

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 195**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/02** (2006.01)

**C07H 1/00** (2006.01)

**C07H 15/08** (2006.01)

**C07H 15/12** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**C07K 14/535** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2006 E 06717998 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 1858543**

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

30 Prioridad:

**10.01.2005 US 643437 P**

**25.03.2005 US 665588 P**

**22.04.2005 US 674199 P**

**25.05.2005 US 684851 P**

**23.06.2005 US 166404**

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

**18.03.2014**

73 Titular/es:

**RATIOPHARM GMBH (100.0%)  
Graf-Arco-Strasse 3  
89079 Ulm, DE**

72 Inventor/es:

**DEFREES, SHAWN;  
CLAUSEN, HENRIK;  
ZOPF, DAVID, A.;  
BOWE, CARYN;  
TAUDTE, SUSANN;  
FELO, MICHAEL y  
WILLET, WALTER, S.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 449 195 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Factor estimulante de colonias de granulocitos glicopegilado

**Antecedentes de la invención**

- 5 El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF – siglas en inglés) es una glicoproteína que estimula la supervivencia, proliferación, diferenciación y función de células progenitoras de granulocitos neutrófilos y de neutrófilos maduros. Las dos formas de G-CSF recombinante humano en uso clínico son estimulantes potentes de la granulopoyesis de neutrófilos y han demostrado eficacia en la prevención de complicaciones infecciosas de algunos estados neutropénicos. Se pueden utilizar para acelerar la recuperación de neutrófilos a partir de tratamientos mielosupresores.
- 10 G-CSF disminuye la morbilidad de la quimioterapia contra el cáncer mediante la reducción de la incidencia de neutropenia febril, la morbilidad de la quimioterapia de dosis alta con el apoyo de un trasplante de médula, y la incidencia y duración de la infección en pacientes con neutropenia crónica grave. Además, recientemente el G-CSF ha demostrado tener aplicabilidad terapéutica cuando se administra después de la aparición de infarto de miocardio.
- 15 La forma humana de G-CSF fue clonada por grupos procedentes de Japón y EE.UU. en 1986 (véase, p. ej., Nagata et al. *Nature* 319: 415-418, 1986). La glicoproteína humana natural existe en dos formas, una de 175 y la otra de 178 aminoácidos. La forma de 175 aminoácidos más abundante y más activa se ha utilizado en el desarrollo de productos farmacéuticos mediante tecnología de ADN recombinante.
- 20 El G-CSF humano recombinante sintetizado en un sistema de expresión de *E. coli* se denomina filgrastim. La estructura de filgrastim difiere ligeramente de la glicoproteína natural. La otra forma de G-CSF humano recombinante se denomina lenograstim y se sintetiza en las células (CHO) de ovario de hámster chino.
- 25 hG-CSF es una proteína monomérica que dimeriza el receptor de G-CSF mediante la formación de un complejo 2:2 de 2 moléculas de G-CSF y 2 receptores (Horan et al *Biochemistry*, 35(15):4886-96 (1996)). Los siguientes residuos de hG-CSF han sido identificados por estudios cristalográficos de rayos X como parte del receptor de interfaces de unión: G4, P5, A6, S7, S8, L9, P10, Q11, S12, L15, K16, E19, Q20, L108, D109, D112, T115, T116, Q119, E122, E123 y L124 (véase, p. ej., Aritomi et al, (1999) *Nature* 401:713).
