

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 948**

51 Int. Cl.:

A01N 43/04 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2004 E 04812271 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1694347**

54 Título: **Eritropoyetina glicopegilada**

30 Prioridad:

24.11.2003 US 524989 P

26.01.2004 US 539387 P

22.03.2004 US 555504 P

23.07.2004 US 590573 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:
06.03.2014

73 Titular/es:

RATIOPHARM GMBH (100.0%)

Graf-Arco-Strasse 3

89079 Ulm, DE

72 Inventor/es:

DEFREES, SHAWN;

BAYER, ROBERT J. y

ZOPF, DAVID A.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 445 948 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

Eritropoyetina glicopegilada

Antecedentes de la invención

5 La eritropoyetina (EPO) es una citoquina producida por el riñón y el hígado que actúa sobre las células madre hematopoyéticas para estimular la producción de glóbulos rojos. La proteína existe en dos formas: una que es un péptido de 165 aminoácidos, y la otra es un péptido de 166 aminoácidos. El péptido de 166 aminoácidos tiene la misma secuencia que el péptido de 165 aminoácidos excepto en que el péptido de 166 aminoácidos tiene una arginina adicional en la posición más terminal del C. El péptido de 165 aminoácidos maduro es una glicoproteína de 34 kD que comprende tres sitios de N-glicosilación (Asn-24, Asn-38, y Asn-83), y 1 sitio de O-glicosilación (Ser-126),
10 y algunas variantes están "hiperglicosiladas" comprendiendo 5 sitios de glicosilación unidos a N.

La síntesis de eritropoyetina está inducida por condiciones que crean hipoxia tisular de forma eficaz, tal como disminución de la tensión de O₂ arterial o el aumento de la afinidad del oxígeno de la sangre. En condiciones normales de homeostasis, el hematocrito y la concentración de hemoglobina en sangre se mantienen constantes con la compensación de la eritropoyesis, la destrucción permanente de los glóbulos rojos envejecidos por macrófagos en la médula ósea, bazo e hígado. Cuantitativamente, aproximadamente 1 % de la masa de los glóbulos rojos, que es aproximadamente 2-3 x 10¹¹ glóbulos rojos, se renueva cada día. Sin embargo, en situaciones que generan de forma eficaz hipoxia tisular, tal como pérdida de sangre o ubicación en altitudes elevadas, la inducción de EPO puede estimular la eritropoyesis 10 veces o más sobre los niveles normales.

Debido a que EPO estimula la producción de glóbulos rojos, es una terapia eficaz para muchas enfermedades y afecciones asociadas con un hematocrito reducido. Los ensayos iniciales de terapia de reemplazo con EPO recombinante humana para restablecer el hematocrito en pacientes con insuficiencia renal en etapa terminal se informaron por primera vez hace aproximadamente 20 años (véase p. ej., Winearls, CG; et al. (1986) Lancet, 2, 1175-1178, y Eschbach, J. W.; et al. (1987) N. Engl. J. Med., 316, 73-78). Este trabajo proporcionó un estímulo para estudios adicionales sobre la fisiopatología y la farmacología de EPO (véase p. ej., Jelkmann, W. y Gross, A. (1989) Erythropoietin; Springer, Berlín Heidelberg Nueva York).

A partir de esos primeros estudios, la EPO recombinante humana se ha usado satisfactoriamente para tratar numerosas afecciones patológicas. Por ejemplo, la aplicación farmacológica de EPO recombinante humana en pacientes quirúrgicos puede disminuir la gravedad y la duración de la anemia postoperatoria. La administración de EPO recombinante humana también ha demostrado que es una terapia eficaz para pacientes que padecen varias enfermedades no renales, tales como inflamación crónica, tumores malignos y SIDA, en donde una falta relativa de EPO endógena contribuye al desarrollo de anemia (véase p. ej., Means, R.T. y Krantz, S.B. (1992) Blood, 80, 1639-1647, y Jelkmann, W. (1998) J. Interf. Cytokine Res., 18, 555-559). Además, se ha informado de que la EPO es protectora de tejidos en lesiones isquémicas, traumáticas, tóxicas e inflamatorias (véase p. ej., Brines M., et al. (2004) PNAS USA 101:14907-14912 y Brines, M. L., et al. (2000). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10526-10531).

35 La utilidad y la eficacia de EPO para el tratamiento de anemias y otras afecciones que surgen de dicha gran diversidad de causas hace que la EPO recombinante humana quizá sea el fármaco más vendido en el mundo. De hecho, la cantidad de ventas estimadas es de más de 5 mil millones de dólares americanos al año.

Solamente una EPO recombinante humana, producida en la línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO), se emplea ampliamente como un agente terapéutico. Dado que todos los mamíferos producen glicanos de estructura similar, Ovario de Hámster Chino (CHO), Riñón de Cría de Hámster (BHK), y Riñón Embrionario Humano 293 (HEK-293) son las células huésped preferentes para la producción de agentes terapéuticos de glicoproteína. Tal como se conoce en la técnica, la glicosilación adecuada es un factor críticamente importante que influye en la vida media *in vivo* y en la inmunogenicidad de los péptidos terapéuticos. De hecho, las proteínas poco glicosiladas son reconocidas por el hígado como "viejas" y de este modo, se eliminan más rápidamente del organismo que las proteínas glicosiladas de forma adecuada.

Desafortunadamente, un aspecto frustrante y bien conocido de la glicosilación de proteínas es el fenómeno de la microheterogeneidad. Por lo tanto, incluso las células huésped preferentes para la producción de glicoproteínas terapéuticas humanas tales como EPO, producen por lo general péptidos que comprenden una gama de variaciones en estructura precisa del glicano. La extensión de esta heterogeneidad puede variar considerablemente desde el sitio de glicosilación al sitio de glicosilación, de proteína a proteína, y de tipo celular a tipo celular. Por lo tanto, numerosas glicofomas, cada una de las cuales es efectivamente una especie molecular distinta, por lo general existe en cualquier preparación dada de glicoproteínas.

El problema de la microheterogeneidad plantea por lo tanto numerosos problemas para la producción a gran escala industrial de glicoproteínas terapéuticas. En particular, dado que cada glicofoma puede representar a una especie molecular distinta, las preparaciones de glicoproteínas terapéuticas se deben fraccionar para purificar la glicofoma individual deseada. Complicaciones adicionales surgen del hecho de que diferentes lotes de producción pueden variar con respecto al porcentaje de la glicofoma deseada que comprende el lote de la glicoproteína terapéutica. Por lo tanto, porciones grandes, no siempre predecibles de cada preparación quizá se tengan que descartar, de modo

que por último el rendimiento final de una glicoforma deseada puede ser bajo. En conjunto, el problema de la microheterogeneidad se refiere a que los glicopéptidos terapéuticos producidos por cultivos celulares de mamífero requieren costes de producción más elevados, que en último lugar se traduce en costes de salud que los que podrían ser necesarios si estuviera disponible un método más eficaz para preparar glicoproteínas terapéuticas más eficaces, de una duración más prolongada.

Una solución al problema de proporcionar glicopéptidos terapéuticos rentables ha sido proporcionar péptidos con vidas medias *in vivo* más largas. Por ejemplo, se han producido glicopéptidos terapéuticos con mejores propiedades farmacocinéticas mediante la unión de polímeros sintéticos a la cadena principal peptídica. Un polímero a modo de ejemplo que se ha conjugado con péptidos es el poli(etilenglicol) ("PEG"). Se ha demostrado el uso de PEG para derivatizar péptidos terapéuticos para reducir la inmunogenicidad de los péptidos. Por ejemplo, Pat. de EE.UU. N° 4.179.337 (Davis *et al.*) desvela polipéptidos no inmunogénicos tales como enzimas y hormonas peptídicas acopladas a polietilenglicol (PEG) o a polipropilenglicol. Además de inmunogenicidad reducida, el tiempo de aclaramiento en circulación es prolongado debido al mayor tamaño del conjugado de PEG de los polipéptidos en cuestión.

El principal modo de unión de PEG, y sus derivados, a péptidos es una unión no específica a través de un resto de aminoácido del péptido (véase, *p. ej.*, la patente de EE.UU. N° 4.088.538, patente de EE.UU. N° 4.496.689, patente de EE.UU. N° 4.414.147, patente de EE.UU. N° 4.055.635, y documento PCT WO 87/00056). Otro modo de unión de PEG a péptidos es a través de la oxidación no específica de los restos de glicosilo en un glicopéptido (véase, *p. ej.*, el documento WO 94/05332).

En estos métodos no específicos, se añade poli(etilenglicol) de una manera no específica al azar a los restos reactivos en una cadena principal peptídica. Por supuesto, la adición aleatoria de moléculas de PEG tiene sus inconvenientes, que incluyen una 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 derivatización que da como resultado la formación de un producto básicamente homogéneo, fácilmente caracterizable y marcado específicamente es superior. Dichos métodos se han desarrollado.

Los agentes terapéuticos de péptidos homogéneos marcados se pueden producir *in vitro* a través de la acción de enzimas. A diferencia de los métodos habituales no específicos para la unión de un polímero sintético u otra marca a un péptido, las síntesis basadas en enzimas tienen las ventajas de regioselectividad y estereoselectividad. Dos clases principales de enzimas para usar en la síntesis de péptidos marcados son glicosiltransferasas (por ejemplo, sialiltransferasas, oligosacariiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas), y glicosidasas. Estas enzimas se pueden usar para la unión específica de azúcares que se pueden modificar posteriormente para que comprendan un resto terapéutico. Como alternativa, las glicosiltransferasas y las glicosidasas modificadas se pueden usar para transferir directamente los azúcares modificados a una cadena principal peptídica (véase, *p. ej.*, la Patente de EE.UU. N° 6.399.336, y las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20030040037, N° 20040132640, N° 20040137557, N° 20040126838 y N° 20040142856). También se conocen métodos que combinan tanto elementos sintéticos químicos como enzimáticos (véase, *p. ej.*, Yamamoto *et al. Carbohydr, Res.* 305: 415-422 (1998) y la Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20040137557).

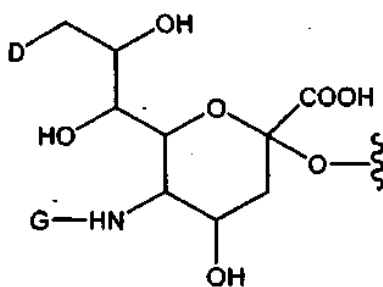
La eritropoyetina (EPO) es un péptido extremadamente valioso. Aunque las formas de EPO disponibles en el mercado están en uso en la actualidad, estos péptidos son menos que eficaces de forma máxima debido a factores que incluyen la microheterogeneidad del producto de glicoproteína que aumenta los costes de producción, escasa farmacocinética del producto de glicoproteína aislada resultante, o una combinación de los dos. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad en la técnica de péptidos de EPO de mayor duración con mejor eficacia y mejor farmacocinética. Además, para que sea eficaz para el mayor número de individuos, debe ser posible producir, en una escala industrial, un péptido de EPO con mejor farmacocinética terapéutica que tenga una estructura básicamente homogénea, predecible que se pueda reproducir fácilmente una y otra vez.

Afortunadamente, en la actualidad se han descubierto péptidos de EPO con la eficacia terapéutica mejorada y métodos para prepararlos. De hecho, la invención proporciona péptidos de EPO con mejor farmacocinética. La invención también proporciona métodos prácticos en la industria y rentables para la producción de péptidos de EPO modificada. Los péptidos de EPO de la invención comprenden grupos de modificación tales como restos de PEG. Por lo tanto, la presente invención satisface la necesidad de péptidos de EPO con la mejor eficacia terapéutica y la mejor farmacocinética para el tratamiento de afecciones y enfermedades en donde EPO proporciona terapia eficaz.

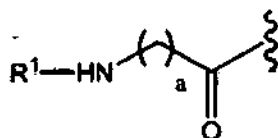
Compendio de la invención

Ahora se ha descubierto que la modificación controlada de eritropoyetina (EPO) con uno o más restos de poli(etilenglicol) proporciona nuevos derivados de EPO con mejores propiedades farmacocinéticas. Además, se han descubierto y desarrollado métodos rentables para la producción fiable de los péptidos de EPO modificada de la invención.

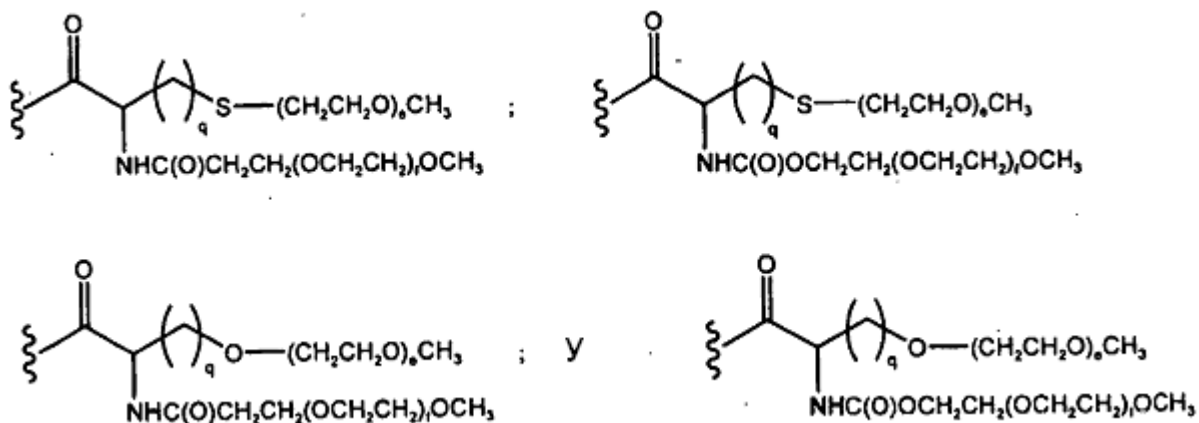
En un aspecto, la presente invención proporciona un péptido de eritropoyetina que comprende el resto:



5 en donde D es un miembro seleccionado entre -OH y R¹-L-NH-; G es un miembro seleccionado entre R¹-L- y -C(O) alquilo (C₁-C₆); R¹ es un resto que comprende un miembro seleccionado entre un resto que comprende un resto de polietilenglicol ramificado, tal como se describe en las reivindicaciones y L es un conector que es un miembro seleccionado entre un enlace, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir 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 una realización, un R¹-L tiene la fórmula:

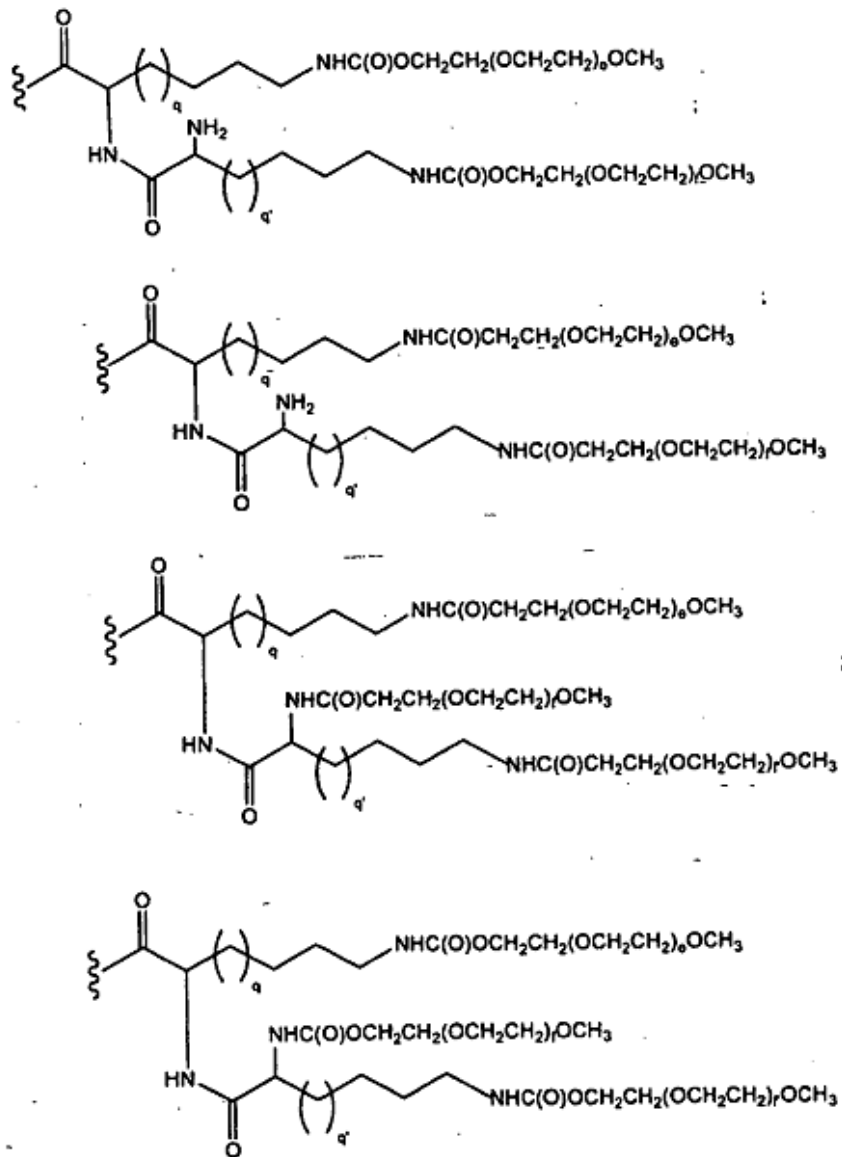


en donde a es un número entero de 0 a 20. R¹ tiene una estructura que es un miembro seleccionado entre:



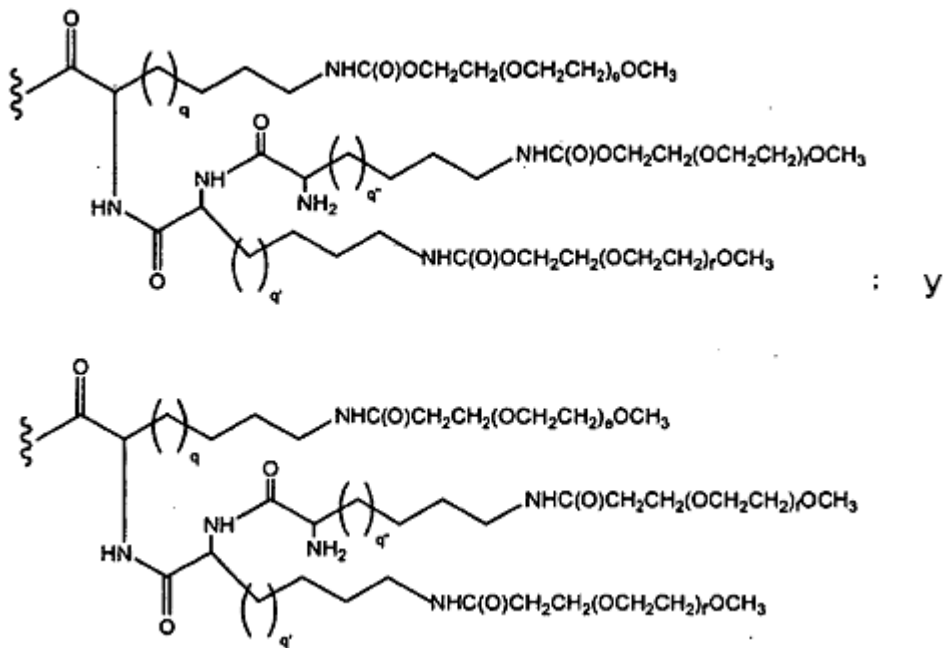
10

en donde e y f son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500; y q es un número entero de 1 a 20, o:



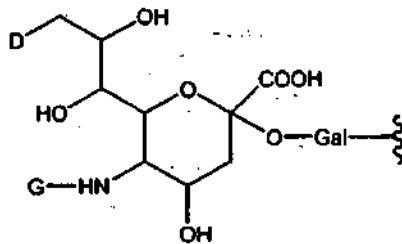
en donde e , f y f' son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500; y q y q' son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 20.

o R^1 tiene una estructura que es un miembro seleccionado entre:

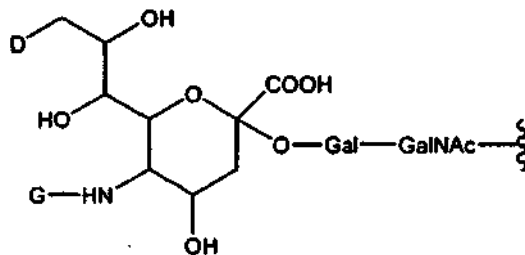


en donde e, f y f' son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500; y q, q' y q'' son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 20, en donde e y f son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500.

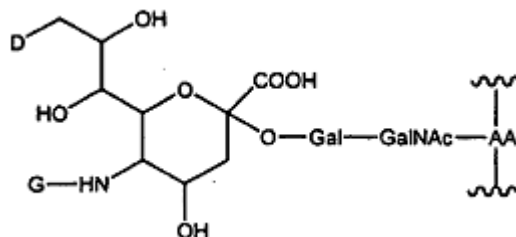
- 5 En otro aspecto, la invención proporciona un péptido que comprende un resto que tiene la fórmula:



En otras realizaciones, el resto tiene la fórmula:



En otra realización a modo de ejemplo, el péptido comprende un resto según la fórmula:

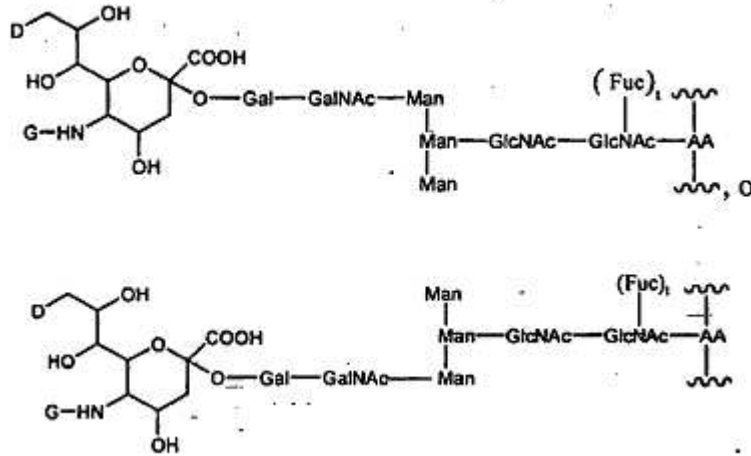


10

en donde AA es un resto de aminoácido de dicho péptido. En algunas realizaciones el resto de aminoácido es un

miembro seleccionado entre serina, treonina y tirosina. En una realización preferida, el resto de aminoácido es una serina en la posición 126 de la SEC. ID. N°: 1.

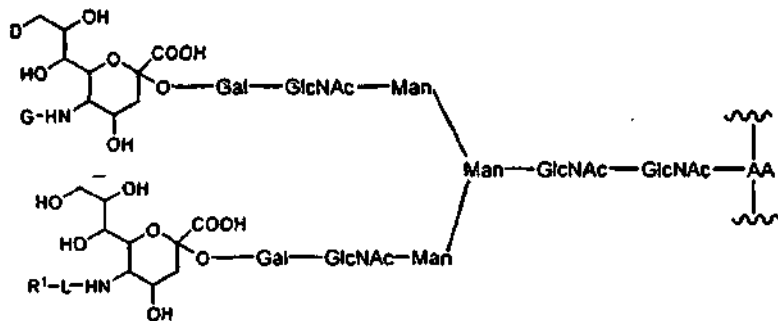
En otra realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un péptido de eritropoyetina en donde el péptido comprende al menos un resto que tiene la fórmula:



5

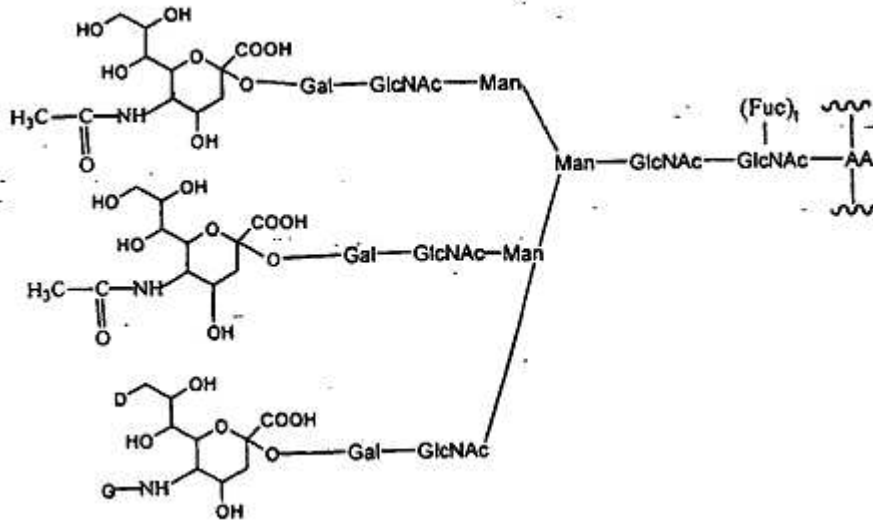
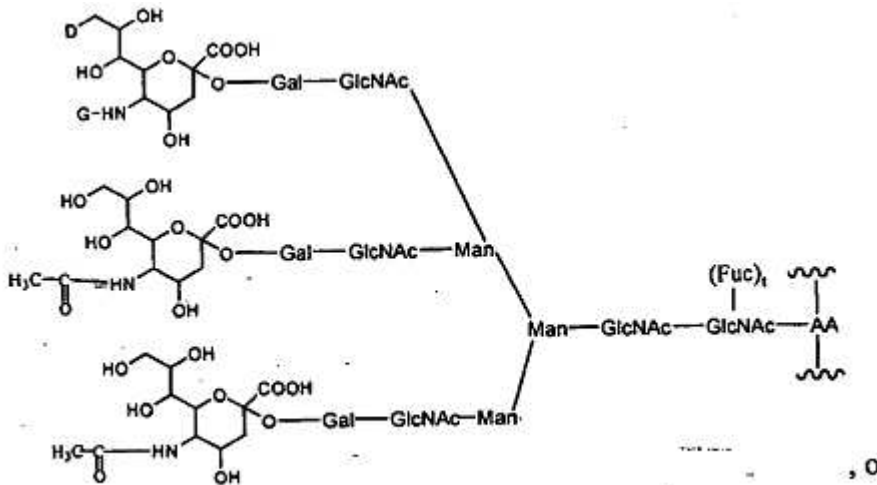
en donde t es un número entero igual a 0 o 1. Por lo tanto, en esta realización, el resto de ácido siálico modificado puede aparecer en cualquier rama de la estructura biantenaria.

En otra realización relacionada, la invención proporciona un péptido de eritropoyetina en donde el péptido comprende al menos un resto que tiene la fórmula:



10

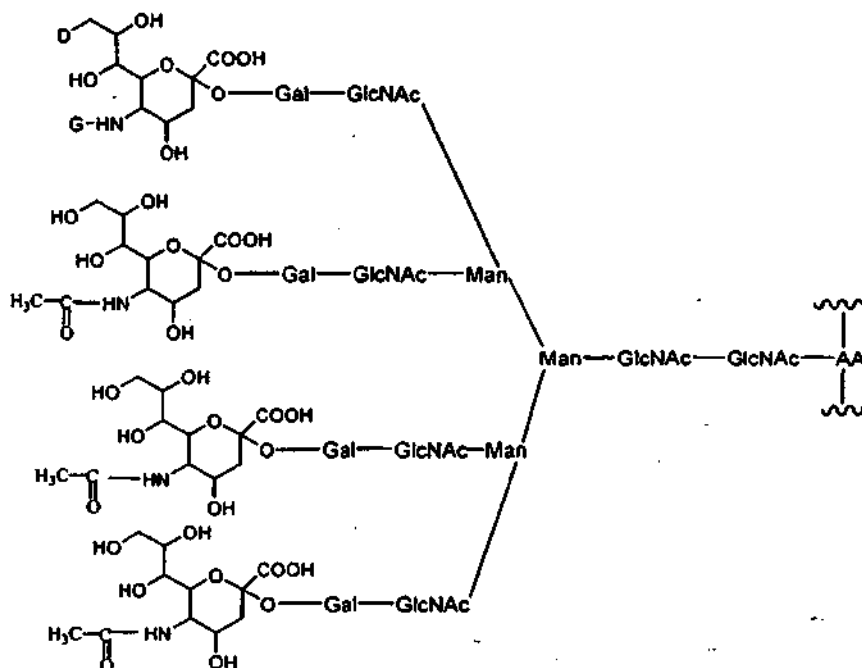
En otra realización, la invención proporciona un péptido de eritropoyetina en donde el péptido comprende al menos un resto que tiene una fórmula según:



En esta realización, el resto de ácido siálico modificado puede aparecer en una cualquiera o más de las ramas de cualquier forma de la estructura triantennaria.

Además, en otra realización, la invención proporciona un péptido de eritropoyetina en donde el péptido comprende al menos un resto que tiene la fórmula:

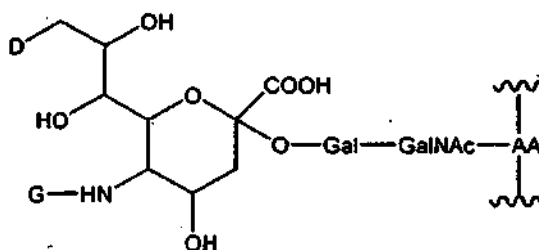
5



En esta realización, el resto de ácido siálico modificado puede aparecer en una cualquiera o más de las ramas de la estructura tetra antenaria.

En otro aspecto la invención proporciona un péptido de eritropoyetina que es un péptido de eritropoyetina bioactiva.

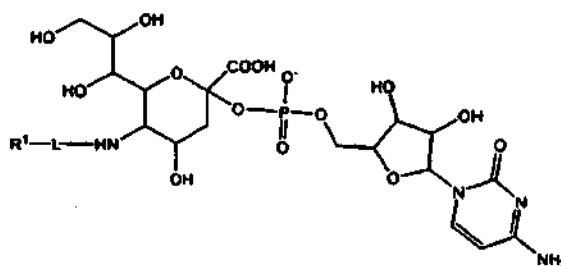
- 5 En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar una eritropoyetina PEG-ilada que comprende el resto:



- 10 en donde R¹ es un resto que comprende un resto de poli(etilenglicol) ramificado tal como se describe en las reivindicaciones y L es un conector que es un miembro seleccionado entre alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir. El método comprende poner en contacto un sustrato peptídico de eritropoyetina que comprende el resto de glicosilo:



con un resto dador de PEG-ácido siálico que tiene la fórmula:



y una enzima que transfiere dicho PEG-ácido siálico en la Gal de dicho resto de glicosilo, en condiciones apropiadas para la transferencia. En una realización, el péptido de eritropoyetina se expresa en un huésped adecuado. En una realización, el huésped es una célula de mamífero, y en otra realización, la célula huésped es una célula de insecto.

5 En otro aspecto, la invención proporciona los conjugados peptídicos para uso en un método para tratar una afección en los sujetos con necesidad del mismo, en donde la afección se caracteriza por la producción comprometida de glóbulos rojos en el sujeto. El método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad del péptido de eritropoyetina de la invención eficaz para mejorar la afección en el sujeto.

10 En otro aspecto, la invención proporciona los conjugados peptídicos para uso en un método para potenciar la producción de glóbulos rojos en un mamífero. El método comprende administrar al mamífero una cantidad del péptido de eritropoyetina de la invención eficaz para potenciar la protección de glóbulos rojos en el mamífero.

En otro aspecto; la invención proporciona los conjugados peptídicos para uso en un método para tratar una lesión tisular en un sujeto con necesidad del mismo, estando dicha lesión caracterizada por daño resultante de isquemia, traumatismo, inflamación o contacto con sustancias tóxicas, comprendiendo dicho método la etapa de administrar al sujeto una cantidad del péptido de eritropoyetina de la invención eficaz para mejorar dicha lesión tisular en el sujeto.

15 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un péptido tal como se define en las reivindicaciones para la preparación de un medicamento para tratar una afección en un sujeto con necesidad del mismo, en donde la afección está caracterizada por producción comprometida de glóbulos rojos en el sujeto. El método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad del péptido de eritropoyetina de la invención eficaz para mejorar la afección en el sujeto.

20 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un péptido tal como se define en las reivindicaciones para la preparación de un medicamento para potenciar la producción de glóbulos rojos en un mamífero. El método comprende administrar al mamífero una cantidad del péptido de eritropoyetina de la invención eficaz para potenciar la producción de glóbulos rojos en el mamífero.

25 En otro aspecto, la invención proporciona el uso del péptido tal como se define en las reivindicaciones para la preparación de un medicamento para tratar una lesión tisular en un sujeto con necesidad del mismo, estando dicha lesión caracterizada por daño resultante de isquemia, traumatismo, inflamación o contacto con sustancias tóxicas, comprendiendo dicho método la etapa de administrar al sujeto una cantidad del péptido de eritropoyetina de la invención eficaz para mejorar dicha lesión tisular en el sujeto.

30 En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende el péptido de eritropoyetina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 En los conjugados de eritropoyetina unidos a O de la invención, básicamente cada uno de los restos de aminoácido a los que se une el polímero tiene la misma estructura. Por ejemplo, si un péptido incluye un resto de glicosilo unido a Ser, al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, 99,2 %, 99,4 %, 99,6 %, o más preferentemente 99,8 % de los péptidos en la población tendrán el mismo resto de glicosilo unido covalentemente al mismo resto de Ser.

Otros objetivos y ventajas de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada que sigue a continuación.

Descripción de los dibujos

40 **FIG. 1.** La Figura 1 ilustra algunos nucleótidos modificados de azúcar, a modo de ejemplo, útiles en la práctica de la invención.

FIG. 2. La Figura 2 ilustra nucleótidos adicionales modificados de azúcar, a modo de ejemplo, útiles en la práctica de la invención.

45 **FIG. 3.** La Figura 3 ilustra nucleótidos modificados de ácido siálico, a modo de ejemplo, útiles en la práctica de la invención. A: Estructura de CMP-Ácido siálico-PEG de 40 kilodalton. B: Estructura de CMP-Ácido siálico-PEG de 30 kilodalton.

50 **FIG. 4.** La Figura 4 presenta una representación esquemática de isoformas de EPO glicopegilada a modo de ejemplo a partir de células de Ovario de Hámster Chino. A. Una glicoforma pegilada unida a O de 40 kilodalton a modo de ejemplo. B: Una de varias glicoformas pegiladas unidas a N de 30 kilodalton. El resto de ácido siálico modificado que comprende la molécula de PEG, puede aparecer en una cualquiera o cualquiera de las ramas del resto de glicosilo unido N. además, la ilustración es a modo de ejemplo de que cualquier molécula de EPO glicosilada puede comprender cualquier mezcla de restos de glicosilo unidos a N mono-, bi- tri-, o tetra-antenarios y una cualquiera o más de las ramas pueden comprender adicionalmente un resto de ácido siálico modificado de la invención.

FIG. 5. La Figura 5 ilustra un péptido de EPO derivado de CHO a modo de ejemplo en su forma no glicopegilada. Tal como se analiza en la referencia a la Figura 4 (anterior) la ilustración es a modo de ejemplo en que cualquier molécula de EPO glicosilada puede comprender cualquier mezcla de restos de glicosilo unidos a N mono-, bi-tri-, o tetra-antenarios.

5 **FIG. 6.** La Figura 6 muestra los resultados de experimentos que comparan la farmacocinética de dos formas de EPO no glicopegilada derivada de CHO, y dos formas diferentes de EPO glicopegilada derivada de CHO.

FIG. 7. La Figura 7 ilustra un péptido de EPO glicopegilada derivada de insecto según la invención.

10 **FIG. 8.** La Figura 8 muestra los resultados de experimentos que comparan la farmacocinética de una forma de EPO no glicopegilada derivada de CHO, una forma de EPO no glicopegilada derivada de insecto, con sus formas glicopegiladas correspondientes.

FIG. 9. La Figura 9 muestra las actividades relativas de dos formas de EPO no glicopegilada (A y B) frente a dos variantes glicopegiladas (las variantes de 30 kilodalton y de 40 kilodalton de las figuras 4 A y B) y una variante hiperglicosilada de EPO en la estimulación de la proliferación de células TF1 que soportan receptores de EPO en cultivo.

