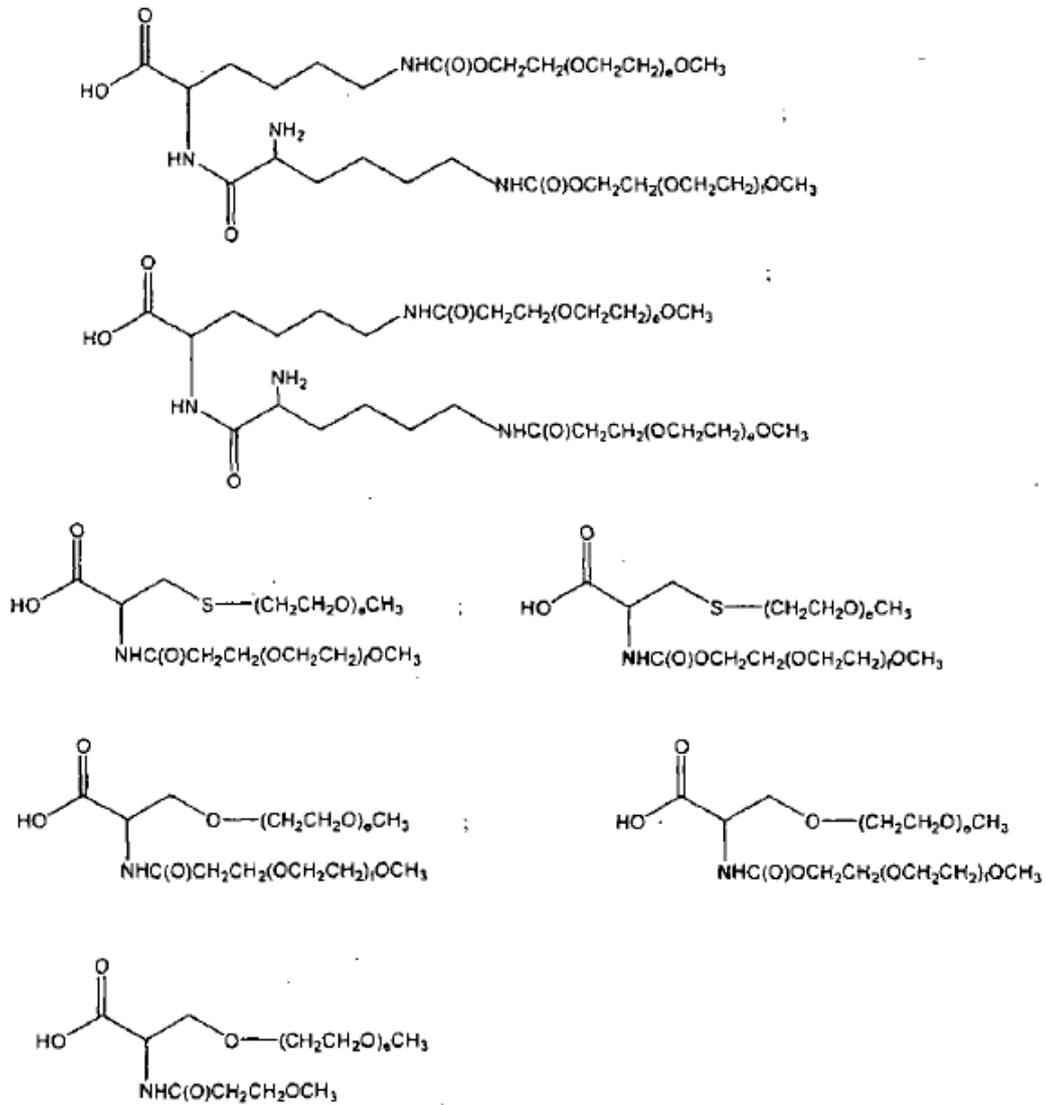
5

en que R^8 y $R^{8'}$ son miembros seleccionados de modo independiente de los grupos definidos para R^8 , anterior. $A1$ y $A2$ son miembros seleccionados de modo independiente de los grupos definidos para $A1$, anteriores. Los índices e , f , o , y q son como se describieron anteriormente. Z e Y son como se describieron anteriormente. $X1$ y $X1'$ son miembros seleccionados de modo independiente de S , $SC(O)NH$, $HNC(O)S$, $SC(O)O$, O , NH , $NHC(O)$, $(O)CNH$ y $NHC(O)O$, $OC(O)NR$, de modo que se pueden formar los compuestos de la invención.

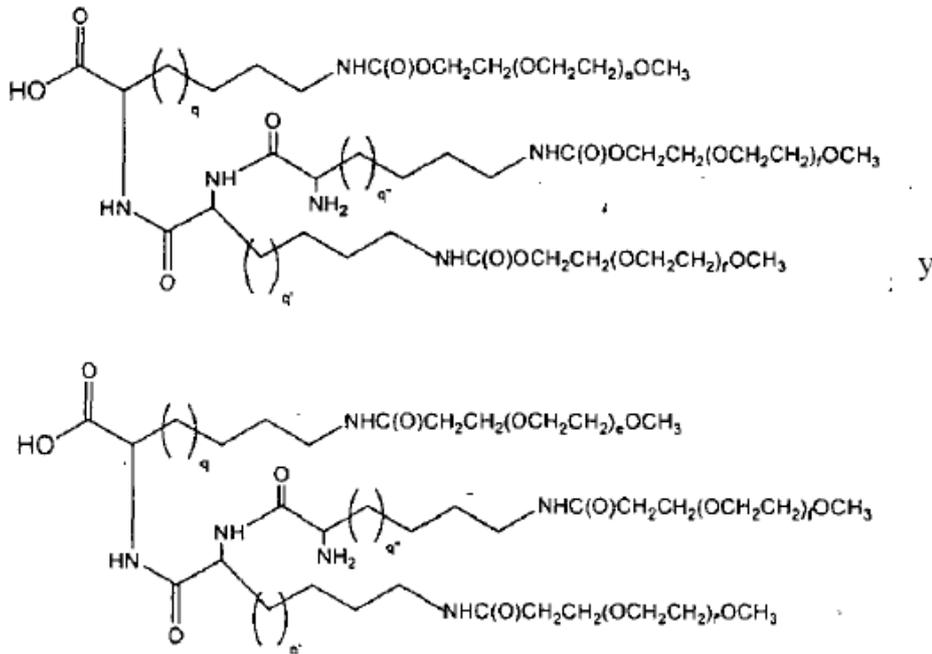
10

El PEG ramificado se basa en un núcleo de cisteína,

serina o di-lisina. En consecuencia, los PEG ramificados ilustrativos incluyen:



En aún otra realización, el resto de PEG ramificado se basa en un péptido de tri-lisina. La tri-lisina puede estar mono-, di-, tri-, o tetra-PEG-ilada. Las especies ilustrativas de acuerdo con esta realización tienen las fórmulas:

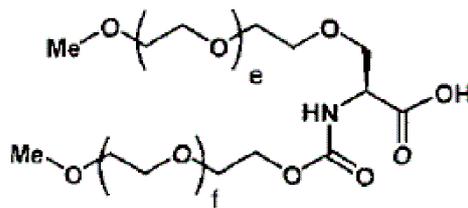


en que e, f y f' son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 2500; y q, q' y q'' son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 20.

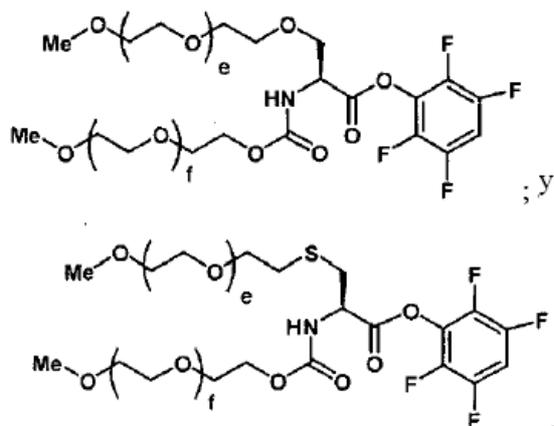
5 En una realización ilustrativa de la invención, el PEG es m-PEG (5 kD, 10 kD, o 20 kD). Una especie de PEG ramificado ilustrativa es una serina o cisteína-(m-PEG)₂ en que el m-PEG es un m-PEG de 20 kD.

10 Como será evidente para los expertos en la técnica, los polímeros ramificados de uso en la invención incluyen variaciones en los temas expuestos anteriormente. Por ejemplo el conjugado de di-lisina-PEG mostrado anteriormente puede incluir tres subunidades poliméricas, la tercera unida a la α-amino mostrada como no modificada en la estructura anterior. De modo similar, el uso de una trilisina funcionalizada con tres o cuatro subunidades poliméricas está dentro del alcance de la invención.

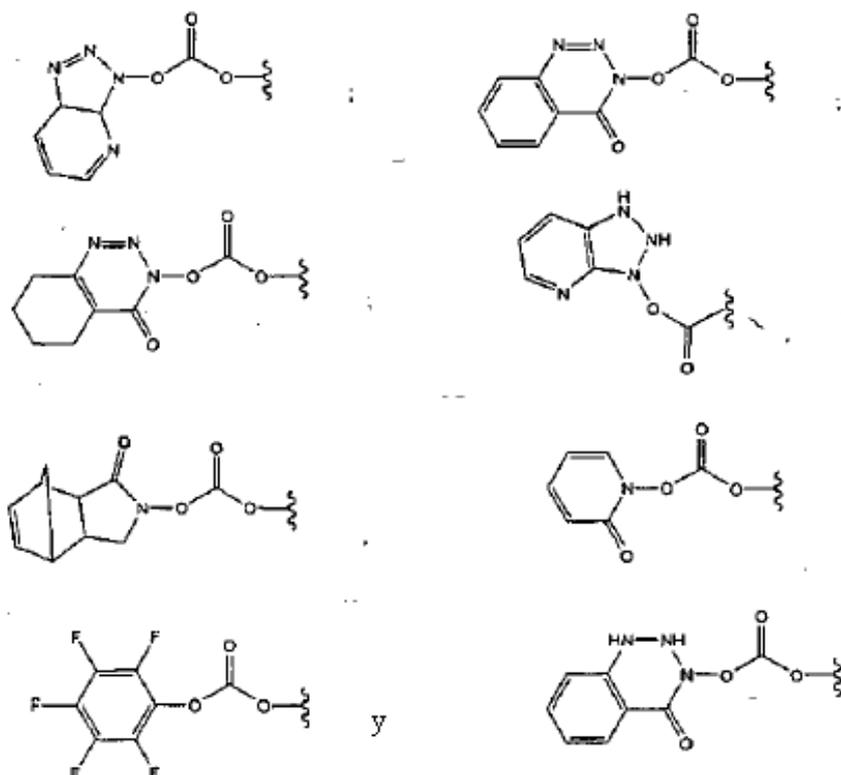
Las realizaciones de acuerdo con la invención incluyen:



y carbonatos y ésteres activos de estas especies, tales como:



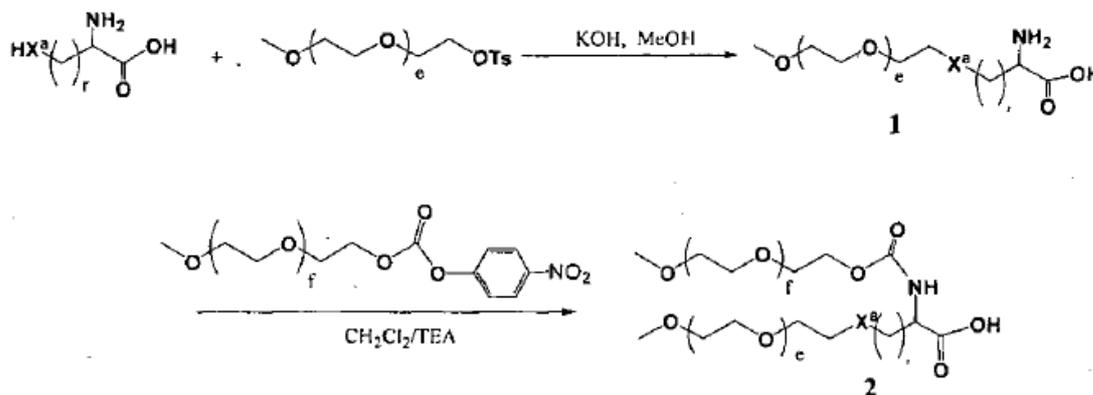
Otros grupos activadores o salientes, apropiados para activar los PEG lineales de usar en la preparación de los compuestos expuestos en la presente incluyen, pero sin limitación las especies:



5 Las moléculas de PEG que se activan con estas y otras especies y los métodos de obtener los PEG activados se exponen en WO 04/083259.

10 Los expertos en la técnica apreciarán que una o más de las ramas de m-PEG del polímero ramificado se pueden reemplazar con un resto de PEG con un extremo terminal diferente, por ejemplo, OH, COOH, NH₂, alquilo C2-C10, etc. Además, las estructuras anteriores se modifican fácilmente mediante la inserción de los ligadores alquilo (o eliminación de los átomos de carbono) entre el átomo de carbono α y el grupo funcional de la cadena lateral. En consecuencia, los derivados "homo" y homólogos superiores, así como los homólogos inferiores están dentro del alcance de los núcleos para PEG ramificados de uso en la presente invención.

Las especies de PEG ramificado expuestas en la presente se preparan fácilmente por métodos tales como los expuestos en el siguiente esquema:



en que X² es O o S y r es un número entero de 1 a 5. Los índices e y f son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 2500.

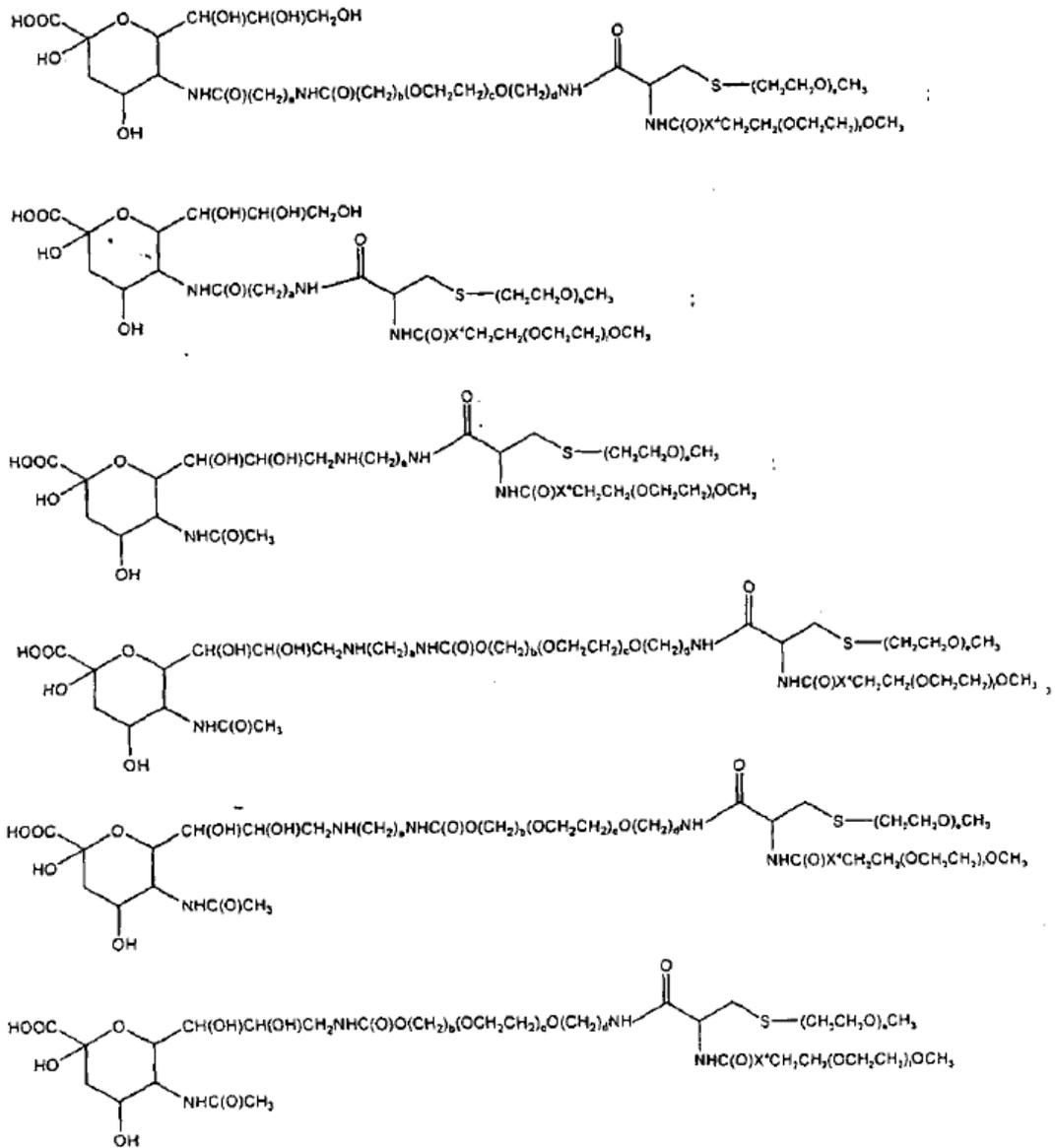
5 En consecuencia, de acuerdo con este esquema, un aminoácido natural o no natural se pone en contacto con un derivado de m-PEG activado, en este caso el tosilato, se forma 1 mediante el alquilado del heteroátomo de la cadena lateral X^a. El aminoácido de m-PEG amino mono-funcionalizado se somete a las condiciones de N-acilación con un derivado de m-PEG reactivo, de este modo se ensambla m-PEG ramificado 2. Como apreciarán los expertos, el grupo saliente tosilato se puede reemplazar con cualquier grupo saliente adecuado, por ejemplo, halógeno, mesilato, triflato, etc. De modo similar, el carbonato reactivo utilizado para acilar la amina se puede reemplazar con un éster activo, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida, etc., o el ácido se puede activar in situ usando un agente deshidratante tal como dicitclohexilcarbodiimida, carbonildiimidazol, etc.

15 En esta invención, el grupo modificador es un resto de PEG, sin embargo, algún grupo modificador, por ejemplo, polímero soluble en agua, polímero insoluble en agua, residuo terapéutico, etc., se puede incorporar en un resto glicosilo a través de una unión apropiada. El azúcar modificado está formado por medio enzimático, medio químico o una combinación de estos, de este modo se produce un azúcar modificado. En una realización ilustrativa, los azúcares están sustituidos con una amina activa en cualquier posición que permite la unión del resto modificador, aun todavía permite que el azúcar actúe como un sustrato para una enzima capaz de acoplar el azúcar modificado al péptido G-CSF. Por ejemplo, cuando la galactosamina es el azúcar modificado, el resto amina se puede unir al átomo de carbono en la posición 6.

20 Especies modificadas del polímero soluble

25 Las especies de azúcar modificado de nucleótido de polímero soluble en agua en que el resto azúcar está modificado con un polímero soluble en agua son útiles en la presente invención. Un ejemplo de azúcar modificado de nucleótido porta un grupo azúcar que está modificado a través de un resto amina en el azúcar. Los nucleótidos de azúcar modificado, por ejemplo, derivados de sacaril-amina de un nucleótido de azúcar, también son útiles en los métodos de la invención. Por ejemplo, una sacaril amina (sin el grupo modificador) se puede conjugar enzimáticamente a un péptido (u otras especies) y el resto de sacaril amina libre posteriormente conjugado a un grupo modificador deseado. De forma alternativa, el nucleótido de azúcar modificado puede actuar como sustrato para una enzima que transfiere el azúcar modificado a un aceptor de sacarilo en un sustrato, por ejemplo, un péptido o glicopeptido.

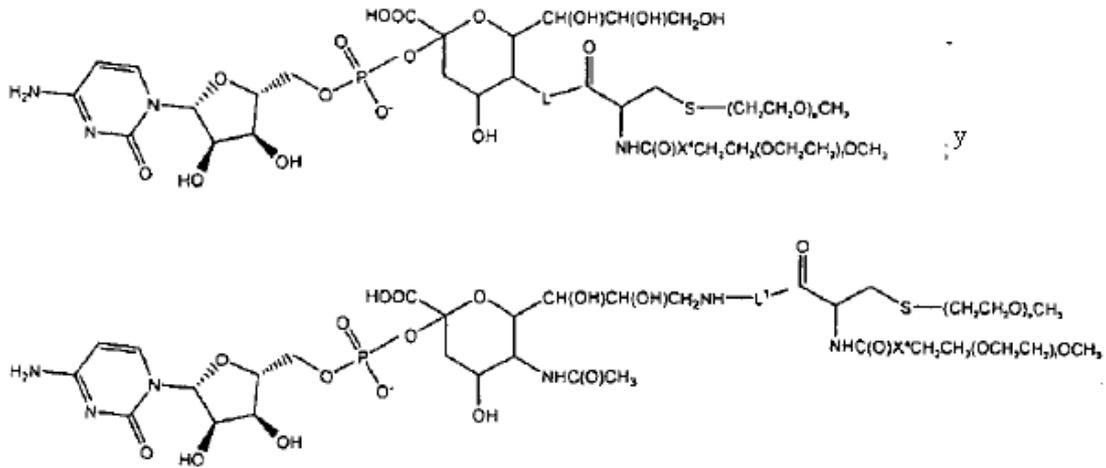
30 En la presente invención. R¹ es un PEG ramificado, por ejemplo, son las especies expuestas anteriormente. Los compuestos ilustrativos de acuerdo con esta realización incluyen:



en que X4 es un enlace u O.

Además, como se describió anteriormente, la presente invención proporciona conjugados peptídicos que se forman usando azúcares de nucleótido que están modificados con un polímero soluble en agua, que es cadena lineal o ramificada. Por ejemplo, los compuestos que tienen la fórmula mostrada a continuación están dentro del alcance de la presente invención:

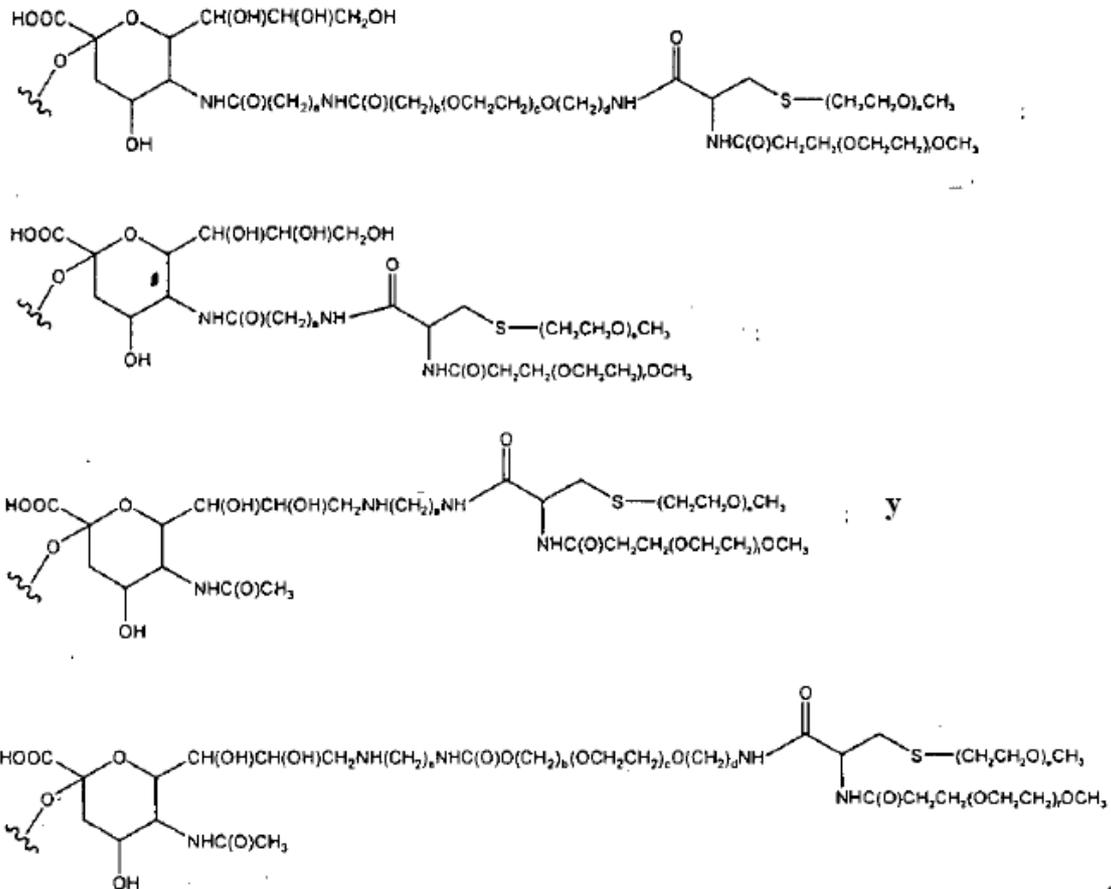
5



en que X^4 es O o un enlace.

También se proporcionan los conjugados de péptidos y glicopéptidos, lípidos y glicolípidos que incluyen las composiciones de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona conjugados que tienen las siguientes fórmulas:

5



Polímeros insolubles en agua

En aún otra realización ilustrativa, el conjugado de la invención incluye un componente de un liposoma. Los liposomas se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo,

como se describe en Eppstein et al., patente US N.º 4.522.811, que se presenta el 11 de junio de 1985. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas se pueden preparar por la disolución de lípidos apropiados (tales como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, aracadoil fosfatidil colina, y colesterol) en un solvente inorgánico que luego se evapora, dejando tras de sí una película fina de lípido seco sobre la superficie del recipiente. Una solución acuosa del compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable luego se introduce en el recipiente. El recipiente se agita manualmente para liberar el material lipídico de los costados del recipiente y para dispersar los agregados lipídicos, de ese modo se forma la suspensión liposómica.

Las micropartículas y los métodos de preparación de las micropartículas anteriormente citados se ofrecen a modo de ejemplo y no están destinados a definir el alcance de micropartículas de uso en la presente invención. Será evidente para los expertos en la técnica que una gran variedad de micropartículas, fabricadas por diferentes métodos, son útiles en la presente invención.

La vida media in vivo de los glicopéptidos terapéuticos también se puede aumentar con los restos de PEG tales como el polietileno glicol (PEG). Por ejemplo, la modificación química de proteínas con PEG (PEGilación) aumenta su tamaño molecular y disminuye su accesibilidad del grupo de superficie y funcional, cada uno de los cuales dependen del tamaño del PEG unido a la proteína. Esto produce una mejora de la vida media plasmática y la estabilidad proteolítica, y una disminución de la inmunogenicidad y la captación hepática (Chaffee et al. J. Clin. Invest. 89: 1643-1651 (1992); Pyatak et al, Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol. 29: 113-127 (1980)). Se ha informado que la PEGilación de la interleuquina-2 aumenta su potencia antitumoral in vivo (Katre et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 1487-1491 (1987)) y la PEGilación de un F (ab')₂ derivado del anticuerpo monoclonal A7 ha mejorado su localización tumoral (Kitamura et al Biochem Biophys Res Commun 28: 1387-94(1990)). Por lo tanto, en otra realización preferida, la vida media in vivo de un péptido derivado con un resto de PEG por un método de la invención está aumentado con respecto a la vida media in vivo del péptido no derivado.

El aumento de la vida media in vivo del péptido se expresa mejor como un rango de aumento de porcentaje de esta cantidad. El extremo inferior del rango del porcentaje de aumento es de aproximadamente 40%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 100%, aproximadamente 150% o aproximadamente 200%. El extremo superior del rango es de aproximadamente 60%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 100%, aproximadamente el 150%, o más de aproximadamente el 250%.

En una realización ilustrativa, la presente invención proporciona un G-CSF PEGilado.

Los métodos

Además de los conjugados descritos anteriormente, la presente invención proporciona métodos para preparar estos y otros conjugados. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método de formación de un conjugado covalente entre un resto seleccionado y un péptido G-CSF. Además, los métodos descriptos son métodos para dirigir los conjugados de la invención a un tejido o región particular del cuerpo.

En una realización ilustrativa, se forma el conjugado entre un resto de PEG (o un resto glicosilo transferible enzimáticamente que comprende el resto de PEG), y un péptido glicosilado o no glicosilado. El PEG es conjugado con el péptido G-CSF por medio de un grupo de unión glicosilo intacto, que está interpuesto entre, y unido covalentemente al péptido G-CSF y el resto de PEG, o a un constructo del ligador PEG-no-glicosilo (por ejemplo alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido). El método incluye poner en contacto el péptido G-CSF con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una glicosiltransferasa para los que el azúcar modificado es un sustrato. La reacción se lleva a cabo bajo condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido G-CSF. El resto de azúcar del azúcar modificado se selecciona con preferencia a partir de azúcares de nucleótidos, azúcares activados y azúcares, que no son nucleótidos ni están activados.

El péptido aceptor (glicosilado o no glicosilado) típicamente se sintetiza de novo, o expresa de forma recombinante en una célula procaríota (por ejemplo, células bacterianas, tales como E. coli) o en una célula eucariota tal como una célula de mamífero, levadura, insectos, hongos o planta. El péptido G-CSF puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento. Por otra parte, el péptido G-CSF puede ser un péptido de tipo salvaje o mutado. En una realización ilustrativa, el péptido G-CSF incluye una mutación que añade uno o más sitios de glicosilación ligados a N u O a la secuencia de péptido.