- 30 Las formas comercialmente disponibles de rhG-CSF tienen un efecto farmacológico a corto plazo y a menudo se deben administrar más de una vez al día durante la duración del estado de leucopenia. Una molécula con una semivida de circulación más prolongada disminuiría el número de administraciones necesarias para aliviar la leucopenia y prevenir infecciones posteriores. Otro problema con los productos rG-CSF disponibles en la actualidad es la aparición de dolor de huesos dependiente de la dosis. Dado que el dolor de huesos es experimentado por los pacientes como un efecto secundario importante del tratamiento con rG-CSF, sería deseable proporcionar un producto rG-CSF que no causara dolor de huesos, ya sea por medio de un producto que inherentemente no tienen este efecto o que es eficaz en una dosis suficientemente pequeño que no provoca dolor de huesos. Por lo tanto, existe claramente una necesidad de mejorar las moléculas de G-CSF recombinante.
- 35 Se han reseñado variantes de hG-CSF tratadas mediante ingeniería de proteínas (Patentes de EE.UU. US N° 5.581.476, US N° 5.214.132, US N° 5.362.853, US N° 4.904.584 y Riedhaar-Olson et al. *Biochemistry* 35:9034 - 9041, 1996). También se ha reseñado una modificación del hG-CSF y otros polipéptidos a fin de introducir al menos una cadena de hidratos de carbono adicional en comparación con el polipéptido nativo (Patente de EE.UU. N° 5.218.092). Además, se han reseñado y estudiado modificaciones de polímeros de hG-CSF nativo, incluyendo la fijación de grupos de PEG, (véase, p. ej., Satake-Ishikawa et al., (1992) *Cell Structure and Function* 17:157; Bowen et al. (1999) *Experimental Hematology* 27:425; patentes US N° 5.824.778, US N° 5.824.784, documentos WO 96/11953, WO 95/21629 y WO 94/20069).
- 40 La fijación de polímeros sintéticos a la cadena principal del péptido en un intento de mejorar las propiedades farmacocinéticas de productos terapéuticos de glicoproteínas se conoce en la técnica. Un polímero ilustrativo que ha sido conjugado a péptidos es poli(etilenglicol) ("PEG"). El uso de PEG para derivatizar productos terapéuticos peptídicos se ha demostrado para reducir la inmunogenicidad de los péptidos. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.179.337 (Davis et al.) describe polipéptidos no inmunogénicos, tales como enzimas y hormonas peptídicas acopladas al polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol. Además de una inmunogenicidad reducida, el tiempo de eliminación en la circulación se prolonga debido al tamaño aumentado del conjugado de PEG de los polipéptidos en cuestión.
- 45 El principal modo de fijación de PEG y sus derivados a péptidos es una unión no específica a través de un residuo aminoácido del péptido (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N° 4.088.538, la Patente de EE.UU. N° 4.496.689, la patente de EE.UU. N° 4.414.147, la Patente de EE.UU. N° 4.055.635 y el documento PCT WO 87/00056). Otro modo de fijación de PEG a péptidos es a través de la oxidación no específica de los residuos de glicosilo en un glicopéptido (véase, p. ej., el documento WO 94/05332).
- 55