15 **FIG. 10.** La Figura 10 muestra la inhibición de la unión de EPO marcada con isótopos a un receptor EPO quimérico recombinante con diversas concentraciones de dos variantes de EPO no pegilada (A y B) y dos variantes glicopegiladas (las variantes de 30 kilodalton y de 40 kilodalton de las figuras 4 A y B).

Descripción detallada de la invención y las realizaciones preferentes

Abreviaturas

20 PEG, poli(etilenglicol); PPG, poli(propilenglicol); Ara, arabinosilo; Fru, fructosilo; Fuc, fucosilo; Gal, galactosilo; GalNAc, N-acetilgalactosaminilo; Glc, glucosilo; GlcNAc, N-acetilglucosaminilo; Man, mannosilo; ManAc, acetato de mannosaminilo; Xyl, xilosilo; y NeuAc, sialil (N-acetilneuraminilo); M6P, mannososa-6-fosfato.

Definiciones

25 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos empleados en esta memoria generalmente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. En general, la nomenclatura empleada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos e hibridación son los bien conocidos y empleados comúnmente en la técnica. Se emplean técnicas convencionales para síntesis de ácidos nucleicos y de péptidos. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (*véase en general*, Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se proporcionan a lo largo de la presente memoria. La nomenclatura empleada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio en química analítica y síntesis orgánica que se describen a continuación son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Las técnicas convencionales, o
35 modificaciones de las mismas, se emplean para las síntesis químicas y análisis químicos.

Todos los oligosacáridos que se describen en la presente memoria 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 o 8), y después el nombre o abreviatura del sacárido reductor (*es decir*, GlcNAc). Cada sacárido es preferentemente una piranosa. Para una
40 revisión de la nomenclatura de glicobiología convencional véase, *Essentials of Glycobiology* Varki *et al.* eds. CSHL Press (1999).

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

45 La expresión "ácido siálico" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia de ácido siálico es 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-glicilil-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 la 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 la familia de ácido siálico, véase, *p. ej.*, Varki, *Glycobiology* 2: 25-40 (1992); *Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function*, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, Nueva York (1992)). La síntesis y el uso de
55 compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación se describen en la solicitud internacional WO

92/16640, publicada el 1 octubre de 1992.

"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, también están incluidos aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homocisteína. 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 emplear en la invención. Todos los aminoácidos empleados 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 emplea en esta memoria, "péptido" se refiere tanto a péptidos glicosilados como a no glicosilados. También se incluyen péptidos que están incompletamente glicosilados por un sistema que expresa el péptido. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., in CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983).

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

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 naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, *p. ej.*, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, *p. ej.*, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (*p. ej.*, norleucina) o cadenas peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un 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 emplea en esta memoria, la expresión "azúcar modificado", se refiere a un hidrato de carbono natural o no, que se añade enzimáticamente en un aminoácido o un resto de glicosilo de un péptido en un procedimiento de la invención. El azúcar modificado se selecciona de diversos sustratos de enzimas que incluyen nucleótidos de azúcar (mono-, di- y tri-fosfatos), azúcares activados (*p. ej.*, haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo y azúcares que no son ni activados ni nucleótidos). El "azúcar modificado" se funcionaliza de modo covalente con un "grupo modificador". Los grupos modificadores útiles incluyen, pero no se limitan a, restos de PEG, restos de diagnóstico, biomoléculas y similares. El grupo modificador preferentemente 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.

La expresión "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 a modo de ejemplo 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, *p. ej.*, poli(lisina). Un polisacárido a modo de ejemplo es el 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.

La cadena principal polimérica del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol) (es decir PEG). Sin embargo, se debería entender que otros polímeros relacionados también son adecuados para su uso en la práctica de la presente invención y que el uso del término PEG o poli(etilenglicol) pretende ser inclusivo y no exclusivo en este respecto. El término PEG incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo alcoxi PEG, PEG difuncional, PEG con múltiples brazos, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes en la cadena principal polimérica), o PEG con uniones degradables en el mismo.

La cadena principal polimérica puede ser lineal o ramificada. Las estructuras principales poliméricas ramificadas generalmente son bien conocidas en la técnica. Por lo general, un polímero ramificado tiene un resto de núcleo de rama central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo de la rama central. PEG se emplean normalmente en formas ramificadas que se pueden preparar mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. El resto de rama central también se puede derivar de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado se puede representar en la forma general como R(-PEG-OH)_m en que R representa el resto del núcleo, tal como glicerol o pentaeritritol, y m representa el número de ramas. Las moléculas de PEG con ramas múltiples, tales como las que se describen en la Pat. de EE.UU. N° 5.932.462, también se pueden usar como la cadena principal polimérica.

También son adecuados para la invención otros muchos polímeros. Las cadenas principales poliméricas que no son peptídicas y solubles en agua, de 2 a aproximadamente 300 términos, son particularmente útiles en la invención. Ejemplos prepolímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxetilado), poli(alcohol

olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli(α -hidroxiácido), alcohol de polivinilo), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), tal como se describe en la Pat. de EE.UU. Nº 5.629.384, y copolímeros; terpolímeros, y mezclas de los mismos. Aunque el peso molecular de cada cadena de la cadena principal polimérica puede variar, por lo general está en el intervalo de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 100.000 Da, a menudo de aproximadamente 6.000 Da a aproximadamente 80.000 Da.

El "área bajo la curva" o "AUC", como se emplea en esta memoria en el contexto de la administración de un fármaco peptídico a un paciente, se define como el área total bajo la curva que describe la concentración del fármaco en circulación sistémica en el paciente como una función del tiempo del cero al infinito.

La expresión "vida media" o " $t_{1/2}$ " como se emplea en esta memoria en el contexto de la administración de un fármaco peptídico a un paciente, se define como el tiempo necesario para que la concentración en plasma de un fármaco en paciente se reduzca a la mitad. Puede existir más de una vida media asociada con el fármaco peptídico dependiendo de múltiples mecanismos de aclaramiento, redistribución, y otros mecanismos bien conocidos en la técnica. Habitualmente, las vidas medias alfa y beta se definen de modo que la fase alfa está asociada con la redistribución, y la fase beta está asociada con el aclaramiento. Sin embargo, con fármacos proteicos que, en su mayor parte están confinados en el torrente sanguíneo, puede haber al menos dos vidas medias de aclaramiento. Para algunos péptidos glicosilados, el aclaramiento rápido en la fase beta se puede mediar a través de receptores sobre macrófagos, o células endoteliales que reconocen galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, mannososa, o fucosa terminal. El aclaramiento más lento en la fase beta se puede producir a través de filtración glomerular renal para moléculas con un radio eficaz < 2 nm (aproximadamente 68 kD) y/o absorción y metabolismo específicos o no específicos en tejidos. La glicoPEGilación puede proteger azúcares terminales (*p. ej.*, galactosa o N-acetilgalactosamina) y por lo tanto bloquear el aclaramiento rápido en la fase alfa a través de receptores que reconocen a estos azúcares. También puede transmitir un radio eficaz más grande y por lo tanto disminuir el volumen de distribución y absorción tisular, prolongando de este modo la fase beta tardía. Por lo tanto, el impacto preciso de la glicoPEGilación en las vidas medias en la fase alfa y en la fase beta variará dependiendo del tamaño, estado de glicosilación, y otros parámetros, tal como se conoce bien en la técnica. La explicación adicional de "vida media" se encuentra en Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin y RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, páginas 101-120).

El término "glicoconjugación", como se emplea en esta memoria, se refiere a la conjugación mediada enzimáticamente de una especie de azúcar modificado a un resto de aminoácido o glicosilo de un polipéptido, *p. ej.*, un péptido de Eritropoyetina de la presente invención. Un subgénero de "glicoconjugación" es "glicol-PEGilación", en que el grupo de modificación del azúcar modificado es poli(etilenglicol), y derivado de alquilo (*p. ej.*, m-PEG) o derivado reactivo (*p. ej.*, H₂N-PEG, HOOC-PEG) del mismo.

Los términos "gran escala" y "escala industrial" se emplean de forma intercambiable y se refieren a un ciclo de reacción que produce al menos aproximadamente 250 mg, preferentemente al menos aproximadamente 500 mg, y más preferentemente al menos aproximadamente 1 gramo de glicoconjugado en el momento de la finalización de un solo ciclo de reacción.

La expresión "grupo de unión glicosilo", como se emplea en esta memoria, se refiere a un resto de glicosilo al que se une covalentemente un grupo de modificación (*p. ej.*, resto de PEG, resto terapéutico, biomolécula); el grupo de unión glicosilo une el grupo de modificación al resto del conjugado. 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 resto 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 resto de aminoácido y/o glicosilo del péptido. El grupo de unión glicosilo puede ser una estructura derivada de sacáridos que se degrada durante la formación de casete de azúcar modificado por grupo de modificación (*p. ej.*, oxidación \rightarrow formación de base de Schiff \rightarrow reducción), o el grupo de unión glicosilo puede estar intacto. Un "grupo de unión glicosilo intacto" se refiere a grupo de unión que se deriva de un resto glicosilo en que el monómero de sacárido que une el grupo de modificación y al resto del conjugado no se degrada, por ejemplo, oxida, *p. ej.*, con metaperyodato sódico. Los "grupos de unión glicosilo intactos" de la invención se pueden derivar de un oligosacárido natural mediante la adición de unidad o unidades de glicosilo o eliminación de una o más unidades de glicosilo de una estructura precursora de sacáridos.

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

Como se emplea en esta memoria, "resto terapéutico" se refiere a cualquier agente útil para terapia que incluye, pero no se limita, antibióticos, agentes antiinflamatorios, fármacos antitumorales, citotoxinas, y agentes radiactivos. "Resto terapéutico" incluye profármacos de agentes bioactivos, constructos en que más de un resto terapéutico está

unido a un vehículo, p. ej., agentes multivalentes. El resto terapéutico también incluye proteínas y constructos que incluyen proteínas. Los ejemplos de proteínas incluyen, pero no se limitan a, Factor de Estimulación de la Colonia de Granulocitos (GCSF), Factor de Estimulación de la Colonia Macrófagos de Granulocitos (GMCSF), Interferón (p. ej., Interferón- α , β , γ), Interleuquina (p. ej., Interleuquina II), proteínas del suero (p. ej., Factores VII, VIII, IX, y X), Gonadotropina Coriónica Humana (HCG), Hormona de Estimulación de Folículos (FSH) y Hormona Luteinizante (LH) y proteínas de fusión de anticuerpos (p. ej., Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (proteína de fusión del dominio (TNFR)/Fc)).

Como se emplea en esta memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material, que cuando se combina con el conjugado retiene la actividad de los conjugados y no es reactivo con los sistemas inmunes del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tal como en forma de una emulsión de aceite/agua, y diversos tipos de agentes de humectación. Otros vehículos también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos que incluyen comprimidos y cápsulas recubiertos. Por lo general, dichos vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, determinados tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Dichos vehículos también pueden incluir aditivos de sabor y color y otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan con métodos convencionales bien conocidos.

Como se emplea en esta memoria, "administración" se refiere a administración oral, administración en forma de un supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal o subcutánea, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, p. ej., una mini-bomba osmótica, al sujeto. La administración es por cualquier vía, que incluye parenteral, y transmucosal (p. ej., oral, nasal, vaginal, rectal, o transdérmica). La administración parenteral incluye, p. ej., intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Por otra parte, cuando la inyección es para tratar un tumor, p. ej. 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 se limitan a, el uso de formulaciones liposómicas, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

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 puede basar en parámetros objetivos o subjetivos, incluyendo los resultados de un examen físico y/o una evaluación psiquiátrica.

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 (ralentizar 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).

Las expresiones "cantidad eficaz" o "una cantidad efectiva para" o una "cantidad terapéuticamente efectiva" o cualquiera de los términos gramaticalmente equivalentes se refiere a la cantidad que, cuando se administra a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el tratamiento para esa enfermedad.

La expresión "protector de tejidos" se refiere a la defensa de un tejido frente a los efectos del daño celular que por lo general se asocia con la experimentación de un tejido órgano u órgano de isquemia/hipoxia, traumatismo, toxicidad y/o información. El daño celular puede conducir a apoptosis y/o necrosis (es decir, muerte celular por tóxicos). Por lo tanto, un efecto "protector de tejidos" protege a un tejido de experimentar el grado de apoptosis y/o muerte celular por tóxicos asociados normalmente con una lesión traumática, inflamatoria, tóxica o isquémica dadas. Por ejemplo, EPO reduce el área de infarto pues de oclusión arterial cerebral media en un modelo de roedor (Siren, A.L. *et al.* (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4044-4049). Por lo tanto, en dichas condiciones, EPO proporciona un efecto "protector de tejidos" al reducir de forma eficaz la necrosis y/o apoptosis asociados normalmente con la lesión isquémica (p. ej., apoplejía isquémica). "Protector de tejidos" también se refiere a la defensa de un tejido frente a los efectos de daño celular y la muerte celular subsiguiente asociada con enfermedades degenerativas tales como retinopatía, o enfermedad neurodegenerativa.

El término "aislado" se refiere a un material que está sustancial o básicamente libre de componentes, que se emplean para producir el material. Para los conjugados peptídicos de la invención, el término "aislado" se refiere al material que está sustancial o básicamente libre de componentes que normalmente acompañan al material en la mezcla usada para preparar el conjugado peptídico. "Aislado" y "puro" se emplean indistintamente. Por lo general, los conjugados peptídicos aislados de la invención tienen un nivel de pureza que se expresa preferentemente como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza para los conjugados peptídicos es de aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 % y el extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o más de aproximadamente 90 %.

Cuando los conjugados peptídicos tienen una pureza de aproximadamente más de 90 %, sus purezas también se expresan preferentemente como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza es de aproximadamente 90

%, aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 % o aproximadamente 98 %. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 100 % de pureza.

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

10 “Básicamente cada miembro de la población”, como se emplea en esta memoria, describe una característica de una población de conjugados peptídicos de la invención en la que un porcentaje seleccionado de los azúcares modificados añadidos a un péptido se añade a múltiples sitios aceptores, idénticos en el péptido. “Básicamente 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 tienen una homogeneidad de al menos aproximadamente 80 %, preferentemente al menos aproximadamente 90 % y más preferentemente al menos aproximadamente 95 %.

15 “Homogeneidad” se refiere a la consistencia estructural a través de una población de restos aceptores a los que se conjugan los azúcares modificados. Por lo tanto, 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 tiene una homogeneidad de aproximadamente 100 %. La homogeneidad se expresa normalmente como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad para los conjugados peptídicos es aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 % y el extremo superior del intervalo de pureza es aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o más de aproximadamente 90 %.

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

30 “Glicofoma 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 (*p. ej.*, fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de una unidad α 1,2-fucosiltransferasa, existe un patrón de 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 (*p. ej.*, 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.

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

45 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 escritura de la estructura de derecha a izquierda, *p. ej.*, $-\text{CH}_2\text{O}-$ se considera que también nombra a $-\text{OCH}_2$.

50 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 de hidrocarburo cíclico, o combinación de los mismos, 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 de hidrocarburo saturado incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, *p. ej.*, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, 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 insaturado incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butenilo, 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 hidrocarburo se denominan “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, siendo preferentes en la presente invención los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Un "alquilo inferior" o "alquileo inferior" es un 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 emplean 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 de hidrocarburo 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 en donde los átomos de nitrógeno y azufre se pueden oxidar opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El heteroátomo o heteroátomos de 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 no se limitan a, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2$, $-\text{S}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}\text{OCH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{N}\text{OCH}_3$, y $-\text{CH}=\text{CH}\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{NH}\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{O}\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. 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 no se limita a, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2-$. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también puede ocupar uno o ambos extremos de la cadena (p. ej., alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino, y similares). Aún más, en los grupos de unión alquileo y heteroalquileo, ninguna orientación del grupo de unión están implicados en la dirección en que se escribe la fórmula del grupo de unión. Por ejemplo, la fórmula $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}^1-$ representa $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}^1-$ y $-\text{R}^1\text{C}(\text{O})_2-$.

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 no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 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, significan, 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 unen 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, en 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-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-benzimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 1-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 emplea en combinación con otros términos (p. ej., 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 (p. ej., bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) que incluyen los grupos alquilo en que un átomo de carbono (p. ej., un grupo metileno) ha sido reemplazado, p. ej., por un átomo de oxígeno (p. ej., fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los términos anteriores (p. ej., "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") significa que incluye las formas sustituidas y no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes preferentes para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (que incluyen los grupos denominados a menudo como alquilenilo, alqueniilo, heteroalquilenilo, heteroalqueniilo, alquiniilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueniilo, y heterocicloalqueniilo) se denominan genéricamente "sustituyentes del grupo alquilo" y pueden ser uno o más de una diversidad de grupos seleccionados de, pero no se limitan a $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-O'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')-NR''$, $-NR-C(NR'R'')=NR''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$ en número que varía de cero a $(2m'+1)$, en donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. Cada uno de R' , R'' , R''' y R'''' con preferencia se refiere de modo independiente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, p. ej., arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o sin sustituir, grupos alcoxi o tioalcoxi o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye uno o más de un grupo R, p. ej., cada uno de los grupos R se selecciona de modo independiente como sucede para cada grupo 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 o 7 miembros. Por ejemplo, $-NR'R''$ significa que incluye, pero no se limita, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir del análisis 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 (p. ej., $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acilo (p. ej., $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$, y similares).

De modo similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se denominan genéricamente "sustituyentes del grupo arilo". Los sustituyentes se seleccionan de, p. ej.: halógeno, $-O'$, $=O$, $=NR'$, $=N-O'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NRC(NR'R''R''')=NR''$, $-NR-C(NR'R'')=NR''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(F)_2$, fluoro(alcoxi (C_1-C_4)), y fluoroalquilo (C_1-C_4)), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema anular aromático y en donde R' , R'' , R''' y R'''' con preferencia se seleccionan de modo independiente de hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir. 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.

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo opcionalmente se pueden reemplazar con un sustituyente de fórmula $-T-C(O)-(CRR')_q-U-$, en donde T y U son de modo independiente $-NR-$, $-O-$, $-CRR'-$ o un enlace sencillo 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 fórmula $-A-(CH_2)_r-B-$, en donde A y B son de modo independiente $-CRR'-$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'-$ o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo formado de este modo se puede 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 fórmula $-(CRR')-X-(CR''R''')_d-$, en 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 (C_1-C_6) sustituido o sin sustituir.

Como se emplea en esta memoria, el término "heteroátomo" significa que incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

Introducción

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína que sirve como el regulador principal en la síntesis de glóbulos rojos. La eritropoyetina se produce en el riñón y actúa mediante células precursoras de estimulación en la médula ósea haciendo que éstas se dividan y se diferencien en glóbulos rojos maduros. EPO puede existir en forma de una glicoproteína de 165 o 166 aminoácidos. La variante de 166 aminoácidos se distingue de la variante de 165 aminoácidos por la presencia de un resto adicional de arginina en el extremo C-terminal de la proteína.

La EPO recombinante ha estado disponible durante algún tiempo como un agente terapéutico eficaz en el tratamiento de diversas formas de anemia, que incluyen anemias asociadas con insuficiencia renal crónica, pacientes infectados por VIH tratados con zidovudina, y pacientes con cáncer con quimioterapia. La glicoproteína se administra por vía parenteral, así como por inyección intravenosa (IV) o subcutánea (SC).

Para mejorar la eficacia de la Eritropoyetina recombinante usará para fines terapéuticos, la presente invención proporciona conjugados de péptidos de eritropoyetina glicosilados y sin glicosilar. Los conjugados se pueden modificar adicionalmente por conjugación adicional con diversas especies tales como restos terapéuticos, restos de diagnóstico, restos de direccionamiento y similares.

Los conjugados de la invención están formados por la unión enzimática de un azúcar modificado al péptido glicosilado o sin glicosilar. Los sitios de glicosilación proporcionan lugares para la conjugación de grupos de modificación al péptido, p. ej., por glicoconjugación. Un grupo de modificación a modo de ejemplo un polímero soluble en agua, tal como poli(etilenglicol), p. ej., metoxi-poli(etilenglicol). La modificación de los péptidos de EPO

puede mejorar la estabilidad y el tiempo de retención de la EPO recombinante en una circulación del paciente, o reducir la antigenicidad de la EPO recombinante.

Los métodos de la invención hacen posible ensamblar péptidos y glicopéptidos que tienen un patrón de derivación sustancialmente homogéneo. Las enzimas empleadas en la invención son generalmente selectivas para un resto de aminoácido particular o una combinación de restos de aminoácidos del péptido. 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 medios prácticos para la preparación a gran escala de glicopéptidos que tienen patrones de derivatización uniformes preseleccionados.

La presente invención también proporciona conjugados de péptidos glicosilados y sin glicosilar con una mayor vida media terapéutica debido, p. ej., a la reducción de la tasa de aclaramiento, o reducción de la tasa de absorción por el sistema inmunitario o reticuloendotelial (RES). Por otra parte, los métodos de la invención proporcionan medios para enmascarar determinantes antigénicos en los péptidos, reduciendo o eliminando de este modo una respuesta inmunitaria del huésped frente al péptido. La unión selectiva de los agentes de direccionamiento también se puede emplear para dirigir un péptido a un receptor del tejido o superficie celular particular que es específica para el agente de direccionamiento particular.

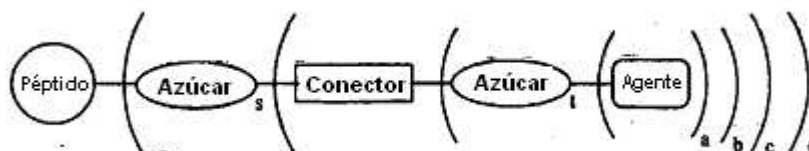
Los conjugados

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un grupo de modificación seleccionado y un péptido de EPO.

La unión entre el péptido y el resto seleccionado incluye un grupo de unión glicosilo intacto interpuesto entre el péptido y el resto seleccionado. El resto seleccionado, tal como se define en las reivindicaciones, da como resultado un "azúcar modificado" que es reconocido por una enzima transferasa apropiada, que añade el azúcar modificado en el péptido. El componente sacárido del azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido y un resto seleccionado, se convierte en un "grupo de unión glicosilo", p. ej. un "grupo de unión glicosilo intacto". El grupo de unión glicosilo se forma a partir de cualquier mono- u oligosacárido que, después de la modificación con el grupo de modificación, es un sustrato para una enzima que añade el azúcar modificado a un resto de aminoácido o de glicosilo de un péptido.

El grupo de unión glicosilo puede ser, o puede incluir, un resto sacárido que se modifica de forma degradativa antes o durante la adición del grupo de modificación. Por ejemplo, grupo de unión glicosilo se puede derivar de un resto sacárido que se produce por degradación oxidativa de un sacárido intacto en el aldehído correspondiente, p. ej., vía a través de la acción de metaperyodato, y posteriormente se convierte en una base de Schiff con una amina apropiada, que se reduce a continuación a la amina correspondiente.

Los conjugados de la invención por lo general corresponderán a la estructura general:



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 un resto soluble en agua, (p. ej., PEG, m-PGE), tal como se describe en las reivindicaciones. El conector puede ser cualquiera de una amplia variedad de grupos de unión, *infra*. Como alternativa, el conector puede ser un enlace sencillo o un "conector de orden cero".

En una realización ilustrativa, el grupo de modificación seleccionado es un polímero soluble en agua. El polímero soluble en agua se une de modo covalente al péptido por medio de un grupo de unión glicosilo. El grupo de unión glicosilo se une de forma covalente a un resto de aminoácido o un resto glicosilo del péptido. La invención también proporciona conjugados en que un resto de aminoácido y un resto glicosilo se modifican con un grupo de unión glicosilo, tal como se describe en las reivindicaciones.

El poli(etilenglicol) es un PEG ramificado que tiene más de un resto PEG unido. Los ejemplos de PEG ramificados se describen en la Patente de EE.UU. Nº 5.932.462; Patente de EE.UU. Nº 5.342.940; Patente de EE.UU. Nº 5.643.575; Patente de EE.UU. Nº 5.919.455; Patente de EE.UU. Nº 6.113.906; Patente de EE.UU. Nº 5.183.660; documento WO 02/09766; Kodera Y., *Bioconjugate Chemistry* 5: 283–288 (1994); y Yamasaki et al., *Agric. Biol. Chem.*, 52: 2125–2127, 1998. En una realización preferida, el peso molecular de cada poli(etilenglicol) del PEG ramificado es igual a o mayor que aproximadamente 40.000 daltons.

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. Empleando los métodos de la invención, es posible formar conjugados peptídicos en que todo

básicamente de los restos del azúcar modificado en toda una población de conjugados de la invención se une a múltiples copias de un resto 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 a través de un grupo de unión glicosilo intacto. En un conjugado preferente de la invención, básicamente cada miembro de la población se une por medio del grupo de unión glicosilo a un resto glicosilo del péptido, y cada resto glicosilo del péptido al que se fija el grupo de unión glicosilo tiene la misma estructura.

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, básicamente cada miembro de la población de restos del polímero soluble en agua se une a un resto de aminoácido del péptido por medio de un grupo de unión glicosilo, y cada resto de aminoácido que tiene un grupo de unión glicosilo unido a este tiene la misma estructura.

También se describen los conjugados análogos a los descritos anteriormente en que el péptido se conjuga a un resto terapéutico, resto diagnóstico, resto de direccionamiento, resto de toxina o similares por medio de un grupo de unión glicosilo intacto. Cada uno de los restos mencionados anteriormente puede ser una molécula pequeña, polímero natural (*p. ej.*, polipéptido) o polímero sintético.

Básicamente, cualquier péptido de eritropoyetina que tiene cualquier secuencia, se puede usar como un componente de los conjugados de la presente invención. En una realización a modo de ejemplo, el péptido tiene la secuencia:

**H₂N-APPRLICDSR VLERYLLEAK EAENITTGCA EHCSLNENIT VPDTKVNIFYA
WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVNSSQPWEP LQLHVDKAVS
GLRSLTLLR ALGAQKEAIS PPDAASAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR
GKLKLYTGEA CRTGD-COOH (SEC ID N°: 1).**

En otra realización a modo de ejemplo el péptido tiene la secuencia:

**H₂N-APPRLICDSR VLERYLLEAK EAENITTGCA EHCSLNENIT VPDTKVNIFYA
WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVNSSQPWEP LQLHVDKAVS
GLRSLTLLR ALGAQKEAIS PPDAASAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR
GKLKLYTGEA CRTGDR-COOH (SEC ID N°: 2).**

En las secuencias de se han expuesto anteriormente, existen dos enlaces disulfuro, uno en la posición C7-C161 otro en la posición C29-C33. Los restos de cisteína se han mostrado anteriormente en fuente cursiva negra.

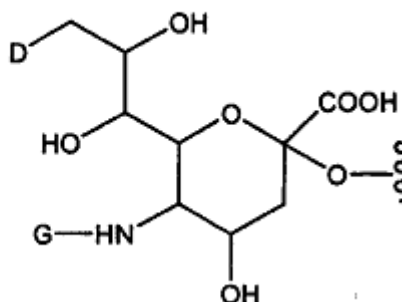
Preferentemente, ningún término se derivatiza.

Los péptidos de la invención incluyen al menos un sitio de glicosilación unido a N o unido a O, que está glicosilado con un resto glicosilo que incluye un resto de PEG. El PEG se une covalentemente al péptido a través de un grupo de unión glicosilo intacto. El resto de unión glicosilo se une covalentemente a un resto de aminoácido o un resto de glicosilo del péptido. Como alternativa, el grupo de unión glicosilo está unido a una o más unidades de glicosilo de un glicopéptido. La invención también proporciona conjugados en que el grupo de unión glicosilo está unido tanto a un resto de aminoácido como a un resto de glicosilo.

El resto de PEG está unido a un conector de glicosilo intacto directamente, o a través de un conector que no es glicosilo, *p. ej.*, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir.

El péptido de eritropoyetina de la invención comprende el resto que se muestra en la Fórmula I:

Fórmula I



En la Fórmula I, D es un miembro seleccionado entre -OH y R¹-L-NH-; G es un miembro seleccionado entre R¹-L- y -C(O)alquilo (C₁-C₆); R¹ es un resto que comprende un miembro seleccionado entre un resto que comprende un resto de poli(etilenglicol) ramificado, tal como se describe en las reivindicaciones, y L es un conector que es un miembro seleccionado entre un enlace, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir 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-.

Las Composiciones

Como se ha analizado anteriormente, la invención proporciona sacáridos que soportan un grupo de modificación, análogos activados de estas especies y conjugados formados entre especies tales como péptidos y un sacárido modificado de la invención.

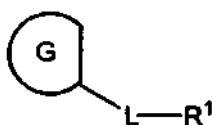
Azúcares modificados

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 es preferentemente un sacárido, un 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 de modificación. El grupo de modificación se conjuga con el resto azúcar, por lo general, a través de la conjugación con una amina, sulfhidrilo o hidroxilo, p. ej., hidroxilo primario, resto en el azúcar. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación se une a través de un resto amina del azúcar, p. ej., 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 de modificación.

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 es ácido siálico. Otros azúcares útiles incluyen amino azúcares tales como el análogo de 5-amina de ácido siálico. 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 de modificación. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un derivado de ácido siálico en que el resto 9-hidroxi se reemplaza con una amina. La amina se derivatiza fácilmente con un análogo activado de un grupo de modificación seleccionado.

En el análisis que sigue a continuación, la invención se ilustra con referencia al uso de los derivados seleccionados de ácido siálico.

En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un amino azúcar modificado que tiene la fórmula:



en que G es un resto glicosilo, L es un enlace o un conector y R¹ es el grupo de modificación. Los enlaces ilustrativos son los que se forman entre un grupo reactivo sobre el resto de glicosilo, p. ej., NH₂, SH, u OH, y un grupo de reactividad complementaria en el grupo de modificación. En consecuencia, los ejemplos de enlaces incluyen, pero no se limitan a NHR¹, OR¹, SR¹ y similares. Por ejemplo, cuando R¹ incluye un resto de ácido carboxílico, este resto se puede activar y acoplar con un resto NH₂ en el resto glicosilo que proporciona un enlace que tiene la estructura NHC(O)R¹. De forma análoga, los grupos OH y SH se pueden convertir en los correspondientes derivados éter o tioéter, respectivamente.

5 Conectores a modo de ejemplo incluyen restos alquilo y heteroalquilo. Los conectores 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 componentes de las especies de la invención, p. ej., entre el resto glicosilo y el conector (L), o entre el conector y el grupo de modificación (R^1). Otros grupos de unión son éteres, tioéteres y aminas. Por ejemplo, en una realización, el conector es un resto de aminoácido, tal como un resto de glicina. El resto de ácido carboxílico de la glicina se convierte en la correspondiente amida por la reacción con una amina en el resto 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 de modificación.

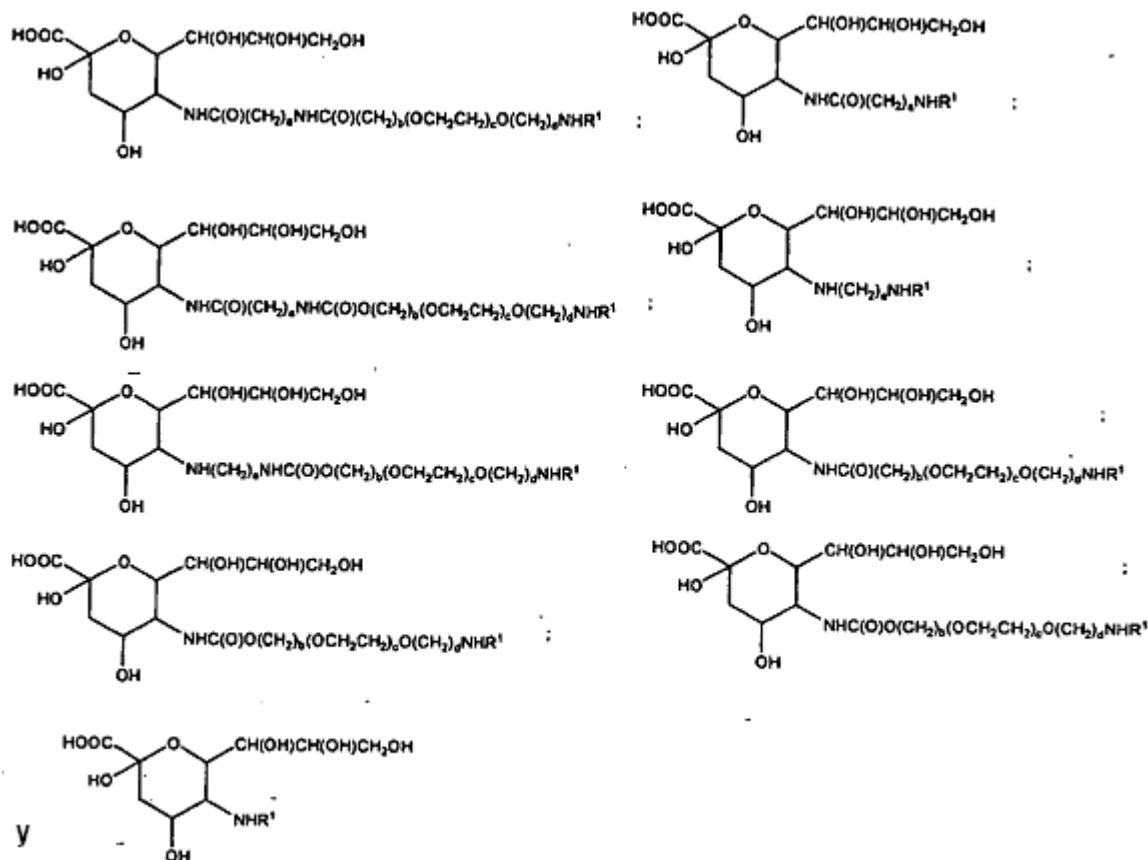
10 Otro ejemplo de conector es un resto de PEG o resto de PEG que está funcionalizado con un resto de aminoácido. El PEG se une al grupo glicosilo a través del resto del aminoácido en un extremo terminal PEG y se une al R^1 a través del otro extremo terminal PEG. De modo alternativo, el resto del aminoácido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

Una especie a modo de ejemplo para $L-R^1$ tiene la fórmula:

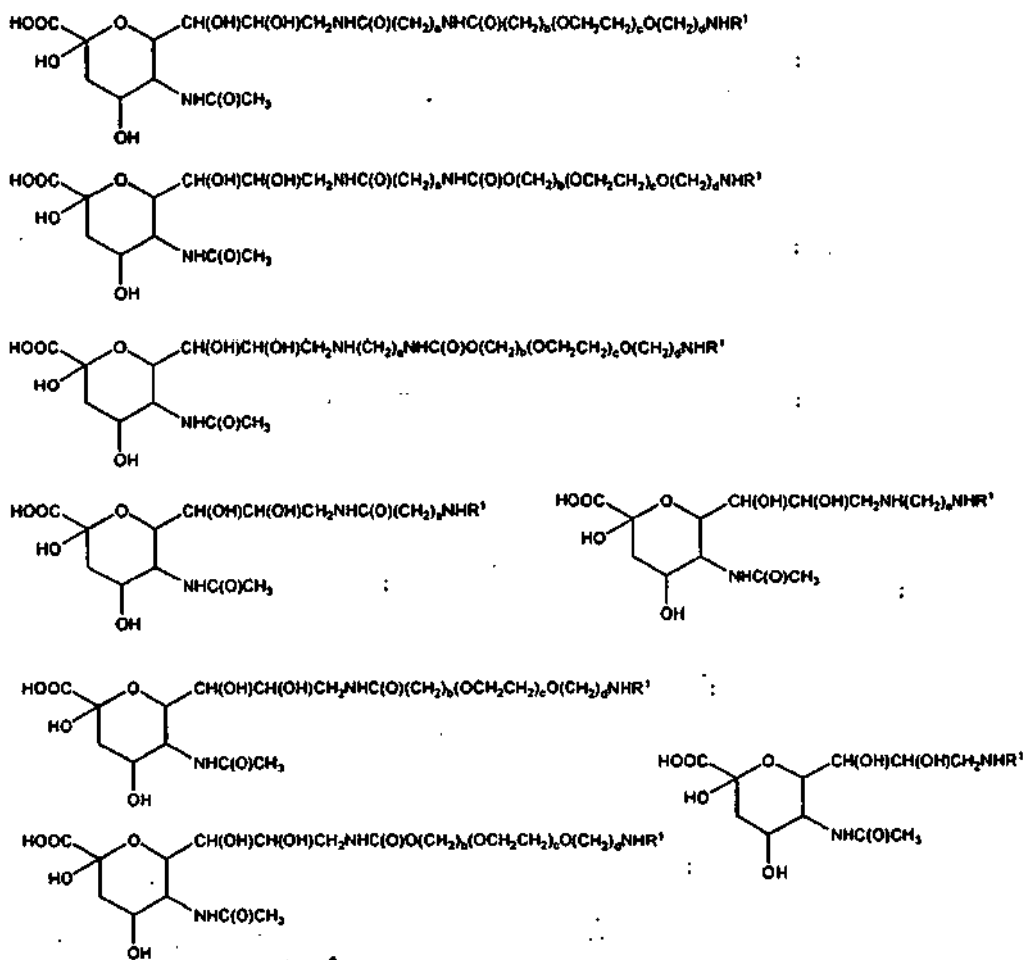
15 $-NH(C(O)CH_2)_aNH(C(O)(CH_2)_bOCH_2CH_2)_cO(CH_2)_dNHR^1$, en que los índices s y t son de modo independiente 0 o 1. Los índices a, b y d son de modo independiente números enteros de 0 a 20, y c es un número entero de 1 a 2500. Otros conectores similares se basan en especies en que el resto $-NH$ se reemplaza, por ejemplo, con $-S$, $-O$ y $-CH_2$.