En una realización ilustrativa, el G-CSF está O-glicosilado y funcionalizado con un polímero soluble en agua de la siguiente manera. El péptido se produce con un sitio de glicosilación de aminoácidos disponible o, si está glicosilado, el resto glicosilo se corta en el aminoácido expuesto. Por ejemplo, una serina o treonina es un 1-N-acetil amino galactosilado (GalNAc) y el péptido NAc-galactosilado se sialila con un casete grupo modificador-ácidos siálico usando ST6GalNAcT1. Alternativamente, el péptido NAc-galactosilado se galactosila usando Núcleo-1-GalT-1 y el producto se sialila con un casete del grupo modificador-ácido siálico usando ST3GalT1. Un conjugado ilustrativo de acuerdo con este método tiene las siguientes uniones: Thr- α -1-GalNAc- β -1,3-Gal- α 2,3-Sia*, en el que Sia* es el casete del grupo modificador-ácido siálico.

En los métodos de la invención, tales como los expuestos anteriormente, el uso de múltiples enzimas y los donantes

- de sacarilo, se pueden realizar las etapas individuales de glicosilación por separado, o combinados en una reacción de “un solo recipiente”. Por ejemplo, en la reacción de tres enzimas expuesta anteriormente, la GalNAc transferasa, GalT y SIAT y sus donantes se pueden combinar en un solo recipiente. Alternativamente, la reacción de GalNAc se puede llevar a cabo sola y GalT y SIAT y los donantes de sacarilo apropiados se añaden en una etapa única. Otro modo de funcionamiento de las reacciones implica la adición de cada enzima y un donante apropiado en forma secuencial y la realización de la reacción en un motivo “de un solo recipiente”. Las combinaciones de cada uno de los métodos antes expuestos son útiles en la preparación de los compuestos de la invención.
- En los conjugados de la invención, en particular los glicanos ligados a N glicopeglados, el casete del grupo modificador-Sia se puede ligar a Gal en una unión α -2, 6, o α -2, 3.
- El método de la invención también se proporciona la modificación péptidos glicosilados de forma incompleta que se producen en forma recombinante. El empleo de un azúcar modificado en un método de la invención, el péptido G-CSF se glicosilar y derivatizar simultáneamente con, por ejemplo, un resto de PEG. El resto de azúcar del azúcar modificado puede ser el residuo que sería propiamente conjugado con el aceptor en un péptido totalmente glicosilado, u otro resto de azúcar con propiedades deseables.
- Los péptidos G-CSF modificados por los métodos de la invención pueden ser péptidos sintéticos o de tipo salvaje o pueden ser péptidos mutados, producidos por métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio. La glicosilación de péptidos normalmente está N-ligado u O-ligado. Una unión a N ilustrativa es la unión del azúcar modificado a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de un grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de un azúcar (por ejemplo, N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa) a una cadena lateral hidroxil de un ácido hidroxiamino, con preferencia serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.
- Por ejemplo, en una realización, G-CSF se expresa en un sistema de mamífero y se modifica por el tratamiento de sialidasa para cortar de nuevo los residuos de ácido siálico terminales, seguido por PEGilación usando ST3Gal3 y un donante de ácido siálico-PEG.
- En otra realización ilustrativa, el G-CSF expresado en células de mamífero se trata primero con sialidasa para cortar de nuevo los residuos terminales de ácido siálico, entonces se pegila usando ST3Ga13 y un donante de ácido siálico-PEG, y luego se sialila usando ST3Ga13 y un donante de ácido siálico.
- El G-CSF expresado en un sistema de mamífero también se puede tratar con sialidasa y galactosidasa para cortar de nuevo su ácido siálico y residuos de galactosa, luego se galactosila usando un donante de galactosa y una galactosiltransferasa, y luego sPEGilada utilizando ST3Gal3 y un donante de PEG-ácido siálico.
- En otra realización ilustrativa, el G-CSF no se trata primero con sialidasa, pero se glicopegila utilizando una reacción de transferencia de ácido siálico con el casete de ácido siálico-grupo modificador, y una enzima tal como ST3Gal3.
- También se describe un método, G-CSF se expresan en las células de insecto y se modifica en el siguiente procedimiento: N-acetilglucosamina se añade primero a G-CSF usando un donante de N-acetilglucosamina apropiado y uno o más de GnT-I, II, IV, y V, G-CSF luego se pegila usando un donante de PEG-galactosa y una galactosiltransferasa.
- El G-CSF producido en levadura también se puede glicopeglar. Por ejemplo, el G-CSF se trata primero con endoglicanasa para cortar de nuevo los grupos glicosilo, se galactosila usando un donante de galactosa y una galactosiltransferasa, y luego se PEGila con ST3Ga13 y un donante de ácido siálico-PEG.
- La adición de sitios de glicosilación a una estructura de péptido o de otro tipo se consigue convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de forma que contenga uno o más sitios de glicosilación. La adición también se puede realizar por la incorporación de una o más especies que presentan un grupo-OH, con preferencia residuos de serina o treonina, dentro de la secuencia del péptido G-CSF (para sitios de glicosilación ligados a O). La adición se puede hacer por mutación o por síntesis química completa del péptido G-CSF. La secuencia de aminoácidos del péptido G-CSF con preferencia se altera a través de cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el péptido en las bases preseleccionadas de modo de generar codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La mutación del ADN se obtiene con preferencia usando métodos conocidos en la técnica.
- En una realización ilustrativa, el sitio de glicosilación se añade mediante la transposición de polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican un péptido candidato se pueden modular con los protocolos de transposición de ADN. La transposición de ADN es un proceso de recombinación recursiva y mutación, realizado por fragmentación aleatoria de una mezcla de genes relacionados, seguido por el reensamblaje de los fragmentos mediante un proceso tipo reacción en cadena de polimerasa. Ver, por ejemplo, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747–10751 (1994); Stemmer, Nature 370:389–391 (1994); y patentes US Nros 605.793, 5.837.458, 5.830.721 y 5.811.238.

La presente invención también proporciona medios de adición (o eliminación) de uno o más residuos de glicosilo seleccionados a un péptido, después de lo cual un azúcar modificado se conjuga con al menos uno de los residuos de glicosilo seleccionados del péptido. La presente realización es útil, por ejemplo, cuando se desea conjugar el azúcar modificado a un residuo de glicosilo seleccionado que, no está presente en un péptido o no está presente en una cantidad deseada. Por lo tanto, antes de acoplar un azúcar modificado a un péptido, el residuo de glicosilo seleccionado está conjugado con el péptido G-CSF mediante acoplamiento enzimático o químico. En otra realización, el patrón de glicosilación de un glicopéptido se altera antes de la conjugación del azúcar modificado por la eliminación de un residuo de hidrato de carbono del glicopéptido. Ver, por ejemplo, WO 98/31826.

La adición o eliminación de cualesquiera restos de carbohidrato presentes en el glicopéptido se lleva a cabo ya sea química o enzimáticamente. La desglicosilación química con preferencia es provocada por la exposición de la variante polipeptídica con el compuesto de ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el péptido intacto. La desglicosilación química se describe en Hakimuddin et al., Arco. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) y por Edge et al., Anal. Biochem. 118: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de carbohidrato en las variantes polipeptídicas puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo-y exo-glicosidasas, tal como se describe por Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138: 350 (1987).

La adición química de restos glicosilo se lleva a cabo por cualquier método reconocido en la técnica. La adición enzimática de restos de azúcar con preferencia se obtiene utilizando una modificación de los métodos establecidos en la presente, sustituyendo unidades de glicosilo nativas para los azúcares modificados utilizados en la invención. Otros métodos de adición de restos de azúcar se describen en la patente US N.º 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554, y 5.922.577.

Los ejemplos de puntos de unión correspondientes a los residuos de glicosilo seleccionado incluyen, pero sin limitación: (a) sitios de consenso para la glicosilación N y O; (b) restos glicosilo terminales que son aceptores para una glicosiltransferasa; (c) arginina, asparagina e histidina; (d) grupos carboxilo libres, (e) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína; (f) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina, o hidroxiprolina, (g) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina, o triptofano, o (h) el grupo amida de la glutamina. Los métodos ilustrativos de uso en la presente invención se describen en el WO 87/05330 publicada 11 de septiembre 1987, y Aplin y Wriston, CRC CRIT. REV. BIC/CHEM., pp. 259–306 (1981).

Los métodos

Además de los conjugados descritos anteriormente, la presente invención proporciona métodos para preparar estos y otros conjugados. Por otra parte, la invención proporciona los conjugados para usar en los métodos de prevenir, curar o aliviar un estado de enfermedad mediante la administración de un conjugado de la invención a un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o un sujeto que tiene la enfermedad.

Por lo tanto, la invención proporciona un método de formación de un conjugado covalente entre un resto seleccionado y un péptido G-CSF.

En realizaciones ilustrativas, el conjugado se forma entre un polímero soluble en agua, como se describe en las reivindicaciones y un péptido G-CSF glicosilado o no glicosilado. El polímero, residuo terapéutico o biomolécula se conjuga con el péptido G-CSF a través de un grupo de unión glicosilo, que está interpuesto entre, y unido covalentemente al péptido y el grupo modificador (por ejemplo, polímero soluble en agua). El método incluye poner en contacto el péptido G-CSF con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una enzima, por ejemplo, una glicosiltransferasa, que conjuga el azúcar modificado al sustrato (por ejemplo, péptido, aglicona, glicolípido). La reacción se lleva a cabo en condiciones adecuadas para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido G-CSF.

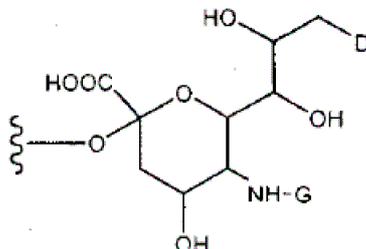
El péptido G-CSF aceptor típicamente se sintetiza de novo, o expresa de forma recombinante en una célula-procariota (por ejemplo, células bacterianas, tales como E. coli) o en una célula eucariota tal como una célula de mamífero, levaduras, insectos, hongos o planta. EL el péptido G-CSF puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento. Por otra parte, el péptido G-CSF puede ser un péptido de tipo salvaje o mutado. En una realización ilustrativa, el péptido CSF T incluye una mutación que añade uno o más N-o de los sitios de glicosilación unidos N u O a la secuencia de péptido.

El método de la invención también se proporciona para la modificación de los péptidos de G-CSF glicosilados de forma incompleta que se producen de forma recombinante. Muchas glicoproteínas producidas de forma recombinante no están completamente glicosiladas, la exposición de los residuos de carbohidratos que pueden tener propiedades indeseables, por ejemplo, inmunogenicidad, reconocimiento por el RES. El empleo de un azúcar modificado en un método de la invención, el péptido se puede glicosilar y derivatizar simultáneamente con, por ejemplo, un polímero soluble en agua, agente terapéutico, o similares. El resto de azúcar del azúcar modificado puede ser el residuo que sería propiamente conjugado con el aceptor en un péptido totalmente glicosilado, u otro resto de azúcar con propiedades deseables.

Los ejemplos de métodos de modificación de péptidos de uso en la presente invención se exponen en

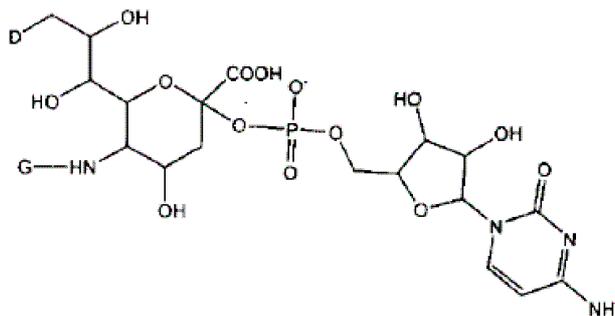
W004/099231, WO 03/031464, y las referencias allí expuestas.

En una realización ilustrativa, la invención proporciona un método de fabricación de un G-CSF PEG-ilado que comprende el resto:



- 5 donde D es -OH o $R^1-L-NH-$. El símbolo G representa R^1-L- o $-C(O)$ alquilo (C1-C6). R^1 es un resto que comprende un residuo de poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada. El símbolo L representa un ligador seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. En general, cuando D es OH, G es R^1-L- , y cuando G es $-C(O)$ alquilo (C1-C6), D es $R^1-L-NH-$. El método of la invención incluye, (a) poner en contacto un péptido G-CSF sustrato con un dador de PEG-ácido siálico y una enzima que es capaz de transferir el resto de PEG-ácido siálico desde el dado al péptido G-CSF sustrato.

Un dador de PEG-ácido siálico ilustrativo es un azúcar de nucleótido tal como el que tiene la fórmula:



y una enzima que transfiere el PEG-ácido siálico en un residuo aminoácido o glicosilo del péptido G-CSF, en condiciones apropiadas para la transferencia.

- 15 En una realización el péptido G-CSF sustrato se expresa en una célula huésped antes de la formación del conjugado de la invención. Una célula huésped ilustrativa es una célula de mamífero. En otras realizaciones, la célula huésped es una célula de insecto, célula de planta, una bacteria o un hongo.

El método presentado en la presente es aplicable a cada uno de los conjugados G-CSF expuestos en las secciones anteriores.

- 20 Los péptidos de G-CSF modificados por los métodos de la invención pueden ser péptidos sintéticos o de tipo salvaje o pueden ser péptidos mutados, producidos por métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio. La glicosilación de péptidos normalmente está unida a N u O. Un ejemplo de unión a N es la unión del azúcar modificado a la cadena lateral de un residuo de asparagina. La secuencias de tripéptido asparagina X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de un grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a 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 ácido hidroxiamino, con preferencia serina o treonina, aunque también se pueden usar aminoácidos inusuales o no naturales, por ejemplo, 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina

- 35 La adición de sitios de glicosilación a una estructura de péptido o de otro tipo se consigue convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de forma que contenga uno o más sitios de glicosilación. La adición también se puede realizar por la incorporación de una o más especies que presentan un grupo-OH, con preferencia residuos de serina o treonina, dentro de la secuencia del péptido G-CSF (para sitios de glicosilación ligados a O). La adición se puede hacer por mutación o por síntesis química completa del péptido. La secuencia de aminoácidos del péptido con preferencia se altera a través de cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el péptido en las bases preseleccionadas de modo de generar codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La mutación del ADN se obtiene con preferencia usando métodos conocidos en la técnica.

- 5 En una realización ilustrativa, el sitio de glicosilación se añade mediante la transposición de polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican un péptido candidato se pueden modular con los protocolos de transposición de ADN. La transposición de ADN es un proceso de recombinación recursiva y mutación, realizado por fragmentación aleatoria de una mezcla de genes relacionados, seguido por el reensamblaje de los fragmentos mediante un proceso tipo reacción en cadena de polimerasa. Ver, por ejemplo, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU. 91:10747-10751 (1994); Stemmer, Naturaleza 370:389-391 (1994) y la patente de EE.UU. N ° 5.605.793, 5.837.458, 5.830.721 y 5.811.238.
- 10 Los ejemplos de métodos de adición o eliminación de sitios de glicosilación, y la adición o la eliminación de estructuras o subestructuras de glicosilo se describen en detalle en WO04/099231, WO03/031464 y solicitudes de US y PCT relacionadas.
- 15 La presente invención también utiliza medios de adición (o eliminación) de uno o más residuos de glicosilo seleccionados a un péptido G-CSF, después de lo cual un azúcar modificado está conjugado con al menos uno de los residuos de glicosilo seleccionados del péptido. Tales técnicas son útiles, por ejemplo, cuando se bien no está presente en un péptido G-CSF o no está presente en una cantidad deseada. Por lo tanto, antes de acoplar un azúcar modificado a un péptido, el residuo de glicosilo seleccionado está conjugado con el péptido G-CSF mediante acoplamiento enzimático o químico. En otra realización, el patrón de glicosilación de un glicopéptido se altera antes de la conjugación del azúcar modificado por la eliminación de un residuo de hidrato de carbono de la glicopéptido. Ver, por ejemplo WO 98/31826.
- 20 Los ejemplos de puntos de unión correspondientes a los residuos de glicosilo seleccionado incluyen, pero sin limitación: (a) sitios de consenso para la glicosilación N sitios para glicosilación ligada a O; (b) restos glicosilo terminales que son aceptores para una glicosiltransferasa; (c) arginina, asparagina e histidina; (d) grupos carboxilo libres, (e) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína; (f) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina, o hidroxiprolina, (g) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina, o triptofano, o (h) el grupo amida de la glutamina. Los métodos ilustrativos de uso en la presente invención se describen en el WO 87/05330 publicada 11 de septiembre 1987, y Aplin y Wriston, CRC CRIT. REV. BIC/CHEM., pp. 259–306 (1981).
- 25 Los azúcares modificados con PEG se conjugan con un péptido glicosilado o no glicosilado usando una enzima apropiada para mediar la conjugación. Con preferencia, las concentraciones de azúcar en el donante modificado, enzimas y péptido aceptor se seleccionan de tal manera que la glicosilación procede hasta que se logra el grado deseado de modificación del aceptor. Las consideraciones descritas a continuación, si bien se exponen en el contexto de una sialiltransferasa, son aplicables a otras reacciones de glicosiltransferasa general.
- 30 Se conocen numerosos métodos de uso de glicosiltransferasas para sintetizar las estructuras de oligosacáridos deseadas y son generalmente aplicables a la presente invención. Los métodos ilustrativos se describen, por ejemplo, en WO 96/32491, Ito et al., Pure Appl. Chem. 65: 753 (1993), patente US Nros. 5.352.670, 5.374.541, 5.545.553, y patentes US de propiedad común. Nros. 6.399.336 y 6.440.703, que se incorporan en la presente como referencia.
- 35 La presente invención se practica utilizando una sola glicosiltransferasa o una combinación de glicosiltransferasas. Por ejemplo, se puede usar una combinación de una sialiltransferasa y una galactosiltransferasa. En estas realizaciones que utilizan más de una enzima, las enzimas y los sustratos se combinan con preferencia en una mezcla de reacción inicial, o las enzimas y reactivos para una segunda reacción enzimática se añaden al medio de reacción una vez que la primera reacción enzimática está completa o casi completa. Mediante la realización de dos reacciones enzimáticas en secuencia en un único recipiente, se mejoran los rendimientos globales respecto de los procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Por otra parte, se reduce la limpieza y eliminación de los solventes adicionales y subproductos.
- 40 En una realización preferida, cada uno de la primera y segunda enzima es una glicosiltransferasa. En otra realización preferida, una enzima es una endoglicosidasa. En una realización preferida adicional, se usan más de dos enzimas para ensamblar la glicoproteína modificada de la invención. Las enzimas se utilizan para alterar una estructura de sacárido en el péptido G-CSF en cualquier momento, ya sea antes o después de la adición del azúcar modificado al péptido.
- 45 En otra realización, el método hace uso de uno o más exo o endoglicosidasas. La glicosidasa es típicamente una mutante, que está manipulada genéticamente para formar enlaces glicosil más que para romperlos. La glicanasa mutante incluye típicamente una sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido ácido para el sitio activo. Por ejemplo, cuando la endoglicanasa es endo-H, los residuos del sitio activo sustituidos será típicamente Asp en la posición 130, Glu en la posición 132 o una combinación de estos. Los aminoácidos se sustituyen generalmente con serina, alanina, asparagina o glutamina.
- 50 La enzima mutante cataliza la reacción, por lo general por una etapa de síntesis que es análoga a la reacción inversa de la etapa de hidrólisis de endoglicanasa. En estas realizaciones, la molécula dadora de glicosio (por ejemplo, una estructura de oligo o monosacárido deseada) contiene un grupo saliente y la reacción procede con la adición de la molécula donante a un residuo GlcNAc en la proteína. Por ejemplo, el grupo saliente puede ser un
- 55

halógeno, tal como fluoruro. En otras realizaciones, el grupo saliente es Asn, o un resto peptídico de Asn. En aún otras realizaciones, el residuo de GlcNAc en la molécula donante de glicosilo está modificado. Por ejemplo, el residuo GlcNAc puede comprender un resto de oxazolina 1,2.

5 En una realización preferida, cada uno de las enzimas utilizados para producir un conjugado de la invención están presentes en una cantidad catalítica. La cantidad catalítica de una enzima particular varía en función de la concentración de sustrato de esa enzima así como de las condiciones de reacción tales como la temperatura, tiempo y valor de pH. Los medios para la determinación de la cantidad catalítica de una enzima dada bajo concentraciones de sustrato y condiciones de reacción preseleccionadas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

10 La temperatura a la que se lleva a cabo un proceso anterior puede variar de justo por encima de la congelación a la temperatura a la que se desnaturalizan las enzimas más sensibles. Los rangos de temperatura preferidos son de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 55 °C, y con más preferencia de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C. En otra realización ilustrativa, uno o más componentes del presente método se llevan a cabo a una temperatura elevada usando una enzima termófila.

15 La mezcla de reacción se mantiene durante un período de tiempo suficiente para que el aceptor sea glicosilado, de este modo se forma el conjugado deseado. Algunos de los conjugados a menudo se pueden detectar después de unas pocas horas, por lo general con cantidades recuperables que se obtienen dentro de las 24 horas o menos. Los expertos en la técnica entienden que la velocidad de reacción depende de un número de factores variables (por ejemplo, concentración de enzima, concentración del donante, concentración del aceptor, temperatura, volumen de solvente), que están optimizados para un sistema seleccionado.

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

25 En la siguiente discusión, la invención se ejemplifica mediante la conjugación de restos de ácido siálico modificados a un péptido glicosilado. El ácido siálico modificado ilustrativo está marcado con PEG. Además, la discusión es igualmente aplicable a la modificación de una unidad de glicosilo con agentes distintos de PEG incluyendo otros restos de PEG.

30 Un abordaje enzimático se puede utilizar para la introducción selectiva de hidratos de carbono PEGilados o PPGilados en un péptido o glicopéptido. El método utiliza azúcares modificados que contienen PEG, PPG, o un grupo funcional reactivo enmascarado, y se combina con la glicosiltransferasa o glicosintasa apropiada. Mediante la selección de la glicosiltransferasa que obtendrá la unión de carbohidratos deseada y la utilización del azúcar modificado como sustrato donante, PEG o PPG se pueden introducir directamente en el esqueleto del péptido G-CSF, en residuos de azúcar existentes de un glicopéptido o sobre residuos de azúcar que tienen ha agregado a un péptido.

35 Un aceptor para la sialiltransferasa se encuentra presente en el péptido G-CSF para ser modificado por los métodos de la presente invención, ya sea como una estructura de natural o una forma colocada en forma recombinante, enzimática o química. Los aceptores adecuados, incluyen, por ejemplo, aceptores de galactosilo tales como Gal β 1,4GlcNAc, Gal β 1,4GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, lacto-N-tetraosa, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,3Ara, Gal β 1, 6GlcNAc, Gal β 1,4Glc (lactosa), y otros aceptores conocidos para los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Paulson et al., J Biol. Chem. 253: 5617–5624 (1978)).

40 En una realización, un aceptor para la sialiltransferasa se encuentra presente en el glicopéptido para modificar después de la síntesis in vivo del glicopéptido. Tales glicopéptidos se pueden sialilar usando los métodos reivindicados sin modificación previa del patrón de glicosilación del glicopéptido. Alternativamente, los métodos de la invención se pueden utilizar para sialilar un péptido que no incluye un aceptor adecuado; primero se modifica el péptido G-CSF para incluir un aceptor mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. En una
45 realización ilustrativa, un residuo GalNAc se añade por la acción de un GalNAc transferasa.

En una realización ilustrativa, el aceptor galactosilo se ensambla uniendo un residuo de galactosa a un aceptor apropiado unido al péptido G-CSF, por ejemplo, un GlcNAc. El método incluye incubar el péptido G-CSF para modificar con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de una galactosiltransferasa (por ejemplo, gal β 1,3 o gal β 1,4), y un donante de galactosilo adecuado (por ejemplo, UDP-galactosa). La reacción se dejó proceder sustancialmente hasta su finalización o, alternativamente, la reacción se termina cuando se añade una cantidad preseleccionada del residuo de galactosa. Otros métodos de ensamblar un aceptor sacárido seleccionado serán evidentes para los expertos en la técnica.

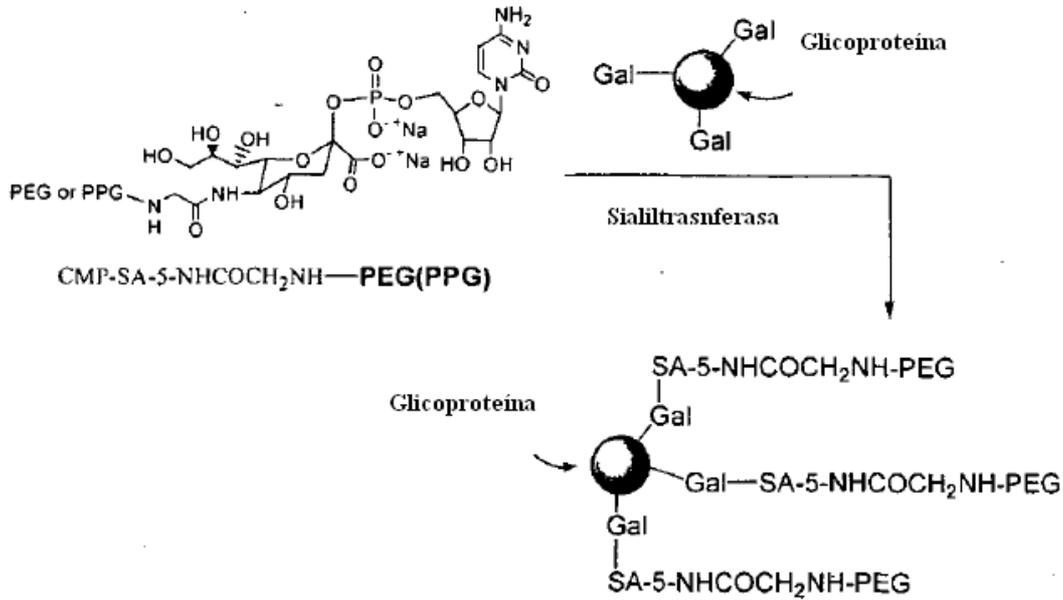
55 En aún otra realización, los oligosacáridos ligados a glicopéptidos primero se “cortan”, ya sea en su totalidad o en parte, para exponer un aceptor para la sialiltransferasa o un resto al que se pueden añadir uno o más residuos apropiados para obtener un aceptor adecuado. Las enzimas tales como glicosiltransferasas y endoglicosidasas (ver, por ejemplo patente US N.º 5.716.812) son útiles para las reacciones de fijación y corte.

En la siguiente discusión, el método de la invención se ejemplifica por el uso de azúcares modificados que tienen un

resto de PEG unido a este. El foco de la discusión es para claridad de la ilustración. Los expertos apreciarán que la discusión es igualmente relevante para otras realizaciones.