En estos métodos no específicos, se añade poli(etilenglicol) de una manera aleatoria y no específica a los residuos reactivos en una cadena principal del péptido. Por supuesto, la adición aleatoria de moléculas de PEG tiene sus inconvenientes, incluyendo una falta de homogeneidad del producto final, y la posibilidad de una reducción en la actividad biológica o enzimática del péptido. Por lo tanto, para la producción de péptidos terapéuticos, es superior una estrategia de derivatización que resulta en la formación de un producto marcado específicamente, fácilmente caracterizable y esencialmente homogénea. Se han desarrollado estos métodos.

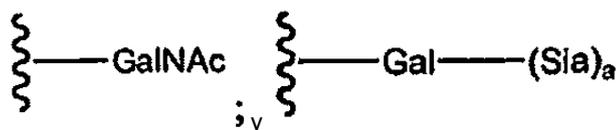
Productos terapéuticos peptídicos, específicamente marcados y homogéneos se pueden producir *in vitro* a través de la acción de enzimas. A diferencia de los métodos no específicos típicos para la fijación de un polímero sintético u otro marcador a un péptido, las síntesis basadas en enzimas tienen las ventajas de regioselectividad y estereoselectividad. Dos clases principales de enzimas para su uso en la síntesis de péptidos marcados son glicosiltransferasas (*p. ej.*, sialiltransferasas, oligosacariltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas) y glicosidasas. Estas enzimas se pueden utilizar para la fijación específica de azúcares que pueden ser posteriormente modificados para que comprendan un resto terapéutico. Alternativamente, glicosiltransferasas y glicosidasas modificados se pueden utilizar para transferir directamente 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. 20030040037, 20040132640, 20040137557, 20040126838 y 20040142856). Métodos que combinan elementos sintéticos tanto químicos como enzimáticos también son conocidos (*véase, p. ej.*, Yamamoto et al. *Carbohydr Res.* 305:415-422 (1998) y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 20040137557).

En respuesta a la necesidad de mejorar la terapéutica de G-CSF, la presente invención proporciona un G-CSF glicopegilado que es terapéuticamente activo y que tiene parámetros farmacocinéticos y propiedades que están mejorados con relación a un péptido de G-CSF idéntico, o estrechamente análogo que no está glicopegilado. Además, la invención proporciona un método para producir de manera rentable y a una escala industrial los péptidos de G-CSF mejorados de la invención.

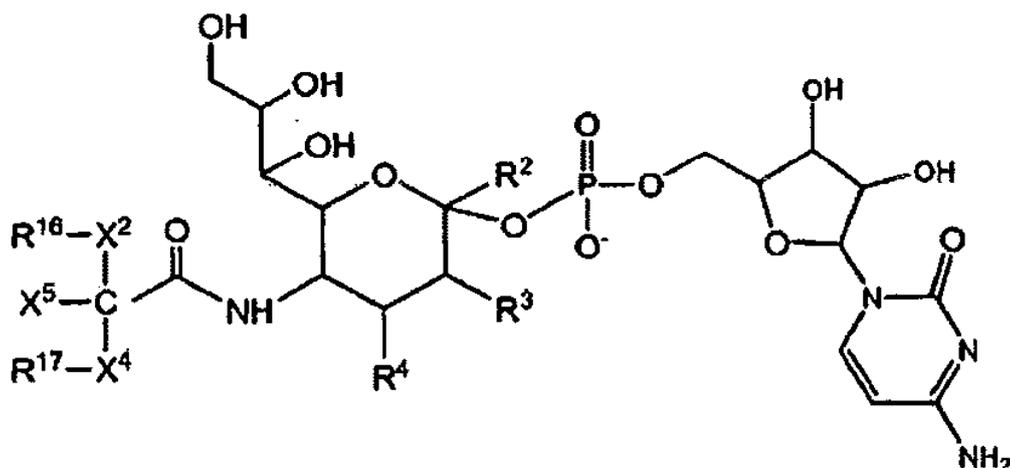
**Sumario de la invención**

Se ha descubierto ahora que la modificación controlada del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) con uno o más restos de poli(etilenglicol) proporciona un nuevo derivado de G-CSF con propiedades farmacocinéticas que están mejoradas con relación al G-CSF nativo (no pegilado) correspondiente (FIG. 3 ). Además de ello, la actividad farmacológica del G-CSF glicopegilado es aproximadamente el mismo que filgrastim mono-pegilado disponible comercialmente (FIG. 4).

En una realización ilustrativa, moléculas de G-CSF "glicopegiladas" de la invención se producen mediante la formación, mediada por enzimas, de un conjugado entre un péptido de G-CSF glicosilado o no glicosilado y un resto sacarilo enzimáticamente transferible que incluye un resto poli(etilenglicol) resto dentro de su estructura. El método comprende (a) poner en contacto un péptido de Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos sustrato que comprende un resto glicosilo seleccionado de:

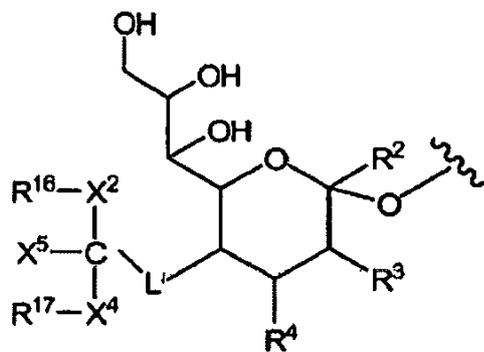


con un donante de PEG-ácido siálico que tiene la fórmula:

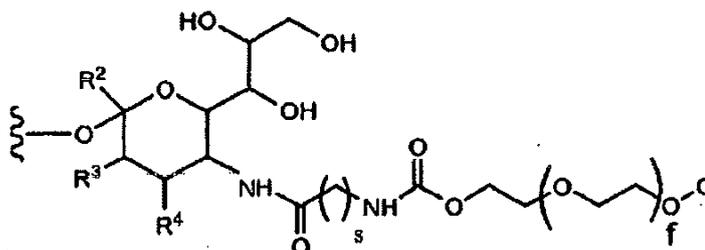


en donde a es 0 ó 1; y (b) poner en contacto un producto de la etapa (a) con una enzima que transfiere el PEG-ácido siálico de dicho donante sobre el Gal de dicho resto glicosilo, bajo condiciones apropiadas para dicha transferencia. El resto de PEG está unido al resto sacarilo directamente (es decir, a través de un solo grupo formado por la reacción de dos grupos reactivos) o a través de un resto enlazador, p. ej., alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, etc. Una estructura de PEG-sacarilo transferible ilustrativa se recoge en la FIG. 5.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un resto de PEG, p. ej., PEG y un péptido que tiene una actividad *in vivo* similar o análoga de otro modo al G-CSF reconocido en la técnica. En el conjugado de la invención, el resto de PEG está unido covalentemente al péptido a través de un grupo de enlace de glicosilo intacto. Grupos de enlace de glicosilo intactos ilustrativos incluyen restos de ácido siálico que son derivatizados con PEG. El péptido del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos comprende un grupo de enlace de glicosilo fijado a un residuo aminoácido de dicho péptido, dicho grupo de enlace de glicosilo comprende un residuo sialilo modificado que tiene la fórmula:



en donde  $R^2$  es H,  $\text{CH}_2\text{OR}^7$ ,  $\text{COOR}^7$  u  $\text{OR}^7$ , en donde  $R^7$  representa H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido;  $R^3$  y  $R^4$  son miembros independientemente seleccionados de H, alquilo sustituido o no sustituido,  $\text{OR}^8$ ,  $\text{NHCO}R^9$ , en donde  $R^8$  y  $R^9$  se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido o ácido siálico; L es un enlazador seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido,  $R^{16}$  y  $R^{17}$  se seleccionan independientemente de brazos poliméricos;  $X^2$  y  $X^4$  se seleccionan independientemente de fragmentos de enlace que unen restos poliméricos  $R^{16}$  y  $R^{17}$  a C; y  $X^5$  es un grupo no reactivo, en donde dicho residuo aminoácido es un residuo asparagina; o comprende un grupo de unión de glicosilo fijado a residuo aminoácido de dicho péptido, dicho grupo de unión de glicosilo comprende un residuo sialilo modificado que tiene la fórmula:



5 en donde  $R^2$  es H,  $CH_2OR^7$ ,  $COOR^7$ ,  $COO^-$  u  $OR^7$ , en donde  $R^7$  representa H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido;  $R^3$  y  $R^4$  son miembros independientemente seleccionados de H, alquilo sustituido o no sustituido,  $OR^8$ ,  $NHC(O)R^9$ , en donde  $R^8$  y  $R^9$  se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido o ácido siálico; s es un número entero de 1 a 20; f es un número entero de 1 a 2500; y Q es un miembro seleccionado de H y alquilo  $C_{1-6}$  sustituido o no sustituido, en donde dicho residuo aminoácido es asparagina.