20 Más particularmente, la invención proporciona compuestos en que $L-R^1$ es: $NHC(O)(CH_2)_aNHC(O)(CH_2)_b(OCH_2CH_2)_cO(CH_2)_dNHR^1$, $NHC(O)(CH_2)_b(OCH_2CH_2)_cO(CH_2)_dNHR^1$, $NHC(O)O(CH_2)_b(OCH_2CH_2)_cO(CH_2)_dNHR^1$, $NH(CH_2)_aNHC(O)(CH_2)_b(OCH_2CH_2)_cO(CH_2)_dNHR^1$, $NHC(O)(CH_2)_aNHR^1$, $NH(CH_2)_aNHR^1$, 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, preferentemente de 1 a 5. El índice c es un número entero de 1 a 2500.

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

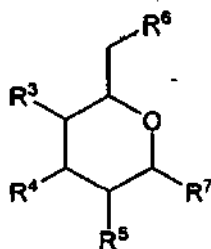


25 En otra realización ilustrativa, un resto hidroxilo primario del azúcar está funcionalizado con el grupo de modificación. Por ejemplo, el 9-hidroxilo del ácido siálico se puede convertir en la amina correspondiente y funcionalizar para proporcionar un compuesto según la invención. Las fórmulas según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



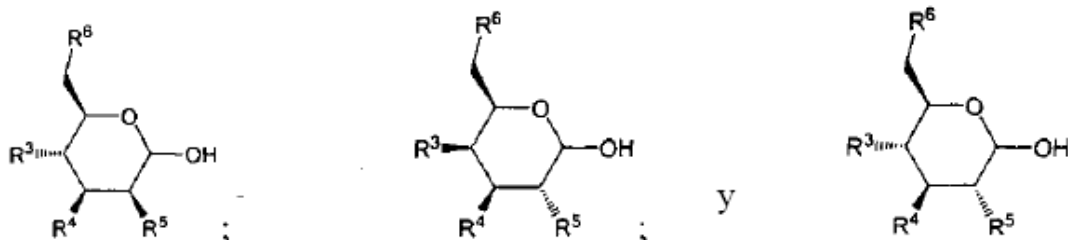
También se describe azúcares modificados en que la posición 6-hidroxilo se convierte en el resto amina correspondiente, que porta un casete de conector-grupo modificador tal como los que expusieron anteriormente. Los ejemplos de grupos sacarilo que se pueden usar como el núcleo de estos azúcares modificados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

5



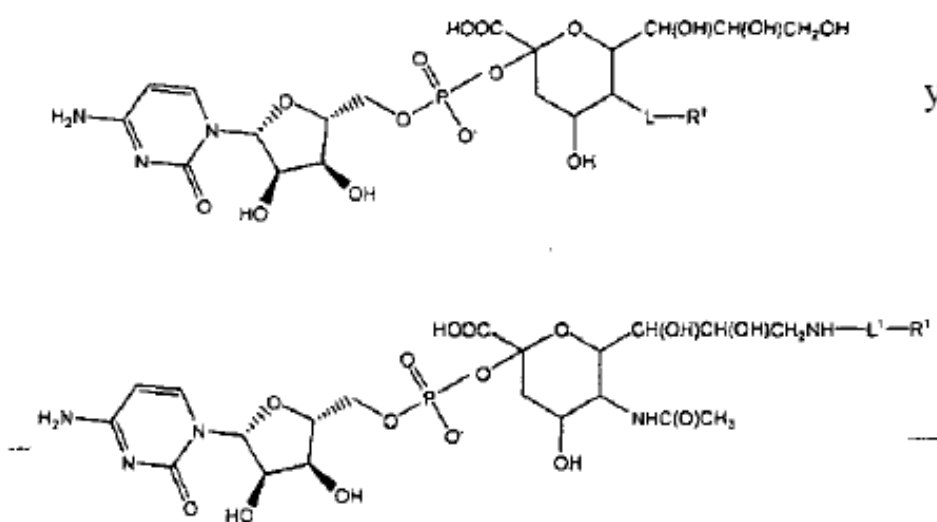
en que R³-R⁵ y R⁷ son miembros seleccionados independientemente entre H, OH, C(O)CH₃, NH, y NH C(O)CH₃. R⁶ es OR¹, NHR¹ o L-R¹, que es como se ha descrito anteriormente.

10 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 a modo de ejemplo, la invención proporciona compuestos tal como se ha expuesto anteriormente que se activan como los correspondientes azúcares de nucleótidos. Los ejemplos de azúcares de nucleótidos que se emplean 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 entre un UDP-glicósido, CMP-glicósido, o un GDP-glicósido. Incluso más preferentemente, la porción de nucleótido del azúcar del nucleótido de azúcar modificado es CMP-ácido siálico. En una realización a modo de ejemplo, el fosfato de nucleótido se une al C-1.

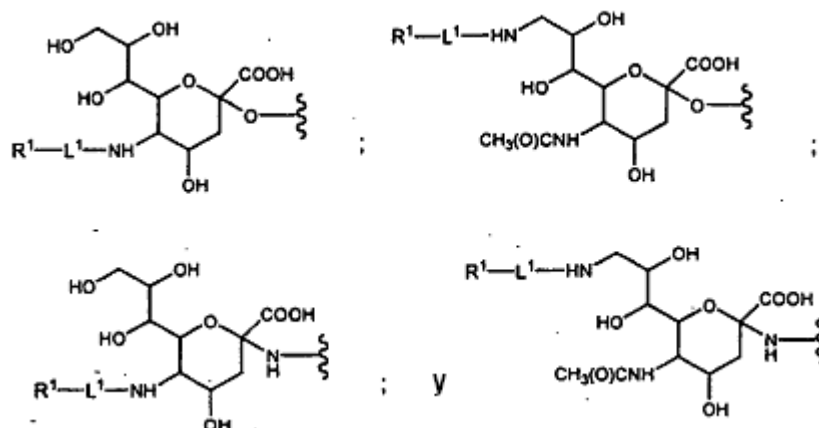
10 Por lo tanto, en una realización ilustrativa en que el resto glicosilo es ácido siálico, la invención proporciona compuestos que tienen las fórmulas:



15 en que L-R¹ es como se ha descrito anteriormente, y L¹-R¹ represente un conector unido al grupo de modificación. De modo similar a L, las especies de conector ilustrativas según L¹ incluyen un enlace, restos alquilo o heteroalquilo. Los ejemplos de compuestos de nucleótidos de azúcar modificado según estas realizaciones se exponen en la FIG. 1 y FIG. 2.

20 En otra realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un conjugado formado entre un azúcar modificado de la invención y un sustrato, p. ej., un péptido, más particularmente entre un azúcar modificado y un resto glicosilo de un glicopéptido. En esta realización, el resto azúcar del azúcar modificado es un grupo de unión glicosilo interpuesto entre el sustrato y el grupo de modificación. 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 (p. ej., metaperyodato de sodio) o enzimáticos (p. ej., oxidasa). Los conjugados seleccionados de la invención incluyen un grupo de modificación que se une al resto amina de un aminosacárido, por ejemplo, manosamina, glucosamina, galactosamina, ácido siálico etc. El ejemplo del grupo de modificación del casete del grupo de unión glicosilo intacto según este motivo se basa en una estructura de ácido siálico, tal como la que tiene las fórmulas:

25



En las fórmulas anteriores, R^1 , L^1 y L^2 son como se han descrito anteriormente.

Grupos de Modificación

Polímeros solubles en agua

- 5 Los polímeros solubles en agua según la invención son poli(etilén) glicoles tal como se describe en las reivindicaciones.

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

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

La presente invención se ilustra con referencia a un conjugado de poli(etilenglicol). Varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación del PEG están disponibles. Véase, *p. ej.*, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.*
20 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 empleando las moléculas reactivas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.672.662 describe un conjugado soluble en agua y aislable de éster activo de un ácido polimérico seleccionado de poli(óxidos de alquileno), poli(polioles oxietilados), poli(alcoholes olefínicos), y
25 poli(acrilomorfolina) lineales o ramificados).

La Patente de EE.UU. N° 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 emplea para formar conjugados con un agente biológicamente activo tal como una proteína o péptido.

El documento WO 99/45964 describe un conjugado que comprende un agente biológicamente activo y un polímero soluble en agua activado que comprende una cadena principal del polímero que tiene al menos un extremo terminal unido a la cadena principal del polímero a través de una unión estable, en donde al menos un extremo terminal comprende un resto de ramificación que tiene grupos reactivos proximales unidos al resto de ramificación, en que el agente biológicamente activo se une a al menos uno de los grupos reactivos proximales. Otros poli(etilenglicoles) ramificados se describen en el documento WO 96/21469. La Patente de EE.UU. N° 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 de EE.UU. N° 5.446.090 describe un conector de PEG bifuncional y su uso para formar conjugados que tienen un péptido en cada uno de los extremos terminales del conector PEG.
30
35
40

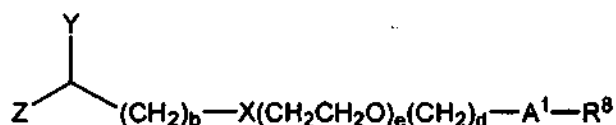
Los conjugados que incluyen uniones de PEG degradables se describen en el documento WO 99/34833; y el documento WO 99/14259, así como en la Patente de EE.UU. N° 6.348.558. Dichas uniones degradables son

aplicables en la presente invención.

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 memoria y también para la conjugación de estos polímeros ramificados con otras especies, p. ej., azúcares, nucleótidos de azúcar y similares.

5

Las moléculas a modo de ejemplo de poli(etilenglicol) de uso en la invención incluyen, no se limitan a, las que tienen la fórmula:



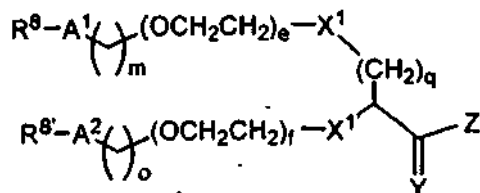
en que R⁸ es H, OH, NH₂, alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, p. ej., acetal, OHC-, H₂N-(CH₂)_q-, HS-(CH₂)_q, o -(CH₂)_qC(Y)Z¹. El índice "e" 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, NH₂, grupos salientes, p. ej., imidazol, p-nitrofenilo, HOBT, tetrazol, haluro, S-R⁹, la porción alcohol de ésteres activados; -(CH₂)_pC(Y¹)V, o -(CH₂)_pU(CH₂)_pC(Y¹)_v. El símbolo Y representa H(2), =O, =S, =N-R¹⁰. Los símbolos X, Y, Y¹, A¹, y U de modo independiente representan los restos O, S, N-R¹¹. El símbolo V representa OH, NH₂, halógeno, S-R¹², 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 R⁹, R¹⁰, R¹¹ y R¹² representan de modo independiente H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

10

15

20

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 descritos en la siguiente fórmula:

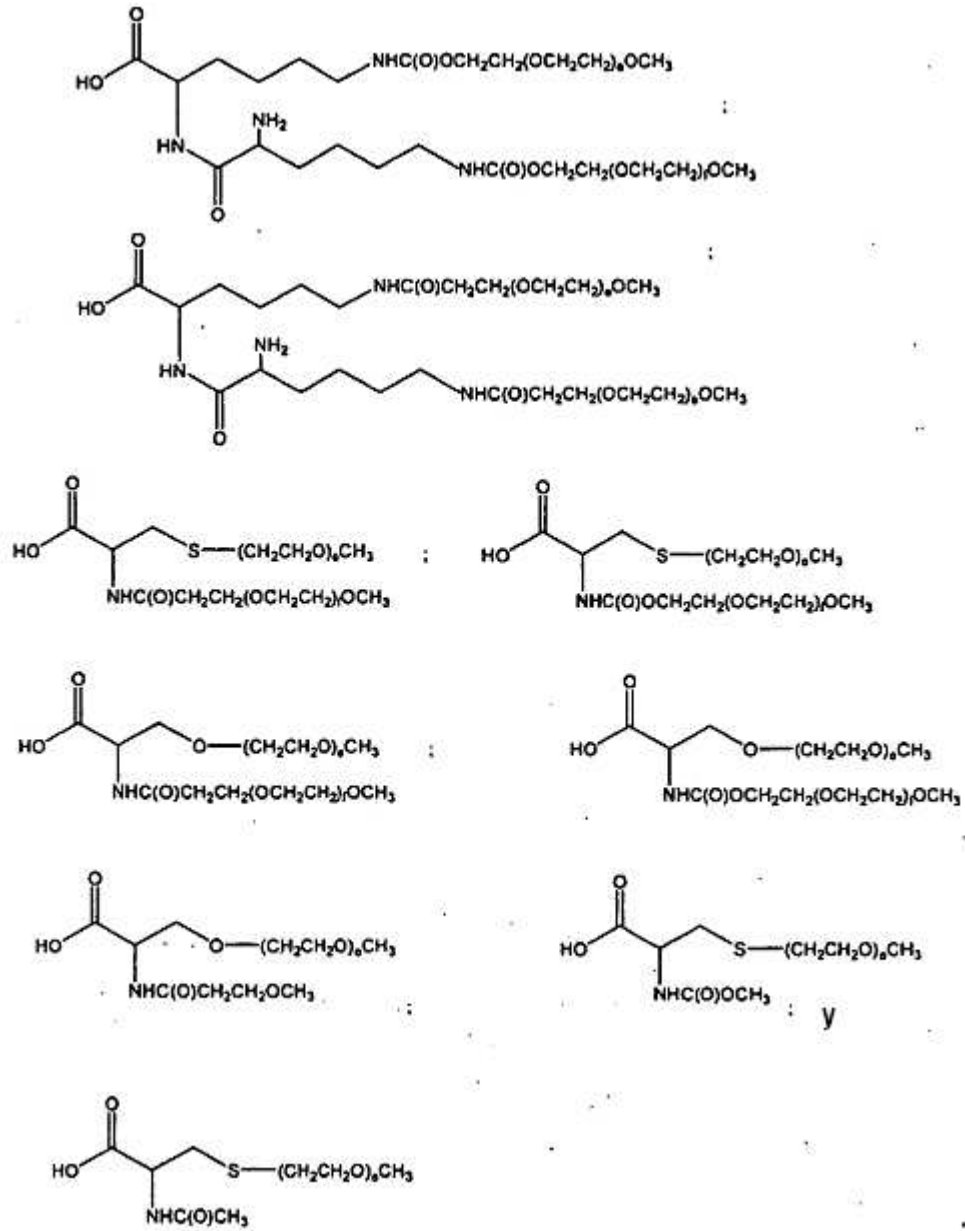


en que R⁸ y R^{8'} son miembros seleccionados de modo independiente de los grupos definidos para R⁸, anterior. A¹ y A² son miembros seleccionados de modo independiente de los grupos definidos para A¹, anteriores. Los índices e, f, o, y q son como se describieron anteriormente. Z e Y son como se describieron 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)NH.

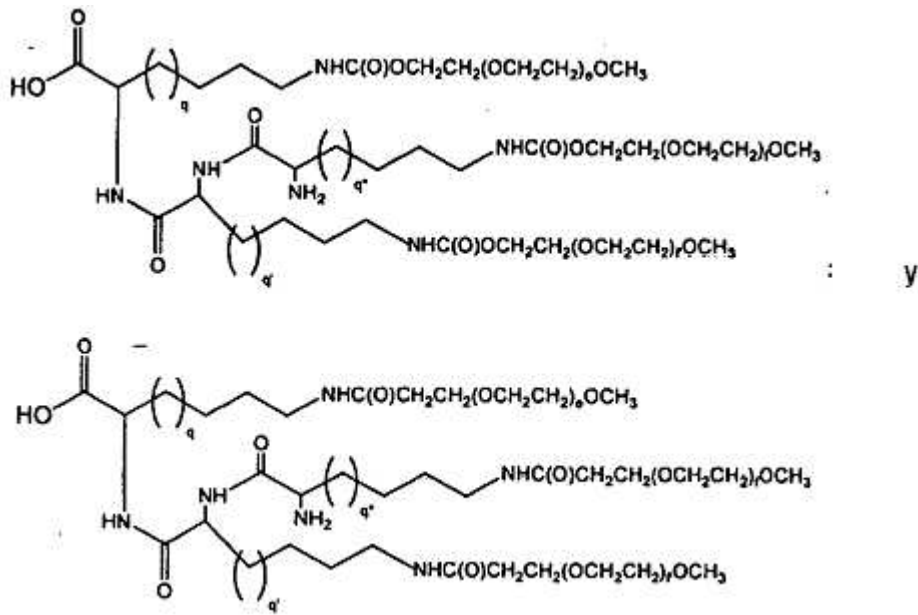
25

30

En otras realizaciones a modo de ejemplo, el PEG ramificado se basa en un núcleo de cisteína, serina o di-lisina. Por lo tanto, PEG ramificados adicionales a modo de ejemplo 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 según esta realización tienen las fórmulas:

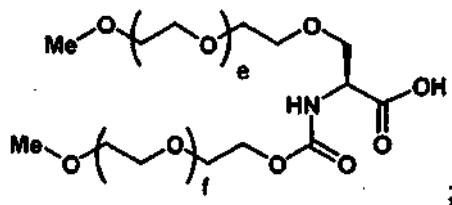


en que e, f y f' son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 2500; y q, q' y q'' son números enteros seleccionados de modo independiente de 1 a 20.

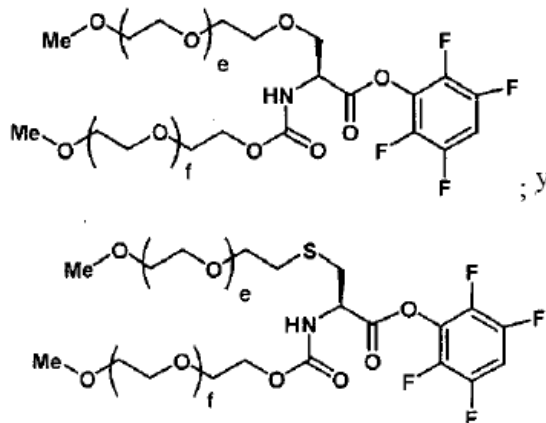
5 En realizaciones a modo de ejemplo de la invención, el PEG es m-PEG (5 kD, 10 kD, o 20 kD). Una especie de PEG ramificado a modo de ejemplo es una serina o cisteína-(m-PEG)₂ en que el m-PEG es un m-PEG de 20 kD.

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-amina mostrada como no modificada en la estructura anterior. De modo similar, el uso de una tri-lisina funcionalizada con tres o cuatro subunidades poliméricas está dentro del alcance de la invención.

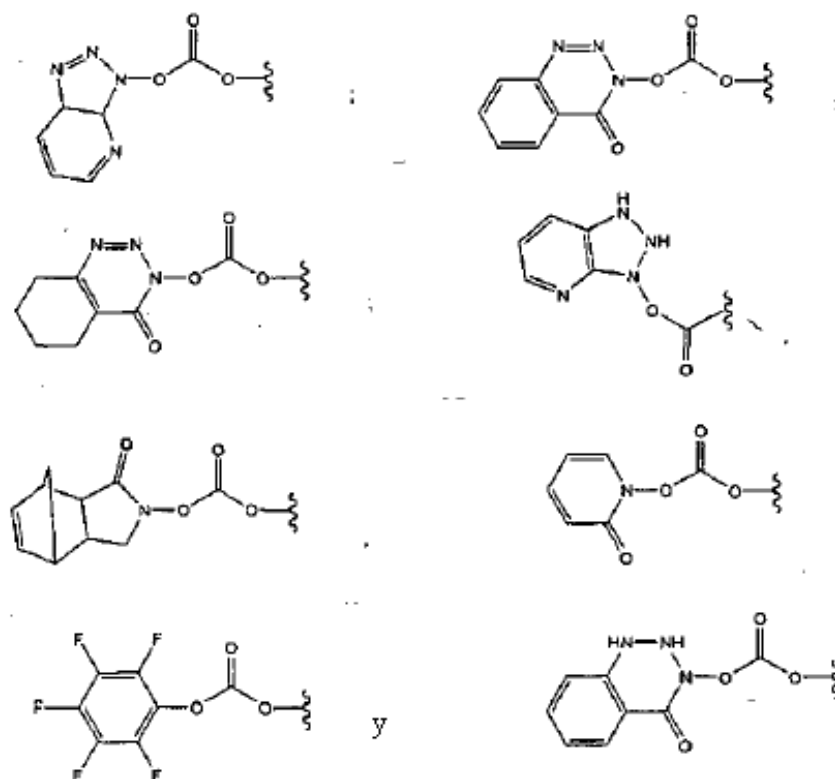
Las realizaciones específicas según la invención incluyen:



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



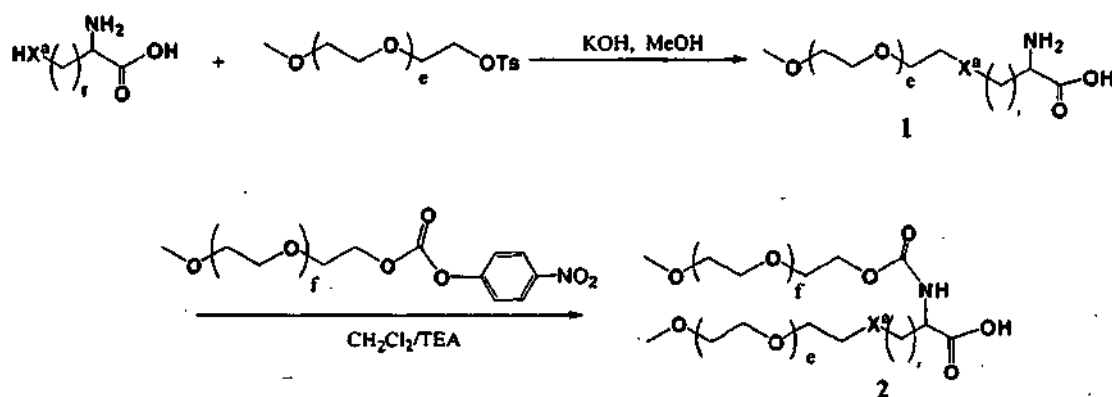
Otros grupos activadores o salientes, apropiados para activar los PEG lineales y ramificados para uso en la preparación de los compuestos expuestos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a las especies:



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

10 Los expertos en la técnica observarán 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. Sin embargo, estos polímeros no entran dentro del alcance de la invención. Además, las estructuras anteriores se modifican fácilmente mediante la inserción de los conectores 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 memoria se preparan fácilmente por métodos tales como los expuestos en el siguiente esquema:



15 en que X^a 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.

En consecuencia, según 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, p. ej., N-hidroxisuccinimida, etc., o el ácido se puede activar *in situ* empleando un agente deshidratante tal como dicitohexilcarbodiimida, carbonildiimidazol, etc.

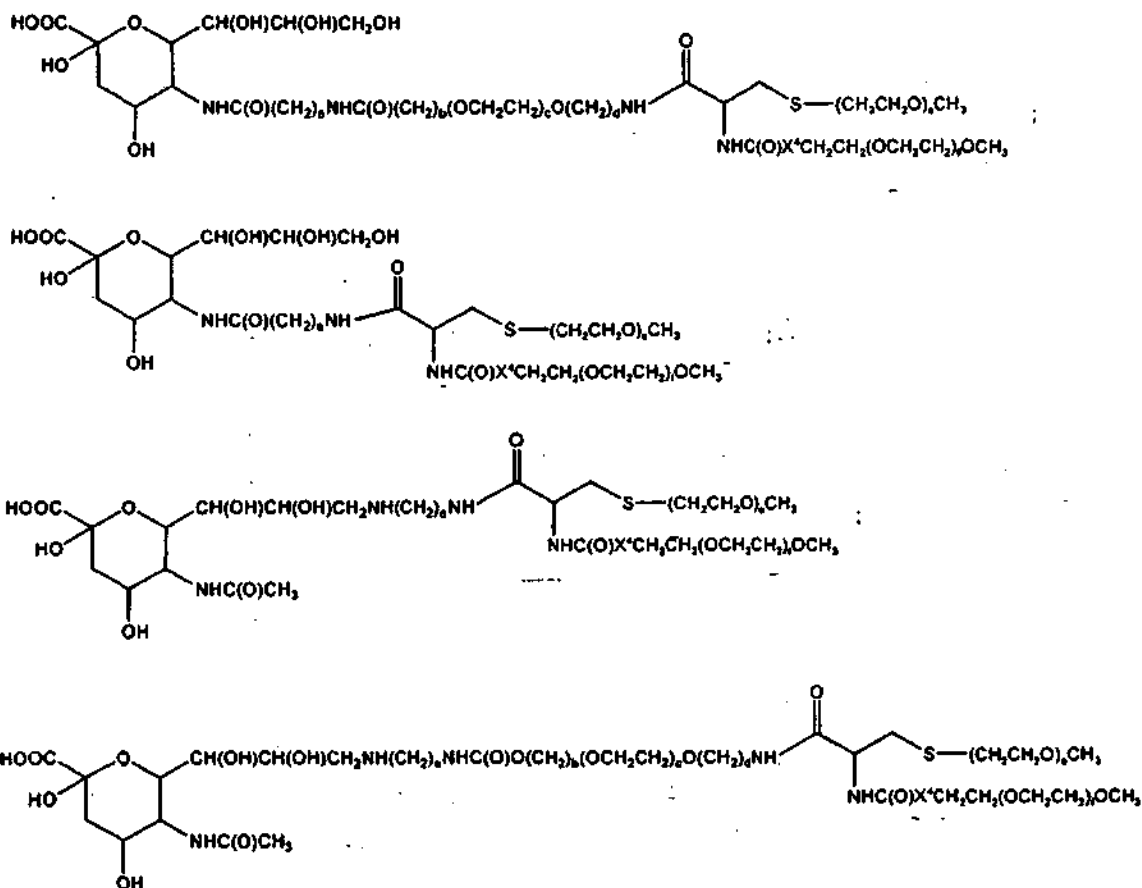
En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación es un resto de PEG. El azúcar modificado está formado por medios enzimáticos, medios químicos o una combinación de estos, de este modo se produce un azúcar modificado. En una realización ilustrativa, los azúcares están sustituidos con una amina activa en cualquier posición que permite la unión del resto de modificación, aun todavía permite que el azúcar actúe como un sustrato para una enzima capaz de acoplar el azúcar modificado al péptido. Por ejemplo, cuando la galactosamina es el azúcar modificado, el resto amina se puede unir al átomo de carbono en la posición 6.

La presente invención también proporciona azúcares de nucleótido en que el resto de azúcar está modificado. 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, p. ej., 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 de modificación) se puede conjugar enzimáticamente a un péptido (u otras especies) y el resto de sacaril amina libre posteriormente conjugado a un grupo de modificación 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, p. ej., un péptido, glicopéptido, aglicona, etc.

En una realización en que el núcleo de sacárido es galactosa o glucosa, R⁵ es NHC(O)Y.

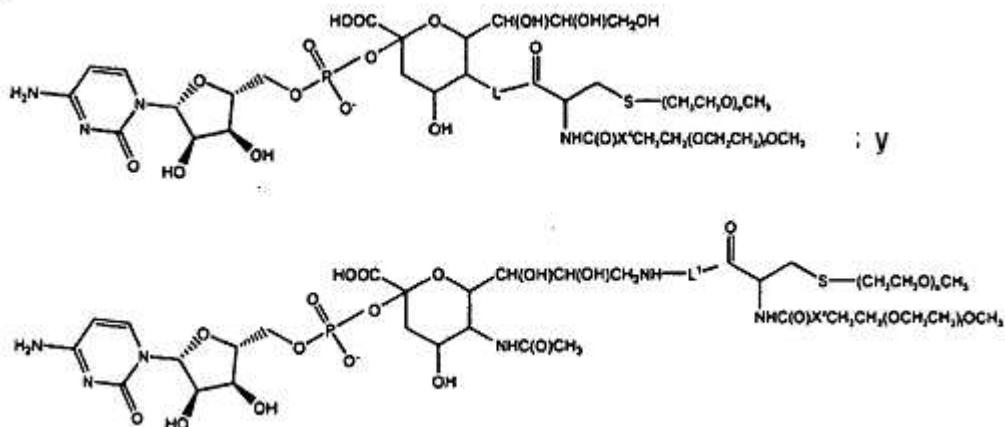
En otras realizaciones a modo de ejemplo, el resto de amida está reemplazado con un grupo tal como un uretano o una urea.

Además, realizaciones adicionales, R¹ es un PEG ramificado, por ejemplo, una de las especies que se han expuesto anteriormente. Los compuestos ilustrativos según esta realización incluyen:



en que X⁴ es un enlace u O.

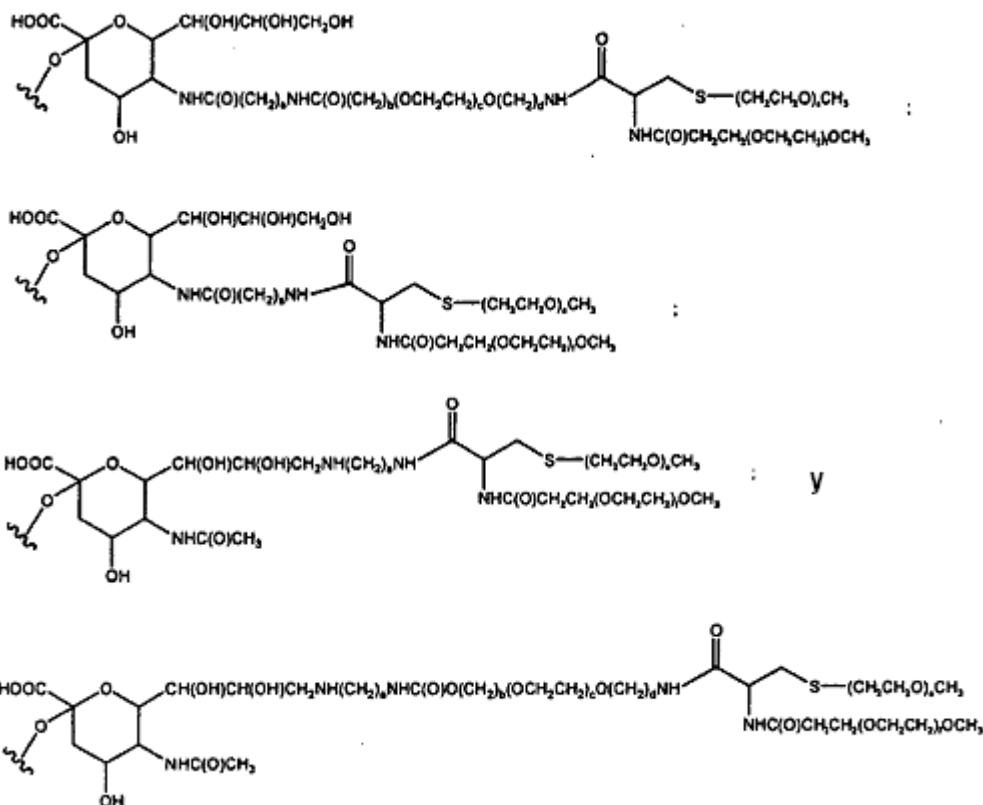
Además, como se ha analizado anteriormente, la presente invención proporciona azúcares de nucleótido que están modificados con un polímero soluble en agua, que es de cadena lineal o ramificada. Por ejemplo, compuestos que tienen la fórmula que se muestra a continuación están dentro del alcance de la presente invención:



5

en que X⁴ es O o un enlace.

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



10 Polímeros insolubles en agua

Los conjugados de la invención también pueden incluir uno o más polímeros insolubles en agua. Esta realización de la invención se ilustra con el uso del conjugado como un vehículo con el que se administra un péptido terapéutico de una manera controlada. Los sistemas de administración de fármacos poliméricos son conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Dunn *et al*, Eds. POLIMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Los expertos en la técnica observarán que

15

básicamente cualquier sistema de administración de fármacos conocidos es aplicable a los conjugados de la presente invención.

5 Los polímeros insolubles en agua representativos incluyen, pero no se limitan a, polifosfazinas, poli (alcoholes de vinilo), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poli(acrilamidas, polialquilen glicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo) polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli (acetato de vinilo), cloruro de polivinilo, poliestireno, polivinil pirrolidona, plurónicos y polivinilfenol y copolímeros de los mismos.

15 Los polímeros naturales modificados sintéticamente de uso en conjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, alquil celulosas, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, y nitrocelulosas. Los miembros particularmente preferentes de las amplias clases de polímeros naturales modificados sintéticamente incluyen, pero no se limitan a, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboximetil celulosa, triacetato de celulosa, sal sódica de sulfato de celulosa, y polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos y ácido algínico.

20 Estos y los otros polímeros que se analizan en la presente memoria se pueden obtener fácilmente de fuentes comerciales tales como Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.), Polysciences (Warrenton, PA.), Aldrich (Milwaukee, WI.), Fluka (Ronkonkoma, NY), y BioRad (Richmond, CA), o también se pueden sintetizar a partir de monómeros obtenidos de estos proveedores empleando técnicas convencionales.

25 Polímeros biodegradables representativos de usar los conjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, polilactidas, poliglicólidos y copolímeros de los mismos, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), poli(lactida-co-glicólido), polianhídridos, polioctoésteres, mezclas y copolímeros de los mismos. Son de uso particular composiciones que forman geles, tales como los que incluyen colágeno, plurónicos, y similares.

30 Los polímeros de uso en la invención incluyen polímeros "híbridos" que incluyen materiales insolubles en agua que tienen dentro de al menos una porción de su estructura, una molécula bioreabsorbible. Un ejemplo de dicho polímero es uno que incluye un copolímero insoluble en agua, que tiene una región bioreabsorbible, una región hidrófila y una pluralidad de grupos funcionales que se pueden reticular por cadena polimérica.

35 Para fines de la presente invención, "materiales insolubles en agua" incluye materiales que son básicamente insolubles en agua o entornos que contienen agua. Por lo tanto, aunque determinadas regiones o segmentos del copolímero pueden ser hidrofílicos o incluso solubles en agua, la molécula de polímero, en su conjunto, no se disuelve en agua en ninguna medida sustancial.

Para fines de la presente invención, la expresión "molécula bioreabsorbible" incluye una región que es capaz de ser metabolizada o descompuesta y reabsorbida y/o eliminada a través de rutas excretoras normales por el organismo. Dichos metabolitos o productos de descomposición preferentemente son básicamente no tóxicos para el organismo.