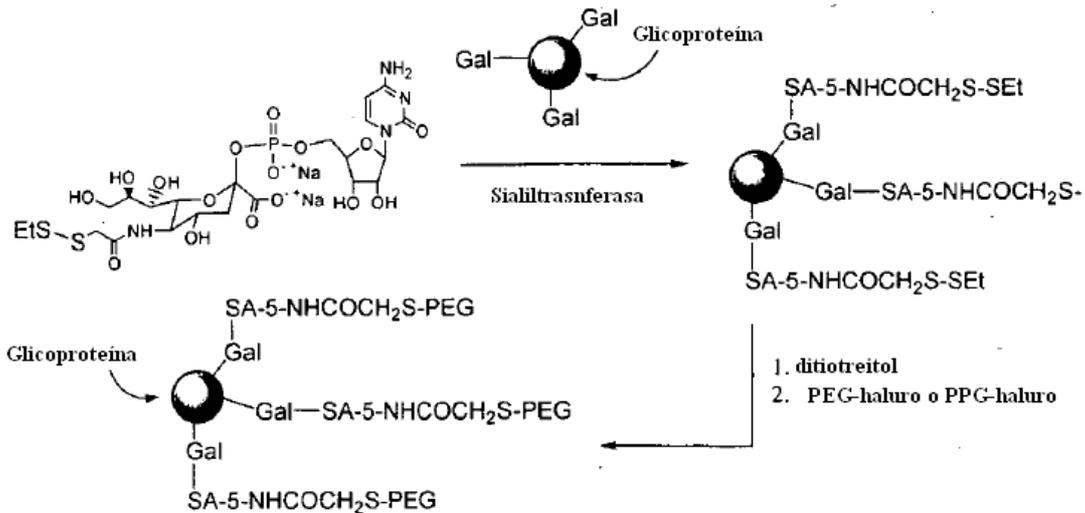
- 5 En una realización ilustrativa de la invención en la que un residuo de carbohidrato se “corta” antes de la adición del azúcar modificado rico en manosa se corta de nuevo a la estructura biantenaria de primera generación. Un azúcar modificado que porta un resto de PEG está conjugado con uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el “repetición de corte”. En un ejemplo, se añade un resto de PEG por medio de un resto de GlcNAc conjugado con el resto de PEG. El G1cNAc modificado está unido a uno o ambos de los residuos de manosa terminales de la estructura biantenaria. Alternativamente, un G1cNAc no modificado se puede añadir a uno o ambos de los extremos de las especies ramificadas.
- 10 En otra realización ilustrativa, se añade un resto de PEG a uno o ambos de los residuos de manosa terminales de la estructura biantenaria a través de un azúcar modificado que tiene un residuo de galactosa, que está conjugado a un residuo de GlcNAc añadido a los residuos de manosa terminales. Alternativamente, una Gal no modificada se puede añadir a uno o ambos residuos G1cNAc terminales.
- En otro ejemplo más, se añade un resto de PEG en un residuo Gal usando un ácido siálico modificado.
- 15 En otra realización ilustrativa, una estructura de rica en manosa se “corta de nuevo” a la manosa desde la cual se ramifica la estructura biantenarias. En un ejemplo, se añade un resto de PEG a través de un G1cNAc modificado con el polímero. Alternativamente, se añade un G1cNAc sin modificar a la manosa, seguido de Gal con un resto de PEG unido. En aún otra realización, los residuos de GlcNAc y Gal sin modificar se añaden secuencialmente a la manosa, seguido de un resto de ácido siálico modificado con un resto de PEG.
- 20 En otra realización ilustrativa, el resto rico en manosa se “corta” a GlcNAc al que está unida la primera manosa. El GlcNAc está conjugado con un residuo de Gal que lleva un resto de PEG. Alternativamente, se añade una Gal no modificada a la G1cNAc, seguido por la adición de un ácido siálico modificado con un azúcar soluble en agua. En otra realización ilustrativa adicional, la GlcNAc terminal es conjugado con la Gal y GlcNAc se fucosilada posteriormente con una fucosa modificado que lleva un resto de PEG.
- 25 El resto rico en manosa también se puede cortar de nuevo al primer G1cNAc unido a Asn del péptido. En un ejemplo, GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc)_a se conjuga con el GlcNAc que porta un polímero soluble en agua. En otro ejemplo, G1cNAc del residuo GlcNAc-(Fuc)_a se modifica con Gal, que porta un polímero soluble en agua. En una realización adicional más, GlcNAc se modifica con Gal, seguido por conjugación con Gal de un ácido siálico modificado con un resto de PEG.
- 30 Otras realizaciones ilustrativas se las publicaciones de solicitudes de patente US de propiedad común: 20040132640, 20040063911, 20040137557, solicitud de patente US Nros: 10/369, 979; 10/410, 913; 10/360, 770; 10/410, 945 y PCT/US02/32263.
- 35 Los ejemplos expuestos anteriormente proporcionan una ilustración de la potencia de los métodos establecidos en la presente. Usando los métodos descritos en la presente, es posible “cortar de nuevo” y construir un residuo de carbohidrato de sustancialmente cualquier estructura deseada. El azúcar modificado se puede añadir a los extremos del resto de carbohidratos como se ha expuesto anteriormente, o puede ser intermedio entre el núcleo y el péptido terminal de los carbohidratos.
- 40 En una realización ilustrativa, un ácido siálico existente se elimina de un glicopéptido de G-CSF usando una sialidasa, de este se desenmascara la totalidad o la mayor parte de los residuos de galactosilo subyacentes. Alternativamente, un péptido o glicopéptido se marca con residuos de galactosa, o un resto oligosacárido que termina en una unidad de galactosa. Después de la exposición de o adición de los residuos de galactosa, se utiliza un sialiltransferasa apropiada para añadir un ácido siálico modificado. La estrategia se resume en el Esquema 1.

Esquema 1



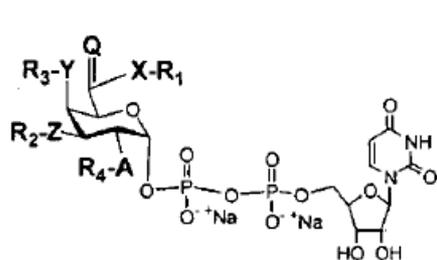
5 En otra estrategia adicional, que se resume en el Esquema 2, una funcionalidad reactiva enmascarada está presente en el ácido siálico. El grupo reactivo enmascarado con preferencia no es afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al G-CSF. Después de la unión covalente del ácido siálico modificado al péptido G-CSF, se retira el enmascaramiento y el péptido G-CSF se conjuga con un agente tal como PEG. El agente se conjuga con el péptido de una manera específica por su reacción con el grupo reactivo desenmascarado en el resto de azúcar modificado.⁷³

Esquema 2

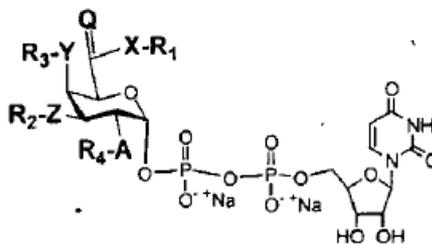


10 Cualquier azúcar modificado establecido en la presente se puede utilizar con su glicosiltransferasa apropiada, de acuerdo con los azúcares terminales de cadenas laterales de oligosacáridos del glicopéptido (Tabla 1). Como se describió anteriormente, el azúcar terminal del glicopéptido requerido para la introducción de la estructura PEGilada se puede introducir naturalmente durante la expresión o se puede producir después de la expresión usando la glicosidasa, glicosiltransferasa o la mezcla de glicosidasa y glicosiltransferasa adecuadas.

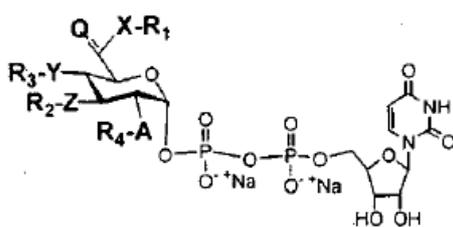
Tabla 1



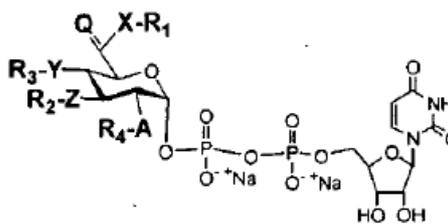
derivados de UDP-galactosa



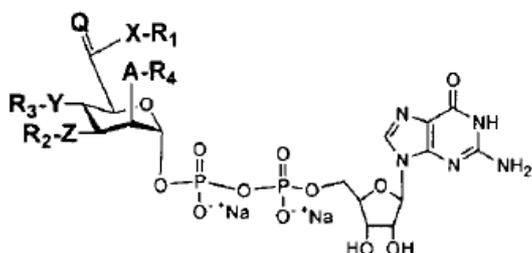
derivados de UDP-galactosamina
(cuando A = NH, R4 puede ser acetilo)



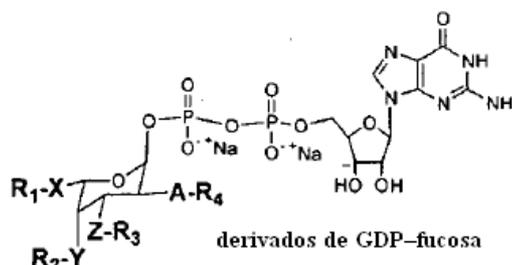
derivados de UDP-glucosa



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, Ligador M, M

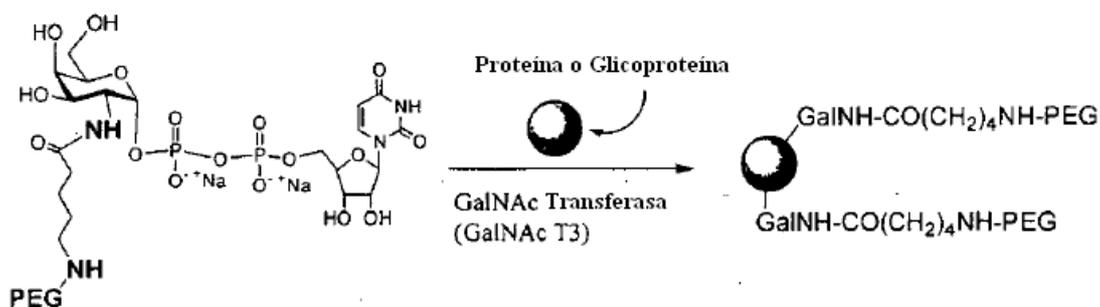
M = PEG, e.g., m-PEG

- 5 También se describe un método donde UDP-galactosa-PEG UDP-galactosa-PEG se hace reaccionar con [β1,4-galactosiltransferasa de leche bovina, de este modo se transfiere la modo la galactosa modificada a la estructura de N-acetilglucosamina terminal apropiado. Los residuos GlcNAc terminales del glicopéptido se pueden producir durante la expresión, como puede ocurrir en sistemas de expresión tales como mamíferos, insectos, plantas u hongos, pero también se puede producir por el tratamiento el glicopéptido con una sialidasa y/o glicosidasa y/o glicosiltransferasa, según se requiera.
- 10 También se describe un método donde una G1cNAc transferasa, como GNT1-5, se utiliza para transferir GlcN pegilado a un residuo de manosa terminal en un glicopéptido. En otra realización ilustrativa más, las estructuras de glicanos ligadas a N y/u O se eliminan enzimáticamente de un glicopéptido para exponer un residuo aminoácido o glicosilo terminal que es posteriormente conjugado con el azúcar modificado. Por ejemplo, un endoglicanasa se utiliza para eliminar las estructuras ligadas a N de un glicopéptido para exponer un GlcNAc terminal como GlcNAc-unido-Asn en el glicopéptido. UDP-Gal-PEG y la galactosiltransferasa adecuada se utilizan para introducir la
- 15

funcionalidad PEG-galactosa sobre el GlcNAc expuesto.

En una realización alternativa, se añade el azúcar modificado directamente al esqueleto del péptido G-CSF usando una glicosiltransferasa conocida para transferir residuos de azúcar al esqueleto del péptido. Esta realización ilustrativa se expone en el Esquema 3. Las glicosiltransferasas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, GalNAc transferasas (GalNAc T1-14), GlcNAc transferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, xilosiltransferasas, manosiltransferasas y similares. El uso de esta estrategia permite la adición directa de azúcares modificados en péptidos que carecen de carbohidratos o, alternativamente, en los glicopéptidos existentes. En ambos casos, la adición del azúcar modificado se produce en posiciones específicas del esqueleto peptídico, definido por la especificidad de sustrato de la glicosiltransferasa y no de una manera aleatoria como ocurre durante la modificación del esqueleto peptídico de una proteína usando métodos químicos. Se puede introducir una variedad de agentes en las proteínas o glicopéptidos que carecen de la secuencia de péptido sustrato de glicosiltransferasa mediante la manipulación genética de la secuencia de aminoácidos apropiada en la cadena de polipéptido.

Esquema 3



En cada uno de las realizaciones ilustrativas expuestas anteriormente, una o más etapas de modificación química adicional o enzimáticas se pueden utilizar después de la conjugación del azúcar modificado al péptido. En una realización ilustrativa, una enzima (por ejemplo, fucosiltransferasa) se utiliza para añadir una unidad de glicosilo (por ejemplo, fucosa) sobre el azúcar modificado terminal unido al péptido G-CSF. En otro ejemplo, una reacción enzimática se utiliza para sitios "capuchón" en los que el azúcar modificado no se logró conjugar. Alternativamente, una reacción química se utiliza para alterar la estructura del azúcar modificado conjugado. Por ejemplo, el azúcar modificado conjugado se hace reaccionar con agentes que estabilizan o desestabilizan su unión con el componente de péptido al que está unido el azúcar modificado. En otro ejemplo, un componente del azúcar modificado se desprotege después de su conjugación con el péptido. Un experto apreciará que hay una gran variedad de procedimientos enzimáticos y químicos que son útiles en los métodos de la invención en una etapa después de que el azúcar modificado se conjuga al péptido G-CSF. La elaboración adicional del conjugado de azúcar modificado-péptido está dentro del alcance de la invención.

Enzimas

Además de las enzimas descritas anteriormente en el contexto de la formación del conjugado ligado a acilo, el patrón de glicosilación del conjugado y los sustratos de partida (por ejemplo, péptidos, lípidos) se puede elaborar, cortar de nuevo o modificar de otro modo por métodos que utilizan otras enzimas. Los métodos de remodelación de péptidos y lípidos usando enzimas que transfieren un donante de azúcar a un aceptor se describen con mayor detalle en DeFrees, WO 03/031464 A2, publicado el 17 de abril de 2003. Un breve resumen de las enzimas seleccionadas de uso en el presente método se expone a continuación.

Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas catalizan la adición de azúcares activados (donante de azúcares NDP o NMP), de una en etapas, a una proteína, glicopéptido, lípido o glicolípido o al extremo no reductor de un oligosacárido en crecimiento. Los glicopéptidos N-ligados se sintetizan a través de una transferasa y un donante oligosacárido ligado a lípidos Dol-PP- NAG₂Glc₃Man₉ en una transferencia de bloque es seguido por el recorte del núcleo. En este caso, la naturaleza del "núcleo" del sacárido es algo diferente de las posteriores uniones. Un gran número de glicosiltransferasas son conocidas en la técnica.

La glicosiltransferasa para ser utilizado en la presente invención puede ser cualquiera siempre que pueda utilizar el azúcar modificado como un donante de azúcar. Los ejemplos de tales enzimas incluyen glicosiltransferasa de la vía de Leloir, tal como galactosiltransferasa, N-acetil glucosaminiltransferasa, N-acetilgalactosaminiltransferasa, fucosiltransferasa, sialiltransferasa, mannosiltransferasa, xilosiltransferasa, glucuroniltransferasa y similares.

Para la síntesis enzimáticas de sacáridos que implican reacciones de glicosiltransferasa, la glicosiltransferasa se puede clonar o aislar de cualquier fuente. Muchas glicosiltransferasas clonadas son conocidas, al igual que sus

secuencias de polinucleótidos. Ver, por ejemplo, "The WWW Guide To Cloned Glicosiltransferasas", (http://www.vei.co.uk/TGN/gt_guide.htm). Las secuencias de aminoácidos de la glicosiltransferasa y secuencias de nucleótidos que codifican las glicosiltransferasas de las cuales se pueden deducir las secuencias de aminoácidos también se hallan en varias bases de datos disponibles al público, que incluyen GenBank, Swiss-Prot, EMBL, y otras.

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

Las glicosiltransferasas que codifican ADN se pueden obtener por síntesis química, mediante la identificación de transcriptos inversos de ARNm a partir de células o de cultivos de líneas celulares adecuados, mediante la identificación de bibliotecas genómicas a partir de células apropiadas, o por combinaciones de estos procedimientos. La detección de ARNm o ADN genómico se puede llevara cabo con sondas de oligonucleótidos generadas a partir de la secuencia génicas de las glicosiltransferasas. Las sondas se pueden marcar con un grupo detectable tal como un grupo fluorescente, un átomo radioactivo o un grupo quimioluminiscente de acuerdo con los procedimientos conocidos y utilizados en ensayos de hibridación convencionales. En forma alternativa, las secuencias de genes de las glicosiltransferasas se pueden obtener mediante el uso del procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los cebadores de oligonucleótidos de PCR que se producen a partir de la secuencia génica de las glicosiltransferasas. Ver, P patente US N.º 4.683.195 de Mullis et al. y patente US N.º 4.683.202 de Mullis.

La glicosiltransferasa se puede sintetizar en células huésped transformadas con vectores que contienen ADN que codifican la enzima glicosiltransferasa. Los vectores se utilizan ya sea para amplificar el ADN que codifica la enzima glicosiltransferasas y/o para expresar ADN que codifica la enzima glicosiltransferasas. Un vector de expresión es un constructo de ADN replicable en la que una secuencia de ADN que codifica las enzimas glicosiltransferasas está unido operativamente a secuencias de control adecuadas capaces de efectuar la expresión de la enzima glicosiltransferasas en un huésped adecuado. La necesidad de tales secuencias de control variará de acuerdo con el huésped seleccionado y el método de transformación elegido. Generalmente, las secuencias de control incluyen un promotor transcripcional, una secuencia operativa opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión ribosómica de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción. Los vectores de amplificación no requieren dominios de control de la expresión. Todo lo que se necesita es la capacidad de replicarse en un huésped, generalmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

En una realización ilustrativa, la invención utiliza una enzima procariótica. Tales glicosiltransferasas incluyen enzimas implicadas en la síntesis de lipooligosacáridos (LOS), que son producidas por muchas bacterias gram negativas (Preston et al Critical Reviews in Microbiology 23 (3):. 139-180 (1996)). Tales enzimas incluyen, pero sin limitación, las proteínas de los operones rfa de especies tales como E. coli y Salmonella typhimurium, que incluyen una β 1,6-galactosiltransferasa y una β 1,3-galactosiltransferasa (ver, por ejemplo, números de acceso de EMBL M80599 y M86935 (E. coli); EMBL N.º de Acceso 556361 (S. typhimurium)), una glucosiltransferasa (Swiss-Prot N.º de Acceso P25740 (E. coli), una β 1,2- glucosiltransferasa (rfaJ) (Swiss-Prot "N.º de Acceso P27129 (E. coli) y de acceso Swiss-Prot N.º P19817 (S. typhimurium)), y una β 1,2 N-acetilglucosaminiltransferasa (rfaK) (EMBL n.º de acceso U00039 (E.coli)). Otros glicosiltransferasas en las que se conocen las secuencias de aminoácidos incluyen las que están codificadas por operones tales como rfaB, que se han caracterizado en los organismos, tales como Klebsiella pneumoniae, E. coli, Salmonella typhimurium, Salmonella enterica, Yersinia enterocolitica, Mycobacterium leprosum, y el operón rhl de Pseudomonas aeruginosa.

También es adecuado para usar en la presente invención las glicosiltransferasas que están implicadas en las estructuras productoras 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 del trisacárido del grupo P^k de asngre, D-galactosil- α -1,4-D-galactosil- β -1,4-D-glucosa, que han sido identificados en LOS de los patógenos de la mucosa Neisseria gonorrhoeae y N. meningitidis (Scholten et al, J. Med. Microbiol 41. 236-243 (1994)). Los genes de N. meningitidis y N. gonorrhoeae que codifican las glicosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de estas estructuras se han identificado a partir de los inmunitipos L3 y L1 de N. meningitidis (Jennings et al., Mol. Microbiol. 18: 729-740 (1995)) y la mutante de N. gonorrhoeae F62 (Gotshlich, J. Exp. Med. 180: 2181-2190 (1994)). En N. meningitidis, un locus que consiste en tres genes, IgtA, IgtB e IgtE, codifica las enzimas glicosiltransferasa necesarias para la adición de los tres últimos de los azúcares de la cadena de lacto-N-neotetraosa (Wakarchuk et al., J. Biol. Chem. 271: 19166-73 (1996)). Recientemente se demostró la actividad enzimática del producto génico de IgtB e IgtA, lo que proporciona la primera evidencia directa de su función de glicosiltransferasa propuesta (Wakarchuk et al, J. Biol. Chem. 271 (45): 28271-276 (1996)). En N. gonorrhoeae, hay dos genes adicionales, IgtD que añade β -D-GalNAc en la posición 3 de la galactosa terminal de la estructura lacto-N- neotetraosa e IgtC que añade un α -D-Gal terminal al elemento de lactosa de un LOS truncado, de este modo se crea la estructura de antígeno del grupo sanguíneo P^k (Gotshlich (1994), supra.). En N. meningitidis, un inmunitipo L1 separado también expresa el antígeno de grupo sanguíneo P^k y se ha demostrado que lleva a un gen IgtC (Jennings et al., (1995), supra.). Las glicosiltransferasas de Neisseria y los genes asociados también se describe en USPN 5.545.553 (Gotschlich). Los genes para α -1,2-fucosiltransferasa y α -

1,3-fucosiltransferasa de *Helicobacter pylori* también se han caracterizado (Martin et al, J. Biol. Chem. 272: 21349 a 21356 (1997)). También se usan en la presente invención las glicosiltransferasas de *Campylobacter jejuni* (ver, por ejemplo, 10 http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf_42.html).

Fucosiltransferasas

5 En algunas realizaciones, una glicosiltransferasa utilizada en el método de la invención es una fucosiltransferasa. Las fucosiltransferasas son conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de fucosiltransferasas incluyen enzimas, que transfieren L-fucosa de GDP-fucosa a una posición hidroxilada de un azúcar aceptor. Las fucosiltransferasas que transfieren azúcares no nucleótidos a un aceptor también se usan en la presente invención.

10 En algunas realizaciones, el azúcar aceptor es, por ejemplo, la GlcNAc en un grupo Gal β (1 \rightarrow 3,4) G1cNAc β en un glicósido oligosacárido. Las fucosiltransferasas adecuadas para esta reacción incluyen el Gal β (1 \rightarrow 3,4) G1cNAc β 1- α (1 \rightarrow 3,4) fucosiltransferasa (FTIII N^o EC 2.4.1.65), que se caracterizó primero a partir de leche humana (ver, Palcic, y col, Carbohydrate Res. 190: 1-11 (1989); Prieels, et al, J. Biol. Chem. 256: 10.456-10.463 (1981), y Núñez, y otros, Can J. Chem. 59: 2086-2095 (1981)) y Gal β (1 \rightarrow 4) G1cNAc β -fucosiltransferasas (FTIV, FTV, FTVI) que se encuentran en el suero humano. FTVII (EC N^o 2.4.1.65), α -sialil α (2 \rightarrow 3) Gal β ((1 \rightarrow 3) G1cNAc β 1 fucosiltransferasa, también se ha caracterizado. Una forma recombinante de la Gal β (1 \rightarrow 3,4) G1cNAc β 1- α (1 \rightarrow 3,4) fucosiltransferasa también se ha caracterizado (ver,

20 Dumas, et al., Bioorg., Med. Letters 1: 425–428, (1991) y Kukowska-Latallo, et al., Genes y Development 4: 1288–1303 (1990)). Otras fucosiltransferasas ilustrativas incluyen, por ejemplo, α 1,2-fucosiltransferasa (EC N^o 2.4.1.69). La fucosilación enzimática puede llevarse a cabo por los métodos descritos en Mollicone, et al., Eur. J. Biochem. 191: 169–176 (1990) o patente US N.º 5.374.655. Las células que se usan para producir una fucosiltransferasa también incluirán un sistema enzimático para sintetizar GDP-fucosa.

Galactosiltransferasas

25 En otro grupo de realizaciones, la glicosiltransferasa es una galactosiltransferasa. Las galactosiltransferasas ilustrativas incluyen α (1,3)-galactosiltransferasas (E.C. No. 2.4.1.151, see, por ejemplo, Dabkowski et al., Transplant Proc. 25:2921 (1993) y Yamamoto et al. Nature 345: 229–233 (1990), ovina (GenBank j04989, Joziassse et al., J. Biol. Chem. 264: 14290–14297 (1989)), murina (GenBank m26925; Larsen et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86: 8227–8231 (1989)), porcina (GenBank L36152; Strahan et al., Immunogenetics 41: 101–105 (1995)). Otra α (1,3)-galactosiltransferasa es la que está involucrada en la síntesis del antígeno del grupo sanguíneo B (EC 2.4.1.37, Yamamoto et al., J. Biol. Chem. 265: 1146–1151 (1990) (humano)). Otra galactosiltransferasa ilustrativa adicional es Gal-TI del núcleo.

30 También son adecuadas para usar en los métodos de la invención las β (1,4)- galactosiltransferasas, que incluyen, por ejemplo, EC 2.4.1.90 (LacNAc synthetase) y EC 2.4.1.22 (lactosa sintetasa) (bovina (D'Agostaro et al., Eur. J. Biochem. 183: 211–217 (1989)), humana (Masri et al., Biochem. BioFys. Res. Commun. 157: 657–663 (1988)), murina (Nakazawa et al., J. Biochem. 104: 165–168 (1988)), así como E.C. 2.4.1.38 y la ceramida galactosiltransferasa (EC 2.4.1.45, Stahl et al., J. Neurosci. Res. 38: 234–242 (1994)). Otras galactosiltransferasas adecuadas incluyen, por ejemplo, α 1,2-galactosiltransferasas (a partir de, por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*, Chapell et al., Mol. Biol. Cell 5: 519–528 (1994)).

Sialiltransferasas

40 Las sialiltransferasas son otro tipo de glicosiltransferasa que son útiles en las células recombinantes y mezclas de reacción de la invención. Las células que producen sialiltransferasas recombinantes también serán producir CMP-ácido siálico, que es un donante de ácido siálico para sialiltransferasas. Los ejemplos de sialiltransferasas que son adecuados para usar en la presente invención incluyen ST3Gal I, ST3Gal II, ST3Gal III (por ejemplo, ST3Gal III de rata o humana), ST3Gal IV, ST3Gal V, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNac I, ST6GalNac II, y ST6GalNac III (la nomenclatura sialiltransferasa usada en la presente es como se describe en Tsuji et al., Glycobiology 6: v–xiv (1996)). Una α (2,3) sialiltransferasa denominada como un α (2,3) sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico al Gal no reductor terminal de un discárido Gal β 1 \rightarrow 3Glc o glicósido. Ver, Van den Eijnden et al., J. Biol. Chem. 256: 3159 (1981), Weinstein et al., J. Biol. Chem. 257: 13845 (1982) y Wen et al., J. Biol. Chem. 267: 21011 (1992). Otra α (2,3)-sialiltransferasa (EC 2.4.99.4) transfiere ácido siálico al Gal no reductor terminal del discárido o glicósido. Ver, Rearick et al., J. Biol. Chem. 254: 4444 (1979) y Gillespie et al., J. Biol. Chem. 267: 21004 (1992).
50 Otras enzimas ilustrativas incluyen Gal- β -1,4-GlcNAc α -2,6-sialiltransferasa (Ver, Kurosawa et al. Eur. J. Biochem. 219: 375–381 (1994)).

Con preferencia, para la glicosilación de carbohidratos de glicopéptidos la sialiltransferasa podrá transferir ácido siálico a la secuencia de Gal β 1,4G1cNAc-, la secuencia penúltima más común que subyace al ácido siálico terminal en las estructuras de carbohidratos totalmente sialiladas (ver, la Tabla 2).

55 **Tabla 2: Sialiltransferasas que usan la secuencia Gal β 1,4G1cNAc como un sustrato aceptor**

| Sialiltransferasa | Fuente | Secuencias formadas | Ref. |
|-------------------|--------------------------------|--|------|
| ST6Gal I | Mamífero | NeuAc α 2,6Gal β 1,4GICNAc- | 1 |
| ST3Gal III | Mamífero | NeuAc α 2,3Gal β 1,4GICNAc- NeuAc α 2,3Gal β 1,3GICNAc- | 1 |
| ST3Gal IV | Mamífero | NeuAc α 2,3Gal β 1,4G1CNAc- NeuAc α 2,3Gal β 1,3GICNAc- | 1 |
| ST6Gal II | Mamífero | NeuAc α 2,6Ga101,4GICNA | |
| ST6Gal II | fotobacterias | NeuAc α 2,6Gal β 1,4GICNAc- | 2 |
| ST3Gal V | N. meningitides N. gonorrhoeae | NeuAc α 2,3Gal β 1,4GICNAc- | 3 |

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

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

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

5 Un ejemplo de una sialiltransferasa que es útil en los métodos reivindicados es ST3Gal III, que también se denomina como α 2,3sialiltransferasa (EC 2.4.99.6). Esta enzima cataliza la transferencia de ácido siálico al Gal de un Gal β 1,3GlcNAc o Gal β 1,4GlcNAc glicosido (ver, por ejemplo, Wen et al., J. Biol. Chem. 267: 21011 (1992); Van den Eijnden et al., J Biol. Chem. 256: 3159 (1991)) y es responsable de la sialilación de oligosacáridos unidos a asparagina en los glicopéptidos. El ácido siálico se une a Gal con la formación de una unión α entre los dos sacáridos. El enlace (unión) entre los sacáridos es entre la posición 2 de NeuAc y la posición 3 de Gal. Esta enzima particular se puede aislar de hígado de rata (Weinstein et al., J. Biol. Chem. 257: 13845 (1982)); el ANDc humano (Sasaki et al. (1993) J Biol. Chem. 268: 22782-22787; Kitagawa & Paulson (1994) J. Biol. Chem. 269: 1394-1401) y las secuencias de AND genómico (Kitagawa et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 931-938) son conocidas, lo que facilita la producción de esta enzima por la expresión recombinante. En una realización preferida, los métodos de sialilación usan una ST3Gal III de rata.

15 Otras sialiltransferasas ilustrativas de uso en la presente invención incluyen las aisladas de *Campylobacter jejuni*, que incluyen CST-I y CST-11 y las que forman uniones α (2,3). Ver, por ejemplo, WO99/49051.

20 Las sialiltransferasas diferentes de las que se enumeran en la Tabla 2, también son útiles en un proceso de gran escala económico y eficiente para la sialilación de glucopéptidos comercialmente importantes. A modo de prueba simple para encontrar la utilidad de estas otras enzimas, diversas cantidades de cada enzima (1-100 mU/mg de proteína) se hacen reaccionar con asialo- α 1 AGP (a 1-10 mg/ml) para comparar la capacidad de la sialiltransferasa de interés para sialilar glicopéptidos con respecto a cualquiera de las ST6Gal I, ST3Gal III bovinas o ambas sialiltransferasas. Alternativamente, otros glicopéptidos o glucopéptidos, u oligosacáridos N-ligados liberados enzimáticamente del esqueleto peptídico se pueden utilizar en lugar de asialo- α 1 AGP para esta evaluación. Las sialiltransferasas con la capacidad de sialilar los oligosacáridos ligados a N de glicopéptidos más eficientemente que ST6Gal I son útiles en un proceso práctico a gran escala para la sialilación del péptido.