10 El resto de modificación polimérico puede estar unido a cualquier posición de un resto glicosilo de G-CSF. Además de ello, el resto de modificación polimérico puede estar unido a un residuo de glicosilo en cualquier asparagina en la secuencia de aminoácidos de un tipo salvaje o péptido de G-CSF mutante.

En una realización ilustrativa, el resto de modificación polimérico está unido al grupo de enlace de glicosilo, generalmente a través de un heteroátomo en el núcleo de glicosilo (p. ej., N, O), a través de un enlazador, L, tal como se muestra a continuación:



18  $R^1$  es el grupo modificador polimérico y L se selecciona de un enlace y un grupo de unión. El índice w representa un número entero seleccionado de 1-6, preferiblemente 1-3 y más preferiblemente 1-2. Grupos de enlace ilustrativos incluyen restos alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y ácido siálico. Un componente ilustrativo del enlazador es un resto acilo. Otro grupo de unión ilustrativo es un residuo aminoácido (p. ej., cisteína, serina, lisina, y oligopéptidos cortos, p. ej., Lys-Lys, Lys-Lys-Lys, Cys-Lys, Ser-Lys, etc.).

20 Cuando L es un enlace, éste está formado por reacción de un grupo funcional reactivo en un precursor de  $R^1$  y un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en un precursor del grupo de unión de glicosilo. Cuando L es un grupo de unión de orden distinto de cero, L puede estar en su lugar en el resto glicosilo antes de la reacción con el precursor de  $R^1$ . Alternativamente, los precursores de  $R^1$  y L se pueden incorporar en una casete preconformada posteriormente que está unida subsiguientemente al resto glicosilo. Tal como se recoge en esta memoria, la selección y preparación de precursores con grupos funcionales reactivos apropiados está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Además de ello, el acoplamiento de los precursores prosigue por la química que se entiende bien en la técnica.

25 Tal como se discute en esta memoria, el PEG de uso en los conjugados de la invención puede ser lineal o ramificado. Un precursor ilustrativo de uso para formar los conjugados de péptidos que contienen PEG ramificado de acuerdo con esta realización de la invención tiene la fórmula:



30 Las especies de polímeros ramificados de acuerdo con esta fórmula son polímeros solubles en agua esencialmente pura.  $X^3$  es un resto que incluye un grupo ionizable (p. ej., OH, COOH,  $H_2PO_4$ ,  $HSO_3$ ,  $NH_2$  y sales de los mismos, etc.) u otro grupo funcional reactivo, p. ej., *infra*. C es carbono.  $X^5$ ,  $R^{16}$  y  $R^{17}$  se seleccionan independientemente de grupos no reactivos (p. ej., H, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido) y los brazos poliméricos (p. ej., PEG).  $X^2$  y  $X^4$  son fragmentos de enlace que son preferiblemente en esencia no reactivos bajo condiciones fisiológicas, que puede ser los mismos o diferentes. Un enlazador ilustrativo incluye restos ni aromáticos ni de éster. Alternativamente, estos enlaces pueden incluir uno o más restos que están diseñados para degradar bajo condiciones fisiológicamente relevantes, p. ej. ésteres, disulfuros, etc.  $X^2$  y  $X^4$  unen los brazos poliméricos  $R^{16}$  y

R<sup>17</sup> a C. Cuando X<sup>3</sup> se hace reaccionar con un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en un enlazador, azúcar o casete de azúcar-enlazador, X<sup>3</sup> se convierte en un componente de fragmento de enlace X<sup>3</sup>.

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

## 5 Descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra nucleótidos del ácido siálico modificados ilustrativos, útiles en la práctica de la invención. **A.** Estructura de nucleótidos de azúcar de CMP-ácido siálico-PEG ilustrativos ramificados (p. ej., 30 kDa, 40 kDa). **B.** Estructura de CMP-ácido siálico-PEG lineal (por ejemplo, 10 kDa).