40 La región bioreabsorbible puede ser hidrófoba o hidrófila, siempre que la composición del copolímero en su conjunto no se traduzca en soluble en agua. Por lo tanto, la región bioreabsorbible se selecciona en base a la preferencia de que el polímero, como un conjunto, permanezca insoluble en agua. Por consiguiente, las propiedades relativas, es decir, las clases de grupos funcionales contenidas por, y las proporciones relativas de la región bioreabsorbible, y la región hidrófila se seleccionan para asegurar que las composiciones bioreabsorbibles útiles permanezcan insolubles en agua.

45 Polímeros bioreabsorbibles a modo de ejemplo incluyen, p. ej., copolímeros del bloque reabsorbibles producidos de forma sintética de poli(ácido α -hidroxi-carboxílico)/poli(oxialquileno), (véase, Conn *et al.*, Patente de EE.UU. Nº 4.826.945). Estos copolímeros no están reticulados y son solubles en agua de modo que el organismo puede excretar las composiciones degradadas de copolímero del bloque. Véase, Younes *et al.*, *J Biomed. Mater. Res.* **21**: 1301-1316 (1987); y Conn *et al.*, *J Biomed. Mater. Res.* **22**: 993-1009 (1988).

50 Polímeros bioreabsorbibles preferentes en la actualidad incluyen uno o más componentes seleccionados entre poli(ésteres), poli(hidroxi ácidos), poli(lactonas), poli(amidas), poliéster-amidas), poli (aminoácidos), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(fosfazinas), poli(fosfoésteres), poli(tioésteres), polisacáridos y mezclas de los mismos. Aún más preferentemente, el polímero bioreabsorbible incluye un componente de poli(hidroxi) ácido. De los poli(hidroxi) ácidos, son preferentes ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido policaproico, ácido polibutírico, ácido polivalérico y copolímeros y mezclas de los mismos.

Además de formar fragmentos que se absorben *in vivo* ("bioreabsorbidos"), los revestimientos poliméricos preferentes para uso en los métodos de la invención también pueden formar un fragmento excretable y/o

metabolizable.

También se pueden usar en la presente invención copolímeros de orden superior. Por ejemplo, Casey *et al.*, Patente de EE.UU. N° 4.438.253, que se expidió el 20 de marzo de 1984, desvela copolímeros tri-bloque producidos a partir de la transesterificación de poli(ácido glicólico) y un poli(alquilen glicol) terminado en hidroxilo. Dichas composiciones se describen para uso como suturas monofilamento reabsorbibles. La flexibilidad de dichas composiciones se controla por la incorporación de un ortocarbonato aromático, tal como ortocarbonato de tetra-p-tolilo en la estructura de copolímero.

También se pueden usar otros polímeros basados en ácidos láctico y/o glicólico. Por ejemplo, Spinu, Patente de EE.UU. N° 5.202.413, que se expidió el 13 de abril de 1993, describe copolímeros multibloque biodegradables que tienen bloques de polilactida y/o poliglicólido ordenados secuencialmente producidos mediante polimerización por apertura del anillo de lactida y/o glicólido en un resto de diol oligomérico o diamina seguido de extensión de la cadena con un compuesto difuncional, tal como, un diisocianato, diacilcloruro o diclorosilano.

Las regiones bioreabsorbibles de revestimientos útiles en la presente invención se pueden diseñar para que sean hidrolíticamente y/o enzimáticamente escindibles. Para fines de la presente invención, "hidrolíticamente escindible" se refiere a la susceptibilidad del copolímero, especialmente la región bioreabsorbible, a la hidrólisis en agua o en un entorno que contiene agua. De forma análoga, "enzimáticamente escindibles", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la susceptibilidad del copolímero, especialmente la región bioreabsorbible, para escindirse mediante enzimas endógenas o exógenas.

Cuando se coloca dentro del organismo, la región hidrófila se puede procesar en fragmentos excretables y/o metabolizables. Por lo tanto, la región hidrófila puede incluir, por ejemplo, poliéteres, óxidos de polialquileno, polioles, poli (vinil pirrolidina), poli(alcohol de vinilo), poli(alquil oxazolinas), polisacáridos, hidratos de carbono, péptidos, proteínas y copolímeros y mezclas de los mismos. Además, la región hidrófila también puede ser, p. ej., un óxido de poli(alquileno). Dichos óxidos de poli(alquileno) pueden incluir, p. ej., óxido de poli(etileno), óxido de poli(propileno) y mezclas y copolímeros de los mismos.

Polímeros que son componentes de hidrogeles también son útiles en la presente invención. Los hidrogeles son materiales poliméricos que son capaces de absorber cantidades relativamente grandes de agua. Ejemplos de compuestos que forman hidrogeles incluyen, pero no se limitan a, ácidos poliacrílicos, carboximetilcelulosa sódica, alcohol de polivinilo, polivinil pirrolidina, gelatina, carragenano y otros polisacáridos, ácido hidroxietilmetacrílico (HEMA), así como derivados de los mismos, y similares. Se pueden producir hidrogeles que son estables, biodegradables y bioreabsorbibles. Además, las composiciones de hidrogel pueden incluir subunidades que presentan una o más de estas propiedades.

Las composiciones biocompatibles de hidrogel cuya integridad se puede controlar a través de reticulación son conocidas y actualmente son preferentes para su uso en los métodos de la invención. Por ejemplo, Hubbell *et al.*, Patentes de EE.UU. N° 5.410.016, que se expidió el 25 de abril de 1995 y N° 5.529.914, que se expidió el 25 de junio de 1996, describen sistemas solubles en agua, que son copolímeros del bloque reticulados que tienen un segmento del bloque central soluble en agua-intercalado entre los extensiones hidrolíticamente lábiles. Dichos copolímeros están protegidos en el extremo con funcionalidades de acrilato fotopolimerizable. Cuando están reticulados, estos sistemas se convierten en hidrogeles. El bloque central soluble en agua de dichos copolímeros puede incluir poli(etilenglicol); mientras que, las extensiones hidrolíticamente lábiles pueden ser un poli(α -hidroxi ácido), tal como ácido poliglicólico o ácido poliláctico. Véase, Sawhney *et al*, *Macromolecules* **26**: 581-587 (1993).

En otra realización preferida, el gel es un gel termoreversible. En la actualidad, son preferentes los geles termoreversibles que incluyen componentes, tales como plurónicos, colágeno, gelatina, ácido hialurónico, polisacáridos, hidrogel de poliuretano, hidrogel de poliuretano-urea y combinaciones de los mismos.

En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado de la invención incluye un componente de un liposoma. Los liposomas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Eppstein *et al.*, Patente de EE.UU. N° 4.522.811, que se expidió el 11 de junio de 1985. Por ejemplo, se pueden preparar formulaciones de liposomas por disolución de lípido o lípidos apropiados (tal como esteroil fosfatidil etanolamina, esteroil fosfatidil colina, aracadoil fosfatidil colina, y colesterol) en un disolvente orgánico que a continuación se evaporó, dejando atrás una película fina de lípido seco sobre la superficie del envase. Una solución acuosa del compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable se introduce a continuación en el envase. El envase se gira a mano para liberar el material lípido de los lados del envase y para dispersar los agregados lipídicos, formando de este modo la suspensión de liposomas.

Las micropartículas y los métodos de preparación de las partículas que se han mencionado anteriormente se ofrecen a modo de ejemplo y no pretenden definir el alcance de las micropartículas de uso en la presente invención. Será evidente para los expertos en la técnica que una matriz de micropartículas, fabricada con diferentes métodos, es de uso en la presente invención.

Los formatos estructurales que se han analizado anteriormente en el contexto de los polímeros solubles en agua, tanto de cadena lineal como ramificados por lo general también son aplicables con respecto a los polímeros

insolubles en agua. Por lo tanto, por ejemplo, los núcleos de ramificación de cisteína, serina, dilisina, y trilisina se pueden funcionar con los restos poliméricos insolubles en agua. Los métodos usados para producir estas especies por lo general son muy análogos a los usados para producir los polímeros solubles en agua.

Los Métodos

5 Además de los conjugados que se han analizado anteriormente, la presente invención proporciona métodos para preparar estos y otros conjugados. Por otra parte, la invención proporciona métodos para prevenir, curar o mejorar 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.

10 Por lo tanto, la invención proporciona un método de formación de un conjugado covalente entre un resto seleccionado y un péptido, una aglicona (por ejemplo, ceramida o esfingosina).

15 En realizaciones a modo de ejemplo, el conjugado se forma entre un polímero soluble en agua, como se describe en las reivindicaciones y un péptido glicosilado o sin glicosilar. El polímero, resto terapéutico o biomolécula se conjuga con el péptido a través de un grupo de unión glicosilo, que está interpuesto entre, y unido covalentemente al péptido y el grupo de modificación (por ejemplo, polímero soluble en agua). El método incluye poner en contacto el péptido 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 (u otro sustrato). El resto de azúcar del azúcar modificado se selecciona preferentemente entre azúcares de nucleótidos.

20 El péptido aceptor por lo general se sintetiza de novo, o se 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 péptido puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento. Por otra parte, el péptido puede ser un péptido de tipo silvestre o mutado. En una realización a modo de ejemplo, el péptido incluye una mutación que añade uno o más sitios de glicosilación unidos a N o a O a la secuencia peptídica.

25 El método de la invención también proporciona la modificación de péptidos glicosilados de forma incompleta que se producen de forma recombinante. Muchas glicoproteínas producidas de forma recombinante son restos de hidratos de carbono glicosilados de forma incompleta que pueden tener propiedades indeseables, por ejemplo, inmunogenicidad, reconocimiento por el RES. Empleando 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 similar. El resto de azúcar del azúcar modificado puede ser el resto que se conjugaría apropiadamente con el aceptor en un péptido totalmente glicosilado, u otro resto de azúcar con propiedades deseables.

30 Los expertos en la técnica observarán que la invención se puede poner en práctica empleando básicamente porque el péptido o glicopéptido a partir de cualquier fuente. Péptidos a modo de ejemplo con los que se puede poner en práctica la invención se exponen el documento WO 03/031464, y las referencias se exponen en el mismo.

35 Los péptidos modificados por los métodos de la invención pueden ser péptidos sintéticos o de tipo silvestre o pueden ser péptidos mutados, producidos por métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio. La glicosilación de péptidos por lo general está unida a N o unida a O. Un ejemplo de unión a N es la unión del azúcar modificado a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de un resto de hidrato de carbono 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 unida 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-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

45 Por consiguiente, además de péptidos, los métodos de la presente invención se podrían poner en práctica con otras estructuras biológicas (*por ejemplo*, glicolípidos, lípidos, esfingoides, ceramidas, células enteras, y similares, que contienen un sitio de glicosilación).

50 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, preferentemente restos de serina o treonina, dentro de la secuencia del péptido (para sitios de glicosilación unidos a O). La adición se puede hacer por mutación o por síntesis química completa del péptido. La secuencia de aminoácidos del péptido se altera preferentemente a través de cambios a nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el péptido en las bases preseleccionadas de modo que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La mutación o mutaciones del ADN se obtienen preferentemente empleando métodos conocidos en la técnica.

55

En una realización a modo de ejemplo, el sitio de glicosilación se añade mediante la transposición de polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican un péptido candidato se pueden modular con 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. Véase, por ejemplo, Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751 (1994); Stemmer, *Nature* 370: 389-391 (1994) y Patente de EE.UU. N° 5.605.793, N° 5.837.458, N° 5.830.721 y N° 5.811.238.

Péptidos a modo de ejemplo con los que la presente invención se puede poner en práctica, métodos de edición o eliminación de sitios de glicosilación, y adición o eliminación de estructuras o subestructuras de glicosilo se describen con detalle en el documento WO03/031464 y las solicitudes relacionadas de EE.UU. y PCT.

La presente invención también proporciona medios de adición (o eliminación) de uno o más restos de glicosilo seleccionados a un péptido, después de lo cual un azúcar modificado está conjugado con al menos uno de los restos de glicosilo seleccionados del péptido. La presente realización es útil, por ejemplo, cuando se desea conjugar el azúcar modificado a un resto de glicosilo seleccionados que no está presente en un péptido o no está presente en una cantidad deseada 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 resto de glicosilo seleccionado está conjugado con el péptido 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 resto de hidrato de carbono del glicopéptido. Véase, por ejemplo el documento WO 98/31826.

La adición o la eliminación de cualquier resto de hidrato de carbono presente en el glicopéptido se consigue químicamente o enzimáticamente. La desglicosilación química se lleva a cabo preferentemente por exposición de la variante de polipéptido al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la extensión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), a la vez que se deja el péptido intacto. La desglicosilación química describe en Hakimuddin *et al*, *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 (1987) y en Edge *et al*, *Anal. Biochem.* 118: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en variantes de polipéptidos se puede conseguir mediante el uso de una diversidad de endo- y exo-glicosidasas tal como se describe en Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* 138: 350 (1987).

La adición química de restos de glicosilo se realiza mediante cualquier método reconocido en la técnica. La adición enzimática de restos de azúcar se consigue preferentemente empleando una modificación de los métodos que se exponen en la presente memoria, sustituyendo unidades de glicosilo nativo por los azúcares modificados usados en la invención. Otros métodos y adición de restos de azúcar se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.876.980, N° 6.030.815, N° 5.728.554, y N° 5.922.577.

Los ejemplos de puntos de unión para restos de glicosilo seleccionados incluyen, pero no se limitan a: (a) sitios de consenso para la glicosilación unida a N y sitios de glicosilación unida 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) restos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina, o triptofano, o (h) el grupo amida de la glutamina. Los métodos a modo de ejemplo de uso en la presente invención se describen en el documento WO 87/05330 publicado en 11 de septiembre 1987, y Aplin y Wriston, *CRC CRIT. REV. BIOCHEM.*, pp. 259-306 (1981).

Además, se describe un método para unir dos o más péptidos a través de un grupo de unión. El grupo de unión es de cualquier estructura útil y se puede seleccionar entre estructuras de cadena lineal y ramificada. Preferentemente, cada término del conector, que está unido a un péptido, incluye un azúcar modificado (es decir, de unión a glicósido intacto emergente).

En un método descrito, dos péptidos o se unen entre sí a través de un resto conector que incluye un polimérico (por ejemplo, conector de PEG). El constructor se ajusta a la estructura general que se ha expuesto en el dibujo anterior. Tal como se describe en la presente memoria, el constructor de la invención incluye dos grupos de unión a glicosilo intactos (es decir, $s + 1 = 1$). El enfoque sobre un conector de PEG que incluye dos grupos glicósidos para fines de claridad y no se debería interpretar como limitante de la identidad de ramas del conector de uso en la presente realización.

[0206] Por lo tanto, un resto PEG está funcionalizado en un primer término con una primera unidad de glicosilo y en un segundo término con una segunda unidad de glicósido. Las primera y segunda unidades de glicosilo son preferentemente sustratos para diferentes transferasas, lo que permite la unión ortogonal del primer y segundo péptidos a la primera y segunda unidades de glicosilo, respectivamente. En la práctica, el conector (glicosil)¹-PEG-(glicosil)² se pone en contacto con el primer péptido y una primera transferasa para la que la primera unidad de glicosilo es un sustrato y una primera transferasa para la que la primera unidad de glicosilo es un sustrato, formando de este modo (péptido)¹-(glicosilo)¹-PEG-(glicosilo)². A continuación, la transferasa y/o el péptido sin reaccionar se retiran opcionalmente de la mezcla de reacción. El segundo péptido y una segunda transferasa para la que la segunda unidad de glicosilo es un sustrato se añade al conjugado de (péptido)¹-(glicosilo)¹-PEG-(glicosilo)²,

formando (péptido)¹-(glicosilo)¹-PEG-(glicosilo)²-(péptido)²; al menos uno de restos de glicosilo está unido directa o indirectamente a O. Los expertos en la técnica observada que el método que se ha descrito anteriormente también es aplicable para formar conjugados entre más de dos péptidos, por ejemplo, mediante el uso de un PEG ramificado, dendrímero, poli(aminoácido), polisacáridos o similares.

5 Preparación de Azúcares Modificados

En general, el resto de azúcar o casete conector-resto de azúcar y el PEG o grupos casete PEG-conector 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 reactivas. El grupo o grupos funcionales reactivos de azúcar se ubican 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 evolucionan en condiciones relativamente moderadas. Estas incluyen, pero no se limitan a sustituciones 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 analizan, *p. ej.*, en March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney *et al.*, *MODIFICATION OF PROTEINS*; *Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Los grupos funcionales reactivos útiles colgantes de un núcleo de azúcar o grupo de modificación, incluyen, pero no se limitan a:

- (a) grupos carboxilo y diversos derivados de estos que incluyen, pero no se limitan a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, imidazoles de acilo, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo y aromáticos;
- (b) grupos hidroxilo, que se pueden convertir en, *por ejemplo*, ésteres, éteres, aldehídos, *etc.*;
- (c) grupos haloalquilo, en donde el haluro se puede desplazar posteriormente con un grupo nucleófilo, tal como, *por ejemplo*, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión, o un ion alcóxido, dando como resultado de este modo la unión covalente de un nuevo grupo en el grupo funcional del átomo de halógeno;
- (d) grupos dienófilos, que son capaces de participar en reacciones de Diels-Alder tales como, *por ejemplo*, grupos maleimido;
- (e) grupos aldehído o cetona, de tal manera que la derivatización posterior es posible a través de la formación de derivados de carbonilo tales como, *por ejemplo*, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de mecanismos tales como la adición de Grignard o adición de alquil-litio;
- (f) grupos haluro de sulfonilo para la reacción posterior 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, *por ejemplo*, con compuestos de aminas e hidroxilo.

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

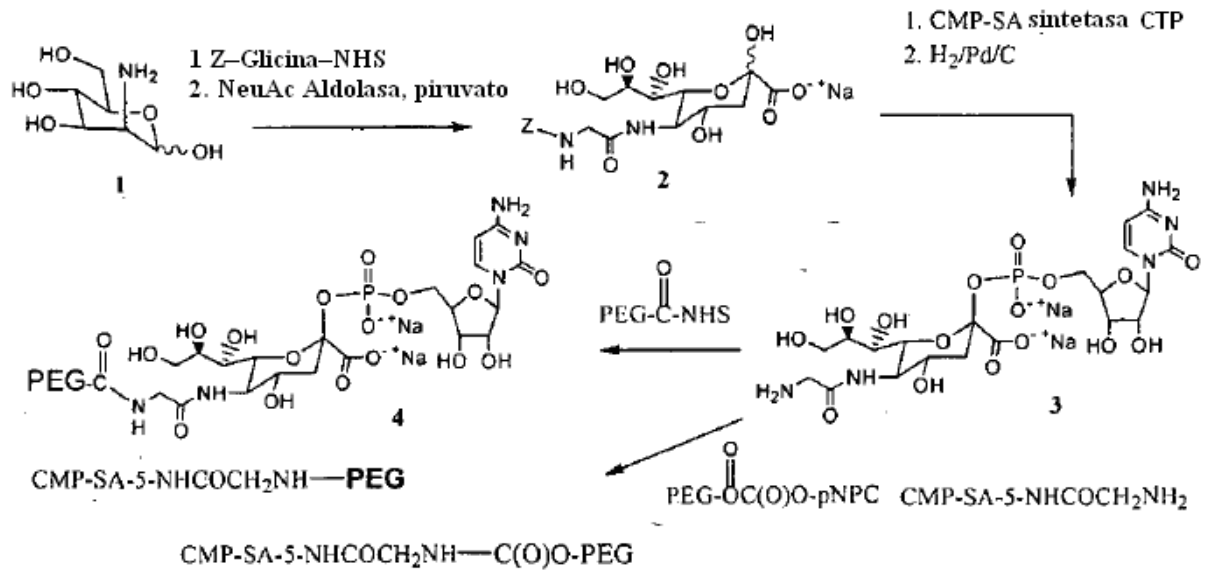
En el análisis que sigue a continuación, se expone una serie de ejemplos específicos de azúcares modificados que son útiles en la práctica de la presente invención. En las realizaciones a modo de ejemplo, un derivado de ácido siálico se emplea como el núcleo de azúcar al que está unido el grupo de modificación.

En una realización a modo de ejemplo, el péptido que se modifica con 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 unidas a N y/u O, que se sialilan de forma incompleta. Las cadenas de oligosacáridos del glicopéptido que carecen de un ácido siálico y que contienen un resto de galactosa terminal se pueden PEGilar, o modificar de otro modo con un ácido siálico modificado.

En el Esquema 1, el amino-glicósido 1, se trata con el éster activo de un derivado de un aminoácido protegido (*por*

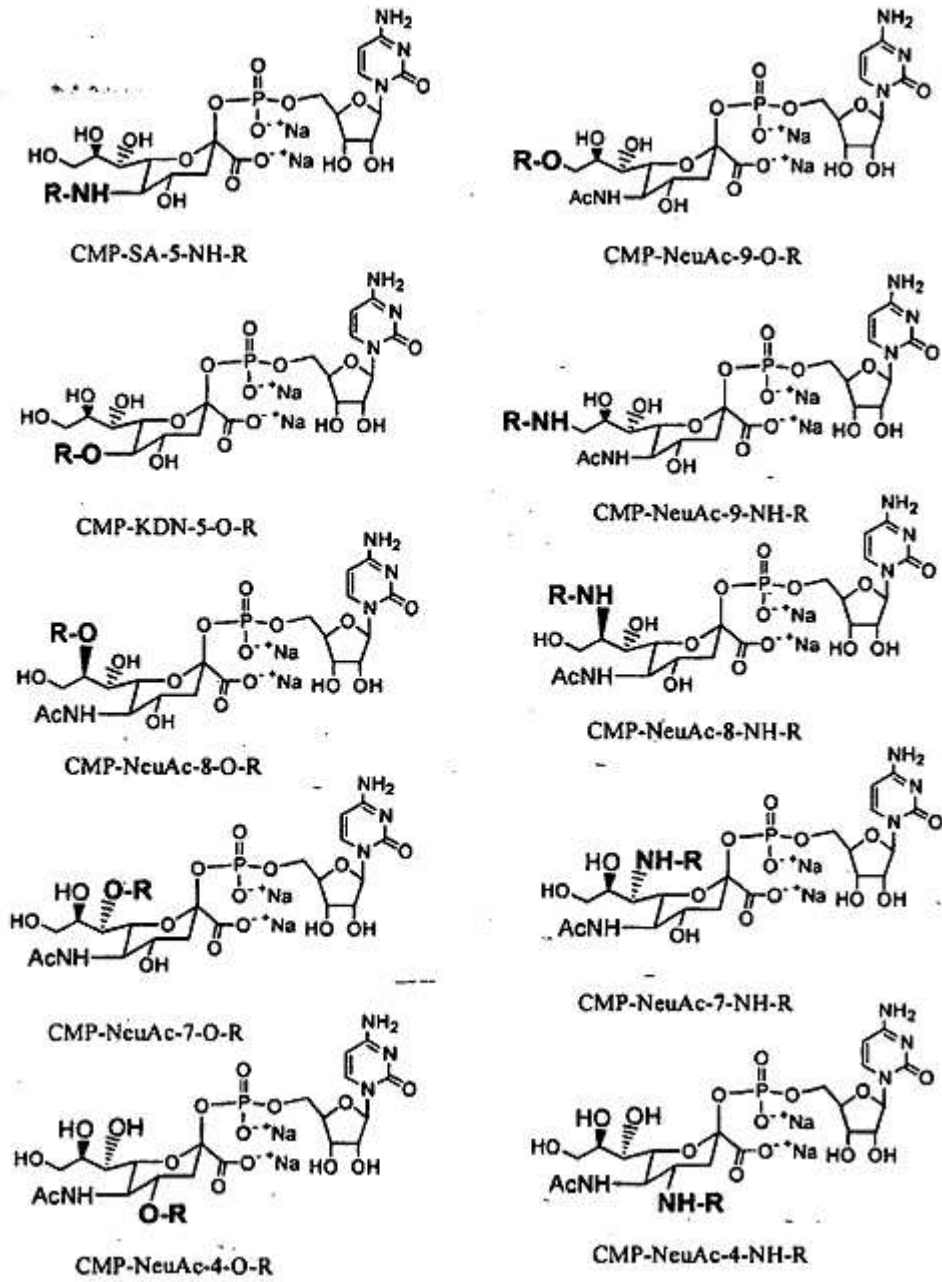
ejemplo, glicina), convirtiendo al resto de amino azúcar en el aducto de amida del aminoácido protegido correspondiente. El aducto se trata con una aldolasa para formar el α -hidroxi carboxilato **2**. El Compuesto **2** se convierte en el derivado de CMP correspondiente por la acción de la CMP-SA sintetasa, seguido de hidrogenación catalítica del derivado de CMP para producir el compuesto **3**. La amina introducida por medio de la formación del aducto de glicina se emplea como un locus de unión a 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 1



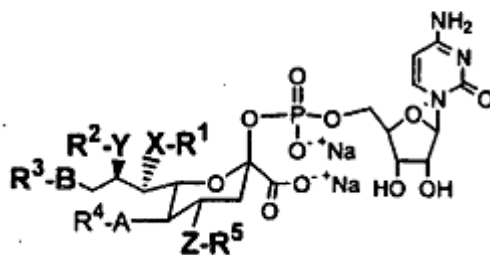
10 La Tabla 1 expone ejemplos representativos de monofosfatos de azúcar que se derivatizan con un resto de PEG. Determinados compuestos de la Tabla 1 se preparan con el método del Esquema 1. Otros derivados se preparan por métodos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Keppler *et al.*, *Glycobiology* 11: 11 R (2001); y Charter *et al.*, *Glycobiology* 10: 1049 (2000)). Otros análogos de PEG reactivos con amina están disponibles en el mercado, o se pueden preparar por métodos fácilmente accesibles para los expertos en la técnica.

Tabla 1



Los fosfatos de azúcar modificado útiles en la práctica de la presente invención se pueden sustituir en otras posiciones así como los que se han expuesto anteriormente. Las sustituciones preferidas en la actualidad de ácido siálico se exponen en la siguiente Fórmula II:

Fórmula II



(II)

en donde X es un grupo de unión, que se selecciona preferentemente entre $-\text{O}-$, $-\text{N}(\text{H})-$, $-\text{S}$, $-\text{CH}_2-$, y $\text{N}(\text{R})_2$, en donde cada R es un miembro seleccionado independientemente de R^1 - R^5 . Los símbolos Y, Z, A y B representan un grupo que se selecciona entre grupo que se ha expuesto anteriormente para la identidad de X. X, Y, Z, A y B se seleccionan independientemente, y por lo tanto, pueden ser iguales o diferentes. Los símbolos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 representan H o un resto de PEG. Como alternativa, estos símbolos representan un conector que se une a un resto de PEG.

Los ejemplos de restos unidos a los conjugados que se describen en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, derivados de PEG (por ejemplo, acilo-PEG, acil-alquilo-PEG, alquil-acilo-PEG, carbamoilo-PEG, arilo-PEG). Los métodos de conjugación de los diversos grupos de modificación a un resto de azúcar 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).

Grupos conectores (grupos de reticulación)

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 resto de azúcar y preferentemente, la formación de un aducto estable, que es un sustrato para una glicosiltransferasa. Por lo tanto, a menudo se prefiere usar un conector, por ejemplo, uno formado por la reacción del PEG y el resto de azúcar con un agente de reticulación para conjugar el PEG y el azúcar. Ejemplos de compuestos bifuncionales que se pueden utilizar para unir grupos de modificación de restos de hidratos de carbono incluyen, pero no se limitan a, poli(etilenglicoles) bifuncionales, poliamidas, poliéteres, poliésteres y similares. Enfoques generales para los hidratos de carbono de unión a otras moléculas son conocidos en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Lee *et al.*, *Biochemistry* 28: 1856 (1989); Bhatia *et al.*, *Anal. Biochem.* 178: 408 (1989); Janda *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 8886 (1990) y Bednarski *et al.*, documento WO 92/18135. En el análisis que sigue a continuación, los grupos reactivos se tratan como beneficiosos en el resto de azúcar del azúcar modificado naciente. El enfoque del análisis es para claridad de la ilustración. Los expertos en la técnica observarán que el análisis también es relevante para los grupos reactivos en el grupo de modificación.

Una estrategia a modo de ejemplo implica la incorporación de un sulfhidrido protegido sobre el azúcar empleando el agente de reticulación heterobifuncional SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de n-succinimidilo), desprotegiendo a continuación el sulfhidrido para la formación de un enlace disulfuro con otro sulfhidrido sobre el grupo de modificación.

Si SPDP afecta perjudicialmente a la capacidad del azúcar modificado para actuar como un sustrato de glicosiltransferasa, uno de una matriz de otros agentes de reticulación tales como 2-iminotiolano o S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) se emplea para formar un enlace disulfuro. 2-iminotiolano reacciona con aminas primarias, incorporando de forma instantánea un sulfhidrido sin proteger sobre la molécula que contiene amina. SATA también reacciona con aminas primarias, pero incorpora un sulfhidrido protegido, que posteriormente se desacetila empleando hidroxilamina para producir un sulfhidrido libre. En cada caso, el sulfhidrido incorporado queda libre para reaccionar con otros sulfhidridos o sulfhidrido protegido, como SPDP, formando el enlace disulfuro requerido.

La estrategia que se ha descrito anteriormente es a modo de ejemplo, y no limitante, de conectores de uso en la invención. Otros agentes de reticulación, que están disponibles, se pueden usar en diferentes estrategias para reticular el grupo de modificación al péptido. Por ejemplo, TPCH (S-(2-tiopiridil)-L-cistein hidrazida y TPMPH ((S-(2-tiopiridil) mercapto-propionohidrazida) reaccionan con restos de hidrato de carbono que se han oxidado previamente mediante el tratamiento suave con el peryodato, formando de este modo un enlace de hidrazona entre la porción de hidrazida del agente de reticulación y los aldehídos generados por peryodato. TPCH y TPMPH introducen un grupo sulfhidrido protegido con 2-piridiltiona sobre el azúcar, que se puede desproteger con DTT a continuación usa posteriormente para la conjugación, tal como formación de enlaces disulfuro entre los componentes.

Si la unión con disulfuro se encuentra inadecuada para producir azúcares modificados estables, se pueden usar otros agentes de reticulación que incorporan enlaces más estables entre los componentes. Los agentes de reticulación heterobifuncionales GMBS (N-gama-malimidobutiriloxi)succinimida) y SMCC (succinimidil 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano) reaccionan con aminas primarias, introduciendo de este modo un grupo a maleimida sobre el componente. El grupo maleimida puede reaccionar posteriormente con sulfhidrilos sobre el otro componente, que se puede introducir mediante los agentes de reticulación que se han mencionado anteriormente, formando de este modo un enlace tioéter estable entre los componentes. Si el impedimento esférico entre componentes interfiere con la actividad del componente o con la capacidad del azúcar modificado para actuar como un sustrato de glicositransferasa, se pueden usar agentes de reticulación que introducen ramas espacial o las largas entre componentes e incluyen derivados de algunos de los agentes de reticulación que se han mencionado anteriormente (es decir, SPDP). Por lo tanto, existe una abundancia de agentes de reticulación adecuados of, que son útiles; para uno de los cuales se selecciona dependiendo del efecto que tiene sobre el conjugado peptídico óptimo y la producción de azúcar modificado.

Se emplea una diversidad de reactivos se emplea para modificar los componentes del azúcar modificado con reticulaciones intramoleculares químicas (para revisiones de reactivos de reticulación y procedimientos de reticulación véase: Wold, F., *Meth. Enzymol.* **25**: 623–651, 1972; Weetall, H.20 H., y Cooney, D. A., In: ENZYME AS DRUGS. (Holcenberg, y Roberts, eds.) pp. 395–442, Wiley, Nueva York, 1981; Ji, T. H., *Meth. Enzymol.* **91**: 580–609, 1983; Mattson et al., *Mol. Biol. Rep.* **17**: 167–183, 1993. Los reactivos de reticulación preferentes se derivan de varios reactivos de reticulación de longitud cero, homo-bifuncionales y hetero-bifuncionales. Los reactivos de reticulación de longitud cero incluyen la conjugación directa de dos grupos químicos intrínsecos sin introducción de material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de un enlace disulfuro pertenecen a esta categoría. Otro ejemplo son los reactivos que inducen la condensación de un grupo carboxilo y un amino primario para formar un enlace amida, tales como carbodiimidias, cloroformiato de etilo, reactivo K de Woodward (5-fenilisoxazolio-3'-sulfonato de 2-etilo), y carbonildiimidazol. Además de estos reactivos químicos, la enzima transglutaminasa (glutamil-péptido γ -glutamilttransferasa; EC 2.3.2.13) se puede usar como reactivo de reticulación de longitud cero. Esta enzima cataliza las reacciones de transferencia de acilo en los grupos carboxamida de los restos glutaminilo unidos a proteínas, por lo general con un grupo amino primario como sustrato. Los reactivos homo y hetero-bifuncionales preferentes contienen dos sitios idénticos o dos diferentes, respectivamente, que pueden ser reactivos para grupos amino, sulfhidrilo, guanidino, indol, o grupos no específicos.

i. Sitios Específicos Preferentes en Reactivos de Reticulación

1. Grupos Amino-Reactivos

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

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

Los imidoésteres son los más específicos de los reactivos de acilación para la reacción con los grupos amina de los componentes de azúcar modificado. A un pH entre 7 y 10, los imidoésteres reaccionan solamente con aminas primarias. Las aminas primarias atacan a los imidatos de forma nucleófilo para producir un compuesto intermedio que se descomponen en amidina a pH elevado o en un nuevo imidato a pH bajo. El nuevo imidato puede reaccionar con otra amina primaria, reticulando de este modo dos grupos amino, un caso de un imidato supuestamente monofuncional que reacciona de forma bifuncional. El producto de reacción principal con aminas primarias es una amidina que es una base más fuerte que la amina original. Por lo tanto, la carga positiva del grupo amino original se retiene.

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

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

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

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

Los aldehídos tales como glutaraldehído reaccionan con aminas primarias de azúcar modificado. Aunque las bases inestables de Schiff se forman después de la reacción de los grupos amino con los aldehídos de los aldehídos, el glutaraldehído es capaz de modificar el azúcar modificado con reticulación es estables. A pH 6-8, el pH de las condiciones de reticulación habituales, los polímeros cíclicos experimentan una deshidratación para formar polímeros de aldehído insaturado α - β . Las bases de Schiff, sin embargo, son estables, cuando se conjugan con otro doble enlace. La interacción resonante de ambos dobles enlaces evita la hidrólisis de la unión de Schiff. Además, las aminas en altas concentraciones locales pueden atacar el doble enlace etilénico para formar un producto de adición de Michael estable.

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

2. Grupos Sulfhidril-Reactivos

En otra realización preferida, los sitios son grupos sulfhidril-reactivos. Ejemplos no limitantes, útiles de grupos sulfhidril-reactivos incluyen maleimidias, haluros de alquilo, disulfuros de piridilo, y tioftalimidias.

Las maleimidias reaccionan preferentemente con el grupo sulfhidrilo de los componentes de azúcar modificado para formar enlaces de tioéter estables. Estos también reaccionan a una velocidad mucho más lenta con grupos amino primario y los grupos imidazol de las histidinas. Sin embargo, a pH 7, el grupo maleimida se puede considerar un grupo específico de sulfhidrilo, ya que a este pH de la velocidad de reacción de los tioles sencillos es de 1000 veces más elevada que la amina de la correspondiente.

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

Los disulfuros de piridilo reaccionan con sulfhidrilos libres a través de intercambio de disulfuro para dar disulfuros mixtos. Como un resultado, los disulfuros decididos a los grupos sulfhidril-reactivos más específicos.

Las tioftalimidias reaccionan con grupos sulfhidrilo libre para formar disulfuros.

3. Resto Carboxil-Reactivo

En otra realización, carbodiimidias solubles tanto en agua como en disolventes orgánicos, se emplean como reactivos carboxil-reactivos. Estos compuestos reaccionan con grupos carboxilo libre formando una pseudourea que a continuación se puede acoplar con aminas disponibles produciendo una unión de amida que enseña a cómo modificar un grupo carboxilo con carbodiimida (Yamada *et al.*, *Biochemistry* 20: 4836-4842,1981).

ii. Sitios No Específicos Preferentes en Reactivos de Reticulación

Además del uso de restos reactivos específicos de sitios, la presente invención contempla el uso de grupos reactivos no específicos para unir el azúcar con el grupo de modificación.