25 Estas y otras sialiltransferasas se exponen en la Figura. 11, que es una tabla de sialil transferasas que son útiles para la transferencia de un aceptor de la especie de ácido siálico modificados expuestos en la presentes y ácido siálico no modificado.

GalNAc transferasas

30 Las N-acetilgalactosaminiltransferasas se usan en la práctica de la presente invención, en particular para la unión de un resto GalNAc a un aminoácido del sitio de glicosilación ligado a O del péptido. Las N-acetilgalactosaminiltransferasas adecuadas incluyen, pero sin limitación, α (1,3) N-acetilgalactosaminiltransferasa, β (1,4) N-acetilgalactosaminiltransferasas (Nagata et al., J. Biol. Chem. 267: 12082-12089 (1992) y Smith et al., J. Biol. Chem. 269: 15162 (1994)) y polipéptido de N-acetilgalactosaminiltransferasa (Noma et al., J. Biol. Chem. 268: 12609 (1993)).

40 La producción de proteínas tales como la enzima GalNAc T_{I-XX} a partir de genes clonados mediante ingeniería genética es bien conocida. Ver, por ejemplo., patente US N.º 4.761.371. Un método implica la recolección de muestras suficientes, a continuación se determina la secuencia de aminoácidos de la enzima por secuenciación N-terminal. Esta información se utiliza luego para aislar un clon de ADNc que codifica una transferasa de longitud completa (unidos a la membrana) que después de la expresión en la línea celular de insecto Sf9 dio como resultado la síntesis de una enzima totalmente activa.

La especificidad de aceptor de la enzima luego se determina, utilizando un análisis semicuantitativa de los aminoácidos que rodean los sitios de glicosilación conocidos en 16 proteínas diferentes seguido por estudios de

glicosilación in vitro de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que ciertos residuos de aminoácidos están sobrerrepresentados en los segmentos de péptidos glicosilados y que los residuos en las posiciones específicas que rodean a los residuos de serina y treonina glicosilados pueden tener una influencia más marcada en la eficiencia aceptora que los otros restos de aminoácidos.

5 Glicosiltransferasas unida a las células

En otra realización, las enzimas utilizadas en el método de la invención son glicosiltransferasas unidos a células. Aunque muchas glicosiltransferasas solubles son conocidas (Ver, por ejemplo, patente US N.º 5.032.519), las glicosiltransferasas están generalmente unidas a membrana cuando se asocian con las células. Muchas de las enzimas unidas a la membrana estudiadas hasta ahora se consideran proteínas intrínsecas, es decir, que no se liberan de las membranas por tratamiento por sonicación y requieren detergentes para la solubilización. Las glicosiltransferasas de superficie se han identificado en las superficies de las células de vertebrados e invertebrados, y también se ha reconocido que estas transferasas superficiales mantienen la actividad catalítica en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la función más reconocida de las glucosiltransferasas de la superficie celular es el reconocimiento intercelular (Roth, MOLECULAR APPROACHES TO SUPRACELLULAR FENOMENA, 1990).

15 Se han desarrollado métodos para alterar las glicosiltransferasas expresadas por las células. Por ejemplo Larsen et al., Proc. Nall. Acad. Sci. USA 86: 8227–8231 (1989), informan un método genético para aislar secuencias de ADNc clonados que determinan la expresión de estructuras de oligosacáridos de la superficie celular y sus glicosiltransferasas cognadas. Una biblioteca de ADNc generada a partir de ARNm aislado de una línea celular murina se sabe que expresan UDP-galactosa: β -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida α -1,3-galactosiltransferasa se transfectó en células COS-1. Las células transfectadas se cultivaron y analizaron para determinar la actividad de α -1,3-galactosiltransferasa.

20 Francisco et al., Proc. Nail. Acad. Sci. USA 89: 2713–2717 (1992), describen un método de anclaje de β -lactamasa a la superficie externa de Escherichia coll. Una fusión tripartita que consiste en (i) una secuencia señal de una proteína de membrana externa, (ii) una sección que abarca la membrana de una proteína de membrana externa, y (iii) se produce una secuencia β -lactamasa madura completa que genera una molécula de β -lactamasa unida a la superficie activa. Sin embargo, el método Francisco se limita sólo a sistemas de células procariotas y como es reconocido por los autores, requiere la fusión tripartita completa para el funcionamiento apropiado.

Sulfotransferasas

30 La invención también proporciona métodos para producir péptidos que incluyen- moléculas sulfatadas, incluyendo, por ejemplo, polisacáridos sulfatados tales como heparina, sulfato de heparano, carragenano, y compuestos relacionados. Las sulfotransferasas adecuadas incluyen, por ejemplo, condroitin-6-sulfotransferasa (ADNc de pollo descrito por Fukuta et al, J. Biol. Chem. 270: 18.575-18580 (1995); GenBank N.º de acceso D49915), glicosaminoglicano N-acetilglucosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 1 (Dixon et al., Genomics 26: 239–241 (1995); UL18918)y glicosaminoglican N-acetilglucosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 2 (ADNc marino descrito en Orellana et al., J. Biol. Chem. 269: 2270–2276 (1994) y Eriksson et al., J. Biol. Chem. 269: 10438–10443 (1994); ADNc humano descrito en GenBank N.º de acceso U2304).

Glicosidasas

40 Esta invención también abarca el uso de glicosidasas de tipo salvaje y mutante. Se ha demostrado que las enzimas β -galactosidasa mutantes catalizan la formación de disacáridos a través del acoplamiento de un fluoruro de α -glicosilo a una molécula aceptora de galactosilo. (Withers, patente U.S, N.º 6.284.494;. presentado el 4 de septiembre de 2001). Otros glicosidasas de uso en esta invención incluyen, por ejemplo, β -glucosidasas, β -galactosidasas, β -manosidasas, β - acetil glucosaminidasas, β -N-acetil-galactosaminidasas, β -xilidasas, β -fucosidasas, celulasas, xilanasas, galactanasas, mananasas, hemicelulasas, amilasas, glucoamilasas, α -glucosidasas, α -galactosidasas, α -manosidasas, α -N-acetil-glucosaminidasas, α -N-acetil-galactosa-aminidas, α -xilidasas, α -fucosidasas y neuraminidasas/sialidasas.

Enzimas inmovilizadas

50 La presente invención también proporciona el uso de enzimas que están inmovilizadas sobre un soporte sólido y/o soluble. En una realización ilustrativa, se proporciona una glicosiltransferasa que está conjugada con un PEG a través de un ligador de glicosilo intacto de acuerdo con los métodos de la invención. El conjugado de PEG-ligador-enzima está unido opcionalmente a un soporte sólido. El uso de enzimas con soporte sólido en los métodos de la invención simplifica el desarrollo de la mezcla de reacción y la purificación del producto de reacción, y también permite la recuperación fácil de la enzima. El conjugado de glicosiltransferasa se utiliza en los métodos de la invención. Otras combinaciones de enzimas y soportes serán evidentes para los expertos en la técnica.

Proteínas de fusión

55 En otras realizaciones ilustrativas, los métodos de la invención utilizan proteínas de fusión que tienen más de una actividad enzimática que está implicada en la síntesis de un conjugado de glicopéptido deseado. Los polipéptidos de

fusión pueden estar compuestos de, por ejemplo, un dominio catalíticamente activo de una glicosiltransferasa que está unido a un dominio catalíticamente activo de una enzima accesoria. El dominio catalítico de la enzima accesoria por ejemplo, puede catalizar un paso en la formación de un azúcar de nucleótidos que es un donante para la glicosiltransferasa, o catalizar una reacción involucrado en un ciclo de glicosiltransferasa. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica una glicosiltransferasa se pueden unir, en marco, a un polinucleótido que codifica una enzima implicada en la síntesis de nucleótidos de azúcar. La proteína de fusión resultante luego puede catalizar no solo la síntesis del azúcar de nucleótido, sino también la transferencia del resto de azúcar a la molécula aceptora. La proteína de fusión puede ser de dos o más enzimas del ciclo ligadas en una secuencia de nucleótidos expresable. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye los dominios catalíticamente activos de dos o más glicosiltransferasas. Ver, por ejemplo, 5.641.668. Los glicopéptidos modificados de la presente invención pueden diseñarse y fabricarse fácilmente utilizando diversas proteínas de fusión adecuadas (ver, por ejemplo, la Solicitud de patente PCT PCT/CA98/01180, que se publicó como WO 99/31224 el 24 de junio de 1999).

Preparación de azúcares modificados

En general, el resto de azúcar o casete del resto de azúcar-ligador y los grupos del casete de PEG o PEG-ligador están unidos entre sí mediante el uso de grupos reactivos, que se transforman normalmente por el proceso de unión en un nuevo grupo funcional orgánico o especies no reactivo. El grupo funcional reactivo azúcar se ubica en cualquier posición en el resto de azúcar. Los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente los que son bien conocidos en la técnica de la química de bioconjugados. Actualmente las clases de reacciones favorecidas disponibles con restos de azúcar reactivos son las que proceden en condiciones relativamente moderadas. Estos incluyen, pero sin limitación las sustituciones de nucleofílicas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrofílicas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples de carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de adición de Michael, Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se discuten en, por ejemplo, March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney et al., *MODIFICATION OF PROTEINS*; *Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Los grupos funcionales reactivos útiles laterales de un núcleo de azúcar o grupo de modificación, incluyen, pero sin limitación:

(a) grupos carboxilo y diversos derivados de estos que incluyen, pero sin limitación, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, imidazoles de acilo, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alqueno, alquino y aromáticos;

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

(c) grupos haloalquilo, en el que el haluro puede ser desplazados más tarde con un grupo nucleófilo, tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión, o un ion alcóxido, de este modo se produce la unión covalente de un grupo nuevo 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 tal manera que la posterior derivación es posible a través de la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de mecanismos tales como la adición de Grignard o adición de alquil-litio;

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

(g) grupos tiol, que se pueden convertir, por ejemplo, en disulfuros o reaccionar con haluros de acilo;

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

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

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

Los grupos funcionales reactivos se pueden elegir de manera tal que no participan en, o interfieren en las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o grupo modificador. Alternativamente, un grupo funcional reactivo se puede proteger de la participación en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los expertos en el arte entienden cómo proteger a un grupo funcional particular de tal manera que no interfiera en un conjunto determinado de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, ver, por ejemplo, Greene et al., *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

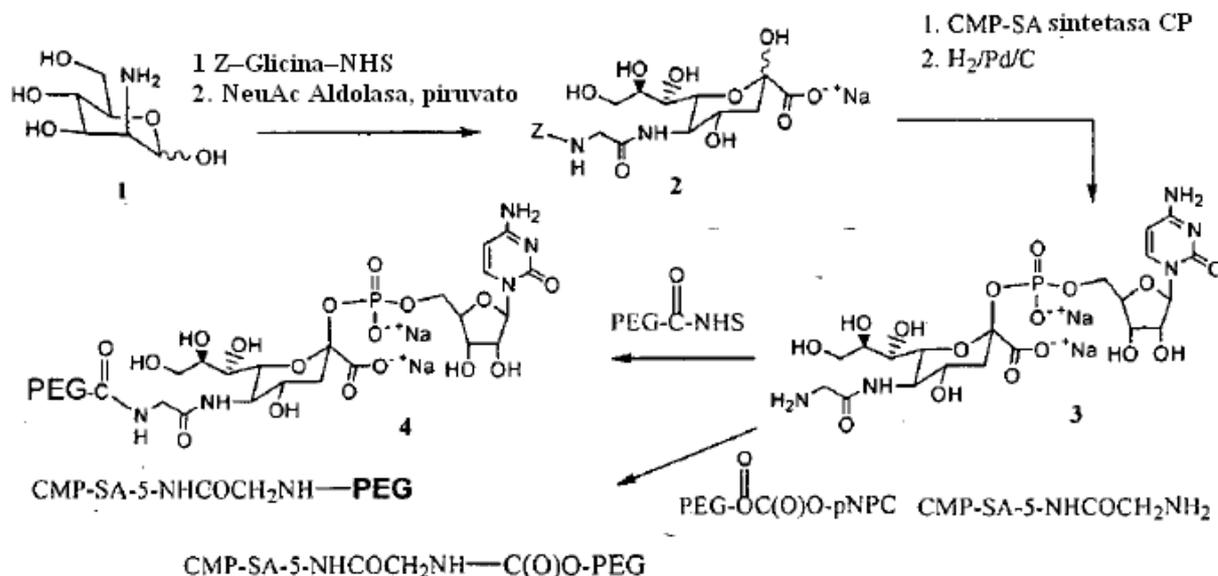
En la siguiente discusión, se expone una serie de ejemplos específicos de azúcares modificados que son útiles en la práctica de la presente invención. En las realizaciones ilustrativas, un derivado de ácido siálico se utiliza como el núcleo de azúcar al que está unido el grupo modificador. El foco de la discusión sobre los derivados de ácido siálico

es para clarificar la ilustración solamente y no se debe interpretar como limitación del alcance de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que una variedad de otros restos de azúcar se pueden activar y derivatizar de una manera análoga a la expuesta usando ácido siálico como un ejemplo. Por ejemplo, están disponibles numerosos métodos para la modificación de galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y fucosa para nombrar unos pocos sustratos de azúcar, que se modifican fácilmente por métodos reconocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Elhalabi et al., *Curr. Med. Chem.* 6: 93 (1999); y Schafer et al., *J. Org. Chem.* 65: realización ilustrativas (2000)).

En una realización ilustrativa, el péptido G-CSF que se modifica por un método de la invención es un glicopéptido que se produce en células de mamífero (por ejemplo, células CHO) o en un animal transgénico y, por tanto, contiene cadenas de oligosacáridos ligadas a N y/u O, que se sialilan en forma incompleta. Las cadenas de oligosacáridos del glicopéptido que carece de un ácido siálico y que contiene un residuo de galactosa terminal se puede PEGilar, PPGilar o modificar de otro modo con un ácido siálico modificado.

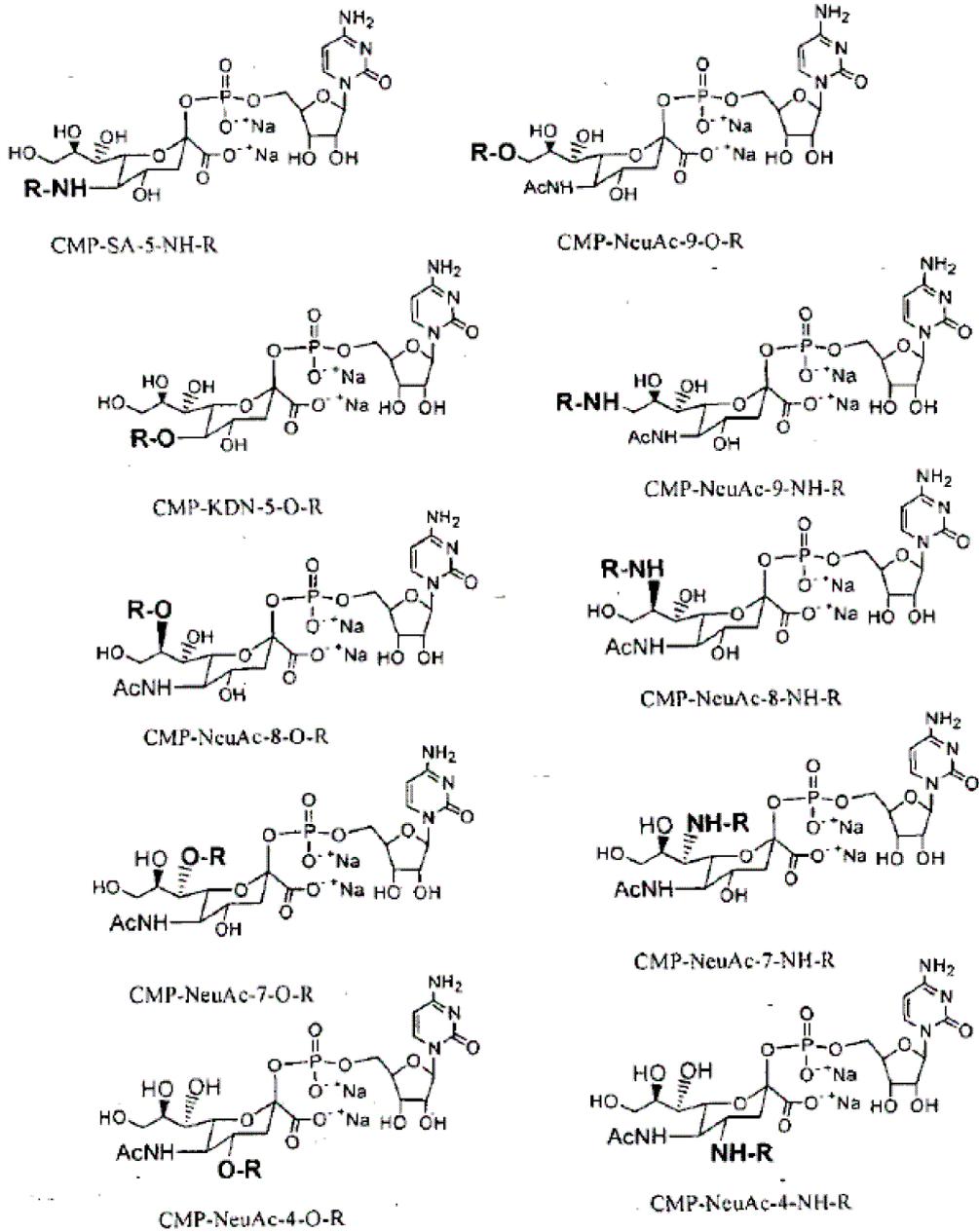
En el Esquema 4, el amino-glicósido 1, se trata con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (por ejemplo, glicina), se convierte el residuo de azúcar en el aducto de amida del aminoácido protegido correspondiente. El aducto se trata con una aldolasa para formar un α -hidroxi carboxilato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

Esquema 4

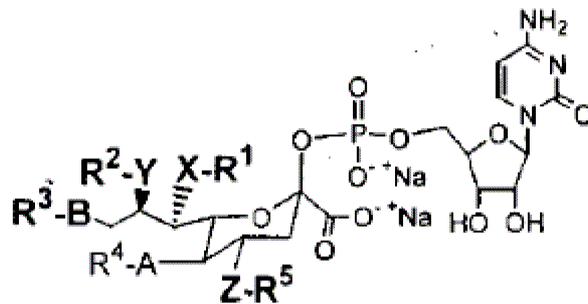


La Tabla 3 expone los ejemplos representativos de monofosfatos de azúcar que se derivatizan con un resto de PEG. Ciertos compuestos de la Tabla 3 se preparan por el método del Esquema 4. Otros derivados se preparan por métodos reconocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Keppler et al., *Glycobiology* 11: 11 R (2001); y Charter et al., *Glycobiology* 10: 1049 (2000)). Otros análogos de PEG y PPG reactivos con amina están disponibles en el comercio, o se pueden preparar por métodos fácilmente accesibles para los expertos en la técnica.

Tabla 3



Los fosfatos de azúcar modificado útiles en la práctica de la presente invención se pueden sustituir en otras posiciones así como los expuestos anteriormente. Las sustituciones preferidas actualmente de ácido siálico se exponen en la siguiente fórmula:



5

En que X es un grupo de unión, que se selecciona con preferencia de -O-, -N(H)-, -S-, -CH₂-, y N(R)₂, en que

5 cada R es un miembro seleccionado de modo independiente de R¹-R⁵. Los símbolos Y, Z, A y B representan un grupo que se selecciona del grupo expuesto anteriormente para la identidad de X. X, Y, Z, A y B se seleccionan de modo independiente, y en consecuencia, pueden ser iguales o diferentes. Los símbolos R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ representan H, un resto de PEG, residuo terapéutico, biomolécula u otro resto. Alternativamente, estos símbolos representan un ligador que se une a un resto de PEG, residuo terapéutico biomolécula u otro resto.

10 Los ejemplos de restos unidos a los conjugados descritos en la presente incluyen los derivados de PEG que se describen en las reivindicaciones (por ejemplo, acilo-PEG, acil-alquil-PEG, alquil-acil-PEG, carbamoil-PEG, aril-PEG). Los métodos de conjugación de los diversos grupos modificadores a un resto de sacárido son de fácil acceso para los expertos en la técnica ((POLY (ETHYLENE GLYCOL CHEMISTRY : BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., Plenum Pub. Corp., 1992; POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMICAL AND BIOLOGICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., ACS Symposium Series No. 680 American Chemical Society, 1997; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; y Dunn et al., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

15 Grupos ligadores (grupos de entrecruzamiento)

20 La preparación del azúcar modificado para su uso en los métodos de la presente invención incluye la unión de un resto de PEG a un residuo de azúcar y con preferencia, la formación de un aducto estable, que es un sustrato para una glicosiltransferasa. Por lo tanto, a menudo se prefiere usar un ligador, por ejemplo, uno formado por la reacción del PEG y el resto de azúcar con un agente de entrecruzamiento para conjugar el PEG y el azúcar. Ejemplos de compuestos bifuncionales que se pueden utilizar para unir grupos modificadores de restos carbohidratos restos incluyen, pero sin limitación, poli(etilenglicoles) bifuncionales, poliamidas, poliéteres, poliésteres y similares. Enfoques generales para los carbohidratos de unión a otras moléculas son conocidos en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Lee y otros, Biochemistry 28: 1856 (1989); Bhatia et al, Anal. Biochem. 178: 408 (1989); Janda et al, J. Am. Chem. Soc. 112: 8886 (1990) y Bednarski et al, WO 92/18135. En la siguiente discusión, los grupos reactivos se tratan como benignos en el resto de azúcar del azúcar modificado naciente. El foco de la discusión es para claridad de la ilustración. Los expertos en la técnica apreciarán que la discusión también es relevante para los grupos reactivos en el grupo modificador.

30 Una variedad de reactivos se utiliza para modificar los componentes del azúcar modificado con entrecruzamientos intramoleculares químicos (para revisiones de reactivos de entrecruzamiento y procedimientos de entrecruzamiento ver: Wold, F., Meth. Enzymol. 25: 623-651, 1972; Weetall, H.20 H., y Cooney, D. A., In: ENZYMES AS DRUGS. (Holcenberg, y Roberts, eds.) pp. 395-442, Wiley, New York, 1981; Ji, T. H., Meth. Enzymol. 91: 580-609, 1983; Mattson et al., Mol. Biol. Rep. 17: 167-183, 1993, todos los cuales se incorporan en la presente por referencia). Los reactivos de entrecruzamiento preferidos se derivan de varios reactivos de entrecruzamiento de longitud cero, homobifuncionales y hetero-bifuncionales. Los reactivos de entrecruzamiento 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 es los reactivos que inducen la condensación de un grupo carboxilo y un amino primario para formar un enlace amida, tales como carbodiimidas, cloroformiato de etilo, reactivo K de Woodward (2-etil-5 fenilisoxazolío-3'-sulfonato), y carbonildiimidazol. Además de estos reactivos químicos, la enzima transglutaminasa (glutamil-péptido γ -glutamilttransferasa; EC 2.3.2.13) se puede utilizar como reactivo de entrecruzamiento de longitud cero. Esta enzima cataliza las reacciones de transferencia de acilo en los grupos carboxamida de los residuos glutaminilo unidos a proteínas, por lo general con un grupo amino primario como sustrato. Los reactivos homo y hetero-bifuncionales preferidos contienen dos sitios idénticos o dos, diferentes, respectivamente, que pueden ser reactivo para grupos amino, sulfhidrilo, guanidino, indol, o grupos no específicos.

45 Purificación de conjugados G-CSF

Replegamiento de G-CSF insoluble

50 Muchas proteínas recombinantes expresadas en bacterias se expresan como agregados insolubles en cuerpos de inclusión bacterianos. Los cuerpos de inclusión son depósitos de proteínas que se encuentran en el espacio citoplásmico y periplásmico de las bacterias (Ver, por ejemplo, Clark, Cur. Op. Biotech. 12:202-207 (2001)). Las proteínas recombinantes G-CSF se expresan en cuerpos de inclusión de las bacterias, y los métodos para el replegamiento de estas proteínas para producir proteínas de G-CSF activa se proporcionan en la presente.

A. Condiciones para el replegamiento de G-CSF activo

55 Para producir proteínas G-CSF activas de las células bacterianas, las proteínas G-CSF se expresan en cuerpos de inclusión bacterianos, las bacterias se recolectan, disgregan y los cuerpos de inclusión se aíslan y lavan. En una realización, se realizan tres lavados: un primer lavado en un tampón a un pH entre 6,0 y 9,0; una sal monovalente, por ejemplo, cloruro de sodio, un detergente no iónico, por ejemplo, Triton X-100; un detergente iónico, por ejemplo, desoxicolato de sodio, y EDTA; un segundo lavado en un tampón libre de detergente, y un tercer lavado en H₂O. Las proteínas dentro de los cuerpos de inclusión luego se solubilizan. La solubilización se puede realizar usando

desnaturalizantes, cloruro de guanidinio o urea; extremos de pH, o detergentes o cualquier combinación de estos. En una realización, se usan guanidina HCl 5-6 M o urea para solubilizar GCSF. En otra realización se añade DDT.

Después de la solubilización, los desnaturalizantes se eliminan de la mezcla de proteínas GCSF. La eliminación del desnaturalizante se puede realizar por una variedad de métodos, que incluyen la disolución en un tampón de replegamiento o métodos de cambio de tampón. Los métodos de intercambio de tampón incluyen diálisis, diafiltración, filtración en gel e inmovilización de la proteína sobre un soporte sólido. (Ver, por ejemplo, Clark, Cur. Op. Biotech. 12:202-207 (2001)). Cualquiera de los métodos anteriores se puede combinar para eliminar los desnaturalizantes.

La formación de enlaces disulfuro en las proteínas GCSF se promueve mediante la adición de un tampón de replegamiento que comprende un par redox. Los pares redox incluyen glutatión oxidado y reducido ((-JSF-I/GSSG), cisteína/cistina, cisteamina/cistamina, DTT/GSSG, y DTE/GSSG. (Ver, por ejemplo, Clark, Cur. Op. Biotech. 12:202-207 (2001)).). En una realización, el par redox es GSH/GSSG en una proporción de 10:1.

El replegamiento se puede realizar en tampón a pH está que varían, por ejemplo, de 6,0 a 10,0. Los tampón de replegamiento pueden incluir otros aditivos para mejorar el replegamiento, por ejemplo, L-arginina (0,4-1 M); PEG; bajas concentraciones de desnaturalizantes, tales como urea (1-2 M) y cloruro de guanidinio (0,5-1,5 M), y detergentes (por ejemplo, Chaps, SDS, CTAB, lauril maltósido, Tween 80, y Triton X-100).

Después del replegamiento, la proteína G-CSF se puede dializar para eliminar el par redox u otros componentes del tampón no deseados. En una realización, se lleva a cabo la diálisis utilizando un tampón que incluye acetato de sodio, glicerol, y un detergente no iónico, por ejemplo, Tween-80. Después de la diálisis, la proteína G-CSF se puede purificar aún más y/o se concentra por cromatografía de intercambio iónico. En una realización, se utiliza una resina de intercambio catiónico SP-sefarosa.

Los expertos reconocerán que una proteína se ha replegado correctamente cuando la proteína replegada tiene actividad biológica detectable. Para una proteína G-CSF, la actividad biológica se puede medir usando una variedad de métodos. Por ejemplo, las proteínas GCSF biológicamente activas son sustratos para la glicosilación ligada a O descrita en las solicitudes de patente US 60/535 284, presentada el 8 de enero de 2004; 60/544411, presentada el 12 de febrero 2004; y Expediente de Abogado Número 019957-018820US, presentada el 20 de febrero 2004; cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia para todos los propósitos. La actividad de la proteína G-CSF también se puede medir utilizando ensayos de proliferación celular o ensayos en leucocitos sanguíneos (WBC) en ratas. (También se describe en las solicitudes de patentes U.S 60/535284, presentada el 8 de enero de 2004; 60/544411, presentada el 12 de febrero 2004, y el Expediente Fiscal Número 019957 018820US, presentada el 20 de febrero 2004). Los ensayos de proliferación y los ensayos de WBC se pueden realizar antes o después de la glicosilación ligada a O de las proteínas de GCSF replegadas.

Otros métodos para el aislamiento de conjugados de la invención

Alternativamente, los productos producidos por los procesos anteriores pueden usarse sin purificación. Sin embargo, se prefiere generalmente recuperar el producto. Se pueden utilizar técnicas estándares bien conocidas para la recuperación de sacáridos glicosilados tales como cromatografía de capa fina o gruesa, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico, o filtración de membrana. Se prefiere el uso de filtración de membrana, con más preferencia utilizando una membrana osmótica inversa, o una o más técnicas cromatográficas de columna para la recuperación como se describe de aquí en adelante y en la bibliografía citada en la presente. Por ejemplo, se puede usar la filtración de membrana en la que las membranas tienen corte de peso molecular de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 10.000 para eliminar las proteínas tales como glicosil transferasas. La nanofiltración u ósmosis inversa se pueden utilizar para eliminar las sales y/o purificar los sacáridos de productos (ver, por ejemplo, WO 98/1558). Las membranas de nanofiltro son una clase de membranas de ósmosis inversa que dejan pasar sales monovalentes pero retienen sales polivalentes y solutos no cargados mayores de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Daltons, de acuerdo con la membrana utilizada. Por lo tanto, en una aplicación típica, los sacáridos preparados por los métodos de la presente invención se retendrán en la membrana y las sales contaminantes pasarán a través de esta.