10 La FIG. 2 es un esquema que muestra una realización ilustrativa de la invención, en la que un resto de carbohidrato en un péptido de G-CSF se remodela mediante la adición enzimática de un resto GalNAc al residuo glicosilo en Thr 133 (Thr 134 cuando está presente metionina) antes de la adición de un resto sacarilo derivatizado con PEG.

La FIG. 3 es un gráfico que compara los tiempos de vida de permanencia *in vivo* de G-CSF no PEGilado (A), G-CSF químicamente pegilado (B) y G-CSF enzimáticamente glicopegilado (C).

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

15 La FIG. 5 es un esquema de síntesis para la producción de un precursor (azúcar modificado) de grupo de enlace de PEG-glicosilo ilustrativo de los autores de la invención en la preparación de los conjugados de la invención.

20 La FIG. 6 muestra secuencias ilustrativas de aminoácidos de G-CSF. SEQ ID NO: 1 es la variante de 175 aminoácidos, en la que el primer aminoácido es metionina y existe un residuo treonina en Thr 134. SEQ ID NO: 2 es una variante de 174 aminoácidos que tiene la misma secuencia que la variante de 175 aminoácidos, excepto que no se encuentra la metionina conductora, por tanto, la secuencia comienza con T y existe un residuo treonina en la posición 133.

La FIG. 7 es una tabla que proporciona sialiltransferasas ilustrativas de uso en la formación de los glicoconjugados de la invención, por ejemplo, a péptidos glicoPEGilados con un ácido siálico modificado.

## Descripción detallada de la invención y las realizaciones preferidas

### 25 Abreviaturas

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

### 30 Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todas las expresiones y términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen generalmente el mismo significado el que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que esta invención pertenece. En general, la nomenclatura utilizada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos y la hibridación son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se utilizan técnicas estándares para el ácido nucleico y la síntesis de péptidos. Las técnicas y los procedimientos se realizan generalmente según 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, Nueva York), que se proporcionan a lo largo de este documento. La nomenclatura utilizada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio en química analítica, y síntesis orgánica descritos a continuación son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Técnicas convencionales, o modificaciones de las mismas, se utilizan para la síntesis química y análisis químicos.

45 Todos los oligosacáridos descritos en el esta memoria se describen con el nombre o abreviatura para el sacárido no reductor (es decir, Gal), seguido por la configuración del enlace glicosídico ( $\alpha$  o  $\beta$ ), el enlace del anillo (1 ó 2), la posición del anillo del sacárido reductor implicado en el enlace (2, 3, 4, 6 u 8), y después el nombre o abreviatura del sacárido reductor (es decir, GlcNAc). Cada uno de los sacáridos es preferiblemente una piranosa. Para una revisión de la nomenclatura glicobiología estándar, véase, *Essentials of Glycobiology* Varki et al. comps. CSHL Press (1999).

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

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 del ácido siálico es ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico) (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA). Un segundo miembro de la familia es ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido 2-ceto-3-desoxi-nonosónico (KDN). (Nadano *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 11550-11557; Kanamori *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:21811-21819 (1990)). También se incluye ácidos siálicos 9-sustituidos tales como un 9-O-acil C<sub>1-6</sub>-Neu5Ac tal 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 del ácido siálico, véase, p. ej., Varki, *Glycobiology* 2:25-40 (1992); *Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function*, R. Schauer, comp. (Springer-Verlag, Nueva York (1992)). La síntesis y el uso de compuestos de ácido siálico en un proceso de sialilación se da a conocer en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de 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, a los que se hace referencia, alternativamente, como un polipéptido. Adicionalmente, también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo, β-alanina, fenilglicina y homoarginina. Los aminoácidos que no son codificados por genes también se pueden utilizar en la presente invención. Además, los aminoácidos que han sido modificados para incluir grupos reactivos, sitios de glicosilación, polímeros, restos terapéuticos, biomoléculas y similares también se pueden usar en la presente invención. Todos los aminoácidos utilizados en la presente invención puede ser el D- o L-isómero. Generalmente, se prefiere el L-isómero. Además, también son útiles en la presente invención otros peptidomiméticos. Tal como se usa en esta memoria, "péptido" se refiere a péptidos tanto glicosilados como no glicosilados. También se incluyen péptidos que están glicosilados de forma incompleta por un sistema que expresa el péptido. Para una revisión general, véase, Spatola, A.F. en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, comps., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983).