Agentes de reticulación no específicos a modo de ejemplo incluyen grupos fotoactivables, totalmente inertes en la oscuridad, que se convierten en especies reactivas después de la absorción de un fotón de energía apropiada. En una realización preferida, los grupos, fotoactivables se seleccionan entre precursores de nitrenos generados después de calentamiento o fotólisis de azidas. Los nitrenos deficientes en electrones son extremadamente reactivos y pueden reaccionar con una diversidad de enlaces químicos que incluyen N-H, O-H, C-H, y C=C. Aunque se pueden usar tres tipos de azidas (derivados de arilo, alquilo, y acilo), las arilazidas son preferentes en la actualidad. La reactividad de las arilazida después de la fotólisis es mejor con enlaces N-H y O-H que con C-H. Y los arilnitrenos eficientes en electrones expanden el anillo rápidamente para formar deshidroazepinas, que tienden a reaccionar con nucleófilos, en lugar de formar productos de inserción de C-H. La reactividad de las arilazidas se puede aumentar mediante la presencia de sustituyentes aceptores de electrones tales como grupos nitro o hidroxilo en el anillo. Dicho sustituyentes llevan el máximo de absorción de las arilazidas a mayores longitudes de onda. Las arilazidas sin sustituir tienen un máximo de absorción en el intervalo de 260-280 nm, mientras que hidroxilo y nitroarilazidas absorben significativa más allá de 305 nm. Por lo tanto, hidroxilo y nitroarilazidas son más preferentes dado que permiten usar condiciones de fotólisis menos dañinas para el componente de afinidad que las arilazidas sin sustituir.

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

En otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan entre restos de benzofenona. Los reactivos de benzofenona por lo general tienen rendimientos de reticulación más elevados que los reactivos de arilazida.

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

- 5 Además, en otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan entre diazopiruvatos. Por ejemplo, el éster de p-nitrofenilo del diazopiruvato de p-nitrofenilo reacciona con aminas alifáticas para dar amidas del ácido diazopirúvico que experimentan fotólisis con radiación ultravioleta para formar aldehídos. El componente de afinidad modificado por diazopiruvato fotolizado reaccionará como formaldehído o glutaraldehído forman reticulaciones.

iii. Reactivos Homobifuncionales

10 **1. Agentes de reticulación homobifuncionales reactivos con aminas primarias**

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

- 15 Ejemplos no limitantes, preferentes de ésteres de NHS homobifuncional incluyen glutarato de disuccinimidilo (DSG), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis-2-(succinimidooxicarboniloxi)etilsulfona (BSOCOES), bis-2-(sulfosuccinimidooxi-carboniloxi)etilsulfona (sulfo-BSOCOES), etilenglicolbis(succinimidilsuccinato) (EGS), etilenglicolbis(sulfosuccinimidilsuccinato) (sulfo-EGS), ditiobis(succinimidil-propionato) (DSP), y ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (sulfo-DSP). Ejemplos no limitantes, preferentes de imidoésteres homobifuncionales incluyen malonimidato de dimetilo (DMM), succinimidato de dimetilo (DMSC), adipimidato de dimetilo (DMA), pimelimidato de dimetilo (DMP), suberimidato de dimetilo (DMS), 3,3'-oxidipropionimidato de dimetilo (DODP), 3,3'-(metilenodioxo)dipropionimidato de dimetilo (DMDP), 3,3'-(dimetilenodioxo)dipropionimidato de dimetilo (DDDP), 3,3'-(tetrametilenodioxo)-dipropionimidato de dimetilo (DTDP), y 3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo (DTBP).

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

- 30 Ejemplos no limitantes, preferentes de isocianatos homobifuncionales incluyen diisocianato de xileno, 2,4-diisocianato de tolueno, 2-isocianato-4-isotiocianato de tolueno, 4,4'-diisocianato de 3-metoxidifenilmetano, diisocianato de 2,2'-dicarboxi-4,4'-azofenilo, y diisocianato de hexametileno.

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

Ejemplos no limitantes, preferentes de reactivos de aldehído alifático homobifuncionales incluyen glioxal, malondialdehído, y glutaraldehído.

- 35 Ejemplos no limitantes, preferentes de reactivos de acilación homobifuncionales incluyen ésteres de nitrofenilo de ácidos dicarboxílicos.

Ejemplos no limitantes, preferentes de cloruros de sulfonilo aromático homobifuncionales incluyen cloruro de fenol-2,4-disulfonilo, cloruro de α -naftol-2,4-disulfonilo.

- 40 Ejemplos no limitantes, preferentes de reactivos homobifuncionales amino-reativos incluyen bicarbonato de eritritol que reacciona con aminas para dar biscarbamatos.

2. Agentes de Reticulación Homobifuncionales Reactivos con Grupos Sulfhidrilo Libre

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

- 45 Ejemplos no limitantes, preferentes de maleimidas homobifuncionales incluyen bismaleimidoheptano (BMH), N,N'-(1,3-fenileno) bismaleimida, N,N'-(1,2-fenileno)bismaleimida, azofenildimaleimida, y bis(N-maleimidometil) éter. Ejemplos no limitantes, preferentes de disulfuro de piridilo homobifuncionales incluyen 1,4-di-3'-(2-piridilditio)propionamidobutano (DPDPB).

- 50 Ejemplos no limitantes, preferentes de haluros de alquilo homobifuncionales incluyen 2,2'-dicarboxi-4,4'-diyodoacetamidoazobenceno, ácido α,α' -diyodo-p-xilenosulfónico, ácido α,α' -dibromo-p-xilenosulfónico, N,N'-bis(b-bromoetil)benclamina, N,N'-di(bromoacetil)fenilthidrazina, y 1,2-di(bromoacetil)amino-3-fenilpropano.

3. Agentes de Reticulación Fotoactivables Homobifuncionales

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

Ejemplos no limitantes, preferentes de agentes de reticulación fotoactivables homobifuncionales incluyen disulfuro de bis-β-(4-azidosalicilamido)etil (BASED), S,S-dióxido de di-N-(2-nitro-4-azidofenil)-cistamina (DNCO), y 4,4'-ditiobisfenilazida.

iv. Reactivos HeteroBifuncionales

10 1. Reactivos HeteroBifuncionales Amino-Reactivos con un Resto de Disulfuro de Piridilo

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

15 Ejemplos no limitantes, preferentes de reactivos heterobifuncionales con un resto de disulfuro de piridilo y un éster de NHS amino-reactivo incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 6-3-(2-piridilditio)propionamidohehexanoato de succinimidilo (LC-SPDP), 6-3-(2-piridilditio)propionamidohehexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LCSPDP), 4-succinimidiloxicarbonil-α-metil-α-(2-piridilditio)tolueno (SMPT), y 6-α-metil-α-(2-piridilditio)toluamidohehexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT).

20 2. Reactivos HeteroBifuncionales Amino-Reactivos con un Resto de Maleimida

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

30 3. Reactivos HeteroBifuncionales Amino-Reactivos con un Haluro de Alquilo

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

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

Ejemplos no limitantes, preferentes de reactivos heterobifuncionales con un resto de haluro de alquilo y un resto de éster de p-nitrofenilo amino-reactivo incluyen yodoacetato de p-nitrofenilo (NPFA).

45 Otros agentes de reticulación son conocidos por los expertos la materia. Véase, por ejemplo, Pomato *et al*, Patente de EE.UU. Nº 5.965.106. Está dentro de las capacidades de un experto en la técnica la elección de un agente de reticulación apropiado para una aplicación en particular.

v. Grupos Conectores Escindibles

50 Además, en una realización adicional, se proporciona el grupo con Héctor con un grupo que se puede escindir para liberar el grupo de modificación del resto de azúcar. En la técnica se conocen muchos grupos escindibles. Véase, por ejemplo, Jung *et. al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 761: 152-162 (1983); Joshi *et. al.*, *J. Biol Chem.* 265: 14518-14525 (1990); Zarlring *et.al.*, *J. Immunol* 124: 913-920 (1980); Bouzizar *et al*, *Eur. J. Biochem*, 155: 141-147 (1986); Park *et al*, *J. Biol Chem.* 261: 205-210 (1986); Browning *et al.*, *J. Immunol* 143: 1859-1867 (1989). Además, un amplio grupo de grupos conectores bifuncionales (tanto homo- como hetero-bifuncionales), escindibles está disponible en el

mercado en proveedores tales como Pierce.

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

Conjugación de Azúcares Modificados a Péptidos

10 Los azúcares modificados con PEG se conjugan con un péptido glicosilado o sin glicosilar empleando una enzima apropiada para mediar la conjugación. Preferentemente, las concentraciones del azúcar o azúcares dadores modificados, enzima o enzimas y péptido o péptidos aceptores se seleccionan de tal manera que la glicosilación evoluciona hasta que el aceptor se consume. Las consideraciones que se analizan a continuación, si bien se exponen en el contexto de una sialiltransferasa, generalmente son aplicables a otras reacciones de glicosiltransferasa.

15 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 a modo de ejemplo se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/32491, Ito *et al.*, *Pure Appl. Chem.* 65: 753 (1993), Patentes de EE. UU. N° 5.352.670, N° 5.374.541, N° 5.545.553, y Patentes de EE. UU. N° 6.399.336 y N° 6.440.703 del mismo solicitante.

20 La presente invención se pone en práctica empleando una sola glicosiltransferasa o una combinación de glicosiltransferasas. Por ejemplo, se puede usar una combinación de una sialiltransferasa y una galactosiltransferasa. En las realizaciones que usan más de una enzima, las enzimas y los sustratos se combinan preferentemente 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 con respecto a los procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Además, se reduce la limpieza y la eliminación de los disolventes y subproductos adicionales.

25 En una realización preferida, cada una de la primera y segunda enzima es una glicosiltransferasa. En otra realización preferida, una enzima es una endoglicosidasa. En una realización preferida adicional, se emplean más de dos enzimas para ensamblar la glicoproteína modificada de la invención. Las enzimas se emplean para alterar una estructura de sacárido en el péptido en cualquier momento, ya sea antes o después de la adición del azúcar modificado al péptido.

30 En otra realización, el método hace uso de uno o más exo o endoglicosidasas. La glicosidasa por lo general es un mutante, que está manipulado genéticamente para formar enlaces glicosilo más que para romperlos. La glicanasa mutante incluye por lo general una sustitución de un resto de aminoácido por un resto de aminoácido ácido para el sitio activo. Por ejemplo, cuando la endoglicanasa es endo-H, los restos del sitio activo sustituidos serán por lo general Asp en la posición 130, Glu en la posición 132 o una combinación de los mismos. Los aminoácidos se sustituyen generalmente con serina, alanina, asparagina o glutamina.

35 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 glicosilo (*por ejemplo*, una estructura de oligo o monosacárido deseada) contiene un grupo saliente y la reacción evoluciona con la adición de la molécula dadora a un resto de GlcNAc en la proteína. Por ejemplo, el grupo saliente puede ser un halógeno, tal como fluoruro. En otras realizaciones, el grupo saliente es Asn, o un resto peptídico de Asn. Además, en otras realizaciones, el resto de GlcNAc en la molécula dadora de glicosilo está modificado. Por ejemplo, el resto GlcNAc puede comprender un resto de 1,2 oxazolina.

45 En una realización preferida, cada una de las enzimas usadas para producir un conjugado de la invención está presentes en una cantidad catalítica. La cantidad catalítica de una enzima en particular varía según la concentración de sustrato de esa enzima así como de las condiciones de reacción tales como temperatura, tiempo y valor de pH. Los medios para determinar la cantidad catalítica de una enzima dada en concentraciones de sustrato y condiciones de reacción seleccionadas previamente son bien conocidos por los expertos en la técnica.

50 La temperatura a la que se realiza un proceso mencionado anteriormente puede variar de justo por encima de congelación a la temperatura a la que se desnaturalizan las enzimas más sensibles. Los rangos de temperatura preferentes son de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 55 °C, y más preferentemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C. En otra realización a modo de ejemplo, uno o más componentes del presente método se realizan a una temperatura elevada empleando una enzima termófila.

55 La mezcla de reacción se mantiene durante un período de tiempo suficiente para que el aceptor se glicosile, 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 dador, concentración del aceptor, temperatura, volumen de solvente), que están optimizados para un sistema seleccionado.

La presente invención también proporciona la producción a escala industrial de péptidos modificados. Tal como se emplea en la presente memoria, una escala industrial generalmente produce al menos un gramo de conjugado purificado, terminado.

[En el análisis que sigue a continuación, la invención se hace a modo de ejemplo mediante la conjugación de restos de ácido siálico modificados a un péptido glicosilado. El ácido siálico modificado a modo de ejemplo está marcado con PEG. El análisis se puede aplicar del mismo modo a la modificación de una unidad de glicosilo con agentes distintos de PEG que incluyen otros restos de PEG.

Se puede usar un enfoque enzimático para la introducción selectiva de hidratos de carbono PEGilados o PPGilados en un péptido o glicopéptido. El método usa 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 producirá la unión deseada de hidratos de carbono y la utilización del azúcar modificado como sustrato dador, PEG o PPG se pueden introducir directamente en el cadena principal del péptido, en restos de azúcar existentes de un glicopéptido o sobre restos de azúcar que se han añadido a un péptido.

Un aceptor para la sialiltransferasa se encuentra presente en el péptido para ser modificado por los métodos de la presente invención, ya sea como una estructura de origen 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 (*véase, por ejemplo*, Paulson *et al.*, *J Biol. Chem.* 253: 5617–5624 (1978)).

En una realización, un aceptor para la sialiltransferasa se encuentra presente en el glicopéptido para su modificación después de la síntesis *in vivo* del glicopéptido. Dichos glicopéptidos se pueden sialilar empleando los métodos que se reivindican sin modificación previa del patrón de glicosilación del glicopéptido. Como alternativa, los métodos de la invención se pueden usar para sialilar un péptido que no incluye un aceptor adecuado; primero se modifica el péptido para incluir un aceptor mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. En una realización a modo de ejemplo, un resto GalNAc se añade por la acción de una GalNAc transferasa.

En una realización a modo de ejemplo, el aceptor de galactosilo se ensambla uniendo un resto de galactosa a un aceptor apropiado unido al péptido, por ejemplo, un GlcNAc. El método incluye incubar el péptido a 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 dador de galactosilo adecuado (por ejemplo, UDP-galactosa). Se permite que la reacción evolucione básicamente hasta su finalización o, como alternativa, la reacción termina cuando se añade una cantidad seleccionada previamente del resto de galactosa. Otros métodos para ensamblar un aceptor sacárido seleccionado serán evidentes para los expertos en la técnica.

Además, en otra realización, los oligosacáridos unidos a glicopéptidos primero se “adaptan”, 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 restos apropiados para obtener un aceptor adecuado. Las enzimas tales como glicosiltransferasas y endoglicosidasas (*véase, por ejemplo* la Patente de EE.UU. Nº 5.716.812) son útiles para las reacciones de unión y adaptación.

En el análisis que sigue a continuación, el método de la invención se hace a modo de ejemplo mediante el uso de azúcares modificados que tienen un resto de PEG unido a los mismos.

En una realización a modo de ejemplo de la invención en la que un resto de hidrato de carbono se “adapta” antes de la adición del azúcar modificado rico en manosa se adapta 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 restos de azúcar expuestos por la “repetición de la adaptación”. En un ejemplo, se añade un resto de PEG por medio de un resto de GlcNAc conjugado con el resto de PEG. El GlcNAc modificado está unido a uno o ambos de los restos de manosa terminales de la estructura biantenaria. Como alternativa, un GlcNAc sin modificar se puede añadir a uno o ambos de los extremos de las especies ramificadas.

En otra realización a modo de ejemplo, se añade un resto de PEG a uno o ambos de los restos de manosa terminales de la estructura biantenaria a través de un azúcar modificado que tiene un resto de galactosa, que está conjugado a un resto de GlcNAc añadido a los restos de manosa terminales. Como alternativa, una Gal sin modificar se puede añadir a uno o ambos restos de G1cNAc terminal.

Además, en otro ejemplo adicional, se añade un resto de PEG en un resto de Gal empleando un ácido siálico modificado.

[En otra realización a modo de ejemplo, una estructura de rica en manosa se “adapta de nuevo” a la manosa desde la cual se ramifica la estructura biantenaria. En un ejemplo, se añade un resto de PEG a través de un GlcNAc modificado con el polímero. Como alternativa, se añade un GlcNAc sin modificar a la manosa, seguido de Gal con

un resto de PEG unido. Además, en otra realización, los restos 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.

En otra realización a modo de ejemplo, el resto rico en manosa se "adapta" a GlcNAc al que está unida la primera manosa. El GlcNAc está conjugado con un resto de Gal que lleva un resto de PEG. Como alternativa, se añade una Gal no modificada a la GlcNAc, seguido por la adición de un ácido siálico modificado con un azúcar soluble en agua. Además, en otra realización a modo de ejemplo, la GlcNAc terminal se conjuga con la Gal y GlcNAc se fucosila posteriormente con una fucosa modificada que lleva un resto de PEG.

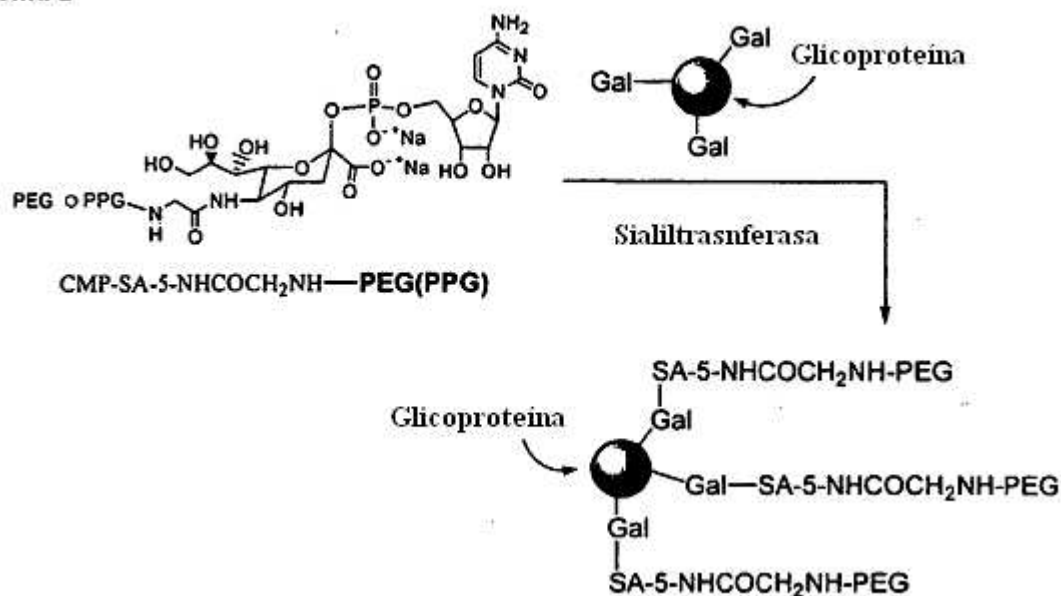
El resto rico en manosa también se puede adaptar de nuevo al primer GlcNAc unido al Asn del péptido. En un ejemplo, el GlcNAc del resto GlcNAc-(Fuc)_a se conjuga con el GlcNAc que porta un polímero soluble en agua. En otro ejemplo, el GlcNAc del resto GlcNAc-(Fuc)_a se modifica con Gal, que porta un polímero soluble en agua. En una realización adicional más, el GlcNAc se modifica con Gal, seguido por conjugación con Gal de un ácido siálico modificado con un resto de PEG.

Otras realizaciones a modo de ejemplo se exponen en las publicaciones de solicitudes de Patente de EE.UU. de propiedad común: N° 20040132640, N° 20040063911, N° 20040137557, solicitud de Patente de EE.UU.: N° 10/369.979; N° 10/410.913; N° 10/360.770; N° 10/410.945 y PCT/US02/32263.

Los ejemplos que se han expuesto anteriormente proporcionan una ilustración de la potencia de los métodos que se establecen en la presente memoria. Empleando los métodos que se describen en la presente memoria, es posible "adaptar de nuevo" y construir un resto de hidrato de carbono de básicamente cualquier estructura deseada. El azúcar modificado se puede añadir a los extremos del resto de hidratos de carbono tal como se ha expuesto anteriormente, o puede ser intermedio entre el núcleo y el péptido terminal de los hidratos de carbono.

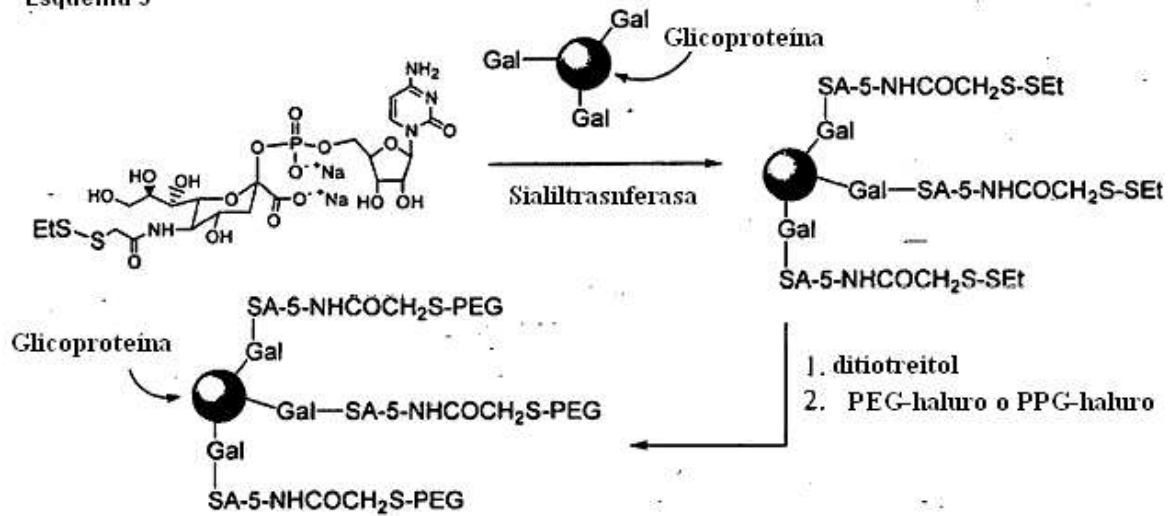
En una realización a modo de ejemplo, un ácido siálico existente se elimina de un glicopéptido empleando una sialidasa, desenmascarando de este modo la totalidad o la mayor parte de los restos de galactosilo subyacentes. Como alternativa, un péptido o glicopéptido se marca con restos de galactosa, o un resto oligosacárido que termina en una unidad de galactosa. Después de la exposición de o la adición de los restos de galactosa, se emplea una sialiltransferasa apropiada para añadir un ácido siálico modificado. El enfoque se resume en el Esquema 2.

Esquema 2



En otro enfoque adicional, que se resume en el Esquema 3, una funcionalidad reactiva enmascarada está presente en el ácido siálico. El grupo reactivo enmascarado preferentemente no se ve afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado a la eritropoyetina. Después de la unión covalente del ácido siálico modificado al péptido, se retira el enmascaramiento y el péptido se conjuga con un agente tal como PEG. El agente se conjuga con el péptido de una manera específica mediante su reacción con el grupo reactivo sin enmascarar en el resto de azúcar modificado.

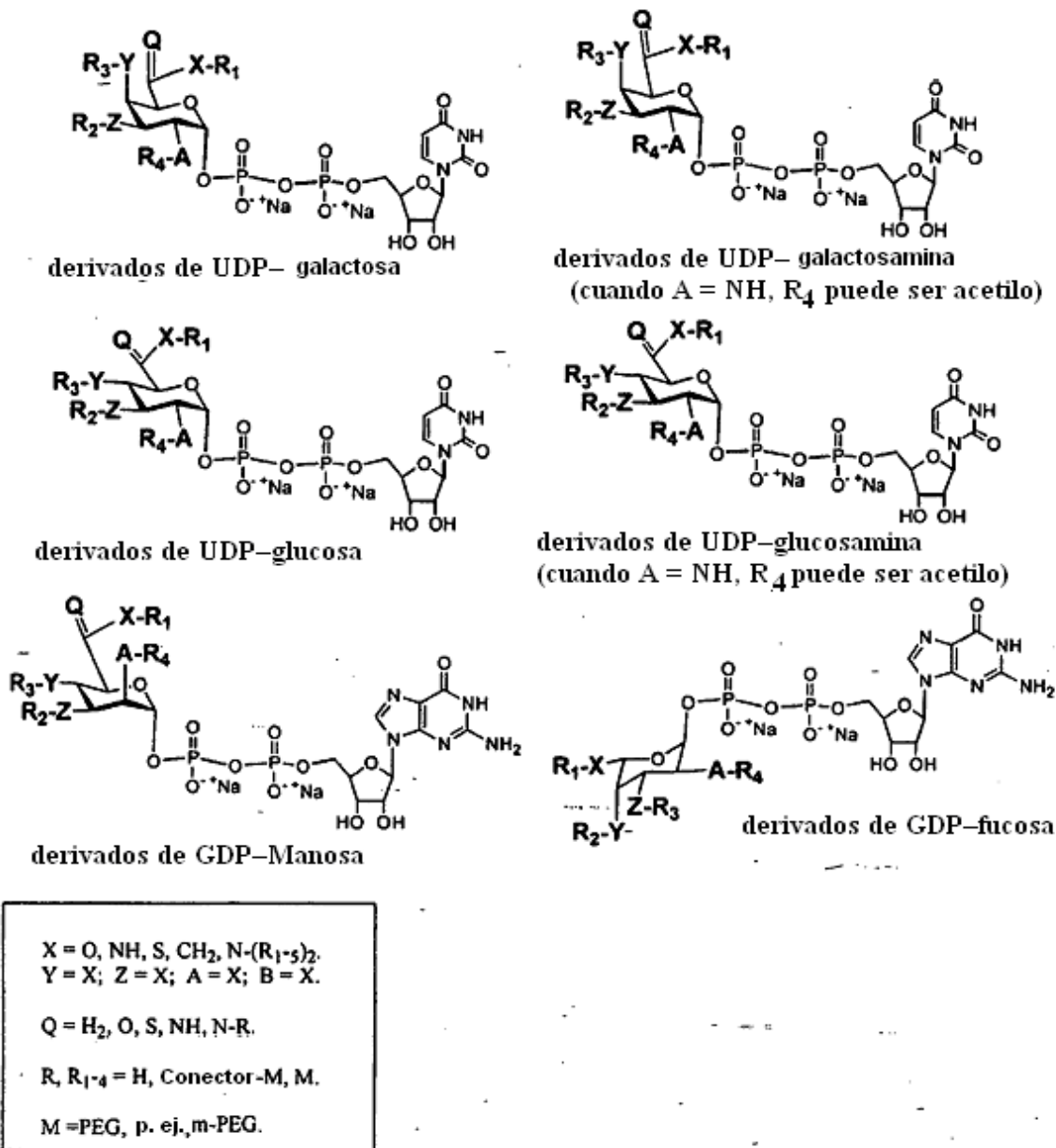
Esquema 3



5

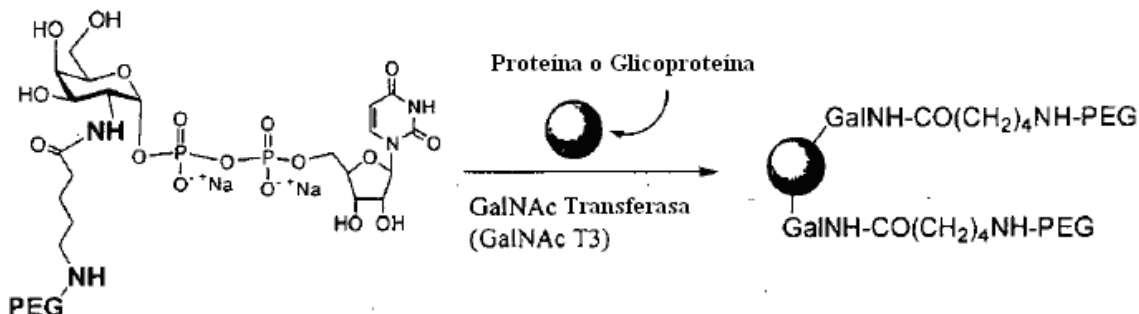
Se podría usar cualquier azúcar modificado con su glicosiltransferasa adecuada, dependiendo de los azúcares terminales de las cadenas laterales de oligosacárido del glicopéptido (Tabla 2). Tal como se ha analizado anteriormente, el azúcar terminal del glicopéptidos necesario para la introducción de la estructura PEGilada se puede introducir de forma natural durante la expresión o se puede producir después de la expresión empleando la glicosidasa o glicosidasas, glicosiltransferasa o glicosiltransferasas apropiadas o mezclas de glicosidasa o glicosidasas y glicosiltransferasa o glicosiltransferasas. Sin embargo, la presente invención se define mediante el alcance de las reivindicaciones.

Tabla 2



En una realización alternativa, se añade el azúcar modificado directamente a la cadena principal peptídica empleando una glicosiltransferasa conocida para transferir restos de azúcar a la cadena principal peptídica. Esta realización a modo de ejemplo se expone en el Esquema 4. Las glicosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, GalNAc transferasas (GalNAc T1-14), GlcNAc transferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, xilosiltransferasas, manosiltransferasas y similares. El uso de este enfoque permite la adición directa de azúcares modificados en péptidos que carecen de hidratos de carbono o, como alternativa, en los glicopéptidos existentes. En ambos casos, la adición del azúcar modificado se produce en posiciones específicas de la cadena principal peptídica, tal como se definen por la especificidad de sustrato de la glicosiltransferasa y no de una manera aleatoria tal como ocurre durante la modificación de la cadena principal peptídica de una proteína empleando 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 manipulación genética de la secuencia de aminoácidos apropiada en la cadena de polipeptídica.

Esquema 4



En cada una de las realizaciones a modo de ejemplo que se han expuesto anteriormente, una o más etapas de modificación química o enzimática adicional se pueden usar después de la conjugación del azúcar modificado al péptido. En una realización a modo de ejemplo, una enzima (*por ejemplo*, fucosiltransferasa) se emplea para añadir una unidad de glicosilo (*por ejemplo*, fucosa) sobre el azúcar modificado terminal unido al péptido. En otro ejemplo, una reacción enzimática se emplea para "proteger" sitios en los que el azúcar modificado no se pudo conjugar. Como alternativa, se emplea una reacción química para alterar la estructura del azúcar modificado conjugado. Por ejemplo, el azúcar modificado conjugado se hace reaccionar con agentes que estabilizan o desestabilizan su unión con el componente peptídico 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 observará que hay una gran variedad de procedimientos enzimáticos y químicos que son útiles en los métodos de la invención en una etapa después de conjugar el azúcar modificado al péptido. La elaboración adicional del conjugado de azúcar modificado-péptido está dentro del alcance de la invención.

i. Enzimas

15 Transferencia de Azúcar

Además de las enzimas que se han analizado anteriormente en el contexto de la formación del conjugado unido a acilo, el patrón de glicosilación del conjugado y los sustratos de partida (*por ejemplo*, péptidos, lípidos) se puede elaborar, adaptar de nuevo o modificar de otro modo por métodos que usan otras enzimas. Los métodos de remodelación de péptidos y lípidos empleando enzimas que transfieren un dador de azúcar a un aceptor se analizan con mayor detalle en DeFrees, documento 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 (azúcares dadores de NDP), de una manera en etapas, a una proteína, glicopéptido, lípido o glicolípido o al extremo no reductor de un oligosacárido en crecimiento. Los glicopéptidos unidos a N se sintetizan a través de una transferasa y un dador de oligosacárido unido a lípidos Dol-PP-NAG₂Glc₃Man₉ en una transferencia de bloque seguido por la captación del núcleo. En este caso, la naturaleza del sacárido "núcleo" es algo diferente de las uniones posteriores. En la técnica se conocen un gran número de glicosiltransferasas.

La glicosiltransferasa a usar en la presente invención puede ser cualquiera siempre que pueda usar el azúcar modificado como un dador de azúcar. Los ejemplos de dichas enzimas incluyen glicosiltransferasa de la vía de Leloir, tal como galactosiltransferasa, N-acetilglucosaminiltransferasa, N-acetilgalactosaminiltransferasa, fucosiltransferasa, sialiltransferasa, mannosiltransferasa, xilosiltransferasa, glucuroniltransferasa y similares.

que implican reacciones de glicosiltransferasa, la glicosiltransferasa se puede clonar o aislar de cualquier fuente. Se conocen muchas glicosiltransferasas clonadas, al igual que sus secuencias de polinucleótidos. Véase, *por ejemplo*, "The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferases," (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 diversas bases de datos disponibles al público, que incluyen GenBank, Swiss-Prot, EMBL, y otras.

Las glicosiltransferasas que se pueden usar en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, galactosiltransferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas, glucuroniltransferasas, sialiltransferasas, mannosiltransferasas, transferasas de ácido glucurónico, transferasas de ácido galacturónico, y oligosacariltransferasas. Las glicosiltransferasas adecuadas incluyen las obtenidas de eucariotas, así como de procariontas.

Las glicosiltransferasas que codifican ADN se pueden obtener por síntesis química, mediante la identificación de transcritos inversos de ARNm a partir de células o de cultivos de líneas celulares adecuados, mediante la identificación sistemática de bibliotecas genómicas a partir de células apropiadas, o mediante combinaciones de estos procedimientos. La identificación sistemática de ARNm o ADN genómico se pueden realizar con sondas de oligonucleótidos generadas a partir de las secuencias genéticas de las glicosiltransferasas. Las sondas se pueden marcar con un grupo detectable tal como un grupo fluorescente, un átomo radioactivo o un grupo quimioluminiscente según procedimientos conocidos y usados 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 genética de las glicosiltransferasas. Véase, Patente de EE.UU. N° 4.683.195 de Mullis *et al.* y Patente de EE.UU. N° 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 emplean ya sea para amplificar el ADN que codifica las enzimas glicosiltransferasas y/o para expresar ADN que codifica las enzimas glicosiltransferasas. Un vector de expresión es un constructo de ADN replicable en la que una secuencia de ADN que codifica las enzimas glicosiltransferasas está unida operativamente a secuencias de control adecuadas capaces de efectuar la expresión de las enzimas glicosiltransferasas en un huésped adecuado. La necesidad de dichas secuencias de control variará según 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 replicación 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 a modo de ejemplo, la invención usa una enzima procariótica. Dichas glicosiltransferasas incluyen enzimas implicadas en la síntesis de lipooligosacáridos (LOS), que son producidos por muchas bacterias gram negativas (Preston *et al Critical Reviews in Microbiology* 23 (3): 139-180 (1996)). Dichas enzimas incluyen, pero no se limitan a, 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 (véanse, por ejemplo, números de acceso de EMBL N° M80599 y N° M86935 (*E. coli*); N° de Acceso de EMBL 556361 (*S. typhimurium*)), una glucosiltransferasa (N° de Acceso de Swiss-Prot P25740 (*E. coli*), una β 1,2- glucosiltransferasa (*rfaJ*) (N° de Acceso de Swiss-Prot P27129 (*E. coli*) y N° de acceso de Swiss-Prot P19817 (*S. typhimurium*)), y una β 1,2 N-acetilglucosaminiltransferasa (*rfaK*) (N° de acceso de EMBL U00039 (*E.coli*). Otras glicosiltransferasas para las que se conocen las secuencias de aminoácidos incluyen las que están codificadas por operones tales como *rfaB*, que se han caracterizado en organismos, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium leprosum*, y el operón *rhl* de *Pseudomonas aeruginosa*.

Para uso en la presente invención también son adecuadas las glicosiltransferasas que están implicadas en las estructuras de producción 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 sanguíneo P^k, 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 el F62 mutante de *N. gonorrhoeae* (Gotschlich, *J. Exp. Med.* 180: 2181-2190 (1994)). En *N. meningitidis*, un sitio que consiste en tres genes, *IgtA*, *IgtB* e *IgE*, 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 genético 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, creando de este modo la estructura de antígeno del grupo sanguíneo P^k (Gotschlich (1994), mencionado anteriormente.). 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), mencionado anteriormente.*). Las glicosiltransferasas de *Neisseria* y los genes asociados también se describen 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 emplean en la presente invención las glicosiltransferasas de *Campylobacter jejuni* (véase, por ejemplo, http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf_42.html).