Si la glicoproteína modificada se produce intracelularmente, como un primer paso, los desechos de partículas, sean células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, la proteína se puede concentrar con un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, seguido por la separación de la variante de polipéptido de otras impurezas mediante uno o más pasos seleccionados de cromatografía de inmutafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (por ejemplo, sobre dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía sobre Blue-Sefarosa, CM Blue-Sefarosa, MONO- Q, MONO-S, lentic lectina-Sefarosa, WGA-Sefarosa, Con A-Sefarosa, Éter Toyopearl, Butil Toyopearl, Fenil Toyopearl, o proteína A Sefarosa, cromatografía de SDS-PAGE, cromatografía de sílice, cromatografía de HPLC de fase inversa (por ejemplo, gel de sílice con grupos alifáticos anexos), filtración en gel utilizando, por ejemplo, tamiz molécula de Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en columnas que se unen selectivamente al polipéptido, y precipitación con etanol o sulfato amónico.

Los glicopéptidos modificados producidos en cultivo se aíslan generalmente por extracción inicial de células, enzimas, etc, seguido de una o más etapas de concentración, precipitación salina, intercambio iónico acuoso, o cromatografía de exclusión por tamaño. Además, la glicoproteína modificada se puede purificar por cromatografía de afinidad. Por último, la HPLC se puede emplear para las etapas finales de purificación.

- 5 Un inhibidor de la proteasa, por ejemplo, fluoruro de metilsulfonilo (PMSF) se puede incluir en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

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

20 Por último, se pueden emplear una o más etapas de RP-HPLC que emplean medios hidrófobo RP-HPLC, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo laterales u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente una composición de variante de polipéptido. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones, también se pueden emplear para proporcionar una glicoproteína modificada homogénea.

25 El glicopéptido modificado de la invención que resulta de una fermentación a gran escala puede purificarse por métodos análogos a los descritos por Urdal et al., J. Chromatog. 296: 171 (1984). Esta referencia describe dos etapas secuenciales de RP-HPLC para la purificación del IL-2 recombinante humana en una columna de HPLC preparativa. Alternativamente, las técnicas tales como cromatografía de afinidad se pueden utilizar para purificar la glicoproteína modificada.

Composiciones farmacéuticas

30 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica que incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un resto de PEG no natural, residuo terapéutico o biomolécula y un péptido glicosilado o no glicosilado. El polímero, residuo terapéutico o biomolécula se conjuga con el péptido G-CSF por medio de un a través de un grupo de unión glicosilo intacto interpuesto entre glicosilo intacto y unido covalentemente al péptido G-CSF y el polímero, residuo terapéutico o biomolécula.

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Las formulaciones adecuadas para uso en la presente invención se hallan en Pharmaceutical Sciences de Remington, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17.^a ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos de administración de fármacos, ver, Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

40 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier manera de administración apropiada, que incluye, por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el portador comprende con preferencia agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se puede emplear cualquiera de los portadores anteriores o un portador sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, y carbonato de magnesio. También se puede emplear microesferas biodegradables (por ejemplo, polilactato poliglicolato) como portadores para las composiciones farmacéuticas de esta invención. Las microesferas biodegradables adecuadas se describen, por ejemplo, en las patentes US Nros 4.897.268 y 5.075.109. Comúnmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. Por lo tanto, la invención proporciona composiciones para la administración parenteral que comprenden el compuesto disuelto o suspendido en un portador aceptable, con preferencia un portador acuoso, por ejemplo, agua, agua regulada, solución salina, PBS y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para

45 50 aproximar las condiciones fisiológicas, tales como ajuste del pH y agentes tampón, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

55 Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden filtrarse de forma estéril. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para usar como tal o liofilizarse, la preparación liofilizada se combina con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones estará típicamente entre 3 y 11, con más preferencia de 5 a 9 y con máxima preferencia de 7 y 8. En algunas realizaciones, los glicopéptidos de la invención se pueden incorporar en liposomas formados a partir de lípidos formadores de vesículas estándar. Una variedad de métodos están disponibles para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), patentes US Nros. 4.235.871, 4.501.728 y

4.837.028. El direccionamiento de liposomas usando una variedad de agentes de direccionamiento (por ejemplo, los sialil galactósidos de la invención) es bien conocido en la técnica (ver, por ejemplo, patentes US Nros 4.957.773 y 4.603.044).

5 Se pueden utilizar métodos estándar para acoplamiento de agentes de direccionamiento a liposomas. Estos métodos implican generalmente la incorporación de componentes lipídicos en los liposomas, tales como fosfatidiletanolamina, que se pueden activar para la fijación de agentes de direccionamiento, o compuestos lipofílicos derivados, tales como glicopéptidos derivados con lípidos de la invención.

10 Los mecanismos de direccionamiento generalmente requieren que los agentes de direccionamiento se ubiquen en la superficie del liposoma de tal manera que los fragmentos blanco estén disponibles para la interacción con el blanco, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Los carbohidratos de la invención pueden estar unidos a una molécula de lípido antes de la formación del liposoma utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica (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). Alternativamente, el liposoma puede estar formado de tal manera que primero se incorpora una porción de conector en la membrana en el momento de la formación de la membrana. La porción del conector debe tener una porción lipófila, que está firmemente incrustada y anclada en la membrana. También debe tener una porción reactiva, la cual está químicamente disponible en la superficie acuosa del liposoma. La porción reactiva se selecciona de modo que sea químicamente adecuada para formar un enlace químico estable con el agente o carbohidrato de direccionamiento, que se añade más tarde. En algunos casos, es posible unir el agente blanco a la molécula de conector directamente, pero en la mayoría de los casos, es más adecuado usar una tercera molécula para actuar como un puente químico, de este modo se une la molécula de conector que se encuentra en la membrana con el agente o carbohidrato blanco que se extiende, en tres dimensiones, fuera de la superficie de la vesícula.

20 Los compuestos preparados por los métodos de la invención también pueden encontrar uso como reactivos de diagnóstico. Por ejemplo, los compuestos marcados se pueden utilizar para localizar áreas de inflamación o metástasis tumoral en un paciente que se sospecha que tiene una inflamación. Para este uso, los compuestos se pueden marcar con ^{125}I , ^{14}C , o tritio.

30 El ingrediente activo utilizado en las composiciones farmacéuticas de la presente invención es G-CSF glicopegilado y sus derivados que tienen las propiedades biológicas de la hormona folículo estimulante para aumentar, por ejemplo, la ovulación. Con preferencia, la composición de G-CSF de la presente invención se administra por vía parenteral (por ejemplo, IV, IM, SC o IP). Se espera que las dosis efectivas varíen considerablemente de acuerdo con la afección que se está tratando y la vía de administración pero se espera que estén en el rango de aproximadamente 0,1 (~7 U) a 100 (~7000 U) mg/kg de peso corporal del material activo. Las dosis preferibles para el tratamiento de las condiciones anémicas son aproximadamente 50 a aproximadamente 300 unidades/kg tres veces a la semana. Debido a que la presente invención proporciona un G-CSF con un mayor tiempo de permanencia in vivo, las dosis indicadas opcionalmente se reducen cuando se administra una composición de la invención.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar los conjugados, y los métodos y de la presente invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

40 GlicoPEGilación de G-CSF producido en las células CHO

a. Preparación de asialo-de colonias de granulocitos Factor de Estimulación (G-CSF)

45 G-CSF producido en las células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en 50 mM de Tris 50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,5 mM de CaCl_2 y se concentran a 500 μL en un filtro de centrifuga Centricon Plus 20. La solución se incubó con 300 mU/ml de neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32 ° C. Para controlar la reacción, una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón adecuado y un gel de IEF realizado. La mezcla de reacción se añade a continuación al conjugado de N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa prelavado (800 μL /ml de volumen de reacción) y las perlas lavadas suavemente se hacen girar durante 24 horas a 4 ° C. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y se recolecta el sobrenadante. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con tampón Tris-EDTA 0,4 ml y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinan. El sobrenadante se dializa a 4 ° C contra Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 1 M, NaN_3 0,05% y luego dos veces más contra Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 1 M, NaN_3 0,05%. La solución dializada luego se concentra, utilizando un filtro de centrifuga Centricon Plus 20 y se almacena a -20 ° C. Las condiciones para el gel de IEF se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos y reactivos suministrados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y desialilado se dializan contra agua y se analizaron por MS MALD1-TOF.

55 b. Preparación de G-CSF-(alfa 2,3)-sialil-PEG

G-CSF desialilado se disolvió en 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15, NaN_3 0,05%, pH 7,2. La solución se

incuba con 1 mM de CMP-ácido siálico-PEG y 0,1 U/ml de ST3Gal1 a 32 ° C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción tenía ligando CMP-SA-PEG-fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1). La incorporación del marcador fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1) y se recolectan las fracciones sobre la base de la absorción UV. El producto de la reacción se analiza mediante SDS-PAGE y análisis de IEF según los procedimientos y reactivos suministrados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y pegilado se dializan contra agua y se analizan por MS MALDI-TOF.

10 c. Preparación de G-CSF-(alfa 2, 8)-sialil-PEG

G-CSF producido en células CHO, que contiene un glicano ligado a O alfa 2 ,3-sialilado, se disuelve en 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl, 0,15, NaN₃ 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con 1 mM de CMP-ácido siálico-PEG y 0,1 U/ml de CST-II a 32 ° C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción tiene ligando CMP-SA-PEG-fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW utilizando tampón PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW utilizando tampón PBS (pH 7,1) y se recolectan las fracciones sobre la base de la absorción UV. El producto de la reacción se analiza mediante SDS-PAGE y análisis de IEF según los procedimientos y reactivos suministrados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y pegilado se dializan frente a agua y se analizan por MS MALDI TOF.

d. Preparación de G-CSF-(alfa2, 6)-Sialil-PEG

G-CSF, que contiene sólo GalNAc ligado a O, se disuelve en 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15, NaN₃ 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con 1 mM de CMP-ácido siálico-PEG y 0,1 U/ml de ST6GalNAc I o II a 32 ° C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción tiene ligando SA-PEG-CMP fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW utilizando tampón PBS (pH 7,1) y se recolectan fracciones sobre la base de la absorción UV. El producto de la reacción se analiza mediante SDS-PAGE y análisis de IEF según los procedimientos y reactivos suministrados por Invitrogen. . Las muestras de G-CSF nativo y pegilado se dializan frente a agua y se analizan por MS MALDI TOF.

El G-CSF producido en las células de CHO se trató con sialidasa de Arthrobacter y se purificó a continuación por exclusión de tamaño en Superdex 75 y se trató con ST3Gal1 o ST3 GA12 y luego con CMP-SA-PEG de 20 kDa. La molécula resultante se purificó por intercambio iónico y filtración en gel y el análisis por SDS-PAGE demostró que la PEGilación estaba completa. Esta es la primera demostración de glicoPEGilación de un glicano ligado a O.

EJEMPLO 2

G-CSF recombinante - Expresión, replegamiento y purificación

- Recolectar células por centrifugación, desechar el sobrenadante. Los resultados del cultivo en diversos medios se muestran en la Figura 9.
- 40 • Resuspender el sedimento celular en Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 75 mM, EDTA 5 mM utilizar 10 ml/g (tampón de lisis)
- Microfluidificar las células (la prensa francesa también funciona)
- Centrifugar 30 min, 4 °C a 5.000 RPM-Desechar el sobrenadante
- Resuspender el sedimento en tampón de lisis y centrifugar como anteriormente
- 45 • Lavar el IB en Tris 25 mM, pH8, NaCl 100 mM, TX-100 1%, NaDOC 1%, EDTA 5 mM. Los pellets se resuspenden mediante pipeteo y agitación. Centrifugar 15 minutos 4 ° C 5000 RPM. Repetir este paso una vez más (un total de dos lavados)
- Lavar los pellet dos veces en Tris 25 mM, pH8, NaCl 100 mM, TX-100 1%, NaDOC 1%, EDTA 5 mM para eliminar los detergentes, centrifugar como antes.
- 50 • Resuspender los pellets en dH₂O para alícuotar y centrifugar como anteriormente. Los pellets se congelan - 20 ° C
- Resuspender los IB en 20 mg/ml en guanidinaHCl 6M, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM, Tris 100 mM pH 8, DTT 10 mM usando una pipeta, seguido por la rotación de 2-4h a temperatura ambiente.

- Centrifugar IB solubilizado durante 1 min a temperatura ambiente a 14.000 RPM. Guardar el sobrenadante.
 - Diluir el sobrenadante 1:20 con tampón de replegamiento MES 50 mM, pH 6, 240 mM NaCl, 10 mM
 - KC1, lauril maltósido 0,3 mM, PEG3350 0,055%, GSH 1 mM, GSSG 0,1 M, arginina 0,5 M y volver a plegar en rotador durante la noche a 4 °C.
- 5
- Transferir el replegamiento a Pierce snakeskin de diálisis 7kDa MWCO. Buffer de diálisis NaOAc 20 mM, pH 4, NaCl 50 mM, Tween-80 0,005%, EDTA 0,1 mM. Dializar un total de 3 veces en comparación con al menos un exceso de 200 veces a 4 °C.
 - Después de la diálisis pasar el material a través de un filtro de 0,45 mm.
 - Equilibrar la columna de SP-Sefarosa con el tampón de diálisis y aplicar la muestra.
- 10
- Lavar la columna con tampón de diálisis y eluir con tampón de diálisis que contiene un gradiente de sal de hasta 1 M de NaCl. La proteína típicamente eluye a 300-400 mM de NaCl.
 - Verificar el material en SDS-PAGE (ver, por ejemplo, la Figura 10).

EJEMPLO 3

El método de dos enzimas en dos recipientes

- 15 El siguiente ejemplo ilustra la preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG en dos pasos secuenciales en los que cada producto intermedio se purifica antes de utilizar en la siguiente etapa.

a. Preparación de G-CSF-GalNAc (pH 6,2) de G-CSF y UDP GalNAc utilizando GalNAc-T2.

- 20 Se concentró G-CSF (960 mcg) en 3,2 ml de tampón de envasado por ultrafiltración utilizando un filtro UF (5K MWCO) y luego se reconstituyó con 1 ml de tampón MES 25 mM (pH 6,2, 0, NaN₃ 0,05%). A continuación se añadieron UDP-GalNAc (6 mg, 9,24 mM), GalNAc-T2 (40 µL, 0,04 U), y MnCl₂ 100 mM (40 µL, 4 mM) y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente.

- 25 Después de 24 horas, el MALDI indicó que la reacción estaba completa. La mezcla de reacción se sometió directamente a purificación por HPLC usando SEC (Superdex 75 y Superdex 200) y un tampón de elución que comprende PBS (solución salina regulada con fosfato, pH 4,9 y Tween 80 0,005%). El pico recolectado de G-CSF-GalNAc se concentró usando un filtro Centricon de 5 KDa MWCO de hasta aproximadamente 150 µl, y se ajustó el volumen a 1 ml utilizando PBS (solución salina regulada con fosfato, pH 4,9 y Tween 80 y 0,005%). La concentración de proteína final fue de 1 mg/ml (A₂₈₀), 100% de rendimiento. La muestra se almacenó a 4 °C.

b. Preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG usando G-CSF-GalNAc purificado, CMP-SA-PEG (20 kDa) y ST6GalNAc-TI de ratón (pH 6,2).

- 30 La solución de G-CSF-GalNAc que contiene 1 mg de proteína se intercambió con tampón MES 25 mM (pH 6,2, NaN₃ 0,005%) y se añadió CMP-SA-PEG (20 kDa) (5 mg, 0,25 mol), Después de la disolución, se añadió MnCl₂ (100 mcl, solución 100 mM) y ST6GalNAc-I (100 mcl, enzima de ratón) y la mezcla de reacción se agitó lentamente a 32 °C durante tres días. La mezcla de reacción se concentró por ultrafiltración (5K MWCO) y se cambió el tampón con NaOAc 25 mM (pH 4,9) una vez y después se concentró a 1 ml de volumen total. El producto se purificó a
- 35 continuación, utilizando SP-Sefarosa (A: NaOAc 25 mM, Tween-80 0,005%, pH 4,5; B: NaOAc 25 mM, Tween-80 0,005%, pH 4,5, NaCl 2 M) en el tiempo de retención de 13-18 minutos y la SEC (Superdex 75; -PBS pH 7,2, Tween 80 0,005%) en el tiempo de retención de 8,6 minutos (Superdex 75, flujo de 1 ml/min). Se recolectaron las fracciones deseadas, se concentraron a 0,5 ml y se almacenaron a 4 °C.

EJEMPLO 4

- 40 Método de un recipiente para obtener G-CSF-GalNAc-SA-PEG con adición simultánea de enzimas

El siguiente ejemplo ilustra la preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG en un recipiente con adición simultánea de enzimas.

1. Proceso de un recipiente usando ST6GalNAc-I de ratón (pH 6,0)

- 45 El G-CSF (960 µg de proteína disuelta en 3,2 ml de tampón de formulación del producto) se concentró por ultrafiltración (MWCO de 5K) a 0,5 ml y se reconstituyó con tampón MES 25 mM (pH 6,0, NaN₃ 0,05%) a un volumen total de alrededor de 1 mL o una concentración de proteína de 1 mg/ml. Luego se añadieron UDP-GalNAc (6 mg, 9,21 µmol), GalNAc-T2 (80 µl, 80 mU), CMP-SA-PEG (20 kDa) (6 mg, 0,3 µmol) y enzima de ratón ST6GalNAc-I (120 µl) y 100 mM de MnCl₂ (50 µl). La solución se agitó a 32 °C durante 48 horas y se purificó utilizando condiciones estándar de cromatografía en SP-sefarosa. Se obtuvo un total de 0,5 mg de proteína (A₂₈₀) o
- 50 aproximadamente un rendimiento total de 50%. La estructura del producto se confirmó por análisis con MALDI y

SDS-PAGE.

2. Proceso de un recipiente usando ST6GalNAc-I de pollo (pH 6,0).

5 Se concentraron 14,4 mg de G-CSF a 3 ml de volumen final, el tampón se intercambió con tampón MES 25 mM (pH 6,0, NaN₃ 0,05%, Tween 80 0,004%) y se ajustó el volumen a 13 ml. Luego se añadieron UDP-GalNAc (90 mg, 150 μmol), GalNAc-T2 (0,59 U), CMP-SA-PEG-20 kDa (90 mg), ST6GalNAc-I de pollo (0,44 U), y 100 mM de MnCl₂ (600 mcl). La mezcla resultante decantó a temperatura ambiente durante 60 horas. La mezcla de reacción se concentró utilizando un UF (5K MWCO) y centrifugación. El residuo (aproximadamente 2 ml) se disolvió en tampón de NaOAc 25 mM (pH 4,5) y se concentró de nuevo a 5 ml de volumen final. Esta muestra se purificó usando SP-Sefarosa durante aproximadamente 10-23 min, La SEC (Superdex 75, 17 minutos, velocidad de flujo de 0,5 ml/min) y una SEC adicional (Superdex 200, 23 min, velocidad de flujo 0,5 ml/min), produjeron 3,6 mg (rendimiento total 25%) de G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20 KDa (A₂₈₀ y método BCA).

EJEMPLO 5

Método de un recipiente para obtener G-CSF-GalNAc-Cal-SA-PEG con adición secuencial de enzimas

15 El siguiente ejemplo ilustra un método para la fabricación de G-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEG en un recipiente con la adición secuencial de las enzimas.

1. A partir de GalNAc-G-CSF

a. Preparación de G-CSF-GalNAc (pH 6,2) de G-CSF y UDP-GalNAc utilizando GalNAc-T2.

20 G-CSF (960 mcg) en 3,2 ml de tampón de envasado se concentró por ultrafiltración usando un filtro UF (5K MWCO) y luego se reconstituyó con 1 ml de tampón MES 25 mM (pH 6,2, NaN₃ 0,005%). A continuación se añadieron UDP-GalNAc (6 mg, 9,24 mM), GalNAc-T2 (40 μL, 0,04 U), y 100 mM de MnCl₂ (40 μL, 4 mM) y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente.

b. Preparación de G-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEG de G-CSF-GalNAc; UDP-galactosa, SA-PEG-20 Kdalton, y las enzimas apropiadas

25 UDP-galactosa (4 mg, 6,5 μmoles), núcleo-1-Gal-T (320 μl, 160 mU), CMP-SA-PEG-20 kDa (8 mg, 0,4 limole), ST3Ga12 (80 pL, 0,07 mU) y 100 mM de MnCl₂ (80 pL) se añaden directamente a la mezcla de reacción cruda del G-CSF-GalNAc (1,5 mg) en 1,5 ml de tampón MES 25 mM (pH 6,0) de la etapa a, anterior. La mezcla resultante se incubó a 32 ° C durante 60 horas. La mezcla de reacción se centrifugó y la solución se concentró mediante ultrafiltración (MWCO de 5K) a 0,2 ml y, luego se redisolvió con NaOAc 25 mM (pH 4,5) hasta un volumen final de 1 ml. El producto se purificó usando SP-Sefarosa (tiempo de retención entre 10-15 minutos), la fracción del pico se concentró utilizando un filtro giratorio (5K MWCO) y el residuo se purificó adicionalmente usando SEC (Superdex 75, tiempo de retención de 10,2 min). Después de la concentración utilizando un filtro giratorio (5K MWCO), la proteína se diluyó a 1 ml utilizando tampón de formulación con PBS, 2,5% de manitol, 0,005% de polisorbato, pH 6,5 y se formuló a una concentración de proteínas de 850 mcg de proteína por ml (A₂₈₀). El rendimiento global fue 55%.

EJEMPLO 6

35 Método de un recipiente para obtener G-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEG con adición simultánea de enzimas

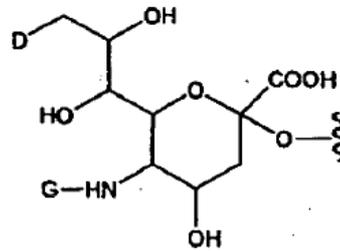
a. A partir de G-CSF

40 G-CSF (960 mcg, 3,2 ml) se concentró por ultrafiltración (MWCO de 5K) y se reconstituyó con tampón MES 25 mM (pH 6,0, NaN₃ 0,005%). El volumen total de la solución de G-CSF era aproximadamente 1 mg/ml. Se añadieron UDP-GalNAc (6 mg), GalNAc-T2 (-80 μl, ~ 80 μU), UDP-Gal (6 mg), Core 1 GalT (160 μl, 80 μU), CMP-SA-PEG (20K) (6 mg) y un 2,3-(O)-sialiltransferasa (160 μl, 120 μU), MnCl₂ 100 mM (40 μl). La mezcla resultante se incubó a 32 ° C durante 48 h. La purificación se realizó tal como se describe a continuación utilizando IEX y SEC. La fracción resultante que contiene el producto se concentró mediante ultrafiltración (MWCO de 5K) y el volumen se ajustó a aproximadamente 1 ml con tampón. La concentración de proteína se determinó que es 0,392 mg/ml mediante A₂₈₀, lo que da un rendimiento global de 40% de G-CSF.

45

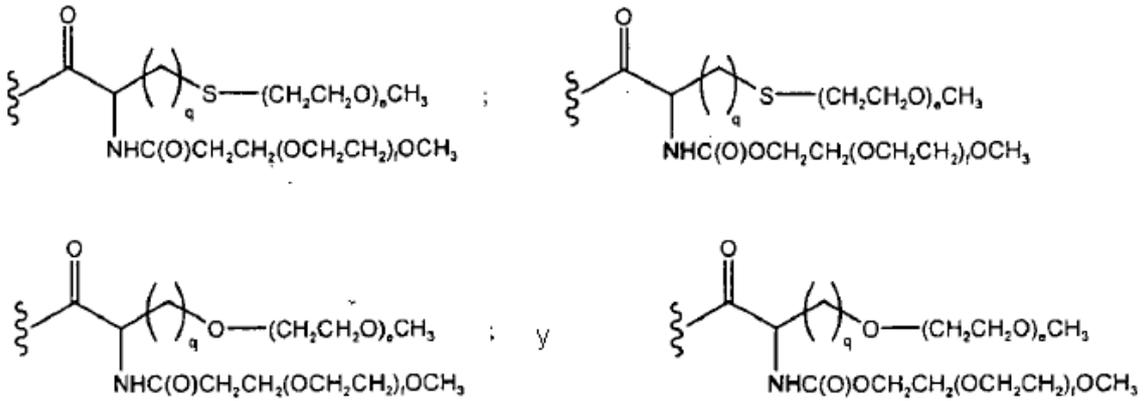
REIVINDICACIONES

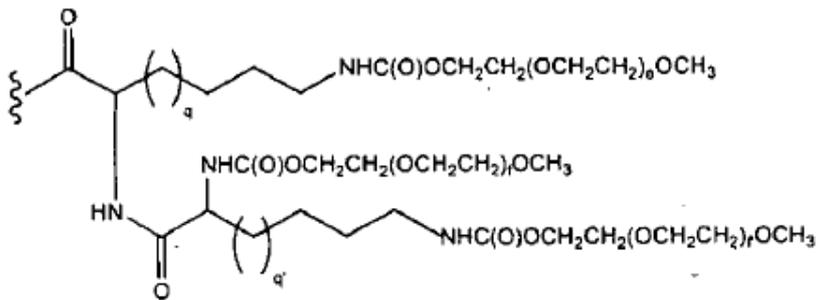
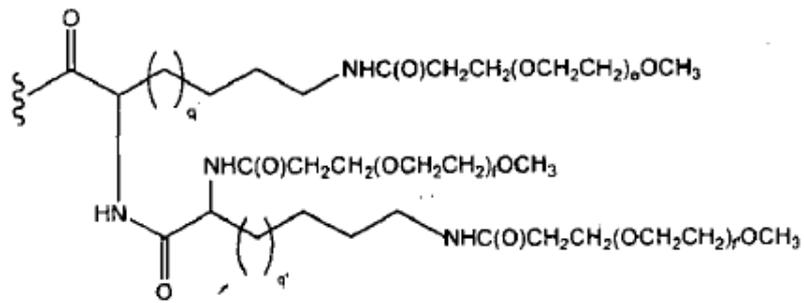
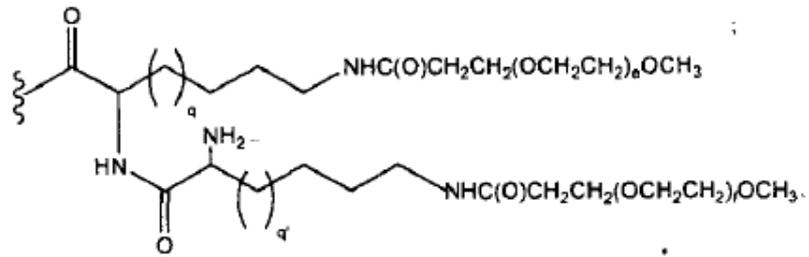
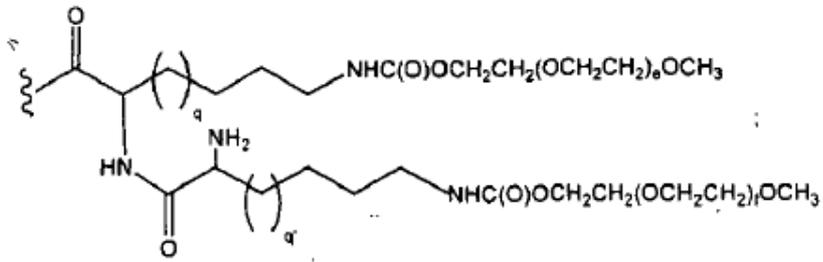
1. Un péptido del factor estimulante de colonias de granulocitos que comprende el resto:

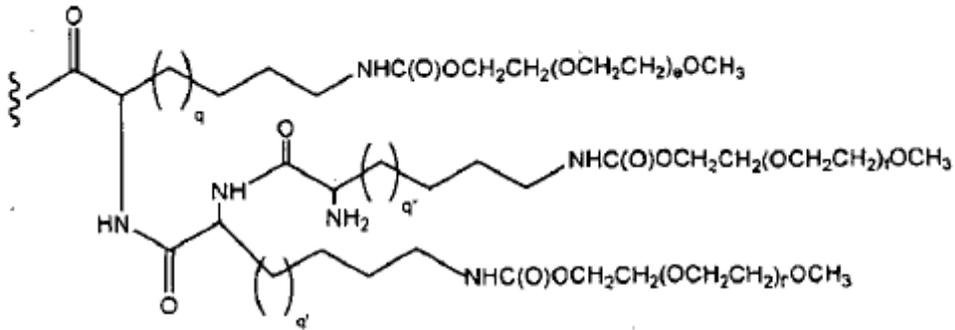


donde

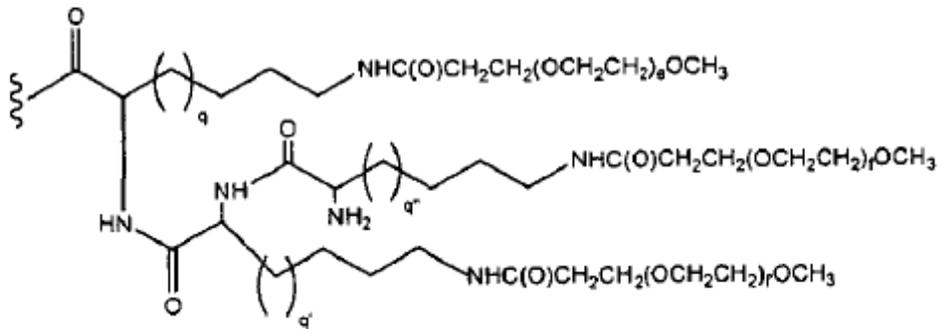
- 5 D es un miembro seleccionado de -OH y R¹-L-HN-;
 G es un miembro seleccionado de R¹-L- y -C(O)alquilo (C1-C6);
 R¹ tiene una estructura que es un miembro seleccionado de:







y



donde

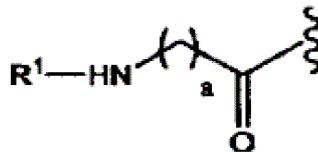
e, f y f son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 2500; y

q, q' y q'' son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 20; y

5 L es un ligador que es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido,

de modo que cuando D es OH, G es R¹-L-, y cuando G es -C(O)alquilo (C1-C6), D es R¹-L-NH-.