Fucosiltransferasas

En algunas realizaciones, una glicosiltransferasa usada 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 hidroxilo de un azúcar aceptor. Las fucosiltransferasas que transfieren azúcares no nucleótidos a un aceptor también se emplean en la presente

invención.

En algunas realizaciones, el azúcar aceptor es, por ejemplo, la GlcNAc en un grupo Galβ(1→3,4) G1cNAcβ en un glicósido oligosacárido. Las fucosiltransferasas adecuadas para esta reacción incluyen la Galβ(1→3,4) G1cNAcβ1-α(1→3,4) fucosiltransferasa (FTIII N° EC 2.4.1.65), que se caracterizó primero a partir de leche humana (véase, Palcic, *et. al.*, *Carbohydrate Res.* 190: 1-11 (1989); Prieels, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256: 10.456-10.463 (1981), y Núñez, *et. al.*, *Can J. Chem.* 59: 2086-2095 (1981)) y las Galβ(1→4) G1cNAcβ -fucosiltransferasas (FTIV, FTV, FTVI) que se encuentran en el suero humano. FTVII (EC N° 2.4.1.65), una sialil α(2→3)Galβ((1→3)GlcNAcβ1 fucosiltransferasa, también se ha caracterizado. Una forma recombinante de la Galβ(1→3,4)GlcNAcβ1-α(1→3,4) fucosiltransferasa también se ha caracterizado (véase, Dumas, *et al.*, *Bioorg., Med. Letters* 1: 425-428, (1991) y Kukowska-Latallo, *et al.*, *Genes y Development* 4: 1288-1303 (1990)). Otras fucosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, α1,2-fucosiltransferasa (EC N° 2.4.1.69). La fucosilación enzimática se puede realizar mediante los métodos que se describen en Mollicone, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 191: 169-176 (1990) o en la Patente de EE.UU. N° 5.374.655. Las células que se emplean para producir una fucosiltransferasa también incluirán un sistema enzimático para sintetizar GDP-fucosa.

15 **Galactosiltransferasas**

En otro grupo de realizaciones, la glicosiltransferasa es una galactosiltransferasa. Las galactosiltransferasas ilustrativas incluyen α(1,3)-galactosiltransferasas (E.C. N° 2.4.1.151, véase, *por ejemplo*, Dabkowski *et al.*, *Transplant Proc.* 25: 2921 (1993) y Yamamoto *et al.* *Nature* 345: 229-233 (1990), bovina (GenBank j04989, Joziassse *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264: 14290-14297 (1989)), murina (GenBank m26925; Larsen *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 86: 8227-8231 (1989)), porcina (GenBank L36152; Strahan *et al.*, *Immunogenetics* 41: 101-105 (1995)). Otra α(1,3)-galactosiltransferasa adecuada es la que está implicada en la síntesis del antígeno del grupo sanguíneo B (EC 2.4.1.37, Yamamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 1146-1151 (1990) (humano)). Además, otra galactosiltransferasa a modo de ejemplo es Gal-T1 del núcleo.

También son adecuadas para su uso en los métodos de la invención las β(1,4)- galactosiltransferasas, que incluyen, por ejemplo, EC 2.4.1.90 (LacNAc sintetasa) y EC 2.4.1.22 (lactosa sintetasa) (bovina (D'Agostaro *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 183: 211-217 (1989)), humana (Masri *et al.*, *Biochem. 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, α1,2-galactosiltransferasas (a partir de, *por ejemplo*, *Schizosaccharomyces pombe*, Chapell *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 5: 519-528 (1994)).

30 **Sialiltransferasas**

Las sialiltransferasas son otro tipo de glicosiltransferasas que son útiles en las células recombinantes y mezclas de reacción de la invención. Las células que producen sialiltransferasas recombinantes también producirán CMP-ácido siálico, que es un dato de ácido siálico para sialiltransferasas. Los ejemplos de sialiltransferasas que son adecuados para usar en la presente invención incluyen ST3Gal III (*por ejemplo*, ST3Gal III de rata o humano), ST3Gal IV, ST3Gal I, ST3GalII, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNac I, ST6GalNac II, y ST6GalNac III (la nomenclatura para sialiltransferasa como se emplea en esta memoria es tal como se describe en Tsuji *et al.*, *Glycobiology* 6: v-xiv (1996)). Una α(2,3) sialiltransferasa denominada α(2,3) sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico al Gal no reductor terminal de un discárido Galβ1 → 3Gle o glicósido. Véase, Van den Eijnden *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256: 3159 (1981), Weinstein *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 13845 (1982) y Wen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 21011 (1992). Otra α(2,3)-sialiltransferasa (EC 2.4.99.4) transfiere ácido siálico al Gal no reductor terminal del discárido o glicósido. Véase, Rearick *et at.*, *J. Biol. Chem.* 254: 4444 (1979) y Gillespie *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 21004 (1992). Otras enzimas ilustrativas adicionales a modo de ejemplo incluyen Gal-β-1,4-GlcNAc α-2,6-sialiltransferasa (Véase, Kurosawa *et al.* *Eur. J. Biochem.* 219: 375-381 (1994)).

45 Preferentemente, para la glicosilación de hidratos de carbono de glicopéptidos, la sialiltransferasa podrá transferir ácido siálico a la secuencia de Galβ1,4GlcNAc-, la penúltima secuencia más común que subyace al ácido siálico terminal en las estructuras de hidratos de carbono totalmente sialiladas (véase, la Tabla 2).

Tabla 2: Sialiltransferasas que usan la secuencia Galβ1,4GlcNAc como un sustrato aceptor

Sialiltransferasa	Fuente	Secuencia o Secuencias formadas	Ref.
ST6Gal I	Mamífero	NeuAca2,6Galβ1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	Mamífero	NeuAca2,3Galβ1,4GlcNAc- NeuAca2,3Galβ1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	Mamífero	NeuAca2,3Galβ1,4GlcNAc- NeuAca2,3Galβ1,3GlcNAc-	1

Sialiltransferasa	Fuente	Secuencia o Secuencias formadas	Ref.
		NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	
ST6Gal II	Mamífero	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNA	
ST6Gal II	Fotobacterias	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitides</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	3

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

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

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

5 Un ejemplo de una sialiltransferasa que es útil en los métodos que se reivindican es ST3Gal III, que también se denomina α (2,3) sialiltransferasa (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 glicósido (véase, 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 ADNc humano (Sasaki *et al.* (1993) *J Biol. Chem.* 268: 22782–22787; Kitagawa y Paulson (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 1394–1401) y las secuencias de ADN genómico (Kitagawa *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 931–938) son conocidas, lo que facilita la producción de esta enzima mediante expresión recombinante. En una realización preferida, los métodos de sialilación que se reivindican usan una ST3Gal III de rata.

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

20 Las sialiltransferasas diferentes de las que se enumeran en la Tabla 2, también son útiles en un proceso a gran escala económico y eficaz para la sialilación de glucopéptidos comercialmente importantes. Como un solo ensayo de 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. Como alternativa, otros glicopéptidos o glucopéptidos, u oligosacáridos unidos a N liberados enzimáticamente de la cadena principal peptídica se pueden usar en lugar de asialo- α ₁ AGP para esta evaluación. Las sialiltransferasas con la capacidad de sialilar los oligosacáridos unidos a N de glicopéptidos de forma más eficaz que ST6Gal I son útiles en un proceso práctico a gran escala para la sialilación del péptido.

GalNAc transferasas

30 Las N-acetilgalactosaminiltransferasas se emplean en la práctica de la presente invención, en particular para la unión de un resto GalNAc a un aminoácido del sitio de glicosilación unido a O del péptido. Las N-acetilgalactosaminiltransferasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, 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 (Homa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 12609 (1993)).

35 La producción de proteínas tales como la enzima GalNAc T_{I-XX} a partir de genes clonados mediante ingeniería genética es bien conocida. Véase, por ejemplo., la Patente de EE.UU. Nº 4.761.371. Un método implica la recolección de muestras suficientes, a continuación se determina la secuencia de aminoácidos de la enzima por secuenciación N-terminal. Esta información se emplea 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 se determina a continuación, empleando un análisis semicuantitativo de los aminoácidos que rodean los sitios de glicosilación conocidos en 16 proteínas diferentes seguido por estudios de glicosilación in vitro de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que determinados restos de aminoácidos están sobrerrepresentados en los segmentos de péptidos glicosilados y que los restos en las posiciones específicas que rodean a los restos de serina y treonina glicosilados pueden tener una influencia más marcada en la eficiencia aceptora que los otros restos de aminoácidos.

45

Glicosiltransferasas Unidas a Células

En otra realización, las enzimas usadas en el método de la invención son glicosiltransferasas unidas a células. Aunque se conocen muchas glicosiltransferasas solubles (véanse, por ejemplo, la Patente de EE.UU N° 5.032.519), las glicosiltransferasas están generalmente en forma de unión a membrana cuando se asocian con 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 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).

Se han desarrollado métodos para alterar las glicosiltransferasas expresadas por las células. Por ejemplo Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8227–8231 (1989), informan de un método genético para aislar secuencias de ADNc clonado que determinan la expresión de estructuras de oligosacáridos de la superficie celular y sus glicosiltransferasas afines. Una biblioteca de ADNc generada a partir de ARNm aislado de una línea celular de murino conocida por que expresa 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 sometieron a ensayo para determinar la actividad de α -1,3-galactosiltransferasa.

Francisco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2713–2717 (1992), describen un método de anclaje de β -lactamasa a la superficie externa de *Escherichia coli*. 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 procarioras, y tal como es reconocido por los autores, requiere la fusión tripartita completa para el funcionamiento apropiado.

Sulfotransferasas

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

Glicosidasas

La presente también abarca el uso de glicosidasas de tipo silvestre 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 de EE.UU. N° 6.284.494; presentada el 4 de septiembre de 2001). Otros glicosidasas de uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, β -glucosidasas, β -galactosidasas, β -manosidasas, β -acetil glucosaminidasas, β -N-acetil-galactosaminidasas, β -xilosidasas, β -fucosidasas, celulasas, xilanasas, galactanasas, mananasas, hemicelulasas, amilasas, glucoamilasas, α -glucosidasas, α -galactosidasas, α -manosidasas, α -N-acetil-glucosaminidasas, α -N-acetil-galactosa-aminidasas, α -xilosidasas, α -fucosidasas y neuraminidasas/sialidasas.

Enzimas Inmovilizadas

La presente invención también proporciona el uso de enzimas que están inmovilizadas sobre un soporte sólido y/o soluble. En una realización a modo de ejemplo, se proporciona una glicosiltransferasa que está conjugada con un PEG a través de un conector de glicosilo intacto según los métodos de la invención. El conjugado de PEG-conector-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 emplea en los métodos de la invención. Otras combinaciones de enzimas y soportes serán evidentes para los expertos en la técnica.

Proteínas de fusión

En otras realizaciones a modo de ejemplo, los métodos de la invención usan 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 una etapa en la formación de un azúcar de nucleótidos que es un dador para la glicosiltransferasa, o catalizar una reacción implicada 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 unidas en una secuencia de nucleótidos expresable. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye los dominios catalíticamente activos de dos o más glicosiltransferasas. Véase, por ejemplo, 5.641.668. Los glicopéptidos modificados de la presente invención se pueden diseñar y preparar fácilmente empleando diversas proteínas de fusión adecuadas (véase, p. ej., la Solicitud de patente de PCT PCT/CA98/01180, que se publicó como documento WO 99/31224 el 24 de junio de 1999).

Purificación de Conjugados de Eritropoyetina

Los productos producidos con los procedimientos que se han mencionado anteriormente se pueden usar sin purificación. Sin embargo, normalmente es preferente recuperar el producto. Se pueden usar técnicas convencionales, bien conocidas para la recuperación de sacáridos glicosilados tales como cromatografía en capa fina o en capa espesa, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico, o filtración con membrana. Es preferente usar filtración con membrana, más preferentemente usar una membrana osmótica inversa, o una o más técnicas cromatográficas en columna para la recuperación tal como se analiza en lo sucesivo la presente memoria y que en la bibliografía que se menciona en la presente memoria. Por ejemplo, la filtración en membrana en donde las membranas tienen punto de corte de peso molecular de aproximadamente 3000 a aproximadamente 10.000 se pueden usar para retirar proteínas tales como glicosil transferasas. A continuación se pueden usar nanofiltración u ósmosis inversa para retirar sales y/o purificar los sacáridos producto (véase, p. ej., el documento WO 98/15581). Las membranas de nanofiltro son una clase de membranas de ósmosis inversa que dejan pasar sales monovalentes pero retienen sales polivalentes y solutos sin cargar mayores que aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Daltons, dependiendo de la membrana usada. Por lo tanto, en una aplicación habitual, los sacáridos preparados con los métodos de la presente invención serán retenidos en la membrana las sales contaminantes pasaron a través de ella.

Si la glicoproteína modificada se produce intracelularmente, como una primera etapa, 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 en el mercado, seguido por la separación de la variante de polipéptido de otras impurezas mediante una o más etapas seleccionadas entre cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (p. ej., sobre dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía sobre Blue-Sefarosa, CM Blue-Sefarosa, MONO- Q, MONO-S, lentin 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 fase inversa (p. ej., gel de sílice con grupos alifáticos anexos), filtración en gel empleando, p. ej., cromatografía por tamiz molecular de Sephadex o por exclusión de 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, se puede usar HPLC para las etapas finales de purificación.

Un inhibidor de la proteasa, *por ejemplo*, fluoruro de metilsulfonilo (PMSF) se puede incluir en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

Dentro de otra realización, los sobrenadantes de los sistemas que producen el glicopéptido modificado de la invención se concentran primero empleando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, 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. Como alternativa, 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 usados en la purificación de proteínas. Como alternativa, 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.

Por último, se pueden usar una o más etapas de RP-HPLC que usan medios hidrófobos de RP-HPLC, p. ej., gel de sílice que tiene grupos metilo colgantes 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 usar para proporcionar una glicoproteína modificada homogénea.

El glicopéptido modificado de la invención que resulta de una fermentación a gran escala se puede purificar por métodos análogos a los que se describen en 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. Como alternativa, las técnicas tales como cromatografía de afinidad se pueden usar para purificar la

glicoproteína modificada.

Composiciones farmacéuticas

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 de origen no natural, y un péptido glicosilado o no glicosilado. El polímero, resto terapéutico o biomolécula se conjuga con el péptido a través de un grupo de unión glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente al péptido y el polímero, resto terapéutico o biomolécula.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para su uso en una diversidad 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, Filadelfia, PA, 17.^a ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos de administración de fármacos, véase, Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990).

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 vehículo comprende preferentemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se puede usar cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, y carbonato de magnesio. También se pueden usar microesferas biodegradables (*p. ej.*, polilactato poliglicolato) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Las microesferas biodegradables adecuadas se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 4.897.268 y N° 5.075.109.

Comúnmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, *p. ej.*, por vía intravenosa. Por lo tanto, la invención proporciona composiciones para la administración parenteral que comprenden el compuesto disuelto o suspendido en un vehículo aceptable, preferentemente un portador acuoso, *p. ej.*, agua, agua tamponador, solución salina, PBS y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como ajuste del pH y agentes tampón, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden filtrar de forma estéril. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para usar como tal o liofilizar, combinando la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones estará por lo general entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9 y lo más preferentemente 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 convencionales. Una diversidad de métodos están disponibles para preparar liposomas, tal como se describe en, *p. ej.*, Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467 (1980), Patentes de EE.UU. N° 4.235.871, N° 4.501.728 y N° 4.837.028. El direccionamiento de liposomas empleando una diversidad de agentes de direccionamiento (*p. ej.*, los silil galactósidos de la invención) es bien conocido en la técnica (*véase, p. ej.*, Patentes de EE.UU. N° 4.957.773 y N° 4.603.044).

Se pueden usar métodos convencionales 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.

Los mecanismos de direccionamiento generalmente requieren que los agentes de direccionamiento se coloquen en la superficie del liposoma de tal manera que los restos diana estén disponibles para la interacción con la diana, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Los hidratos de carbono de la invención pueden estar unidos a una molécula de lípido antes de la formación del liposoma empleando métodos conocidos por los expertos en la técnica (*p. ej.*, alquilación o acilación de un grupo hidroxilo presente en el hidrato de carbono con un haluro de alquilo de cadena larga o con un ácido graso, respectivamente). Como alternativa, 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 hidrato de carbono de direccionamiento, que se añade más tarde. En algunos casos, es posible unir el agente diana a la molécula de conector directamente, pero en la mayoría de los casos, es más adecuado usar una tercera molécula para que actúe como un puente químico, poniéndose de este modo a la molécula conectora que se encuentra en la membrana con el agente o hidrato de carbono diana que se extiende, en tres dimensiones, fuera de la superficie de la vesícula.

Los compuestos preparados por los métodos de la invención también pueden encontrar uso como reactivos de diagnóstico. Por ejemplo, los compuestos marcados se pueden usar 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.

El principio activo usado en las composiciones farmacéuticas de la presente invención es eritropoyetina glicopegilada y sus derivados que tienen las propiedades biológicas de hacer que las células de médula ósea aumenten la producción de reticulocitos y glóbulos rojos. La dispersión liposomal de la presente invención es útil como una formulación parenteral en el tratamiento de trastornos sanguíneos caracterizados por una producción baja o defectuosa de glóbulos rojos tales como diversas formas de anemia, incluyendo anemias asociadas con fallo renal crónico, pacientes infectados con VIH tratados con zidovudina, y pacientes con cáncer con quimioterapia. Además, puede tener aplicación en el tratamiento de una diversidad de estados de enfermedad, trastornos y estados de irregularidad hematológicas, tales como, enfermedad de células falciformes, beta-talasemia, fibrosis quística, trastornos del embarazo y menstruales, anemia temprana del prematuro, lesiones de la médula espinal, vello espacial, pérdida de sangre aguda, envejecimiento y similares. Preferentemente, la composición de EPO de la presente invención se administra por vía parenteral (p. ej., IV, IM, SC o IP). Se espera que las dosificaciones eficaces varíen considerablemente dependiendo de la afección que se está tratando y la vía de administración pero se espera que estén en el intervalo de aproximadamente 0,1 (~7 U) a 100 (~7000 U) $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del material activo. Las dosis preferentes para el tratamiento de afecciones anémicas son de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 Unidades/kg tres veces a la semana. Dado que la presente invención proporciona una eritropoyetina con un mayor tiempo de permanencia in vivo, las dosificaciones indicadas se reducen opcionalmente cuando se administra una composición de la invención.

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

20 Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de UDP-GalNAc-6'-CHO

UDP-GalNAc (200 mg, 0,30 mmoles) se disolvió en una solución de CuSO_4 1 mM (20 ml) y una solución de NaH_2PO_4 25 mM (pH 6,0; 20 ml). A continuación se añadieron galactosa oxidasa (240 U; 240 μl) y catalasa (13000 U; 130 μl), el sistema de reacción equipado con un globo se cargó con oxígeno y se agitó a temperatura ambiente durante siete días. La mezcla de reacción se filtró a continuación (cartucho de agitación; MWCO 5K) y el filtrado (~40 ml) se almacenó a 4 °C durante el tiempo necesario. TLC (sílice; EtOH/agua (7/2); $R_f = 0,77$; visualizado con tinción con anisaldehído).

Ejemplo 2

30 Preparación de UDP-GalNAc-6'-NH₂

Se añadieron acetato amónico (15 mg, 0,194 mmoles) y NaBH_3CN (solución de THF 1 M; 0,17 ml, 0,17 mmoles) a la solución de UDP-GalNAc-6'-CHO mencionada anteriormente (2 ml o ~ 20 mg) a 0 °C y se permitió que calentara a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró a través de una columna G-10 con agua y el producto se recogió. Las fracciones apropiadas se liofilizaron y se almacenaron congeladas. TLC (sílice; etanol/agua (7/2); $R_f = 0,72$; visualizado con reactivo de ninhidrina).

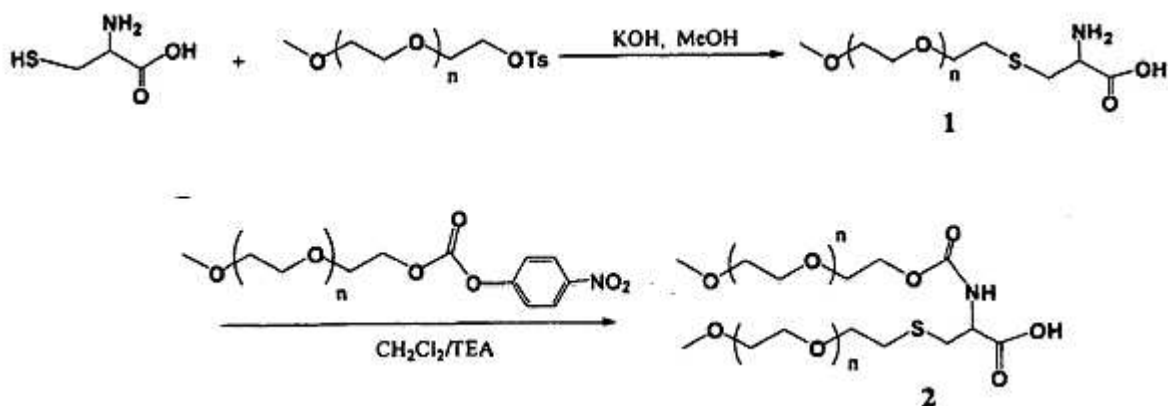
Ejemplo 3

Preparación de UDP-GalNAc-6-NHCO(CH₂)₂-O-PEG-OMe (1 KDa).

La galactosaminil-1-fosfato-2-NHCO(CH₂)₂-O-PEG-OMe (1 KDa) (58 mg, 0,045 mmoles) se disolvió en DMF (6 ml) y piridina (1,2 ml). UMP-morfolidato (60 mg, 0,15 mmoles) se añadió a continuación y la mezcla resultante se agitó a 70 °C durante 48 h. El disolvente se retiró por burbujeo con nitrógeno a través de la mezcla de reacción y el residuo se purificó por cromatografía en fase inversa (sílice C-18 silica, gradiente de etapa de 10 a 80 %, metanol/agua). Las fracciones deseadas se recogieron y se secaron a presión reducida para producir 50 mg (70 %) de un sólido de color blanco. TLC (sílice, propanol/H₂O/NH₄OH, (30/20/2), $R_f = 0,54$). MS (MALDI): Observado, 1485,1529, 1618, 1706.

Ejemplo 4

45 Preparación de Cisteína-PEG₂ (2)



4.1 Síntesis del Compuesto

Se añadió hidróxido potásico (84,2 mg, 1,5 mmol, en forma de polvo) a una solución de L-cisteína (93,7 mg, 0,75 mmol) en metanol anhidro (20 l) en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, y la continuación se añadió mPEG-O-tosilato de masa molecular de 20 kilodalton (Ts; 1,0 g, 0,05 mmol) en varias porciones durante más de 2 horas. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 días, y se concentró por evaporación rotatoria. El residuo se diluyó con agua (30 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para destruir cualquier exceso de mPEG-O-tosilato de 20 kilodalton. La solución se neutralizó a continuación con ácido acético, el pH se ajustó a pH 5,0 y se cargó en una columna de cromatografía en fase inversa (sílice C-18). La columna se eluyó con un gradiente de metanol/agua (el producto eluye a aproximadamente metanol a 70 %), la elución del producto se controló por dispersión de luz evaporativa, y las fracciones apropiadas se recogieron y se diluyeron con agua (500 ml). Esta solución se cromatografió (intercambio iónico, XK 50 Q, BIG Beads, 300 ml, forma de hidróxido; gradiente de agua a agua/ácido acético 0,75 N) y el pH de las fracciones apropiadas se redujo a 6,0 con ácido acético. Esta solución se capturó a continuación en una columna de fase inversa (sílice C-18) y se eluyó con un gradiente de metanol/agua tal como se ha descrito anteriormente. Las fracciones de producto se combinaron, se concentró, se volvió disolver en agua y se liofilizó para proporcionar 453 mg (44 %) de un sólido de color blanco (1). Los datos estructurales para el compuesto fueron los que siguen a continuación: RMN ¹H (500 MHz; D₂O) δ 2,83 (t, 2H, O-C-CH₂-S), 3,05 (c, 1H, S-CHH-CHN), 3,18 (c, 1H, (c, 1H, S-CHH-CHN), 3,38 (s, 3H, CH₃O), 3,7 (t, OCH₂CH₂O), 3,95 (c, 1H, CHN). La pureza del producto se confirmó por SDS PAGE.

4.2 Síntesis del Compuesto 2 (Cisteína -PEG₂)

Se añadió trietilamina (~0,5 ml) gota a gota a una solución del compuesto 1 (440 mg, 22 μmol) disuelto en CH₂Cl₂ anhidro (30 ml) hasta que la solución fue básica. Una solución de carbonato de mPEG-O-p-nitrofenilo de 20 kilodalton (660 mg, 33 μmol) y N-hidroxisuccinimida (3,6 mg, 30,8 μmol) en CH₂Cl₂ (20 ml) se añadió en varias porciones durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después, el disolvente se retiró por evaporación rotatoria, el residuo se disolvió en agua (100 ml), y el pH se ajustó a 9,5 con NaOH 1,0 N. la solución básica se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y a continuación se neutralizó con ácido acético hasta un pH 7,0. La solución se cargó a continuación en una columna de cromatografía en fase inversa (sílice C-18). La columna se eluyó con un gradiente de metanol/agua (el producto eluye a aproximadamente metanol a 70 %), la elución del producto se controló por dispersión de luz evaporativa, y las fracciones apropiadas se recogieron y se diluyeron con agua (500 ml). Esta solución se cromatografió (intercambio iónico, XK 50 Q, BIG Beads, 300 ml, forma de hidróxido; gradiente de agua a agua/ácido acético 0,75 N) y el pH de las fracciones apropiadas se redujo a 6,0 con ácido acético. Esta solución se capturó a continuación en una columna de fase inversa (sílice C-18) y se eluyó con un gradiente de metanol/agua tal como se ha descrito anteriormente. Las fracciones de producto se combinaron, se concentró, se volvió disolver en agua y se liofilizó para proporcionar 575 mg (70 %) de un sólido de color blanco (2). Los datos estructurales para el compuesto fueron los que siguen a continuación: RMN ¹H (500 MHz; D₂O) δ 2,83 (t, 2H, O-C-CH₂-S), 2,95 (t, 2H, O-C-CH₂-S), 3,12 (c, 1H, S-CHH-CHN), 3,39 (s, 3H CH₃O), 3,71 (t, OCH₂CH₂O). La pureza del producto se confirmó por SDS PAGE.

Ejemplo 5

Preparación de UDP-GalNAc-6-NHCO(CH₂)₂-O-PEG-OMe (1 KDa).

Galactosaminil-1-fosfato-2-NHCO(CH₂)₂-O-PEG-OMe (1 kilodalton) (58 mg, 0,045 mmoles) se disolvió en DMF (6 ml) y piridina (1,2 ml). A continuación se añadió UMP-morfolidato (60 mg, 0,15 mmoles) y la mezcla resultante se agitó a 70 °C durante 48 h. El disolvente se retiró por burbujeo con nitrógeno a través de la mezcla de reacción y el residuo se purificó por cromatografía en fase inversa (sílice C-18, gradiente de etapa de 10 a 80 %, metanol/agua). Las fracciones deseadas se recogieron y se secó a presión reducida para producir 50 mg (70 %) de un sólido de color blanco. TLC (sílice, propanol/H₂O/NH₄OH, (30/20/2), R_f = 0,54). MS (MALDI): Observado, 1485, 1529, 1618, 1706.

Ejemplo 6**Reacción de GnT1 y GalT1 en una etapa***6.1. Reacción en Una Etapa*

5 La reacción de GlcNAc transferasa-1 y galactosa transferasa-1 en una etapa se realizó por incubación de EPO (1 mg/ml) en Tris HCl 100 mM a pH 7,5 o MES a pH 6,5 que contenía NaCl 150 mM, UDP-GlcNAc 5 mM, UDP-Gal5 mM, MnCl₂ 5 mM, azida sódica al 0,02 %, 30 mU/ml de GlcNAc transferasa-1 purificada y 200 mU/ml de galactosa transferasa-1 purificada a 32 °C durante 16 h.

6.2. Purificación de EPO en Superdex75

10 Una columna Superdex 75 se equilibró en tampón MES 100 mM a pH 6,5 que contenía NaCl 150 mM a un caudal de 5 ml/min. La EPO, producto de la etapa 6.1 (anterior) se cargó en la columna y se eluyó con el tampón de equilibrio. El eluido se controló para absorbancia a 280 nm y la conductividad. Se usó SDS-PAGE para determinar que fracciones de picos combinados contienen la EPO y se usó en experimentos adicionales.

6.3. Reacción de ST3Gal-III

15 La reacción de ST3Gal-III se realizó por incubación de 1 mg/ml EPO-Gal (a partir de la etapa 6.2, anterior) en Tris HCl 100 mM a pH 7,5 o MES a pH 6,5 que contenía NaCl 150 mM, CMP-ácido N-acetil-neuramínico-20 kilodalton-PEG 0,5 mM, azida sódica al 0,02 %, y 200 mU/ml de ST3Gal-III purificada a 32 °C durante 16 horas.

Ejemplo 7**Reacción de GnT1, GalT1 y ST3Gal-III (empleando CMP-NAN-20KPEG) en una etapa**

20 EPO (1 mg/ml) se incubó con 30 mU/ml de GlcNAc transferasa-1, 200 mU/ml de Galactosa transferasa-1 y 500 mU/ml de ST3Gal-III con nucleótidos de azúcar y CMP-ácido N-acetil-neuramínico-20 Kd PEG en tampón MES 100 mM a pH 6,5 y se analizó empleando SDS-PAGE. De forma similar a la de los resultados obtenidos en las reacciones de remodelación de enzimas en dos etapas, se observan tres bandas de EPO PEGilada en las preparaciones de tres enzimas, de una etapa.

Ejemplo 8**Producción de PEG-EPO Biantenaria***8.1. Adición de GlcNAc a rEPO*

EPO recombinante, expresada en baculovirus (1 mg/ml) en Tris 0,1 M, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM y azida sódica al 0,02 % a pH 7,2 se incubó con USP-GlcNAc3 mM, 50 mU/mg de GlcNAc transferasa-1 y 50 mU/mg de GlcNAc transferasa-II a 32 °C durante 24 horas.

8.2. Adición de Galactosa

30 Al péptido marcado con GlcNAc de la etapa 8.1 (anterior) se añadió UDP-Gal 3 mM y 0,2 U/mg de Galactosa transferasa-1. La mezcla se incubó durante 36 horas a 32 °C. El producto galactosilado se aisló por cromatografía de filtración en gel sobre una columna Superdex 75 en solución salina tamponada con Tris. El producto purificado se concentró a 1 mg/ml.

8.3. Adición de Ácido Siálico o Ácido Siálico PEG

35 El producto galactosilado de la etapa 8.2 (anterior) (1 mg/ml) en Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M a pH 7,2 se incubó a 32 °C durante 24 horas con 200 mU/mg de ST3GalIII y CMP-ácido siálico 0,5 mM o CMP-ácido siálico-PEG (en donde el PEG tiene una masa molecular de 5 kilodaltons, 10 kilodaltons o 20 kilodaltons).

Ejemplo 9**PEGilación de 30K unido a N con CST-II**

40 La EPO glicosilada tal como se expresa en células CHO (Ovario de Hámster Chino) (5 mg, 0,166 µmol, 5 ml) se concentró y se intercambió el tampón por tampón tris (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 0,001 M + NaN₃ al 0,005 %) hasta un volumen final de 5 ml. A continuación se añadieron CMP-ácido siálico-PEG (30 kilodaltons, 25 mg, 0,833 µmol; véase la Figura 3B para la estructura de 30 Kdalton de CMP-ácido siálico-PEG), 0,25 ml de MnCl₂ 100 mM
45 0,25 ml, y una sialiltransferasa bifuncional de *Campylobacter jejuni*, CST-II (1,4 U/ml, 0,5 ml, 0,7 U). La mezcla resultante se agitó a 32 °C durante 48 horas.

Al final de la reacción, la mezcla se concentró por ultrafiltración hasta un volumen final de 1 ml, y que a continuación se hizo intercambio de tampón por NaOAc 25 mM + Tween-80 al 0,005 % (pH 6,0) a 2,5 ml. Se realizó cromatografía

IEX en Q-Sepharose empleando NaOAc 25 mM + NaCl 2 M + Tween-80 al 0,005 % (pH 6,0) como eluyente. El Pico 2 se recogió y se concentró a 1,5 ml por ultrafiltración, a continuación se sometió a purificación en superdex-200 (columna: Superdex 200, 16/60 GL, Amersham) empleando 1X de PBS (pH 5,5 + Tween 80 al 0,005 %) como eluyente. El Pico 2 se recogió y se concentró a 1,5 ml. Este material resultante se filtró de forma estéril y se formuló hasta un volumen final de 2,5 ml empleando NaOAc 10 mM (NaCl 0,75 %, pH 5,5). Concentración de proteína 264 µg/ml; se obtuvieron 660 µg de proteína (determinación por BCA).

Ejemplo 10

El siguiente ejemplo ilustra un método para preparar EPO unida a PEG de 40 kilodalton unido a O empleando ST3GalIII.

10.1. Desialilación

En esta etapa, se cultivó EPO en células de Ovario de Hámster Chino (células CHO), se desialiló. La unión GlcNAc-Gal sirve como un aceptor para la transferencia del ácido siálico PEG modificado en la etapa 10.2, que sigue a continuación.

A 10 ml de solución de EPO (10 mg, 0,33 µmol) glicosilada tal como se expresa en células CHO (Ovario de Hámster Chino), se hizo intercambio de tampón por tampón Tris (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,02 %, pH 7,2) para dar un volumen final de 10 ml. A continuación se añadieron a la solución 750 mU de 2,3,6,8-neuramidasa, de *Arthrobacter Ureafaciens*. La mezcla resultante se agitó a 32 °C durante 48 horas. El producto de esta etapa se usó directamente en la siguiente etapa del protocolo (véase a continuación).

10.2. PEGilación de 40 K unida a O

En esta etapa, se emplea O-sialiltransferasa para transferir un resto modificado de ácido siálico-PEG a la desialilada de la etapa 10.1, anterior.

CMP-ácido siálico-PEG (40 kilodalton, 33 mg, 0,825 µmol; véase la Figura 3A para la estructura de CMP-SA-PEG de 40 kilodalton), O-sialiltransferasa (1,4 U/ml, 300 mU), y 0,25 ml de MnCl₂ 100 mM se añadieron a la mitad de la mezcla anterior. Esta mezcla se agitó a 32 °C durante 48 horas. Después del período de 48 horas, la mezcla de reacción se concentró por ultrafiltración (MWCO 5K) hasta 2,8 ml, a continuación se intercambió el tampón por NaOAc 25 mM + Tween-80 al 0,001 %, pH 6,0) hasta un volumen final de 3 ml. Se hizo intercambio iónico al producto final purificado sobre SP (5 ml) tres veces (tres inyecciones, cada una de 1 ml). Se recogió EPO PEGilada (Pico 2) y se concentró por ultrafiltración hasta un volumen final de 2 ml para purificación por SEC. La purificación en superdex 200 proporcionó la resolución de la proteína deseada: EPO-GlcNAc-Gal-SA-PEG (40 K) para la etapa final de la reacción.

10.3. Sialilación terminal completa de CHO-EPO-GalNAc-Gal-SA-PEG (40K)

En esta etapa del proceso, se añadió ácido siálico a los extremos de estructuras de glicosilo que no soportaban un resto de ácido siálico modificado.

EPO PEGilada combinada (aproximadamente 2 mg a partir de la reacción en la etapa b anterior) se concentró por ultrafiltración (MWCO 5K.) a continuación se intercambio iónico con tampón tris (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 0,001 M + NaN₃ al 0,005 %) hasta un volumen final de 2 ml. A continuación, se añadieron CMP-ácido N-acetil neuramínico (CMP-NANA; 1,5 mg, 2,4 µmol), ST3GalIII (8,9 U/ml, 10 µl, 0,089 U) y se añadieron 50 µl de MnCl₂ 100 mM. La mezcla resultante se agitó a 32 °C durante 24 h, a continuación se concentró hasta un volumen final de 1 ml. Esta solución se sometió directamente a purificación con Superdex 200 empleando 1X de PBS (pH 5,5 + Tween 80 al 0,005 %) como eluyente. El Pico 1 se recogió y huyó a 10 ml. Concentración de proteína 52,8 µg/ml (BCA). Se obtuvieron un total de total 528 µg de proteína. Una representación esquemática del producto peptídico final se muestran a Figura 4A.