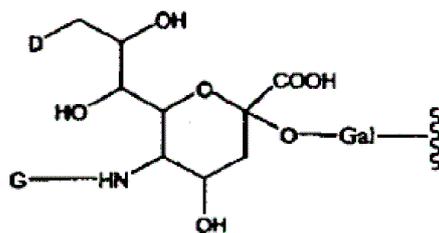
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde L-R¹ tiene la fórmula:



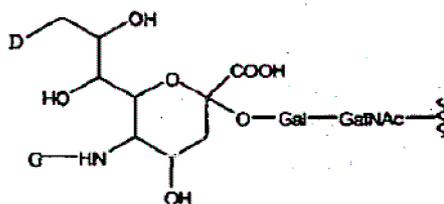
10 donde

a es un número entero de 0 a 20.

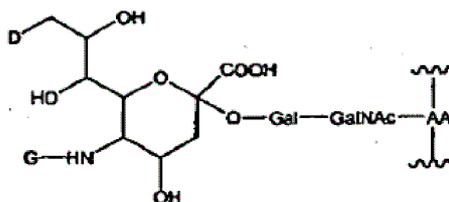
3. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde dicho resto tiene la fórmula:



4. El péptido G-CSF de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho resto tiene la fórmula:

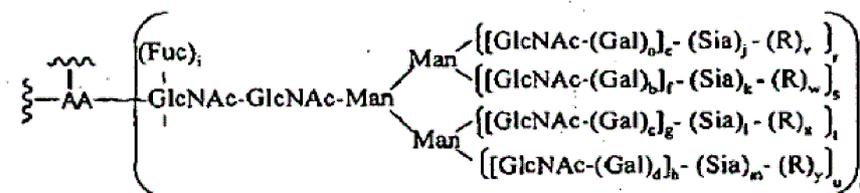


5. El péptido G-CSF de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho resto tiene la fórmula:



donde

- 5 AA es un residuo de aminoácido de dicho péptido.
- 6. El péptido de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho residuo de aminoácido es serina o treonina.
- 7. El péptido de acuerdo con la reivindicación 5 o reivindicación 6, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
- 8. El péptido de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho residuo de aminoácido es treonina en la posición 133 de la SEQ ID NO: 1.
- 9. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- 10. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende un resto de la fórmula:

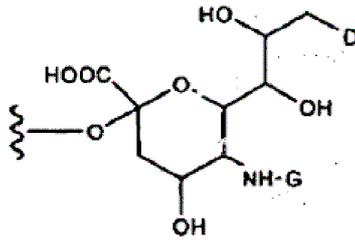


15 donde

- a, b, c, d, i, r, s, t, y u son números enteros seleccionados de modo independiente de 0 y 1; q es 1;
- e, f, g, y h son miembros seleccionados de modo independiente de los números enteros de 0 a 6;
- j, k, l, y m son miembros seleccionados de modo independiente de los números enteros de 0 y 100;
- v, w, x, e y se seleccionan de modo independiente de 0 y 1, y al menos uno de v, w, x e y es 1;

20 AA es un residuo de aminoácido de dicho péptido;

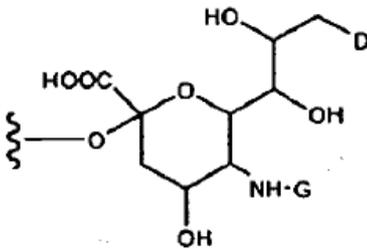
Sia-(R) es un resto de la fórmula:



11. El péptido de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho residuo de aminoácido es un residuo de asparagina.

12. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde dicho péptido es el péptido bioactivo del factor estimulante de colonias de granulocitos.

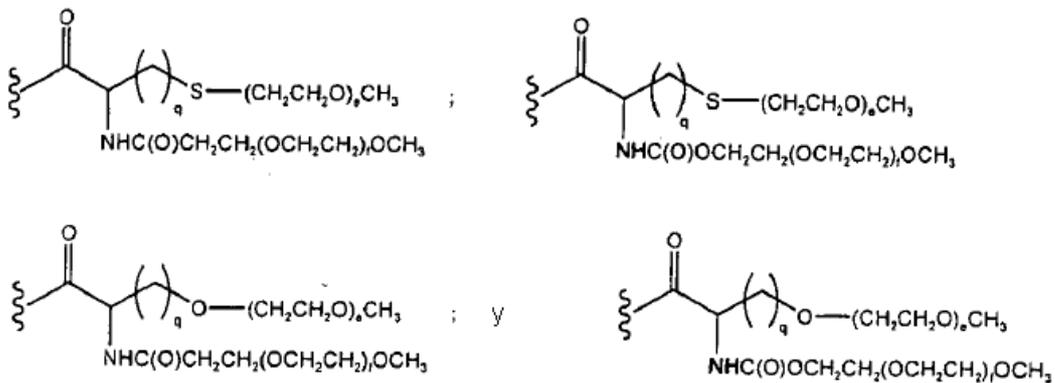
5 13. Un método de obtener un conjugado del péptido G-CSF que comprende el resto:

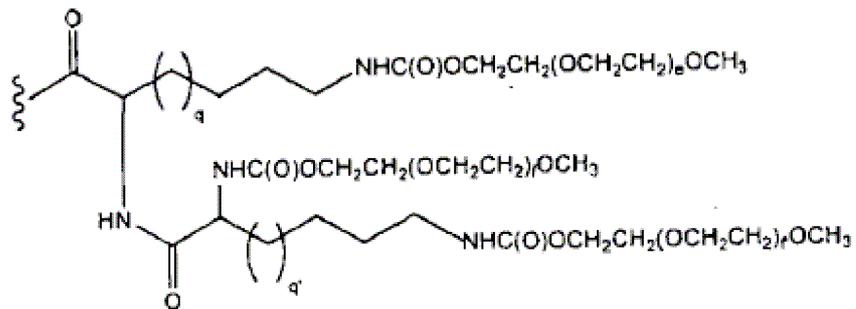
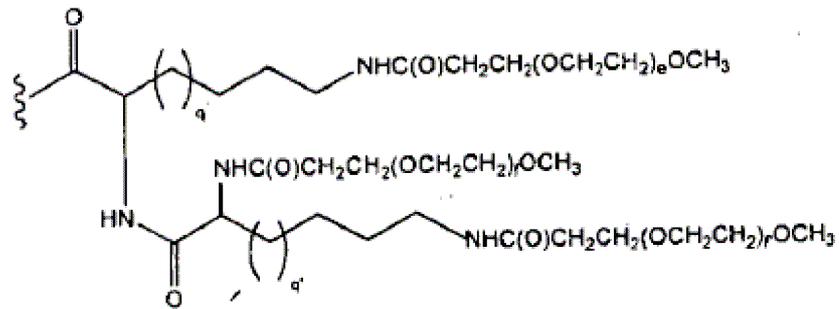
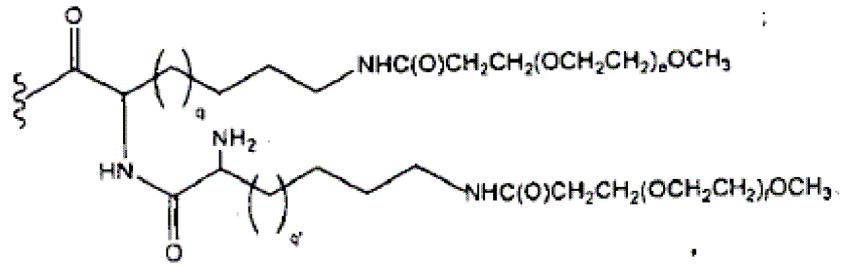
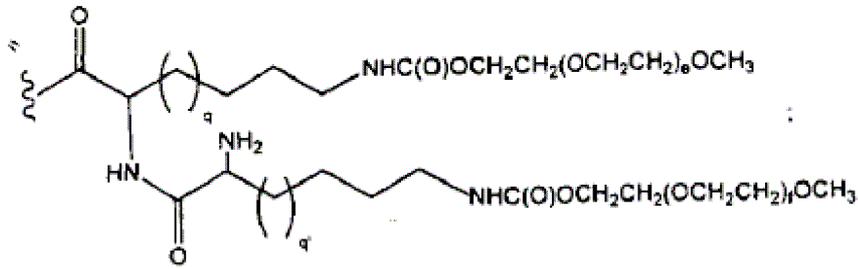


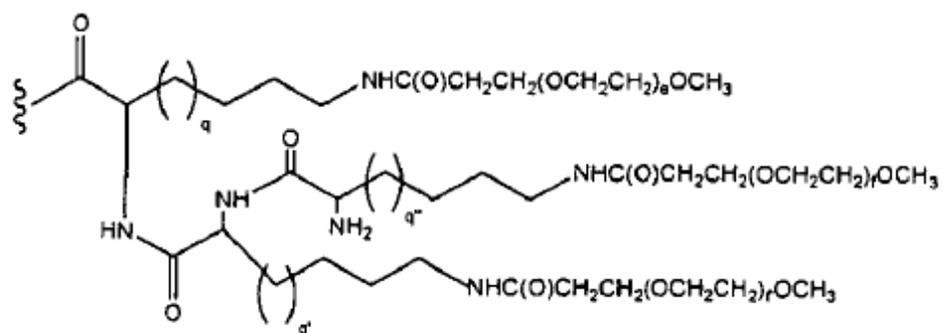
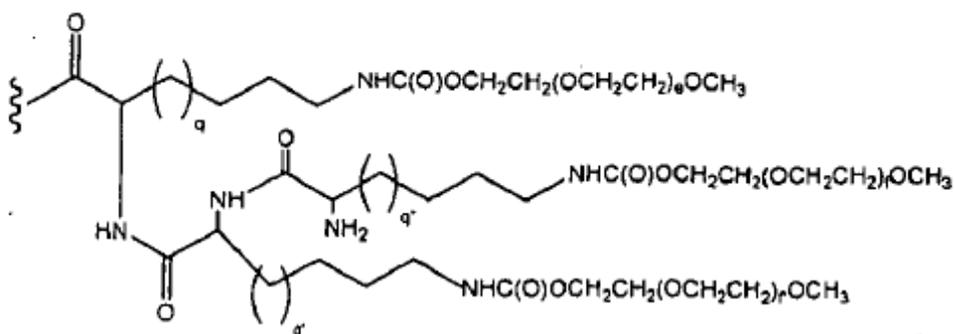
donde

D es un miembro seleccionado de -OH y R¹-L-HN-,

10 G es un miembro seleccionado de R¹-L- y -C(O)alquilo (C1-C6); R¹ tiene una estructura que es un miembro seleccionado de:







donde

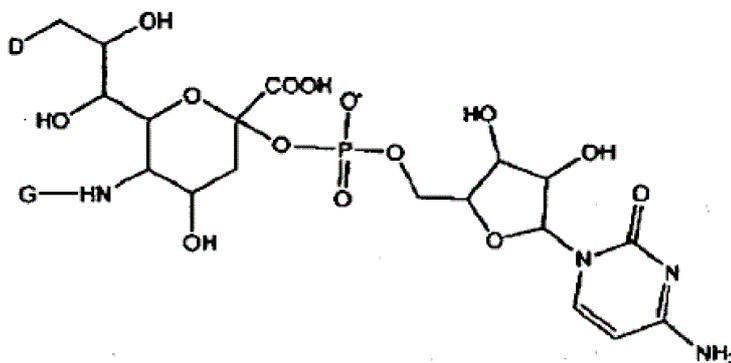
e, f y f' son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 2500; y

q, q' y q'' son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 20; y

- 5 L es un ligador que es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido,

de modo que cuando D es OH, G es R¹-L y cuando G es -(O)alquilo (C1-C6), D es R¹-L-NH-, dicho método comprende:

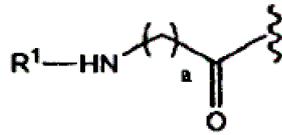
(a) poner en contacto un sustrato de péptido G-CSF con un resto dador de PEG-ácido siálico que tiene la fórmula:



10

y una enzima que transfiere dicho PEG-ácido siálico sobre un residuo aminoácido o glicosilo de dicho péptido G-CSF, en las condiciones apropiadas para la transferencia.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, donde L-R¹ tiene la fórmula:



donde

a es un número entero de 0 a 20.

15. El método de la reivindicación 13 ó 14, que además comprende, antes de la etapa (a):
- 5 (b) expresar dicho péptido del factor estimulante de colonias de granulocitos sustrato en un huésped adecuado.
16. El método de la reivindicación 15, donde dicho huésped se selecciona de una célula de insecto y una célula de mamífero.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, que además comprende formular el péptido en una formulación farmacéutica.
- 10 18. Uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la fabricación de un medicamento para estimular la producción de leucocitos inflamatorios en un mamífero.
19. Uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la fabricación de un medicamento para tratar una infección.
- 15 20. Una formulación farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un portador farmacéuticamente aceptable.
21. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso terapéutico.

FIGURA 1

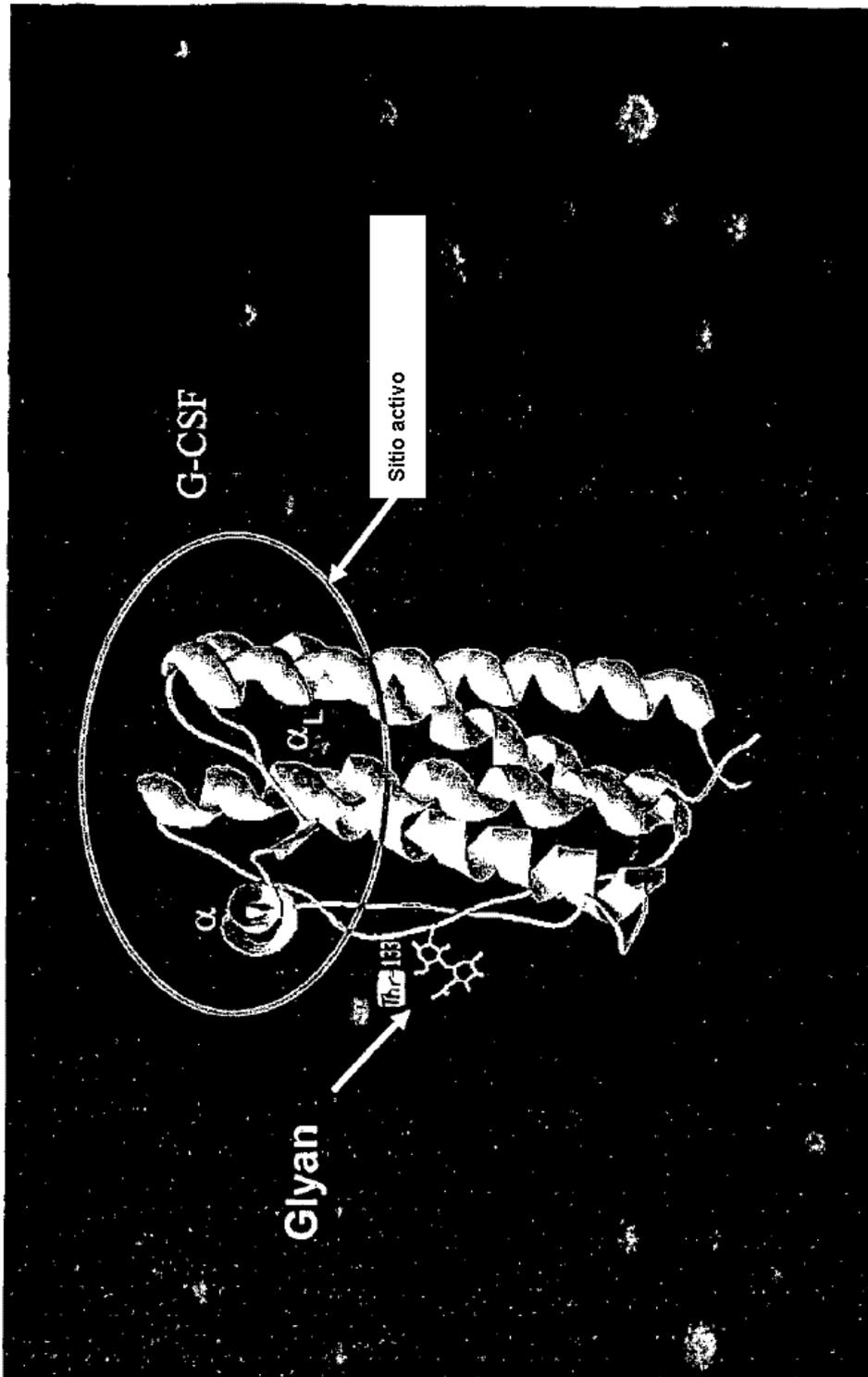


FIGURA 2

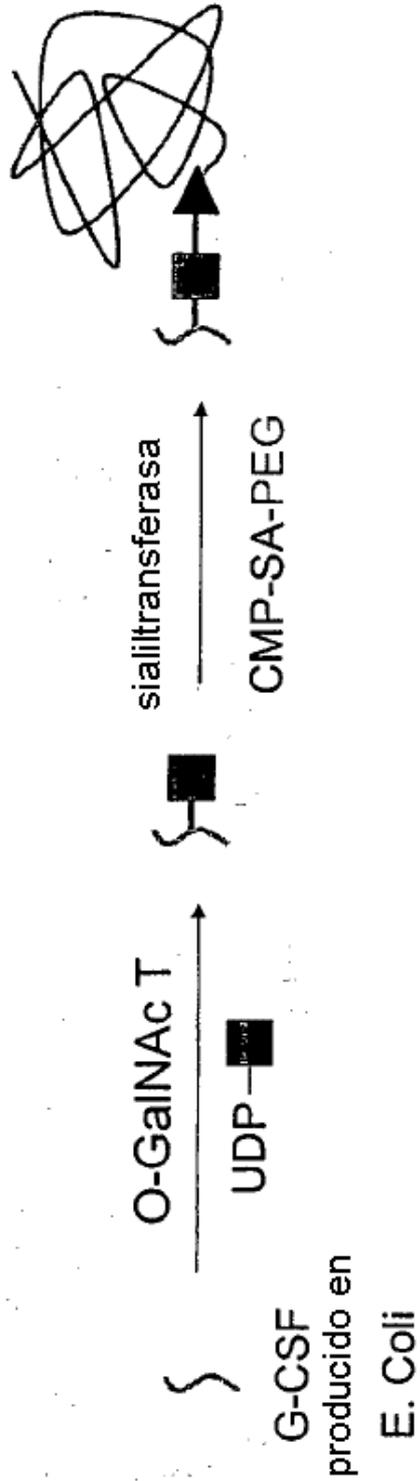


FIGURA 3

Inyección de bolo IV de proteínas rotuladas con [¹²⁵I] en ratas

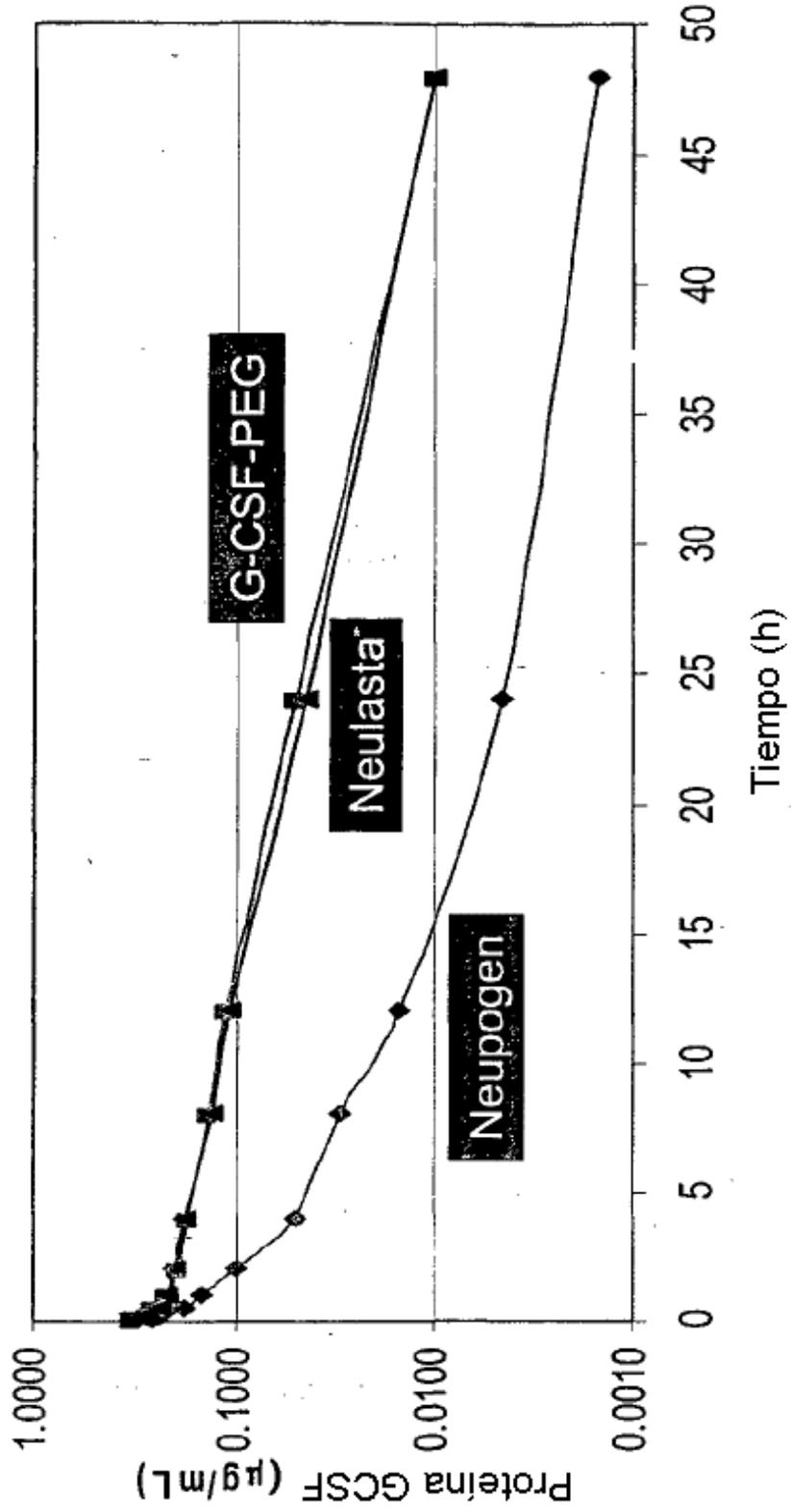


FIGURA 4

Respuesta de ratón WBC a variantes de GCSF (250 µg/Kg) administrados i.v. a 0 horas

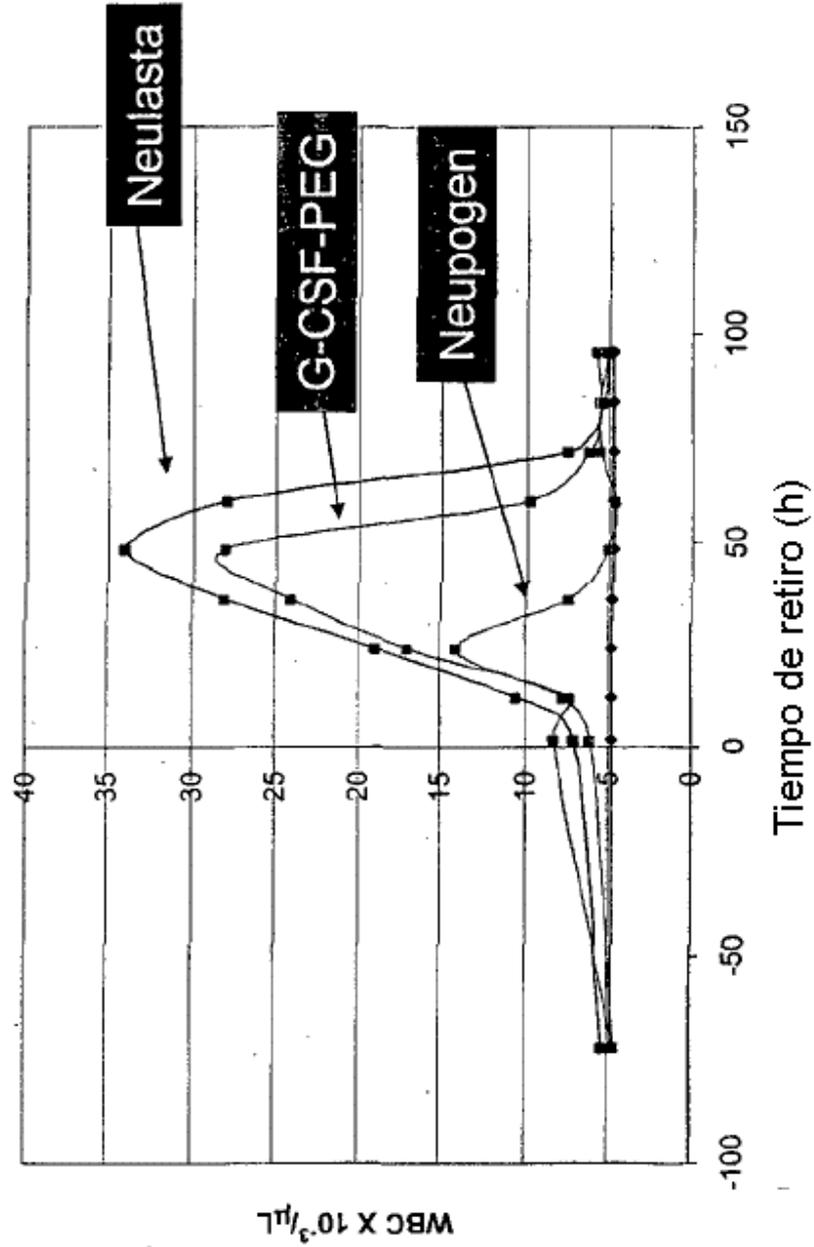


FIGURA 5

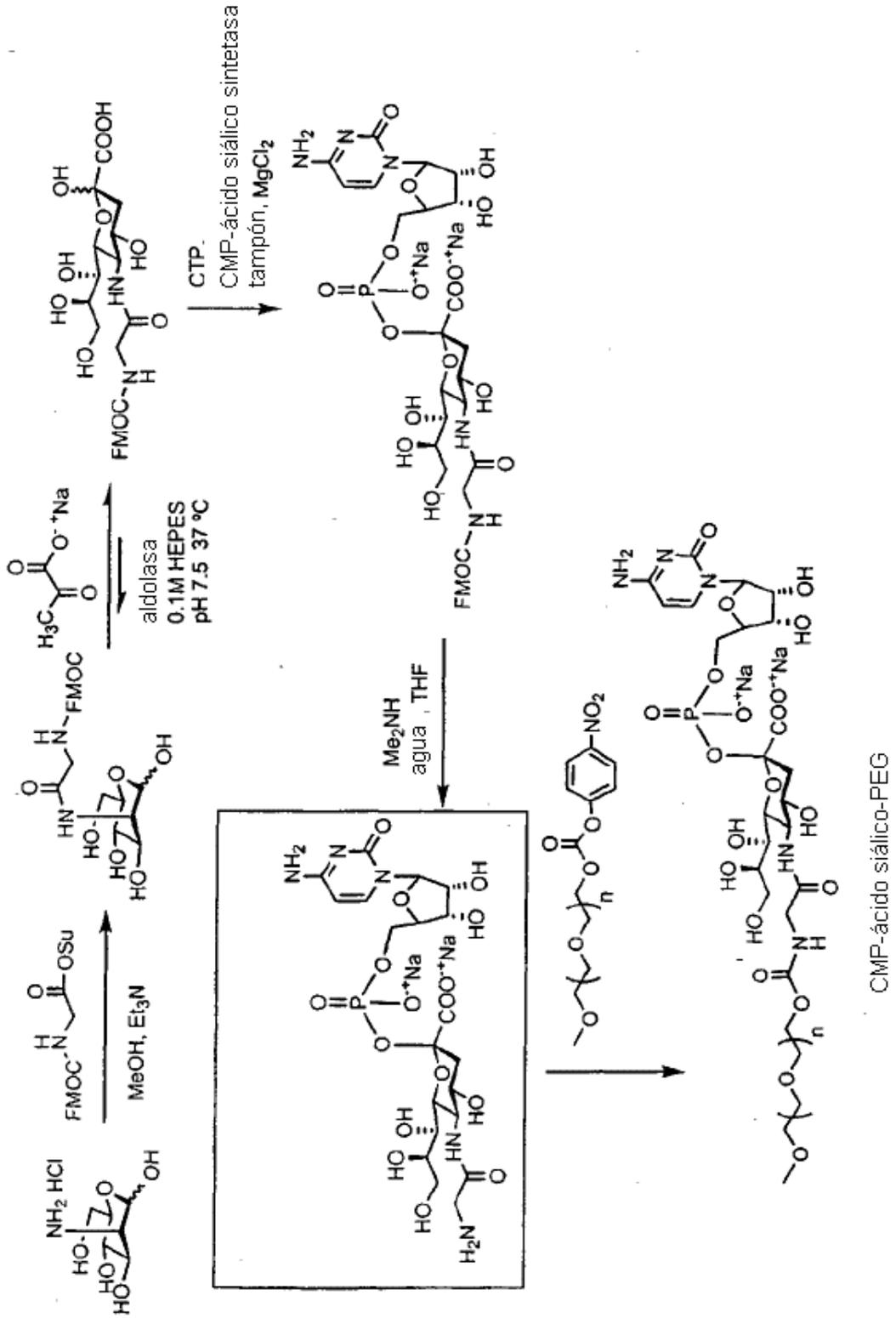


FIGURA 6

variante de 175 aminoácidos

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS
QLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFAT
TIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL
VASHLQSFLEVSyrVLRHLAQP (SEQ ID NO: 1).

variante de 174 aminoácidos

TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS
QLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTI
WQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLV
VASHLQSFLEVSyrVLRHLAQP (SEQ ID NO: 2).