Ejemplo 11

En este ejemplo, los perfiles farmacocinéticos de EPO derivada de CHO administrada por vía intravenosa (se muestra una representación esquemática en la Figura 5) y variantes glicopegiladas de la EPO derivada de CHO se compararon empleando un ensayo de ELISA.

La farmacocinética de dos lotes no PEGilados de Eritropoyetina derivada de CHO, una Eritropoyetina derivada de CHO PEGilada de 30 K (Figura 4B) producida con métodos de la invención, y una Eritropoyetina derivada de CHO PEGilada de 40 K (Figura 4A) producida con métodos de la invención, se comparó con ELISA después de una sola dosis intravenosa de 30 µg/kg en ratas.

11.1 Preparación de la placa de ELISA.

Se dosificó un anticuerpo de captura frente a EPO humana en todos los pocillos de una placa de 96 pocillos a 100 µl por pocillo. La placa se cubrió con cinta para cerrar placas herméticamente y se incubó durante 2 horas a 37 °C. El

anticuerpo de Captura se retiró de la placa lavando 2 veces con solución salina campanada con Tris que contenía Tween-20 al 0,2 % (TBST). Después de un tercer lavado, una solución del bloqueo de leche al 3 % (TBST más leche al 3 %) se añadió a la placa, la placa se cubrió con cinta para cerrar placas herméticamente y se incubó durante una noche a 4 °C.

- 5 Por la mañana, la solución del bloqueo se retiró clavando 3 veces con TBST. Las muestras de plasma de ratas y las proteínas convencionales diluyeron apropiadamente con plasma de ratas y se dosificaron en los pocillos a 100 µl/pocillo. La placa se cubrió con cinta para cerrar placas herméticamente y se incubó durante una noche a 4 °C.

- 10 A la mañana siguiente, se emplearon proteínas convencionales para generar una regresión estándar convencional para cada una de las proteínas de EPO cuyas propiedades farmacocinéticas se sometieron a ensayo. Un análisis de HPLC en fase inversa de las proteínas convencionales se completó y las concentraciones se determinaron calculando el área bajo el pico o los picos correspondientes a la proteína detectada.

11.2 Preparación y adición de las muestras de ensayo.

Cada muestra de ensayo se diluyó y las muestras diluidas se dosificaron en una placa para ELISA a 100 µl/pocillo. La placa se cubrió a continuación con cinta para cerrar placas herméticamente y se incubó durante una noche a 4 °C.

5 11.3 Medida de los recuentos de Europio.

Por la mañana, las muestras de suero de rata se retiraron las placas se lavaron 3 veces con TBST. El anticipo de detección, EPO anti-humana de ratón que anteriormente se marcó con Europio c y sacrificio a través de una columna de filtración en gel, se aplicó a las placas de ELISA. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación a 100 rpm.

10 El anticuerpo de detección se retiró clavando las placas 6 veces con TBST. Se añadió solución de refuerzo a las placas a 200 µl/pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. La fluorescencia se leyó con un lector de placas Wallac empleando un programa de recuento de Europio.

11.4 Resultados

11. 4a Generación de la Regresión Lineal Estándar

15 Los recuentos de Europio a partir de las proteínas convencionales para cada placa se emplearon para generar una curva de regresión lineal estándar y una ecuación. La ecuación se usó para convertir el recuento de Europio en la cantidad de EPO equivalente para cada pocillo de muestra.

11.4b Resultados farmacocinéticos

20 Los resultados se muestran en la Figura 6. El límite de detección es de aproximadamente 0,4 ng/ml para la no PEGilada, y de aproximadamente 0,8 ng/ml para EPO PEGilada tanto de 30 kilodalton como de 40 kilodalton.

25 La EPO derivada de CHO PEGilada de 30 kilodalton, y la EPO derivada de CHO PEGilada de 40 kilodalton, presentan claramente parámetros de aclaramiento intravenoso muy superiores con respecto a sus homólogos sin PEGilar. Tal como se puede observar en la Figura, las diversas isoformas de EPO se clasificaron como EPO derivada de CHO PEGilada de 40 kilodalton ~ EPO derivada de CHO PEGilada de 30 kilodalton >>> homólogos sin PEGilar.

Ejemplo 12

En este ejemplo, los perfiles farmacocinéticos de Eritropoyetina derivada de CHO administrada por vía subcutánea (EPO), una EPO sin glicopegilar hiperglicosilada, una EPO glicopegilar cultivar en células de insecto, y una EPO glicopegilar derivada de células CHO se determinaron empleando un ensayo de ELISA.

30 La farmacocinética de una EPO derivada de CHO sin glicopegilar, una EPO derivada de CHO hiperglicosilada sin PEGilar, una EPO derivada de células de insecto glicoPEGilada; una Eritropoyetina derivada de células de insecto PEGilada unida a N de 10 K (una representación esquemática se muestra en la Figura 7), y Eritropoyetina derivada de CHO PEGilada unida a O de 40 kilodalton (véase la Figura 4A) se compararon por ELISA después de administrar a las ratas una sola dosis subcutánea de 10 µg/kg.

35 Las placas para ELISA se prepararon y se bloquearon tal como se ha descrito en el Ejemplo 10. También se prepararon proteínas y además se determinaron los recuentos de Europio tal como se ha descrito anteriormente.

12. 1 Preparación y adición de las muestras de rata.

40 Después de las inyecciones subcutáneas (S.C.), la cantidad de EPO en la circulación se redujo en comparación con la observada en las inyecciones I.V. equivalentes. Las concentraciones en plasma de las proteínas de EPO inyectadas S.C. por lo general se detectaron de 30 minutos a 48 horas después de la inyección.

12.2 Resultados farmacocinéticos.

45 Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 8. La Figura 8 muestra la cantidad promedio de EPO en ng/ml y las desviaciones estándar en las muestras de suero de rata en diferentes puntos temporales después del tiempo de inyección = 0 horas para cada grupo de variante de EPO. El límite de detección es de aproximadamente 0,3 ng/ml para EPO non-PEGilada y para EPO PEGilada.

En el caso de la EPO PEGilada de 10 K cultivar en células e insectos y la CHO-EPO PEGilada de 40 kilodalton, parece que la absorción es gradual, creando una situación en donde muchas de estas variantes de EPO permanecen para ser absorbidas mucho más allá del nivel de suero del pico ($C_{m\acute{a}x}$).

50 La variante de EPO PEGilada de 10K cultivada en células de insecto consigue $C_{m\acute{a}x}$ en un intervalo de tiempo de 24-36 horas después de la inyección. Mientras que la variante de CHO-EPO PEGilada de 40 kilodalton consigue una C

m_{\max} a las 40-60 horas después de la inyección. Además, estaban presentes niveles apreciables de las variantes pegiladas a las 96 horas después de la inyección con la dosis real inyectada.

El orden de clasificación del suero $t_{1/2}$ es como sigue a continuación: CHO-EPO PEGilada de 40 kilodalton > variante de EPO PEGilada de 10 K cultivada en células de insecto > CHO-EPO hiperglicosilada >> CHO-EPO sin pegilar.

5 **Ejemplo 13**

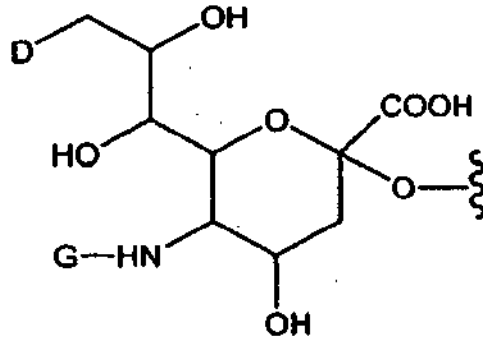
Las actividades relativas de dos variantes de EPO sin pegilar (A y B) se compararon con dos variantes glicoPEGiladas (PEG de 30 kilodalton y de 40 kilodalton) y con un PEG hiperglicosilado en la estimulación de la proliferación de células TF1 que soportan receptores de EPO en cultivo. Las actividades de los péptidos de EPO glicopegilada en este ensayo son similares a las de la variante de EPO hiperglicosilada.

10 **Ejemplo 14**

La inhibición de la unión de EPO marcada con isótopos a un receptor de EPO quimérica recombinante con diversas concentraciones de EPO sin pegilar (A y B) y variantes de PEG de 30 kilodalton y de 40 kilodalton glicoPEGiladas. Las afinidades por el receptor (K_i) son similares para EPO sin pegilar y para las variantes glicoPEGiladas.

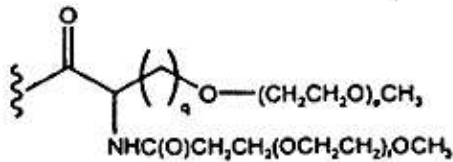
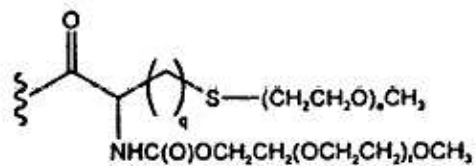
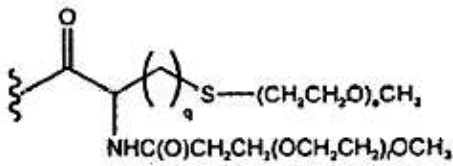
REIVINDICACIONES

1. Un péptido de eritropoyetina que comprende el resto:

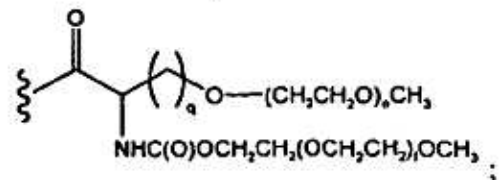


en donde

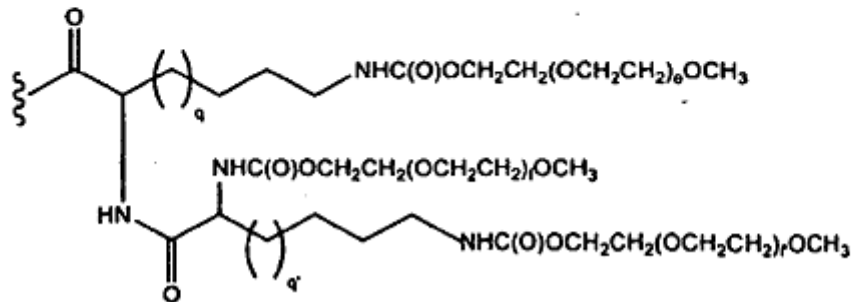
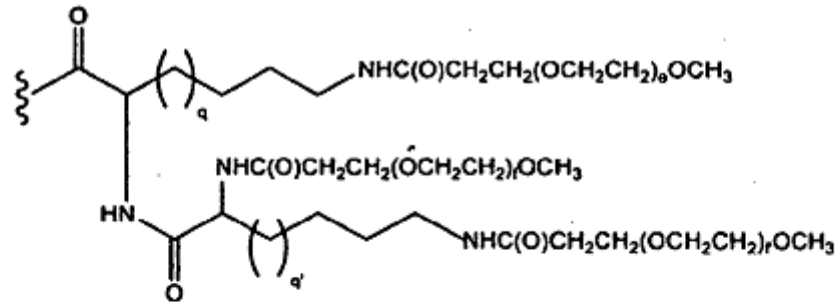
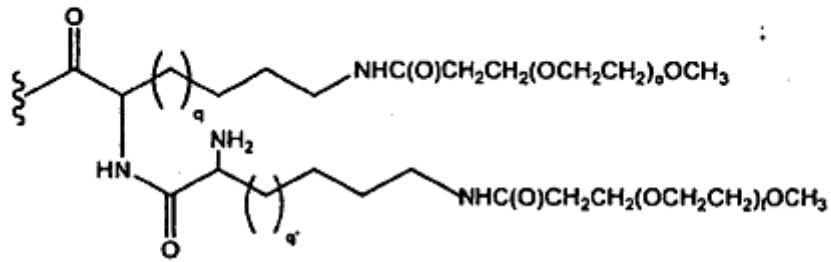
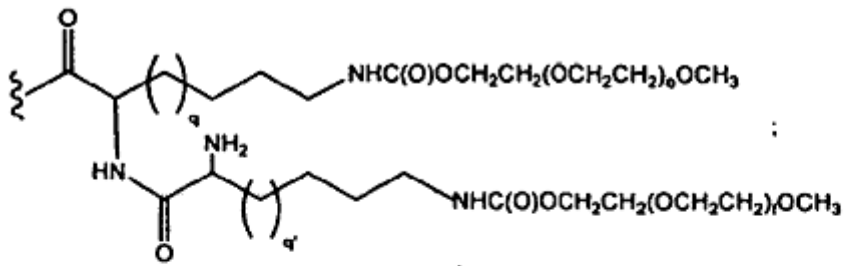
- 5 D es un miembro seleccionado entre -OH y R¹-L-HN-;
 G es un miembro seleccionado entre R¹-L- y -C(O)alquilo (C₁-C₆);
 R¹ tiene una estructura que es un miembro seleccionado entre:

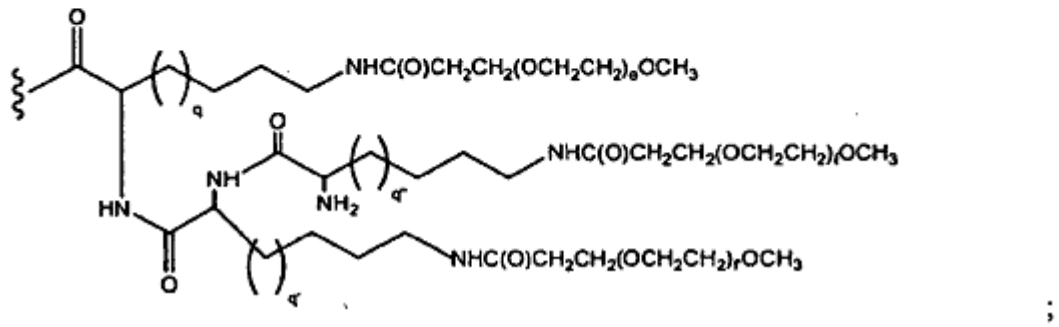
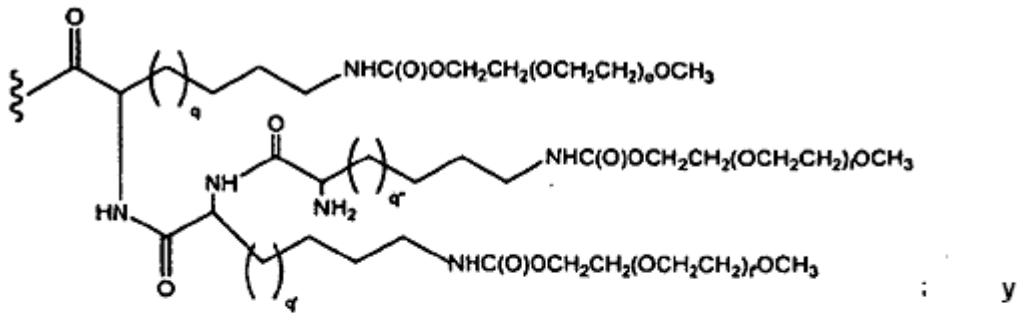


;



RN:SL





en donde

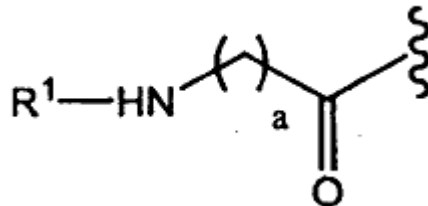
e, f y f' son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500; y

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

5 L es un conector que es un miembro seleccionado entre un enlace, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir,

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-

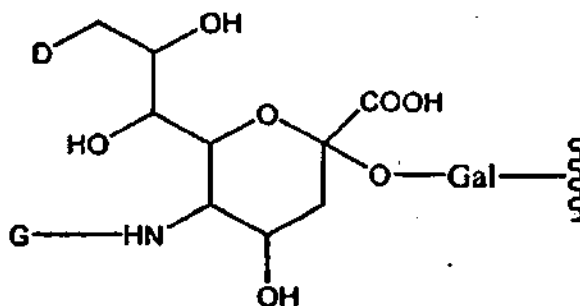
2. El péptido según la reivindicación 1, en donde L-R¹ tiene la fórmula:



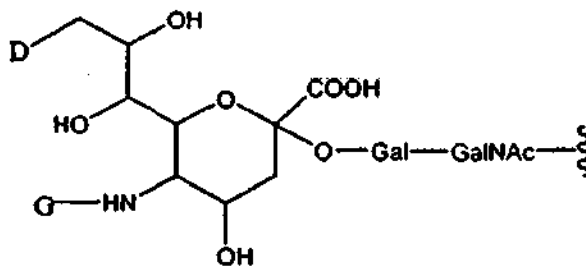
10 en donde

a es un número entero de 0 a 20.

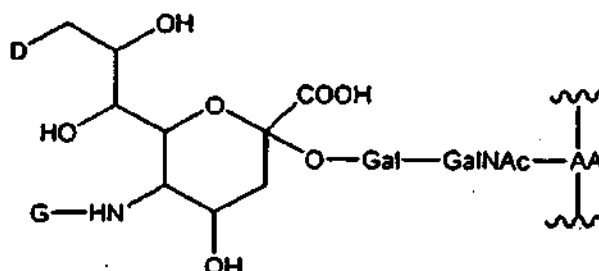
3. El péptido según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho resto tiene la fórmula:



4. El péptido según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho resto tiene la fórmula:



5. El péptido según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho resto tiene la fórmula:



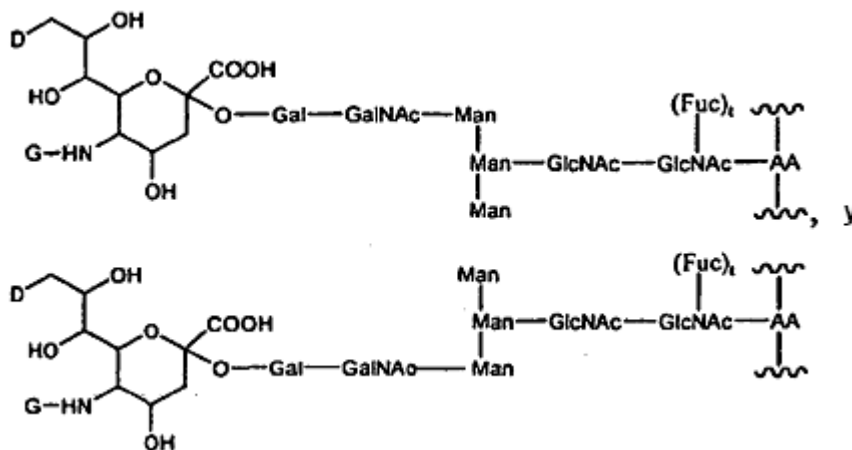
5 en donde AA es un resto de aminoácido de dicho péptido.

6. El péptido según la reivindicación 5, en donde dicho resto de aminoácido es serina o treonina.

7. El péptido según la reivindicación 6, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N°: 1.

8. El péptido según la reivindicación 7, en donde dicho resto de aminoácido es una serina en la posición 126 de la SEC. ID. N°: 1.

10 9. El péptido según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho péptido comprende al menos uno de dichos restos según una fórmula seleccionada entre:

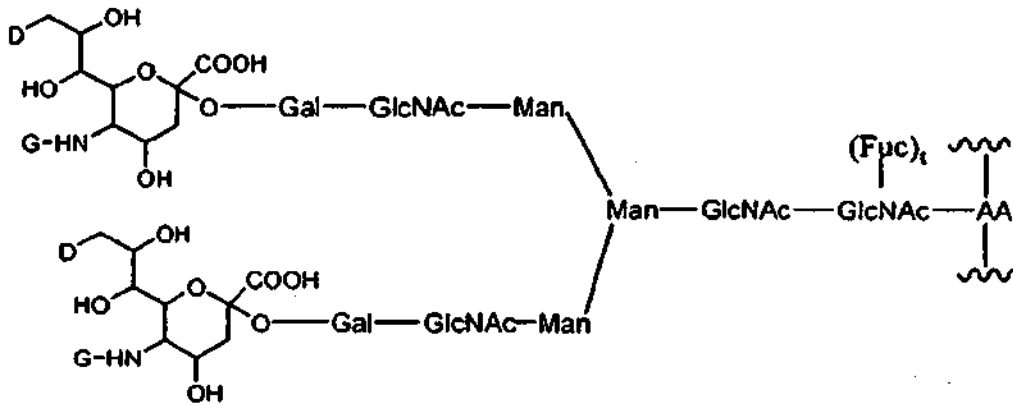


en donde AA es un resto de aminoácido de dicho péptido y t es un número entero igual a 0 o 1.

10. El péptido según la reivindicación 9, en donde dicho resto de aminoácido es un resto de asparagina.

15 11. El péptido según la reivindicación 10, que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1, y en donde dicho resto de aminoácido es un resto de asparagina que es un miembro seleccionado entre N24, N38, N83, y combinaciones de los mismos.

12. El péptido según la reivindicación 1 o 2, que comprende al menos un resto de fórmula:

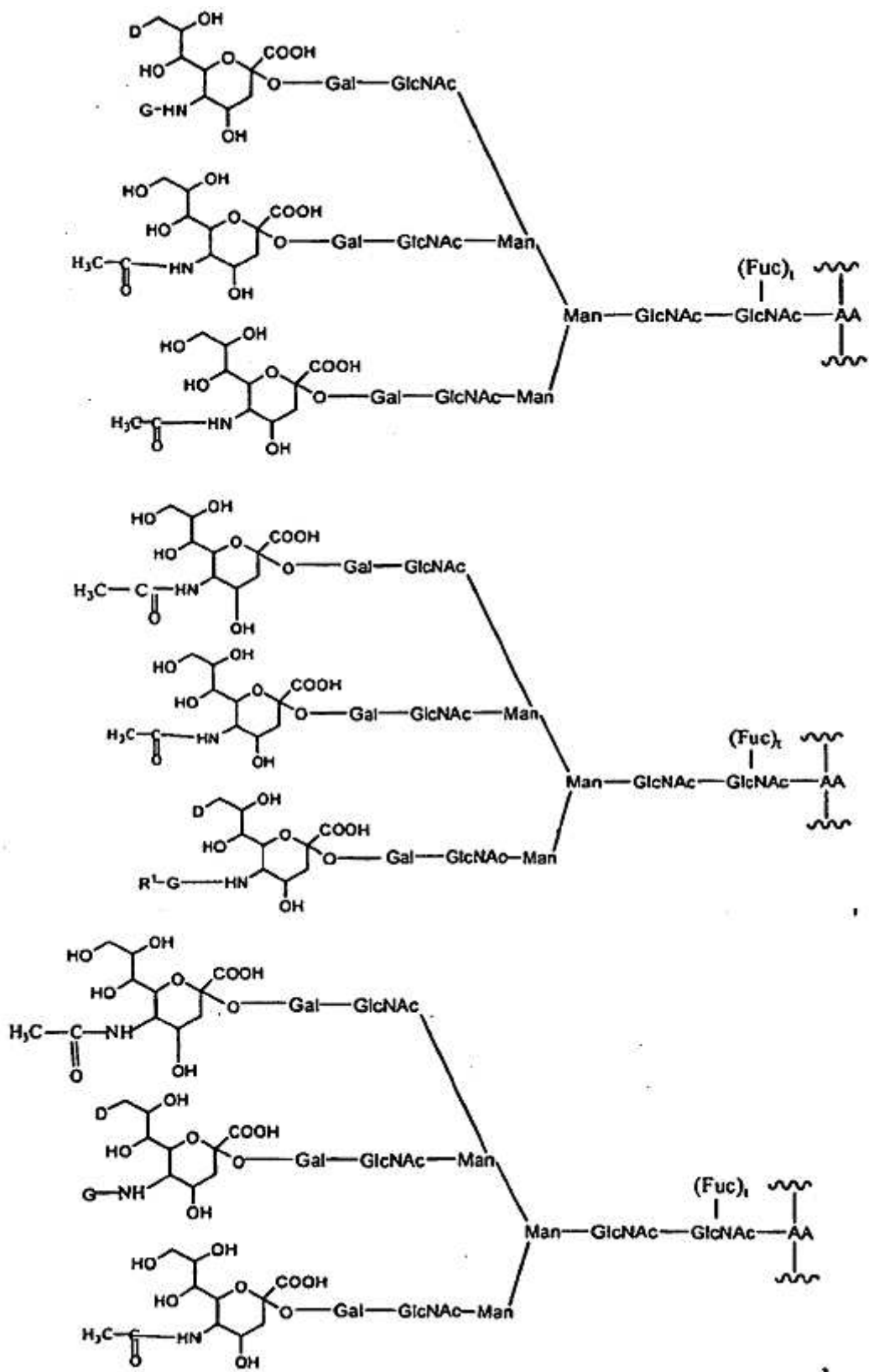


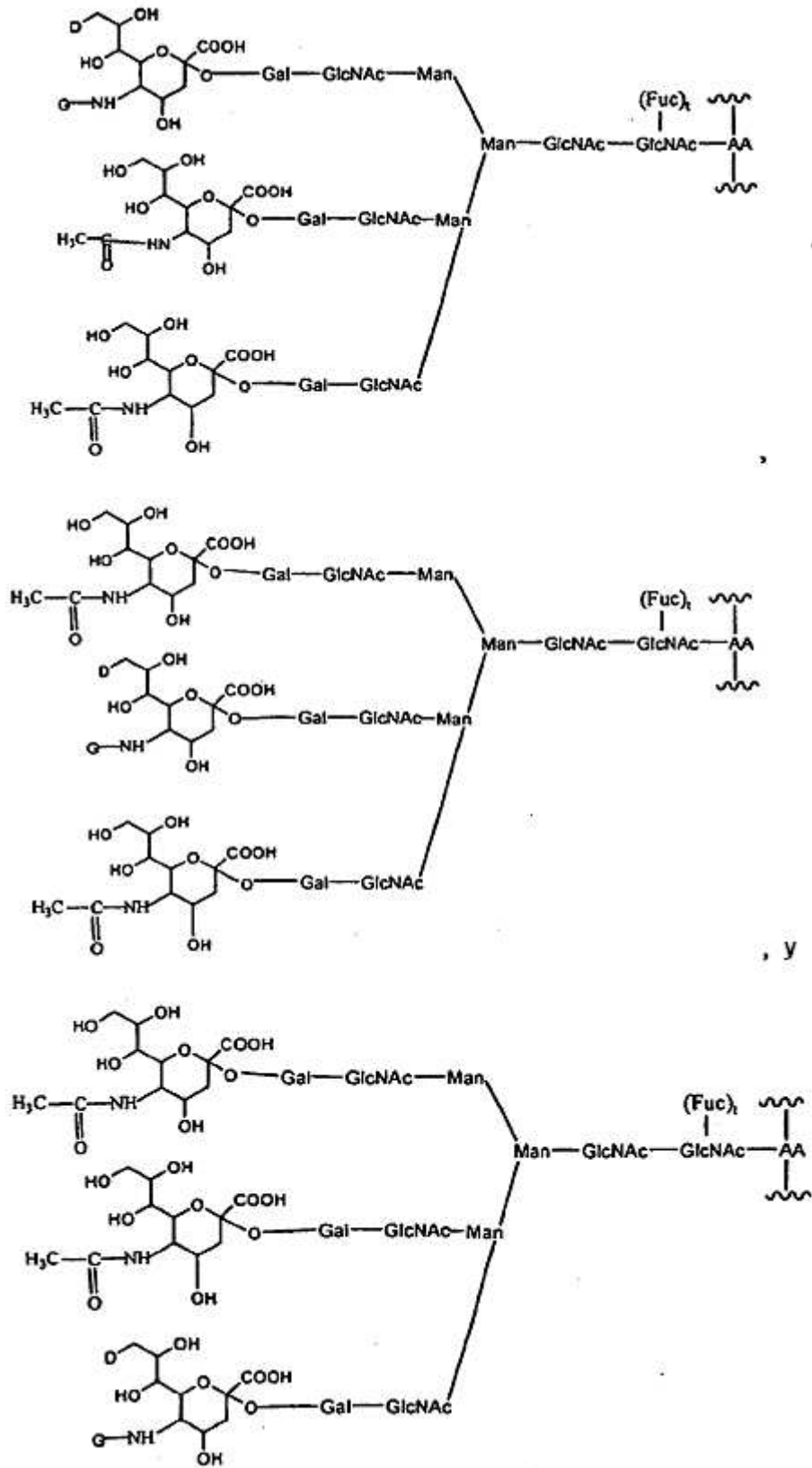
en donde AA es un resto de aminoácido de dicho péptido, y t es un número entero igual a 0 o 1.

13. El péptido según la reivindicación 12, en donde dicho resto de aminoácido es un resto de arginina.

5 14. El péptido según la reivindicación 13, que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1, y en donde dicho resto de aminoácido es un resto de asparagina que es un miembro seleccionado entre N24, N38, N83, y combinaciones de los mismos.

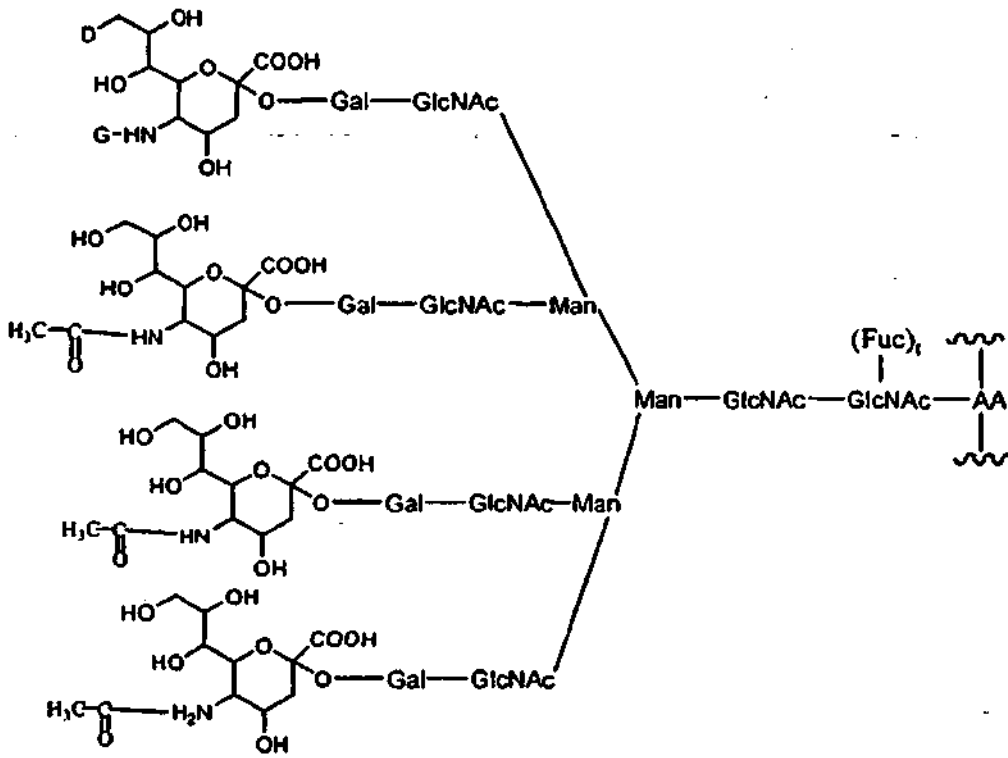
15. El péptido según la reivindicación 1, en donde dicho péptido comprende al menos uno de dichos restos según una fórmula seleccionada entre:

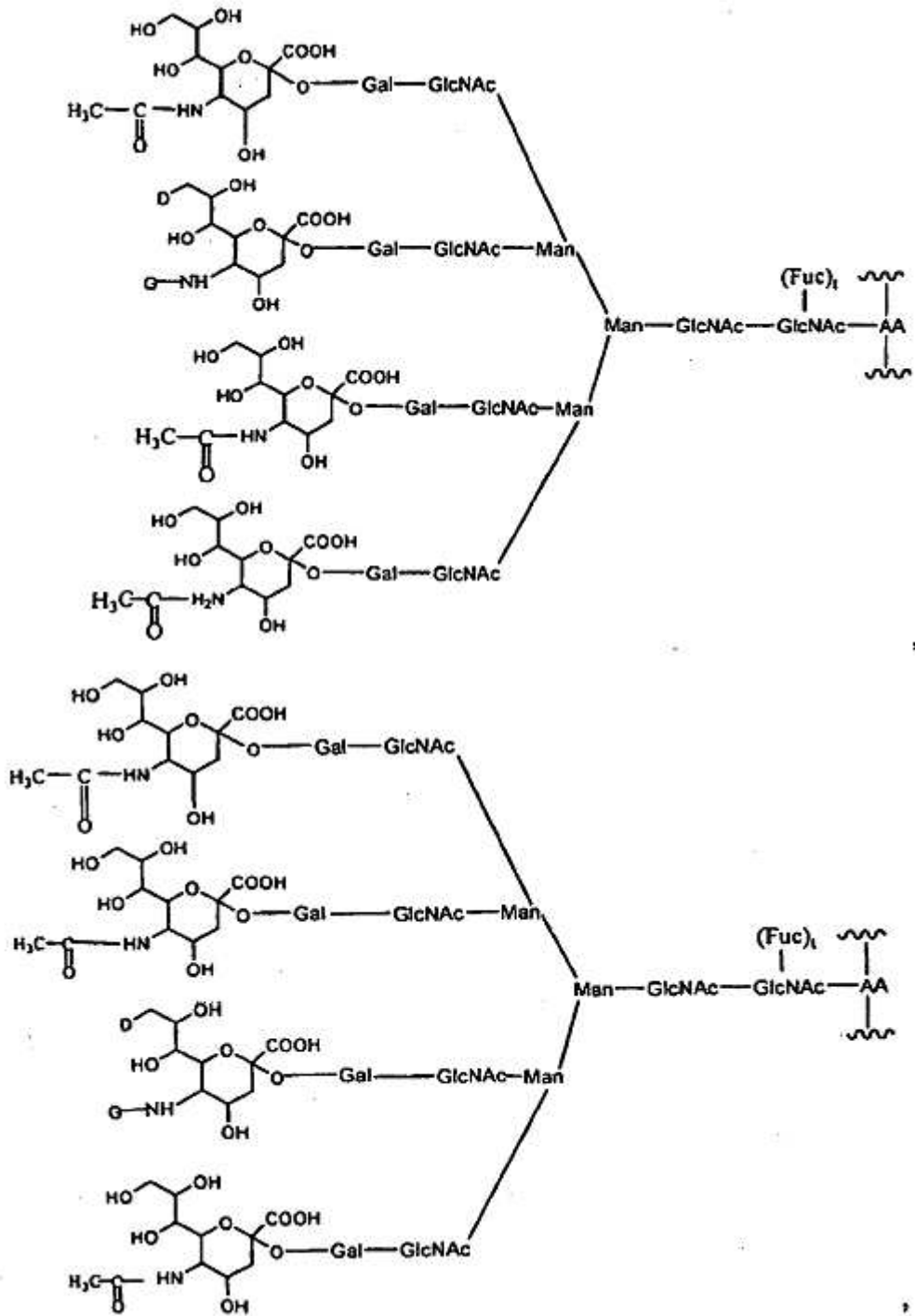


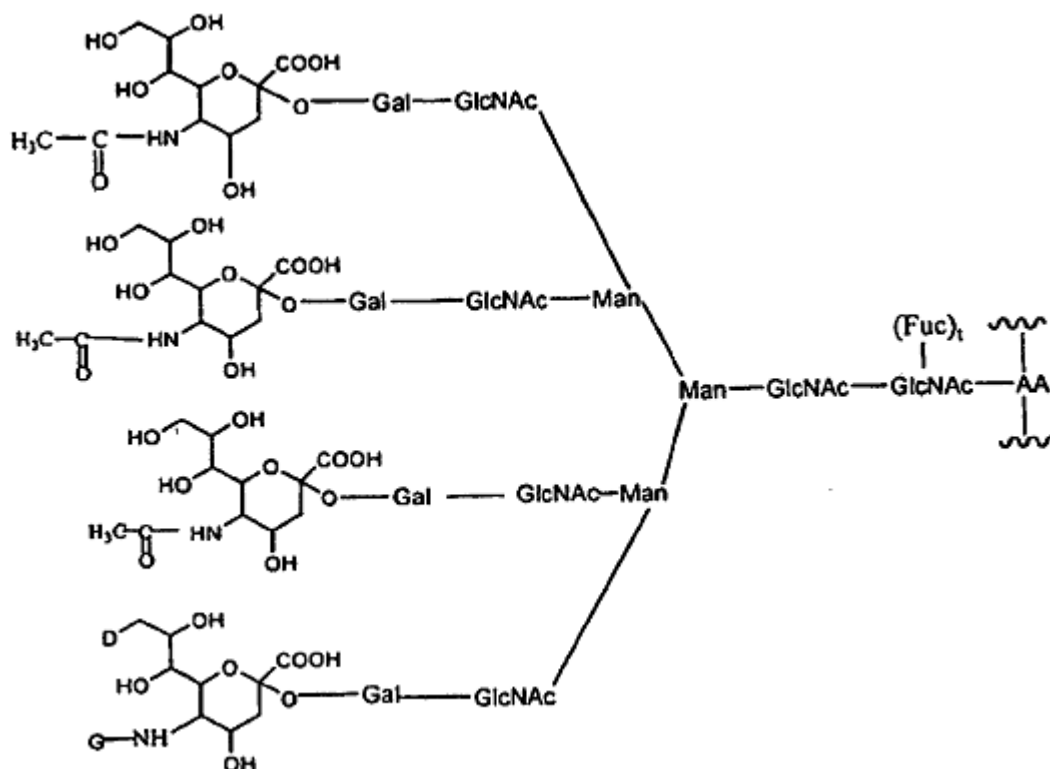


en donde AA es un resto de aminoácido de dicho péptido, y t es un número entero igual a 0 o 1.

16. El péptido según la reivindicación 1 en donde dicho péptido comprende al menos un resto mencionado según una fórmula seleccionada entre:







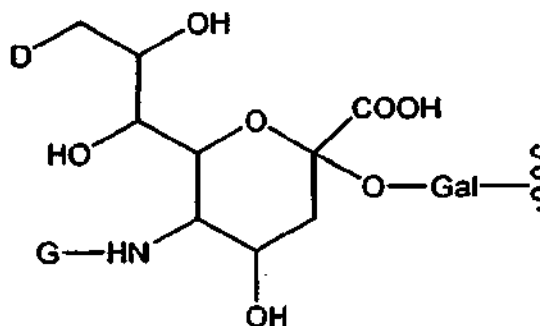
en donde AA es un resto de aminoácido de dicho péptido, y t es un número entero igual 0 o 1.

17. El péptido según la reivindicación 16, en donde dicho resto de aminoácido es un resto de asparagina.

5 18. El péptido según la reivindicación 17, en donde dicho péptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1, y en donde dicho resto de aminoácido es un resto de asparagina que es un miembro seleccionado entre N24, N38, N83, y combinaciones de los mismos.

19. El péptido según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho péptido es un péptido de eritropoyetina bioactiva.

20. Un método para preparar una eritropoyetina PEG-ilada que comprende el resto:



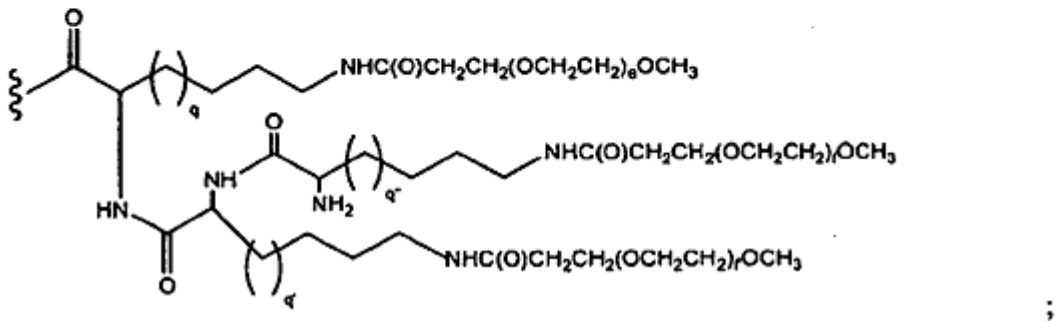
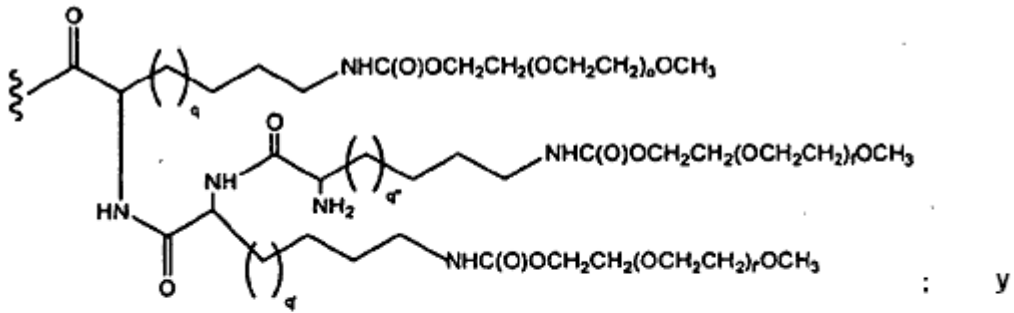
10

en donde

D es un miembro seleccionado entre -OH y R¹-L-HN-;

G es un miembro seleccionado entre R¹-L- y -C(O)alquilo (C₁-C₆);

R¹ tiene una estructura que es un miembro seleccionado entre:



en donde

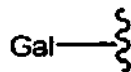
e, f y f' son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500; y

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

- 5 L es un conector que es un miembro seleccionado entre alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir,

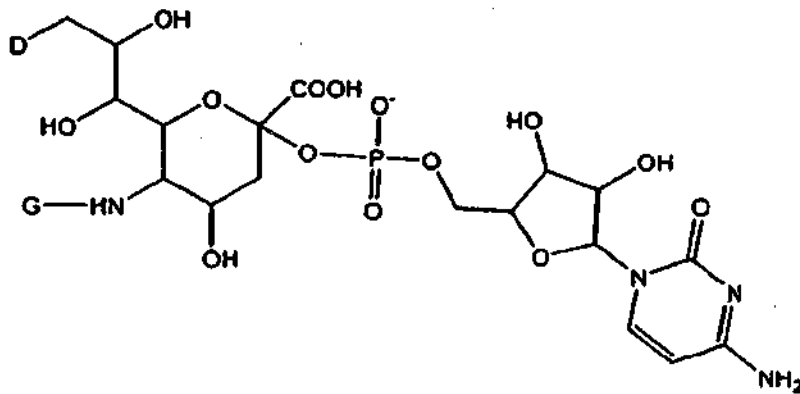
de modo que cuando D es OH, G es R¹-L-, y cuando G es -C(O)alquilo (C₁-C₆), D es R¹-L-NH-, comprendiendo dicho método:

(a) poner en contacto un sustrato peptídico de eritropoyetina que comprende el resto glicosilo:



10

con un resto dador de PEG-ácido siálico que tiene la fórmula:



y una enzima que transfiere dicho PEG-ácido siálico sobre el Gal de dicho resto glicosilo, en condiciones apropiadas

para dicha transferencia.

21. El método de la reivindicación 20, que comprende adicionalmente, antes de la etapa (a):

(b) expresar dicho sustrato peptídico de eritropoyetina en un huésped adecuado.

5 22. El método de la reivindicación 21, en donde dicho huésped se selecciona entre una célula de insecto y una célula de mamífero.

23. El método de la reivindicación 22, en donde dicha célula de insecto es una línea celular de *Spodoptera frugiperda*.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, que comprende adicionalmente formular el péptido en una formulación farmacéutica.

10 25. Uso de un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para la preparación de un medicamento para tratar una afección caracterizada por la producción comprometida de glóbulos rojos.

26. Uso de un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para la preparación de un medicamento para potenciar la producción de glóbulos rojos en un mamífero.

15 27. Uso de un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para la preparación de un medicamento para tratar una lesión tisular caracterizada por daño resultante de isquemia, traumatismo, inflamación o contacto con sustancias tóxicas.

28. Una formulación farmacéutica que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

29. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para uso terapéutico.

20

FIGURA 1

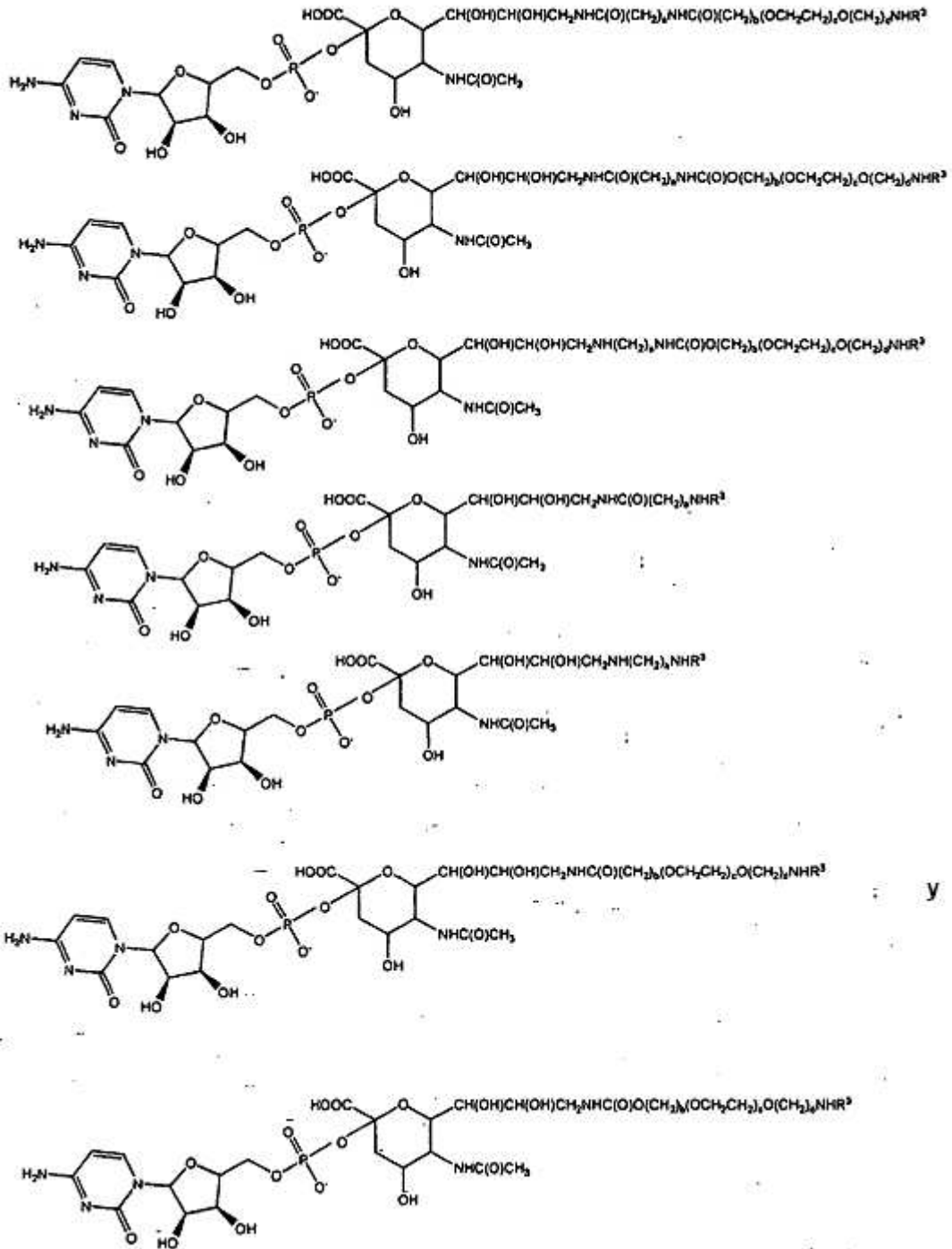


FIGURA 2

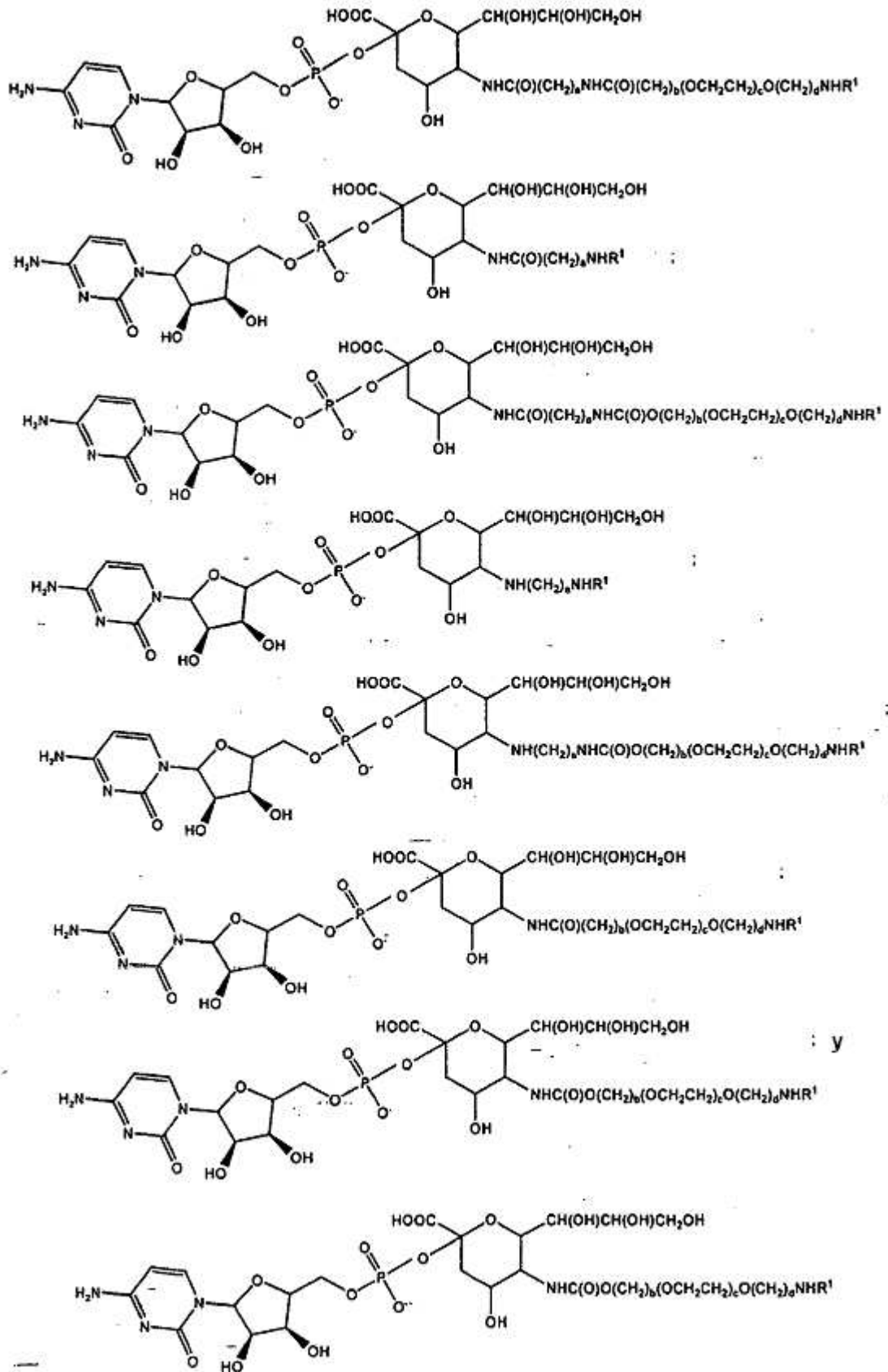


FIGURA 3A

Estructura de CMP-SA-PEG(40K)

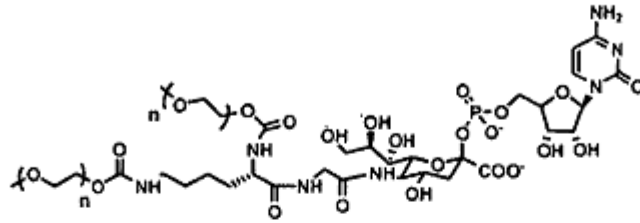


FIGURA 3B
Estructura de CMP-SA-PEG(30K)

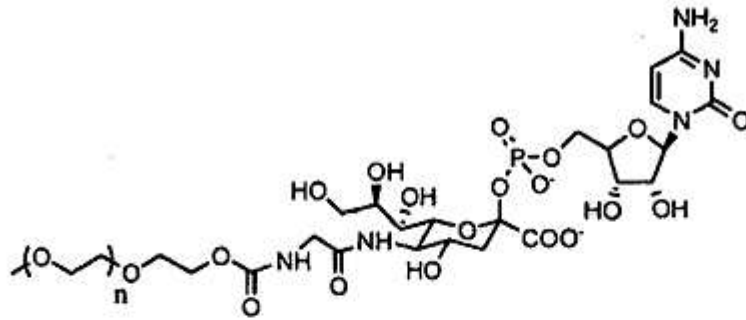


FIGURA 4 A

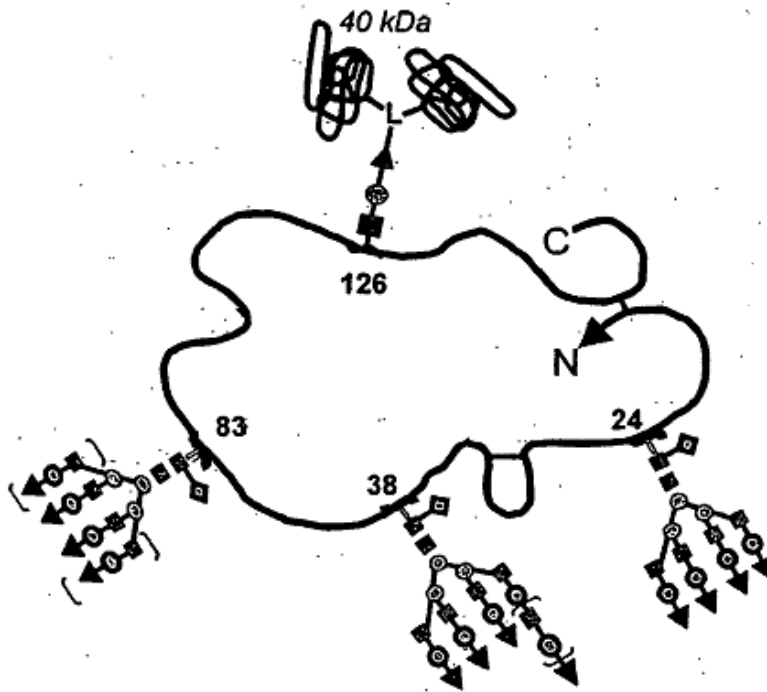


FIGURA 4 B

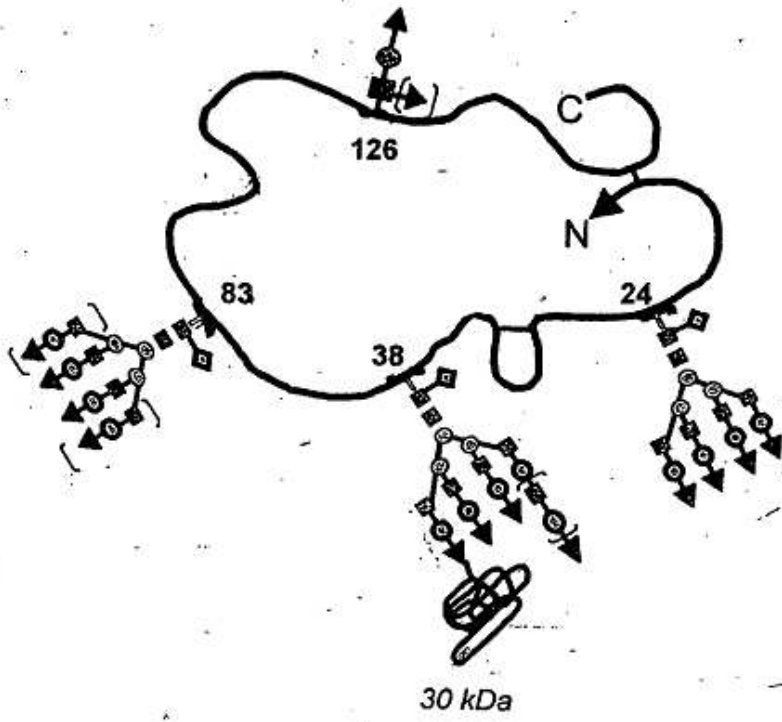


FIGURA 5

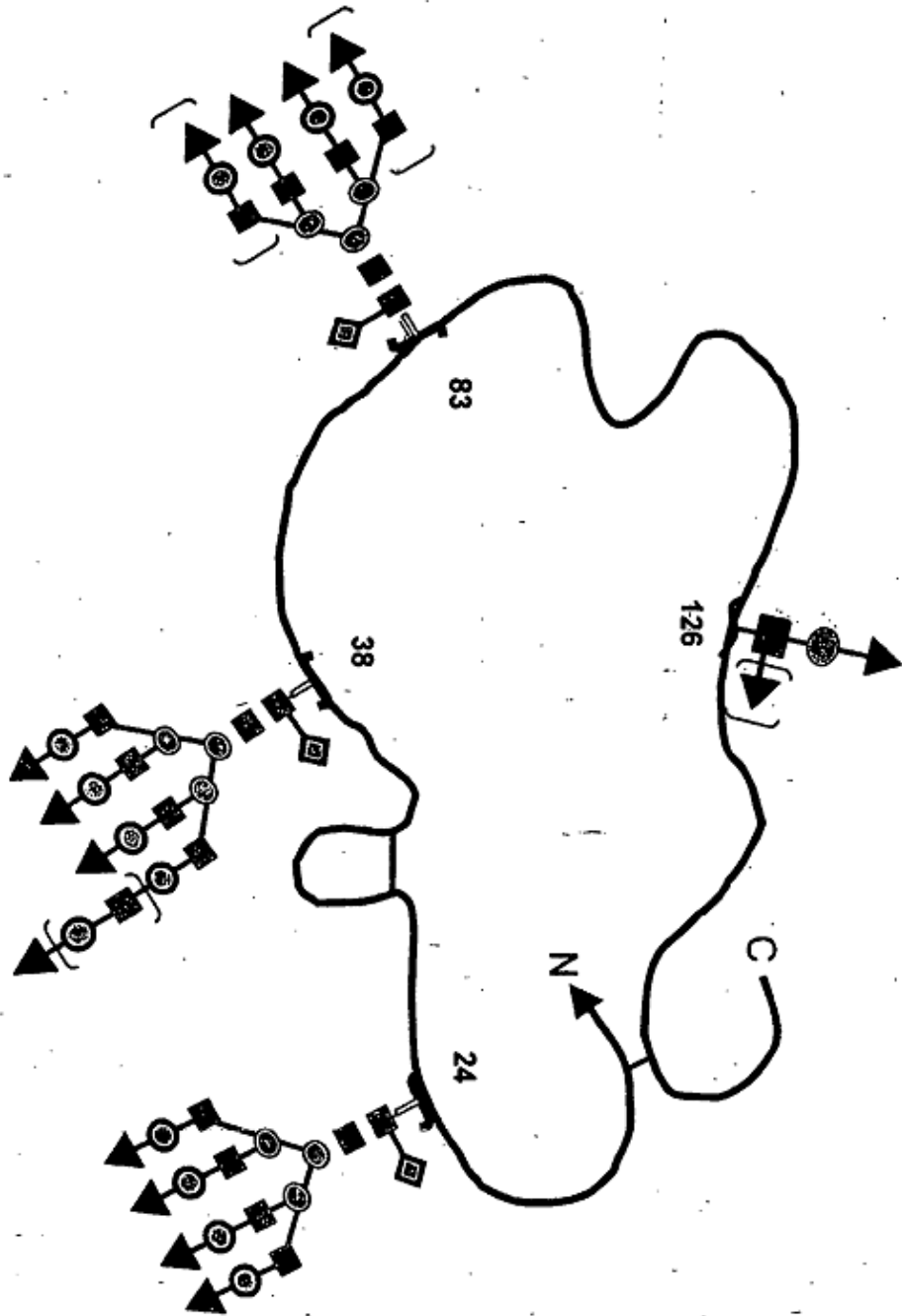
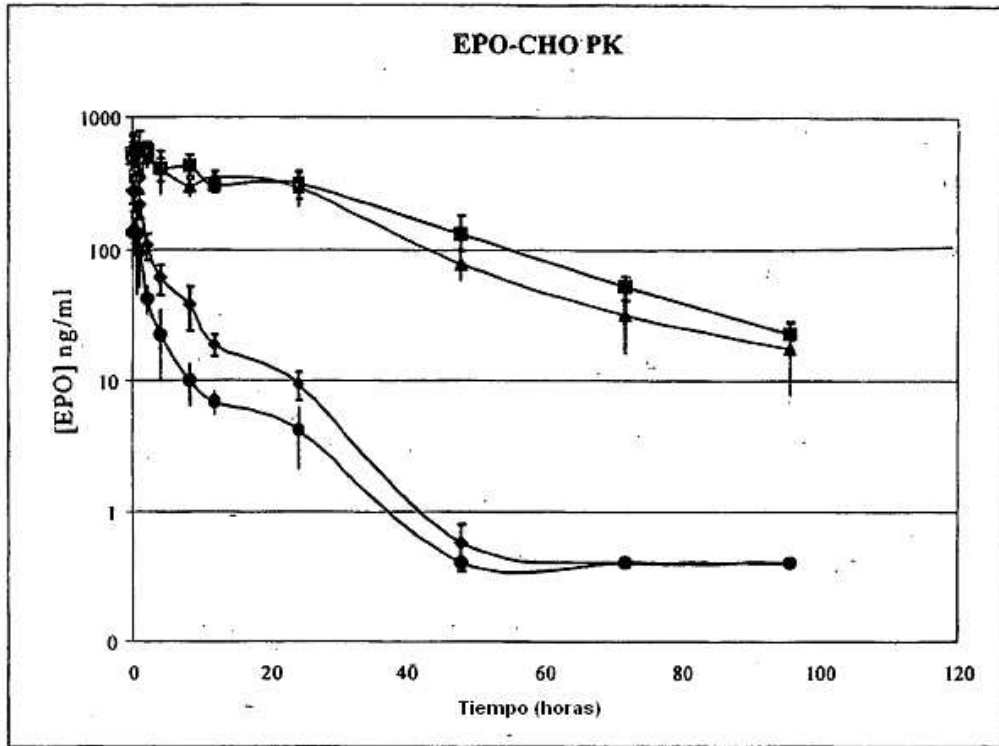


FIGURA 6

VELOCIDADES COMPARATIVAS DE ACLARADO DE PLASMA PARA
VARIANTES DE EPO PEGILADA Y NO PEGILADA



- ◆ CHO-EPO no glicopegilada
- CHO-EPO no glicopegilada
- EPO glicopegilada derivada de insectos
- ▲ CHO-EPO glicopegilada de 40 K

FIGURA 7

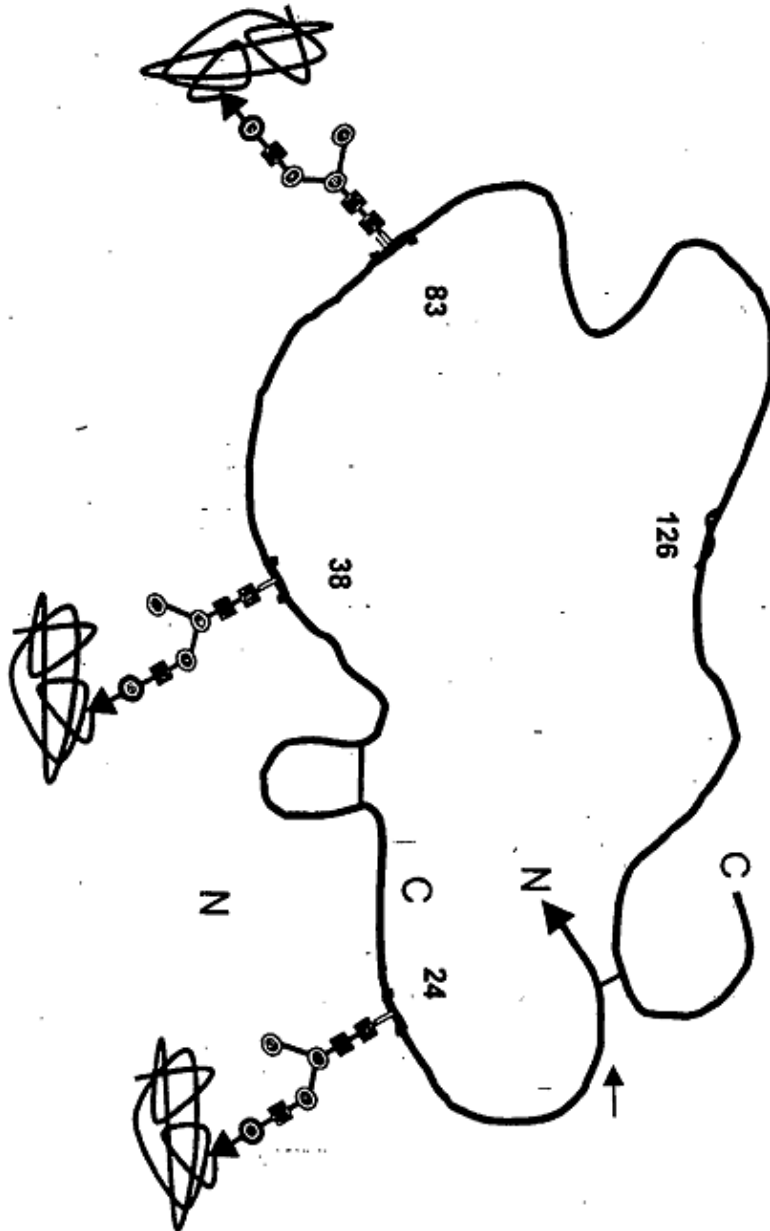


FIGURA 8

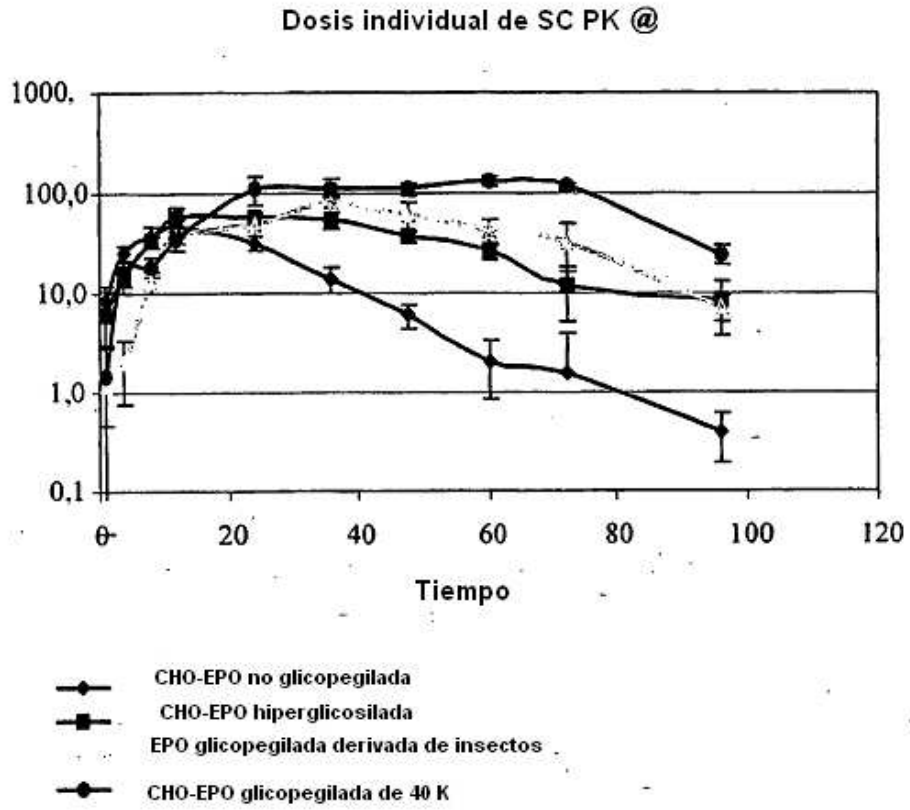


FIGURA 9

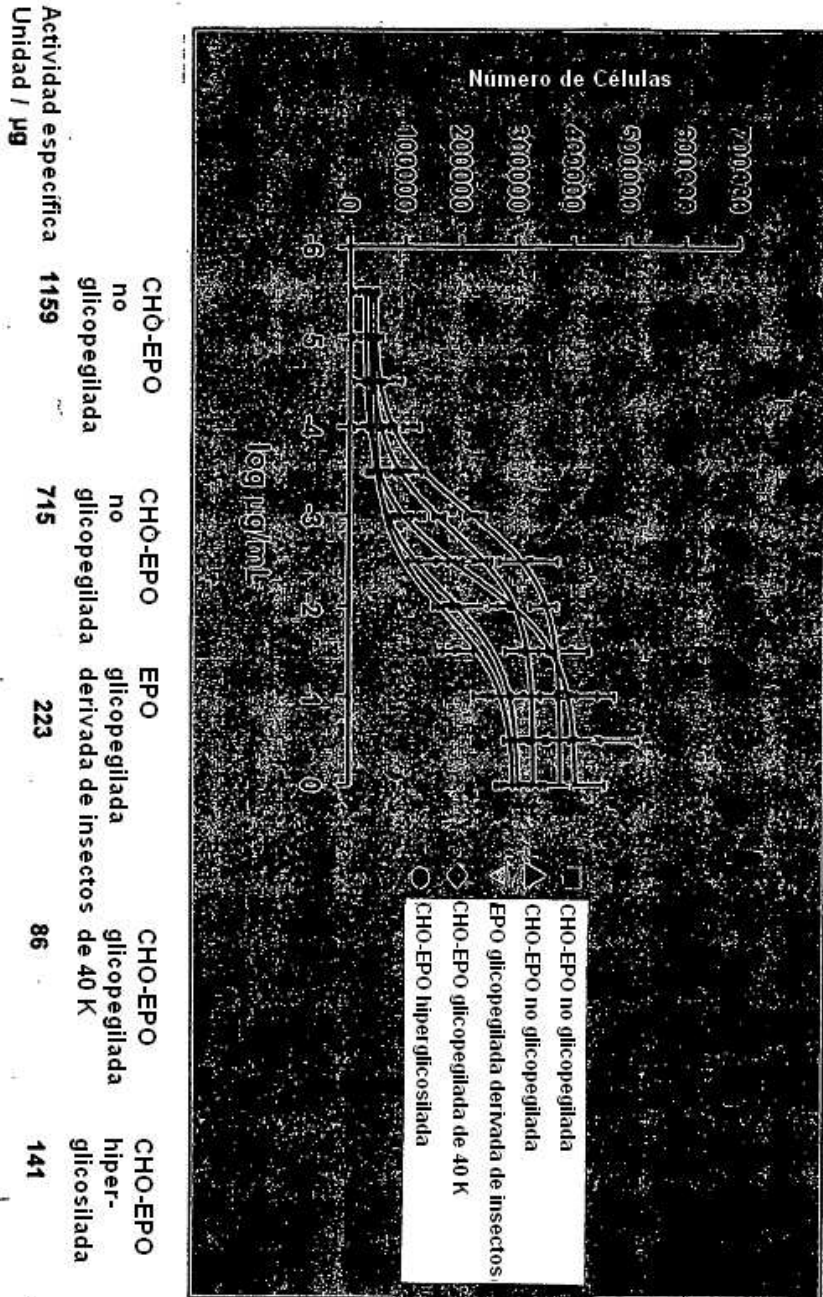


FIGURA 10