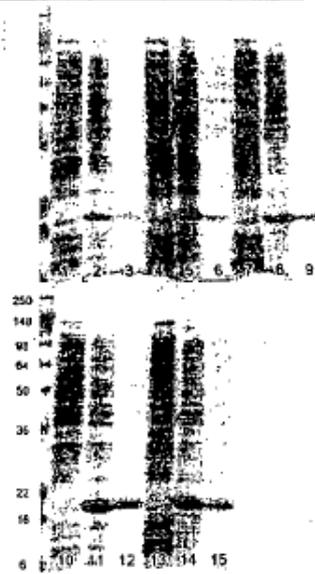
FIGURA 7

Ensayo de condiciones de cultivo - lavado de IBs

| 37°C, 1mM (final) IPTG | | | Rend IB (~0.7-1g/L) | |
|------------------------|-------|--------------------------|---------------------|-----------------------|
| | Medio | pH tamponado | Tiempo | pellet IB húmedo (mg) |
| 1. | LB | n/a | 5hr | 120 |
| 2. | TB | 7.4 (K-PO ₄) | 5hr | 230 |
| 3. | TB | 6 (MES) | 5hr | 170 |
| 4. | LB | n/a | o/n | 190 |
| 5. | TB | 7.4 (K-PO ₄) | o/n | 250 |

Muestras celulares, cargadas igualmente en ug
(mejor expresión de pernoctaciones más aparentes)

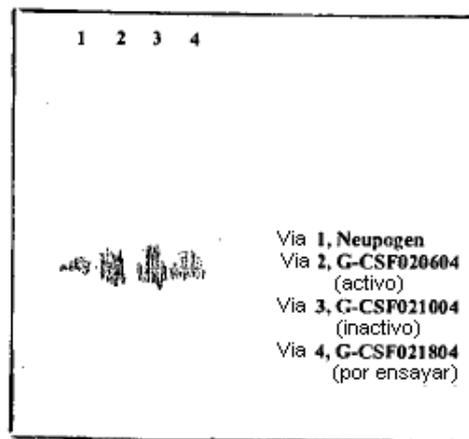
- | | |
|----------------------|----------------------|
| 1. #1 lisato supe | 10. #4 lisato supe |
| 2. #1 lisato pellet | 11. #4 lisato pellet |
| 3. #1 IB final | 12. #4 IB final |
| 4. #2 lisato. supe | 13. #5 lisato supe |
| 5. #2 lisato. pellet | 14. #5 lisato pellet |
| 6. #2 IB final | 15. #5 IB final |
| 7. #3 lisato. supe | |
| 8. #3 lisato. pellet | |
| 9. #3 IB final | |



IB purificados se muestran en las bandas 3, 6, 9, 12 y 15. Observar vías IB cargadas a aproximadamente la mitad de la cantidad de la vía precedente (en base al peso del pellet previsto).

FIGURA 8

Análisis de Western blot de G-CSF replegado
electroforesis en gel de poliacrilamida nativa



G-CSF020604 y G-CSF21004 provienen del mismo lote de reacción de replegado. La única diferencia era que G-CSF21004 se salvó de la medición de flujo de G-CSF020604 ajustando el pH y recargando en SP sefarosa. G-CSF021804 era un lote de replegado separado.

Después de SP-sefarosa, se verá únicamente una banda por tinción de Coomassie o Western.

FIGURA 9

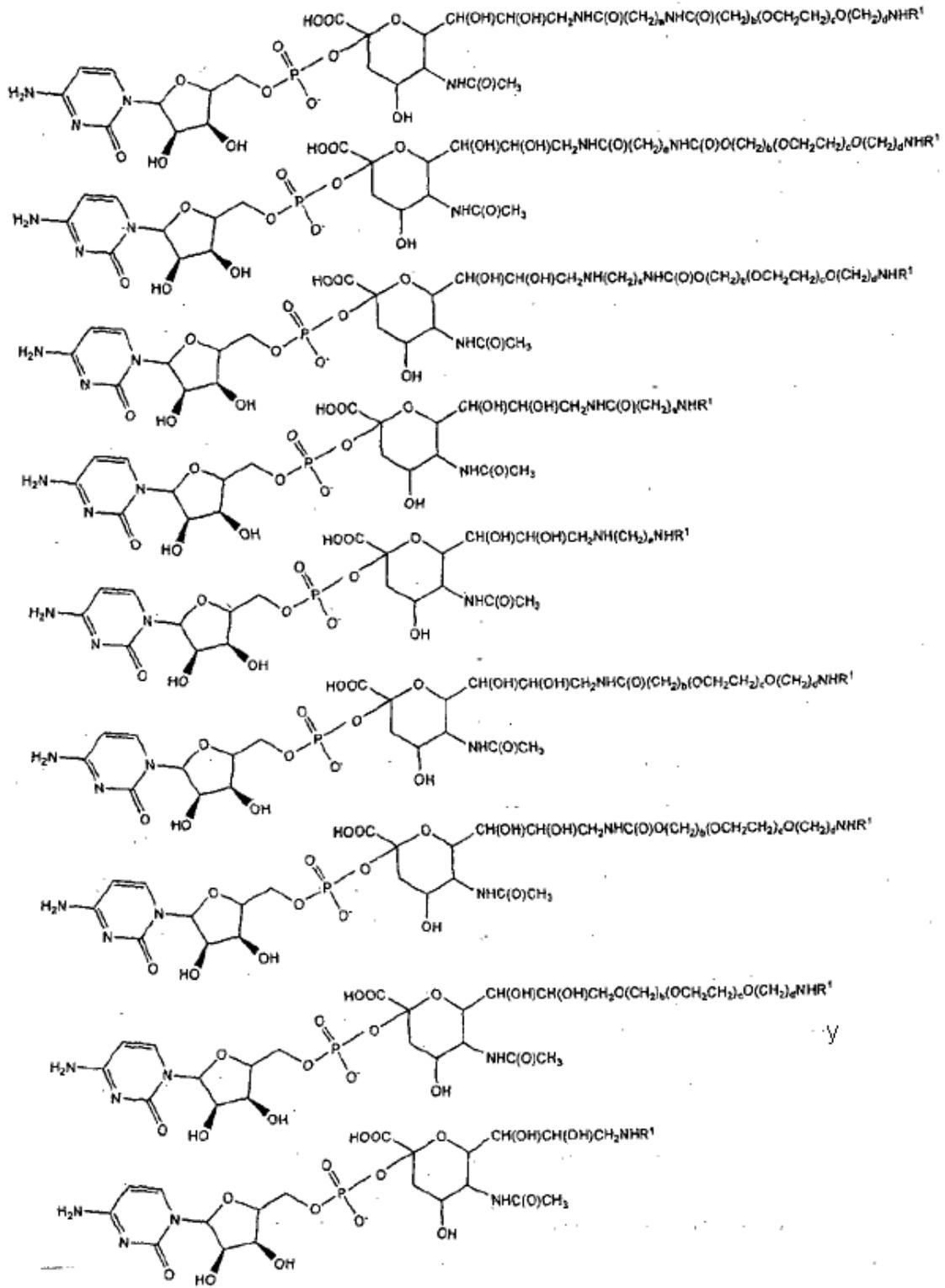


FIGURA 10

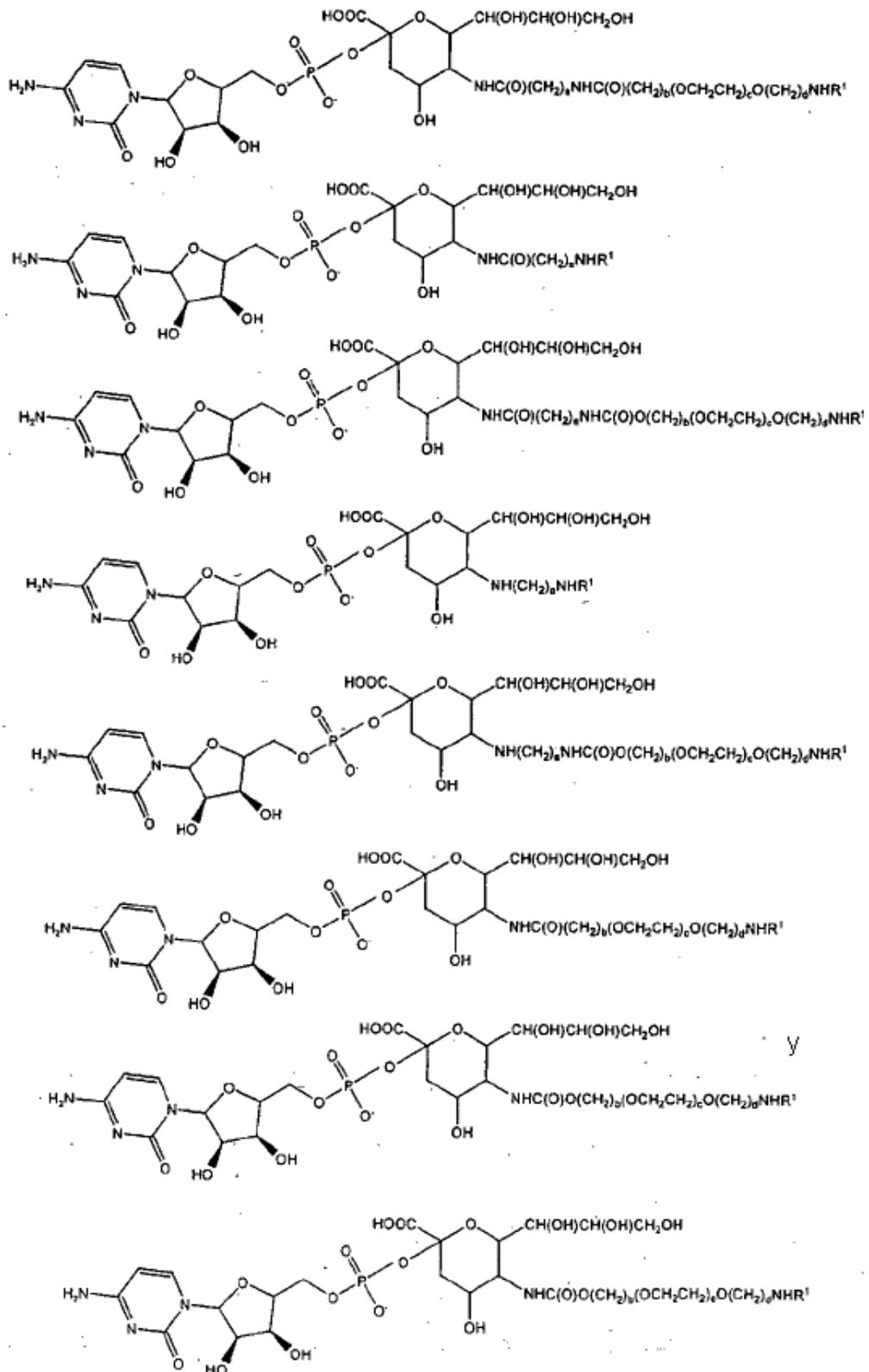


FIGURA 11A

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|--|-------------------------------|----------|---|------------------|----------|
| At1g08280 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | n.d. | AC011438 AAF18231.1 BT004583 AAG42829.1 NC_003070 NP_172305.1 | Q84W00 Q9SGD2 | |
| At1g08660/F22O13.14 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | n.d. | AC003981 AAF99778.1 AY064135 AAL36042.1 AY124807 AAM70516.1 NC_003070 NP_172342.1 NM_180609 NP_850940.1 | Q8VZJ0 Q9FRR9 | |
| At3g48820/T21J18_90 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | n.d. | AY080589 AAL85966.1 AY133816 AAM91750.1 AL132963 CAB87910.1 NM_114741 NP_199451.1 | Q8RY00 Q9M301 | |
| α -2,3- sialiltransferasa (ST3Gal-IV) | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AJ584673 CAE48298.1 | | |
| α -2,3- sialiltransferasa (ST3Gal-V) | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AJ585768 CAE51392.1 | | |
| α -2,6- sialiltransferasa (Siat7b) | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AJ620651 CAF05850.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa (SIAT8A) | <i>Bos taurus</i> | 2.4.99.8 | AJ699418 CAG27880.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa (Siat8D) | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AJ699421 CAG27883.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa ST8Six-III (Siat8C) | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AJ704563 CAG28696.1 | | |
| CMP α -2,6- sialiltransferasa (ST6Gal I) | <i>Bos taurus</i> | 2.4.99.1 | Y15111 CAA75385.1 NM_177517 NP_803483.1 | O18974 | |
| sialiltransferasa 8 (fragmento) | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AF450088 AAL47018.1 | Q8WN13 | |
| sialiltransferasa ST3Gal-II (Siat4B) | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AJ748841 CAG44450.1 | | |
| sialiltransferasa ST3Gal-III (Siat6) | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AJ748842 CAG44451.1 | | |
| sialiltransferasa ST3Gal-VI (Siat10) | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AJ748843 CAG44452.1 | | |
| ST3Gal I | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AJ305086 CAC24698.1 | Q9BEG4 | |
| ST6GalNAc-VI CDS4 | <i>Bos taurus</i> | n.d. | AJ620949 CAF06586.1 | | |
| polisialiltransferasa (PST (fragmento) ST8Sia IV) | <i>Branchiostoma floridae</i> | n.d. | AF391289 AAM18873.1 | Q8T774 | |
| polisialiltransferasa (STX (fragmento) ST8Sia II) | <i>Cercopithecus aethiops</i> | 2.4.99.- | AF210729 AAF17105.1 | Q9TT09 | |
| polisialiltransferasa (STX (fragmento) ST8Sia II) | <i>Cercopithecus aethiops</i> | 2.4.99.- | AF210318 AAF17104.1 | Q9TT10 | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4) | <i>Ciona intestinalis</i> | n.d. | AJ626815 CAF25173.1 | | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4) | <i>Ciona savignyi</i> | n.d. | AJ626814 CAF25172.1 | | |
| α -2,8- polisialiltransferasa ST8Sia IV | <i>Cricetulus griseus</i> | 2.4.99.- | -AAE28634 Z46801 CAA86822.1 | Q64690 | |
| Gal β -1,3/4- GlcNAc α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal I | <i>Cricetulus griseus</i> | n.d. | AY266675 AAP22942.1 | Q80WLD | |
| Gal β -1,3/4- GlcNAc α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal II (fragment) | <i>Cricetulus griseus</i> | n.d. | AY266676 AAP22943.1 | Q80WK9 | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ783740 CAH04017.1 | | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ783741 CAH04018.1 | | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ626821 CAF25179.1 | | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ744809 CAG32845.1 | | |

FIGURA 11B

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|---|--------------------------------|----------|--|------------------|----------|
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal-VI (Siat5-rel) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ783742 CAH04019.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I (Siat1) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ744801 CAG32837.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc-III (Siat7B) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ634459 CAG25680.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ646874 CAG26703.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ646883 CAG26712.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ715535 CAG29374.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ715543 CAG29382.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IV (Siat 8D) (fragmento) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ715545 CAG29384.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E) (fragmento) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ715546 CAG29385.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VI (Siat 8F) (fragmento) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ715551 CAG29390.1 | | |
| β -galactosamida α -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ627627 CAF29495.1 | | |
| N-glycan α -2,8-sialiltransferasa | <i>Danio rerio</i> | n.d. | BC050483 AAH50483.1 AY055462 AAL17875.1 NM_153662 NP_705948.1 | Q7ZU51 Q8QH83 | |
| ST3Gal III-rel(siat6r) | <i>Danio rerio</i> | n.d. | BC053179 AAH53179.1 AJ626820 CAF25178.1 NM_200355 NP_956649.1 | Q7T3B9 | |
| St3Gal-V | <i>Danio rerio</i> | n.d. | AJ619960 CAF04061.1 | | |
| st6GalNAc-VI | <i>Danio rerio</i> | n.d. | BC060932 AAH60932.1 AJ620947 CAF06584.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa (CG4871) ST6Gal I | <i>Drosophila melanogaster</i> | 2.4.99.1 | AE003465 AAF47256.1 AF218237 AAG13185.1 AF397532 AAK92126.1 AE003465 AAM70791.1 NM_079129 NP_523853.1 NM_166684 NP_726474.1 | Q9GU23 Q9W121 | |
| α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-VI) | <i>Gallus gallus</i> | n.d. | AJ585767 CAE51391.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I | <i>Gallus gallus</i> | 2.4.99.4 | AJ627204 CAF25503.1 X80503 CAA56666.1 NM_205217 NP_990548.1 | Q11200 | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (fragment) | <i>Gallus gallus</i> | 2.4.99.- | AF035250 AAC14163.1 | | 073724 |
| α -2,3-sialiltransferasa (ST3GAL-II) | <i>Gallus gallus</i> | n.d. | AJ585761 CAE51385.2 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa (Siat7b) | <i>Gallus gallus</i> | n.d. | AJ620653 CAF05852.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I | <i>Gallus gallus</i> | 2.4.99.1 | X75558 CAA53235.1 NM_205241 NP_990572.1 | Q92182 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I | <i>Gallus gallus</i> | 2.4.99.3 | -AAE68028.1 -AAE68029.1 X74946 CAA52902.1 NM_205240 NP_990571.1 | Q92183 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II | <i>Gallus gallus</i> | 2.4.99.- | X77775 AAE68030.1 NM_205233 CAA54813.1 NP_990564.1 | Q92184 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (SIAT7C) | <i>Gallus gallus</i> | n.d. | AJ634455 CAG25677.1 | | |

FIGURA 11C

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|--|----------------------|----------|--|--|----------|
| (fragmento) α -2,6 sialiltransferasa ST6GalNAc V (SIAT7E) | <i>Gallus gallus</i> | n.d. | AJ646877 CAG26706.1 | | |
| (fragmento) α -2,8- sialiltransferasa (GD3- sintasa), ST8Sia I | <i>Gallus gallus</i> | 2.4.99.- | U73176 AAC28888.1 | P79783 | |
| α -2,8- sialiltransferasa (SIAT8B) | <i>Gallus gallus</i> | n.d. | AJ699419 CAG27881.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa (SIAT8C) | <i>Gallus gallus</i> | n.d. | AJ699420 CAG27882.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa (SIAT8F) | <i>Gallus gallus</i> | n.d. | AJ699424 CAG27886.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa ST8Sia-V (SIAT8C) | <i>Gallus gallus</i> | n.d. | AJ704564 CAG28697.1 | | |
| β galactosamida α -2,6- sialiltransferasa II (ST6Gal II) | <i>Gallus gallus</i> | n.d. | AJ627629 CAF29497.1 | | |
| GM3 sintasa (SIAT9) | <i>Gallus gallus</i> | 2.4.99.9 | AY515255 AAS83519.1 | | |
| polisialiltransferasa ST8Sia IV | <i>Gallus gallus</i> | 2.4.99.- | AF008194 AAB95120.1 | O42399 | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal I | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.4 | L29555 AAA36612.1 AF059321 AAC17874.1 L13972 AAC37574.1 AF155238 AAD39238.1 AF186191 AAG29876.1 BC018357 AAH18357.1 NM_003033 NP_003024.1 NM_173344 NP_775479.1 | Q11201 O60677 Q9UN51 | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal II | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.4 | U63090 AAB40389.1 BC036777 AAH36777.1 X96667 CAA65447.1 NM_006927 NP_008858.1 | Q16842 O00654 | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal III (SiaT6) | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.6 | L23768 AAA35778.1 BC050380 AAH50380.1 AF425851 AAO13859.1 AF425852 AAO13860.1 AF425853 AAO13861.1 AF425854 AAO13862.1 AF425855 AAO13863.1 AF425856 AAO13864.1 AF425857 AAO13865.1 AF425858 AAO13866.1 AF425859 AAO13867.1 AF425860 AAO13868.1 AF425861 AAO13869.1 AF425862 AAO13870.1 AF425863 AAO13871.1 AF425864 AAO13872.1 AF425865 AAO13873.1 AF425866 AAO13874.1 AF425867 AAO13875.1 AY167992 AAO38806.1 AY167993 AAO38807.1 AY167994 AAO38808.1 AY167995 AAO38809.1 AY167996 AAO38810.1 AY167997 AAO38811.1 AY167998 AAO38812.1 NM_006279 NP_006270.1 NM_174964 NP_777624.1 NM_174965 NP_777625.1 NM_174966 NP_777626.1 NM_174967 NP_777627.1 NM_174969 NP_777629.1 NM_174970 NP_777630.1 NM_174972 NP_777632.1 | Q11203 Q86UR6 Q86UR7 Q86UR8 Q86UR9 Q86US0 Q86US1 Q86US2 Q8IX43 Q8IX44 Q8IX45 Q8IX46 Q8IX47 Q8IX48 Q8IX49 Q8IX50 Q8IX51 Q8IX52 Q8IX53 Q8IX54 Q8IX55 Q8IX56 Q8IX57 Q8IX58 | |

FIGURA 11D

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|---|---------------------|----------|--|---------------------|----------|
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.- | L23767 AAA16460.1 | Q11206 | |
| | | | AF035249 AAC14162.1 | O60497 | |
| | | | BC010645 AAH10645.1 | Q96QQ9 | |
| | | | AY040826 AAK93790.1 | Q8N6A6 | |
| | | | AF516602 AAM66431.1 | Q8N6A7 | |
| | | | AF516603 AAM66432.1 | Q8NFD3 | |
| | | | AF516604 AAM66433.1 | Q8NFG7 | |
| | | | AF525084 AAM81378.1 | | |
| | | | X74570 CAA52662.1 | | |
| | | | CR456858 CAG33139.1 | | |
| | | | NM_006278 NP_006269.1 | | |
| | | | NM_006100 NP_006091.1 | | |
| | | | α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.4 |
| BC023312 AAH23312.1 | | | | | |
| AB022918 BAA77609.1 | | | | | |
| AX877828 CAE89895.1 | | | | | |
| AX886023 CAF00161.1 | | | | | |
| α -2,6-sialiltransferasa (ST6Gal II ; KIAA1877) | <i>Homo sapiens</i> | n.d. | BC008680 AAH08680.1 | Q86Y44 | |
| | | | AB058780 BAB47506.1 | Q8IUG7 | |
| | | | AB059555 BAC24793.1 | Q96HE4 | |
| | | | AJ512141 CAD54408.1 | Q96JF0 | |
| | | | AX795193 CAE48260.1 | | |
| | | | AX795193 CAE48261.1 | | |
| | | | NM_032528 NP_115917.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa (ST6GALNAC III) | <i>Homo sapiens</i> | n.d. | BC059363 AAH59363.1 | Q8N259 | |
| | | | AY358540 AAQ88904.1 | Q8NDV1 | |
| | | | AK091215 BAC03611.1 | | |
| | | | AJ507291 CAD45371.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc V) | <i>Homo sapiens</i> | n.d. | NM_152996 NP_694541.1 | | |
| | | | BC001201 AAH01201.1 | Q9BVH7 | |
| | | | AK056241 BAB71127.1 | | |
| | | | AL035409 CAB72344.1 | | |
| | | | AJ507292 CAD45372.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc II) | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.- | NM_030965 NP_112227.1 | | |
| | | | U14550 AAA52228.1 | Q9UJ37 | |
| | | | BC040455 AAH40455.1 | Q12971 | |
| | | | AJ251053 CAB61434.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.1 | NM_006456 NP_006447.1 | | |
| | | | BC031476 AAH31476.1 | P15907 | |
| | | | BC040009 AAH40009.1 | | |
| | | | A17362 CAA01327.1 | | |
| | | | A23699 CAA01686.1 | | |
| | | | X17247 CAA35111.1 | | |
| | | | X54363 CAA38246.1 | | |
| | | | X62822 CAA44634.1 | | |
| | | | NM_003032 NP_003023.1 | | |
| | | | NM_173216 NP_775323.1 | | |
| | | | NM_022462 AAH22462.1 | Q8TBJ6 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.3 | AY096001 AAM22800.1 | Q9NSC7 | |
| | | | AY358918 AAQ89277.1 | Q9NXQ7 | |
| | | | AK000113 BAA90953.1 | | |
| | | | AY11339 CAA72179.2 | | |
| | | | NM_018414 NP_060884.1 | | |
| α -2,8- polisialiltransferasa ST8Sia IV | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.- | L41680 AAC41775.1 | Q8N1F4 | |
| | | | BC027866 AAH27866.1 | Q92187 | |
| | | | BC053657 AAH53657.1 | Q92693 | |
| | | | NM_005668 NP_005659.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.8 | L32867 AAA62366.1 | Q86X71 | |
| | | | L43494 AAC37586.1 | Q92185 | |
| | | | BC046158 AAH46158.1 | Q93064 | |
| | | | AAQ53140.1 | | |
| | | | AY569975 AAS75783.1 | | |
| | | | D26360 BAA05391.1 | | |
| | | | X77922 CAA54891.1 | | |
| NM_003034 NP_003025.1 | | | | | |
| α -2,8 sialiltransferasa | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.- | L29556 AAA36613.1 | Q92186 | |

FIGURA 11F

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|---|---------------------------------|----------|--|--|----------|
| ST8Sia II | | | U82762 AAB51242.1 U33551 AAC24458.1 BC069584 AAH69584.1 NM_006011 NP_006002.1 | Q92470 Q92746 | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.- | AF004668 AAB87842.1 AF003092 AAC15901.2 NM_015879 NP_056963.1 | Q43173 Q9NS41 | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.- | U91641 AAC51727.1 CR457037 CAG33318.1 NM_013305 NP_037437.1 | O15466 | |
| ENSP00000020221 (fragmento) | | n.d. | AC023295 | | |
| lactosilceramida α -2,3- sialiltransferasa (ST3Gal V) | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.9 | AF105026 AAD14634.1 AF119415 AAF66146.1 BC065936 AAH65936.1 AY152815 AAO16866.1 AAP65066 AAP65066.1 AY359105 AAQ89463.1 AB018356 BAA33950.1 AX876536 CAE89320.1 NM_003896 NP_003887.2 | Q9UNP4 O94902 | |
| N-acetilgalactosamida α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc VI) | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.- | BC006564 AAH06564.1 BC007802 AAH07802.1 BC016299 AAH16299.1 AY356672 AAQ89035.1 AB035173 BAA87035.1 AK023900 BAB14715.1 AJ507293 CAD45373.1 AX880950 CAE91135.1 CR457318 CAG33599.1 NM_013443 NP_038471.2 | Q969X2 Q9H8A2 Q9ULB8 | |
| N-acetilgalactosamida α -2,6-sialiltransferasa IV (ST6GalNAc IV) | <i>Homo sapiens</i> | 2.4.99.- | AF127142 AAF00102.1 BC036705 AAH36705.1 -AAP63349.1 AB035172 BAA87034.1 AK000600 BAA91281.1 Y17461 CAB44354.1 AJ271734 CAC07404.1 AX061620 CAC24981.1 AX068265 CAC27250.1 AX969252 CAF14360.1 NM_014403 NP_055218.3 NM_175039 NP_778204.1 | Q9H4F1 Q9NWU6 Q9UKU1 Q9ULB9 Q9Y3G3 Q9Y3G4 | |
| ST8SIA-VI (fragmento) | <i>Homo sapiens</i> | n.d. | AJ621583 CAF21722.1 XM_291725 XP_291725.2 | | |
| producto proteínico sin nombre | <i>Homo sapiens</i> | n.d. | AK021929 BAB13940.1 AX881696 CAE91353.1 | Q9HAA9 | |
| Gal β 1,3/4-GlcNAc α - 2,3-sialiltransferasa (ST3Gal III) | <i>Mesocricetus auratus</i> | 2.4.99.6 | AJ245699 CAB53394.1 | Q9QXF6 | |

FIGURA 11F

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|---|---------------------------------------|----------|--|--|----------|
| Gal β -1,3/4-GlcNAc α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal IV) | <i>Mesocricetus auratus</i> | 2.4.99.6 | AJ245700 CAB53395.1 | Q9QXF5 | |
| GD3 sintasa: (fragmento) | <i>Mesocricetus auratus</i> | n.d. | AF141657 AAD33879.1 | Q9WUL1 | |
| ST8Sia I polisialiltransferasa (ST8Sia IV) | <i>Mesocricetus auratus</i> | 2.4.99.- | AJ245701 CAB53396.1 | Q9QXF4 | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I | <i>St3gal1</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.4 | AF214028 AAF60973.1 AK031344 BAC27356.1 AK078469 BAC37290.1 X73523 CAA51919.1 NM_009177 NP_033203.1 | P54751 Q11202 Q9JL30 | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II | <i>St3gal2</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.4 | BC015264 AAH15264.1 BC066064 AAH66064.1 AK034554 BAC28752.1 AK034863 BAC28859.1 AK053827 BAC35543.1 X76989 CAA54294.1 NM_009179 NP_033205.1 NM_178048 NP_835149.1 | Q11204 Q8BPL0 Q8BSA0 Q8BSE9 Q91WH6 | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III | <i>St3gal3</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.- | BC006710 AAH06710.1 AK005053 BAB23779.1 AK013016 BAB28598.1 X84234 CAA59013.1 NM_009176 NP_033202.2 | P97325 Q922X5 Q9CZ48 Q9DBB6 | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV | <i>St3gal4</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.4 | BC011121 AAH11121.1 BC050773 AAH50773.1 D28941 BAA06068.1 AK008543 BAB25732.1 AB061305 BAB47508.1 X95809 CAA65076.1 NM_009178 NP_033204.2 | P97354 Q61325 Q91Y74 Q921R5 Q9CVE8 | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI | <i>St3gal6</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.4 | AF119390 AAD39130.1 BC052338 AAH52338.1 AB063326 BAB79494.1 AK033562 BAC28360.1 AK041173 BAC30851.1 NM_018784 NP_061254 | Q80UR7 Q8BLV1 Q8VIB3 Q9WVG2 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II | <i>St6galnac2</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.- | NM_0091806677963 BC010208 AAH10208.1 AB027198 BAB00637.1 AK004613 BAB23410.1 X93999 CAA63821.1 X94000 CAA63822.1 NM_009180 NP_033206.2 | P70277 Q9DC24 Q9JJM5 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I | <i>St6gal1</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.1 | AF119390 AAD39130.1 BC027833 AAH27833.1 D16106 BAA03680.1 AK034768 BAC28828.1 AK084124 BAC39120.1 NM_145933 NP_1666045.1 | Q64685 Q8BM62 Q8K1L1 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal II | <i>St6gal2</i> <i>Mus musculus</i> | n.d. | AK082566 BAC38534.1 AB095093 BAC87752.1 AK129462 BAC98272.1 NM_172829 NP_766417.1 | Q8BUU4 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I | <i>St6galnac1</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.3 | Y11274 CAA72137.1 NM_011371 NP_035501.1 | Q9QZ39 Q9JJP5 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III | <i>St6galnac3</i> <i>Mus musculus</i> | n.d. | BC058387 AAH58387.1 AK034804 BAC28836.1 Y11342 CAA72181.2 Y11343 CAB95031.1 NM_011372 NP_035502 | Q9WUV2 Q9JHP5 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV | <i>St6galnac4</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.7 | BC056451 AAH56451.1 AK085730 BAC39523.1 AJ007310 CAA07446.1 Y15779 CAB43507.1 | Q8C3J2 Q9JHP2 Q9R2B6 Q88725 | |

FIGURA 11G

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|--|---------------------------------------|----------|-----------------------|-----------|----------|
| α-2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I | <i>St8sia1</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.8 | Y15780 CAB43514.1 | Q9JHP0 | |
| | | | Y19055 CAB93946.1 | Q9QUP9 | |
| | | | Y19057 CAB93948.1 | Q9R2B5 | |
| | | | NM_011373 NP_035503.1 | | |
| | | | L38677 AAA91869.1 | Q64468 | |
| | | | BC024821 AAH24821.1 | Q64687 | |
| | | | AK046188 BAC32625.1 | Q8BL76 | |
| | | | AK052444 BAC34994.1 | Q8BW10 | |
| | | | X84235 CAA59014.1 | Q8K1C1 | |
| | | | AJ401102 CAC20706.1 | Q9EPK0 | |
| α-2,8-sialiltransferasa (ST8Sia VI) | <i>St8sia6</i> <i>Mus musculus</i> | n.d. | NM_011374 NP_035504.1 | | |
| | | | AB059554 BAC01265.1 | Q8BI43 | |
| | | | AK085105 BAC39367.1 | Q8K4T1 | |
| α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia II | <i>St8sia2</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.- | NM_145838 NP_665837.1 | | |
| | | | X83562 CAA58548.1 | Q35696 | |
| | | | X99646 CAA67965.1 | | |
| | | | X99647 CAA67965.1 | | |
| | | | X99648 CAA67965.1 | | |
| | | | X99649 CAA67965.1 | | |
| | | | X99650 CAA67965.1 | | |
| | | | X99651 CAA67965.1 | | |
| | | | NM_009181 NP_033207.1 | | |
| | | | BC060112 AAH60112.1 | Q64692 | |
| α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia IV | <i>St8sia4</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.8 | AK003690 BAB2294.1 | Q8BY70 | |
| | | | AK041723 BAC31044.1 | | |
| | | | AJ223956 CAA11685.1 | | |
| | | | X86000 CAA59992.1 | | |
| | | | Y09484 CAA70692.1 | | |
| | | | NM_009183 NP_033209.1 | | |
| α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia V | <i>St8sia5</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.- | BC034855 AAH34855.1 | P70126 | |
| | | | AK078670 BAC37354.1 | P70127 | |
| | | | X98014 CAA66642.1 | P70128 | |
| | | | X98014 CAA66643.1 | Q8BJW0 | |
| | | | X98014 CAA66644.1 | Q8JZQ3 | |
| | | | NM_013666 NP_038694.1 | | |
| | | | NM_153124 NP_694764.1 | | |
| | | | NM_177416 NP_803135.1 | | |
| α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia III | <i>St8sia3</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.- | BC075645 AAH75645.1 | Q64689 | |
| | | | AK015874 BAB30012.1 | Q9CUJ6 | |
| | | | X80502 CAA56665.1 | | |
| | | | NM_009182 NP_033208.1 | | |
| GD1 sintasa (ST6GalNAc V) | <i>St6galnac5</i> <i>Mus musculus</i> | n.d. | BC055737 AAH55737.1 | Q8CAM7 | |
| | | | AB030836 BAA85747.1 | Q8CBX1 | |
| | | | AB028840 BAA89292.1 | Q9QYJ1 | |
| | | | AK034387 BAC28693.1 | Q9R0K6 | |
| | | | AK038434 BAC29997.1 | | |
| | | | AK042683 BAC31331.1 | | |
| | | | NM_012028 NP_036158.2 | | |
| | | | AF119416 AAF66147.1 | Q88829 | |
| GM3 sintasa (α-2,3-sialiltransferasa) ST3Gal V | <i>St3gal5</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.9 | AAP65063.1 | Q9CZ65 | |
| | | | AB018048 BAA33491.1 | Q9QWF9 | |
| | | | AB013302 BAA76467.1 | | |
| | | | AK012961 BAB2857.1 | | |
| | | | Y15003 CAA75235.1 | | |
| | | | NM_011375 NP_035505.1 | | |
| | | | BC036985 AAH36985.1 | Q8CDC3 | |
| N-acetilgalactosamida α-2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc VI) | <i>St6galnac6</i> <i>Mus musculus</i> | 2.4.99.- | AB035174 BAA87036.1 | Q8JZW3 | |
| | | | AB035123 BAA95940.1 | Q9JM95 | |
| | | | AK030648 BAC27064.1 | Q9R0G9 | |
| | | | NM_016973 NP_058669.1 | | |
| | | | U46578 AAD00069.1 | | |
| M138L | <i>Myxoma virus</i> | n.d. | AF170726 AAE61323.1 | | |
| | | | NC_001132 AAE61326.1 | | |
| | | | AAF15026.1 | | |
| α-2,3-sialiltransferasa | <i>Oncorhynchus</i> | n.d. | NP_051852.1 | | |
| | | | AJ585760 CAE51384.1 | | |

FIGURA 11H

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|---|---|----------|--|-----------|----------|
| (St3Gal-I) α -2,6- sialiltransferasa (Siat1) | <i>mykiss</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> | n.d. | AJ620649 CAF058485.1 | | |
| α -2,8- polisialiltransferasa IV (ST8Sia IV) | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | n.d. | AB094402 BAC77411.1 | Q7T2X5 | |
| GalNAc α -2,6- sialiltransferasa (RtST6GalNAc) | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | n.d. | AB097943 BAC77520.1 | Q7T2X4 | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal IV OJ1217_F02.7 | <i>Oryctolagus cuniculus</i> <i>Oryza sativa</i> (<i>japonica cultivar-group</i>) | 2.4.99.- | AF121967 AAF28871.1 | Q9N257 | |
| OSJNBa0043L24.2 c OSJNBb0002J11.9 | <i>Oryza sativa</i> (<i>japonica cultivar-group</i>) | n.d. | AL731626 CAD41185.1 AL662969 CAE04714.1 | | |
| P0683f02.18 c P0489B03.1 | <i>Oryza sativa</i> (<i>japonica cultivar-group</i>) | n.d. | AP003289 BAB63715.1 AP003794 BAB90552.1 | | |
| α -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento) | <i>Oryzias latipes</i> | n.d. | AJ646876 CAG26705.1 | | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ744803 CAG32839.1 | | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ744804 CAG32840.1 | | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ626819 CAG25177.1 | | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ626824 CAG25182.1 | | |
| α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal VI (Siat10) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ744808 CAG32844.1 | | |
| α -2,6- sialiltransferasa (Sia7A) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ748740 CAG38615.1 | | |
| α -2,6- sialiltransferasa (Sia7B) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ748741 CAG38616.1 | | |
| α -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc III (Siat7C) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ634454 CAG25676.1 | | |
| α -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragmento) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ646870 CAG26699.1 | | |
| α -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ646875 CAG26704.1 | | |
| α -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ646882 CAG26711.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa 8A (Siat8A) | <i>Pan troglodytes</i> | 2.4.99.8 | AJ697658 CAG26896.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa 8B (Siat8B) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ697659 CAG26897.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa 8C (Siat8C) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ697660 CAG26898.1 | | |
| α -2,8- 8D (Siat8D) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ697661 CAG26899.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa 8E (Siat8E) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ697662 CAG26900.1 | | |
| α -2,8- sialiltransferasa 8F (Siat8F) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ697663 CAG26901.1 | | |
| β -galactosamida α -2,6- sialiltransferasa I (ST6Gal I; Siat1) | <i>Pan troglodytes</i> | 2.4.99.1 | AJ627624 CAG29492.1 | | |
| β -galactosamida α -2,6- sialiltransferasa II (ST6Gal II) | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ627625 CAG29493.1 | | |
| GM3- sintasa: ST3Gal V | <i>Pan troglodytes</i> | n.d. | AJ744807 CAG32843.1 | | |

FIGURA 111

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|---------------------------------------|--------------------------------------|----------|-----------------------|-----------|----------|
| (Siat9) | | | | | |
| S138 | <i>Rabbit fibroma virus</i> | n.d. | NC_001266 NP_052025 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | 2.4.99.6 | M97754 AAA42146.1 | Q02734 | |
| ST3Gal III | | | NM_031697 NP_113885.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AJ626825 CAF25183.1 | | |
| ST3Gal IV (Siat4c) | | | | | |
| α -2,3-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AJ626743 CAF25053.1 | | |
| ST3Gal VI | | | | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | 2.4.99.- | X76988 CAA54293.1 | Q11205 | |
| ST3Gal II | | | NM_031695 NP_113883.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | 2.4.99.1 | M18769 AAA41196.1 | P13721 | |
| ST6Gal I | | | M83143 AAB07233.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AJ634458 CAG25684.1 | | |
| ST6GalNAc I (Siat7A) | | | | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AJ634457 CAG25679.1 | | |
| ST6GalNAc II (Siat7B) | | | | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | 2.4.99.- | L29554 AAC42086.1 | Q64686 | |
| ST6GalNAc III | | | BC072501 AAH72501.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | NM_019123 NP_061996.1 | | |
| ST6GalNAc IV (Siat7D) | | | AJ646871 CAG26700.1 | | |
| (fragmento) | | | | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AJ646872 CAG26701.1 | | |
| ST6GalNAc V (Siat7E) | | | | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AJ646881 CAG26710.1 | | |
| ST6GalNAc VI (Siat7F) | | | | | |
| (fragmento) | | | | | |
| α -2,8-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | 2.4.99.- | U53883 AAC27541.1 | P70554 | |
| (GD3 sintasa) ST8Sia I | | | D45255 BAA08213.1 | P97713 | |
| α -2,8-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AJ699422 CAG27884.1 | | |
| (SIAT8c) | | | | | |
| α -2,8-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AJ699423 CAG27885.1 | | |
| (SIAT8f) | | | | | |
| α -2,8-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | 2.4.99.- | L13445 AAA42147.1 | Q07977 | |
| ST8Sia II | | | NM_057156 NP_476497.1 | Q64688 | |
| α -2,8-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | 2.4.99.- | U55938 AAB50061.1 | P97877 | |
| ST8Sia III | | | NM_013029 NP_037161.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa | <i>Rattus norvegicus</i> | 2.4.99.- | U90215 AAB49989.1 | O08563 | |
| ST8Sia IV | | | | | |
| β -galactosamid α -2,6- | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AJ627626 CAF29494.1 | | |
| sialiltransferasa II | | | | | |
| (ST6Gal II) | | | | | |
| GM3 sintasa ST3Gal V | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AB018049 BAA33492.1 | O88830 | |
| | | | NM_031337 NP_112627.1 | | |
| sialiltransferasa ST3Gal- | <i>Rattus norvegicus</i> | n.d. | AJ748840 CAG44449.1 | | |
| I (Siat4A) | | | | | |
| α -2,3-sialiltransferasa | <i>Silurana tropicalis</i> | n.d. | AJ585763 CAE51387.1 | | |
| (St3Gal-II) | | | | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Silurana tropicalis</i> | n.d. | AJ620650 CAF05849.1 | | |
| (Siat7b) | | | | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | n.d. | AJ699425 CAG27887.1 | | |
| (St6galnac) | | | | | |
| α -2,3-sialiltransferasa | <i>Sus scrofa</i> | n.d. | AJ585765 CAE51389.1 | | |
| (ST3GAL-III) | | | | | |
| α -2,3-sialiltransferasa | <i>Sus scrofa</i> | n.d. | AJ584674 CAE48299.1 | | |
| (ST3GAL-IV) | | | | | |
| α -2,3-sialiltransferasa | <i>Sus scrofa</i> | 2.4.99.4 | M97753 AAA31125.1 | Q02745 | |
| ST3Gal I | | | | | |
| α -2,6-sialiltransferasa | <i>Sus scrofa</i> | 2.4.99.1 | AF136746 AAD33059.1 | Q9XSG8 | |
| (fragmento) ST6Gal I | | | | | |
| β -galactosamida α -2,6- | <i>Sus scrofa</i> | n.d. | AJ620948 CAF06585.2 | | |
| sialiltransferasa | | | | | |
| (ST6GalNAc-V) | | | | | |
| sialiltransferasa | <i>sus scrofa</i> | n.d. | AF041031 AAC15633.1 | O62717 | |
| (fragmento) ST6Gal I | | | | | |

FIGURA 11J

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|--|------------------------------|----------|--|-----------|----------|
| ST6GalNAc-V | <i>Sus scrofa</i> | n.d. | AJ620948 CAG065853.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (Siat5-r) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ744805 CAG32841.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ626816 CAG251765.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5) (fragmento) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ626817 CAG25175.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ626818 CAG251765.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I (Siat1) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ744800 CAG32836.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ634460 CAG25681.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II B (Siat7B-rel) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ634461 CAG25682.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (Siat7C) (fragmento) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ634456 CAG25678.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragmento) | <i>Takifugu rubripes</i> | 2.4.99.3 | Y17466 CAB44338.1 AJ646889 CAG26698.1 | Q9W6U6 | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ646873 CAG26702.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ646880 CAG26709.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ715534 CAG29373.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II (Siat 8B) (fragmento) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ715538 CAG29377.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ715541 CAG29380.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IIIr (Siat 8Cr) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ715542 CAG29381.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E) (fragmento) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ715547 CAG29386.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VI (Siat 8F) (fragmento) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ715549 CAG29388.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VIr (Siat 8Fr) | <i>Takifugu rubripes</i> | n.d. | AJ715550 CAG29389.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (Siat5-r) | <i>Tetraodon nigrovindis</i> | n.d. | AJ744806 CAG32842.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4) | <i>Tetraodon nigrovindis</i> | n.d. | AJ744802 CAG32838.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6) | <i>Tetraodon nigrovindis</i> | n.d. | AJ626822 CAG25180.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B) | <i>Tetraodon nigrovindis</i> | n.d. | AJ634462 CAG25683.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento) | <i>Tetraodon nigrovindis</i> | n.d. | AJ646879 CAG26708.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento) | <i>Tetraodon nigrovindis</i> | n.d. | AJ715536 CAG29375.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II (Siat 8B) (fragmento) | <i>Tetraodon nigrovindis</i> | n.d. | AJ715537 CAG29376.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa | <i>Tetraodon</i> | n.d. | AJ715539 CAG29378.1 | | |

FIGURA 11K

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|--|-------------------------------------|----------|---|------------------|----------|
| ST8Sial II (Siat8C) (fragmento) | <i>nigroviridis</i> | | | | |
| α -2,8-sialiltransferasa | <i>Tetraodon</i> | n.d. | AJ715540 CAG29379.1 | | |
| ST8Sia IIIr (Siat8Cr) (fragmento) | <i>nigroviridis</i> | | | | |
| α -2,8-sialiltransferasa | <i>Tetraodon</i> | n.d. | AJ715548 CAG29387.1 | | |
| ST8Sia V (Siat8E) (fragmento) | <i>nigroviridis</i> | | | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (St3Gal-II) | <i>Xenopus laevis</i> | n.d. | AJ585762 CAE51386.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (St3Gal-VI) | <i>Xenopus laevis</i> | n.d. | AJ585766 CAE51390.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa St3Gal-III (Siat6) | <i>Xenopus laevis</i> | n.d. | AJ585764 CAE51388.1 AJ626823 CAF25181.1 | | |
| α -2,8-polisialiltransferasa | <i>Xenopus laevis</i> | 2.4.99.- | AB007468 BAA32617.1 | O93234 | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia-I (Siat8A; GD3 sintasa) | <i>Xenopus laevis</i> | n.d. | AY272056 AAQ16162.1 AY272057 AAQ16163.1 AJ704562 CAG28695.1 | | |
| desconocido (proteína para MGC:81265) | <i>Xenopus laevis</i> | n.d. | BC068760 AAH68760.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (3Gal-VI) | <i>Xenopus tropicalis</i> | n.d. | AJ626744 CAF25054.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (Siat4c) | <i>Xenopus tropicalis</i> | n.d. | AJ622908 CAF22058.1 | | |
| α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento) | <i>Xenopus tropicalis</i> | n.d. | AJ646878 CAG26707.1 | | |
| α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat8C) (fragmento) | <i>Xenopus tropicalis</i> | n.d. | AJ715544 CAG29383.1 | | |
| β galactosamida α -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II) sialiltransferasa St8Sial | <i>Xenopus tropicalis</i> | n.d. | AJ627628 CAF29496.1 AY652775 AAT67042 | | |
| poli- α -2,8-sialosil sialiltransferasa (NeuS) | <i>Escherichia coli K1</i> | 2.4.-.- | M76370 AAA24213.1 X60598 CAA43053.1 | Q57269 | |
| polisialiltransferasa' | <i>Escherichia coli K92</i> | 2.4.-.- | M88479 AAA24215.1 | Q47404 | |
| α -2,8 polisialiltransferasa SiaD | <i>Neisseria meningitidis B1940</i> | 2.4.-.- | M95053 AAA20478.1 X78068 CAA54985.1 | Q51281 Q51145 | |
| SynE | <i>Neisseria meningitidis FAM18</i> | n.d. | U75650 AAB53842.1 | O06435 | |
| polisialiltransferasa (SiaD) (fragmento) | <i>Neisseria meningitidis M1019</i> | n.d. | AY234192 AAO85290.1 | | |
| SiaD (fragmento) | <i>Neisseria meningitidis M209</i> | n.d. | AY281046 AAP34769.1 | | |
| SiaD (fragmento) | <i>Neisseria meningitidis M3045</i> | n.d. | AY281044 AAP34767.1 | | |
| polisialiltransferasa (SiaD) (fragmento) | <i>Neisseria meningitidis M3315</i> | n.d. | AY234191 AAO85289.1 | | |
| SiaD (fragmento) | <i>Neisseria meningitidis M3515</i> | n.d. | AY281047 AAP34770.1 | | |
| polisialiltransferasa (SiaD) (fragmento) | <i>Neisseria meningitidis M4211</i> | n.d. | AY234190 AAO85288.1 | | |
| SiaD (fragmento) | <i>Neisseria meningitidis M4642</i> | n.d. | AY281048 AAP34771.1 | | |
| polisialiltransferasa (SiaD) (fragmento) | <i>Neisseria meningitidis M5177</i> | n.d. | AY234193 AAO85291.1 | | |
| SiaD (fragmento) | <i>Neisseria meningitidis M5178</i> | n.d. | AY281043 AAP34766.1 | | |
| SiaD (fragmento) | <i>Neisseria meningitidis M980</i> | n.d. | AY281045 AAP34768.1 | | |
| NMB0067 | <i>Neisseria meningitidis MC58</i> | n.d. | NC_003112 NP_273131 | | |

FIGURA 11L

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|---|---|----------|---|-----------|----------|
| Lst | <i>Aeromonas punctata</i> Sch3 | n.d. | AF126256 AAS66624.1 | | |
| ORF2 | <i>Haemophilus influenzae</i> A2 | n.d. | M94855 AAA24979.1 | | |
| HI1699 | <i>Haemophilus influenzae</i> Rd | n.d. | U32842 AAC23345.1 NC_000907.NP_43984.1 | Q48211 | |
| α -2,3-sialiltransferasa | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> F62 | 2.4.99.4 | U60664 AAC44539.1 AAE67205.1 | P72074 | |
| α -2,3-sialiltransferasa | <i>Neisseria meningitidis</i> 126E, NRCC 4010 | 2.4.99.4 | U60662 AAC44544.2 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa | <i>Neisseria meningitidis</i> 406Y, NRCC 4030 | 2.4.99.4 | U60661 AAC44543.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (NMB0922) | <i>Neisseria meningitidis</i> MC56 | 2.4.99.4 | U60660 AAC44541.1 AE002443 AAF41330.1 NC_003112 NP_273962.1 | P72097 | |
| NMA1118 | <i>Neisseria meningitidis</i> Z2491 | n.d. | AL162755 CAB84380.1 NC_003116 NP_283887.1 | Q9JUV5 | |
| PM0508 | <i>Pasteurella multocida</i> PM70 | n.d. | AE006086 AAK02592.1 NC_002663 NP_245445.1 | Q9CNC4 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARB25 | n.d. | AF519787 AAM82550.1 | Q8KS93 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARB3 | n.d. | AF519788 AAM82551.1 | Q8KS92 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARB39 | n.d. | AF519789 AAM82552.1 | | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARB53 | n.d. | AF519790 AAM82553.1 | | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARB57 | n.d. | AF519791 AAM82554.1 | Q8KS91 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARB71 | n.d. | AF519793 AAM82556.1 | Q8KS89 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARB8 | n.d. | AF519792 AAM82555.1 | Q8KS90 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARC10V | n.d. | AF519779 AAM88840.1 | Q8KS99 | |
| WaaH (fragmento) | <i>Salmonella enterica</i> SARC12 | n.d. | AF519781 AAM88842.1 | | |
| WaaH (fragmento) | <i>Salmonella enterica</i> SARC13I | n.d. | AF519782 AAM88843.1 | Q8KS98 | |
| WaaH (fragmento) | <i>Salmonella enterica</i> SARC14I | n.d. | AF519783 AAM88844.1 | Q8KS97 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARC15II | n.d. | AF519784 AAM88845.1 | Q8KS96 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARC16II | n.d. | AF519785 AAM88846.1 | Q8KS95 | |

FIGURA 11M

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|---|---|----------|---|----------------|----------|
| WaaH (fragmento) | <i>Salmonella enterica</i> SARC3I | n.d. | AF519772 AAM88834.1 | Q8KSA4 | |
| WaaH (fragmento) | <i>Salmonella enterica</i> SARC4I | n.d. | AF519773 AAM88835.1 | Q8KSA3 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARC5IIa | n.d. | AF519774 AAM88836.1 | | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARC6IIa | n.d. | AF519775 AAM88837.1 | Q8KSA2 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARC8 | n.d. | AF519777 AAM88838.1 | Q8KSA1 | |
| WaaH | <i>Salmonella enterica</i> SARC9V | n.d. | AF519778 AAM88839.1 | Q8KSA0 | |
| UDP-glucosa: α -1,2-glucosiltransferasa (WaaH) | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> SARC5 | 2.4.1.- | AF511116 AAM48166.1 | | |
| α -2,3/-2,8-sialiltransferasa (Cst-II) Cst bifuncional | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43449 | n.d. | AF401529 AAL06004.1 | Q93CZ5 | |
| | <i>Campylobacter jejuni</i> 81-176 | n.d. | AF305571 AAL09368.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (Cst-III) | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43429 | 2.4.99.- | AY044156 AAK73183.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (Cst-III) | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43430 | 2.4.99.- | AF400047 AAK85419.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (Cst-II) | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43432 | 2.4.99.- | AF215659 AAG43979.1 | Q9F0M9 | |
| α -2,3/8-sialiltransferasa (CstII) | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43438 | n.d. | AF400048 AAK91725.1 | Q93MQ0 | |
| α -2,3-sialiltransferasa cst-II | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43446 | 2.4.99.- | AF167344 AAF34137.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa (Cst-II) | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43456 | 2.4.99.- | AF401528 AAL05990.1 | Q93D05 | |
| α -2,3- α -2,8-sialiltransferasa (CstII) | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43460 | 2.4.99.- | AY044868 AAK96001.1 | Q938X6 | |
| α -2,3/8-sialiltransferasa (Cst-II) | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 700297 | n.d. | AF216647 AAL36462.1 | | |
| ORF | <i>Campylobacter jejuni</i> GB11 | n.d. | AY422197 AAR82875.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa cstIII | <i>Campylobacter jejuni</i> MSC57360 | 2.4.99.- | AF195055 AAG29922.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa cstIII Cj1140 | <i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168 | 2.4.99.- | AF139077 CAB73395.1 | Q9PNF4 | |
| α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa II (cstII) | <i>Campylobacter jejuni</i> O:10 | n.d. | NC_002163 NP_282288.1 -AAO96669.1 AX934427 CAF04167.1 | | |
| α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa II (CstII) | <i>Campylobacter jejuni</i> O:19 | n.d. | AX934431 CAF04169.1 | | |
| α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa II (CstII) | <i>Campylobacter jejuni</i> O:36 | n.d. | AX934436 CAF04171.1 | | |
| α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa II (CstII) | <i>Campylobacter jejuni</i> O:4 | n.d. | AX934434 CAF04170.1 | | |
| α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa II (CstII) | <i>Campylobacter jejuni</i> O:41 | n.d. | -AAO96670.1 -AAT17967.1 AX934429 CAF04168.1 | | |
| α -2,3-sialiltransferasa cst-I | <i>Campylobacter jejuni</i> OH4384 | 2.4.99.- | AF130466 AAF13495.1 | Q9RGF1 | |
| α -2,3/-2,8-sialiltransferasa (Cst-II) bifuncional | <i>Campylobacter jejuni</i> OH4384 | 2.4.99.- | AF130984 AAF31771.1 AX934425 CAF04166.1 | 1R07C 1R08A | |

FIGURA 11N

| Proteína | Organismo | EC# | GenBank / GenPept | SwissProt | PDB / 3D |
|---|-------------------------------|------|-----------------------|-----------|----------|
| HI0352 (fragmento) | <i>Haemophilus influenzae</i> | n.d. | U32720 AAC22019 | | P24324 |
| | <i>Rd</i> | | X57315 CAA40567 | | |
| PM1174 | <i>Pasteurella multocida</i> | n.d. | NC_000907.NP_438516.1 | | |
| | <i>PM70</i> | | AE006157 AAK03258.1 | Q9CLP3 | |
| Secuencia 10 de la patente US 6503744 | Desconocido | n.d. | NC_002663 NP_246111.1 | | |
| Secuencia 10 de la patente US 6699705 | Desconocido | n.d. | -AAO96672.1 | | |
| Secuencia 12 de la patente US 6699705 | Desconocido | n.d. | -AAT17969.1 | | |
| Secuencia 2 de la patente US 6709834 | Desconocido | n.d. | -AAT17970.1 | | |
| Secuencia 3 de la patente US 6503744 | Desconocido | n.d. | -AAT23232.1 | | |
| Secuencia 3 de la patente US 6699705 | Desconocido | n.d. | -AAO96668.1 | | |
| Secuencia 34 de la patente US 6503744 | Desconocido | n.d. | -AAT17965.1 | | |
| Secuencia 35 de la patente US 6503744 (fragmento) | Desconocido | n.d. | -AAO96684.1 | | |
| Secuencia 48 de la patente US 6699705 | Desconocido | n.d. | -AAO96685.1 | | |
| Sequence 5 de la patente US 6699705 | Desconocido | n.d. | -AAS36262.1 | | |
| Secuencia 9 de la patente US 6503744 | Desconocido | n.d. | -AAT17988.1 | | |
| | | | -AAT17966.1 | | |
| | | | -AAO96671.1 | | |