La expresión "conjugado peptídico" se refiere a especies de la invención en las que un péptido está conjugado con un azúcar modificado tal como se recoge en esta memoria.

El término "aminoácido" se refiere a que se produce de forma natural y aminoácidos sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se producen de forma natural. Aminoácidos que que se producen de forma natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de forma 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, metionina-metil-sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (p. ej., norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero que conservan la misma estructura química básica que un aminoácido que ocurre de forma natural. 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 que ocurre de forma natural.

Tal como se usa en esta memoria, la expresión "azúcar modificado" se refiere a un hidrato de carbono que se produce de forma natural o no natural que se añade enzimáticamente a un aminoácido o un residuo de glicosilo de un péptido en un procedimiento de la invención. El azúcar modificado se selecciona de sustratos de enzimas que incluyen, pero no se limitan a nucleótidos de azúcares (mono-, di- y tri-fosfatos), azúcares activados (p. ej., haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo) y azúcares que no están activados ni son nucleótidos. El "azúcar modificado" se funcionaliza de forma covalente con un "grupo modificador." Grupos modificadores útiles incluyen, pero no se limitan a, restos de PEG, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, biomoléculas y similares. El grupo modificador es preferiblemente uno que no se produce de forma natural, o es un hidrato de carbono no modificado. El lugar de funcionalización con el grupo de modificación se selecciona de tal manera que no impida que el "azúcar modificado" sea añadido enzimáticamente a un péptido.

La expresión "soluble en agua" se refiere a restos que tienen un cierto grado detectable de solubilidad en agua. Métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua son bien conocidos en la técnica. Polímeros solubles en agua ilustrativos incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mixtas compuestas de un solo aminoácido, p. ej. poli(lisina). Un polisacárido ilustrativo es poli(ácido siálico). Un poli(éter) ilustrativo es poli(etilenglicol). Poli(etilenimina) es una poliamina ilustrativa, y ácido poli(acrílico) es un poli(ácido carboxílico) representativo.

La cadena principal de polímero del polímero soluble en agua puede ser poli(etilenglicol) (es decir, PEG). Sin embargo, se debe entender que otros polímeros relacionados también son adecuados para uso en la práctica de esta invención y que el uso del término PEG o poli(etilenglicol) pretende ser inclusivo y no exclusivo a este respecto. El término PEG incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo alcoxi PEG, PEG difuncional, PEG de múltiples brazos, PEG bifurcado, PEG ramificado, PEG colgante (es decir, PEG o polímeros

relacionados que tienen uno o más grupos funcionales que cuelgan de la cadena principal del polímero) o PEG con enlaces degradables en el mismo.

La cadena principal del polímero puede ser lineal o ramificada. Cadenas principales de polímeros ramificadas son generalmente conocidas en la técnica. Típicamente, un polímero ramificado tiene un resto de núcleo ramificado central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo ramificado central. PEG se usa comúnmente en formas ramificadas que se pueden preparar por adición de óxido de etileno a diversos polioles tales como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. El resto de la rama central también puede derivar de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado se puede representar de 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 brazos. Moléculas de PEG de múltiples brazos, tales como las descritas en la Patente de EE.UU. N° 5.932.462 también se puede utilizar como la cadena principal del polímero.

Muchos otros polímeros son también adecuados para la invención. Cadenas principales de polímeros que son no peptídicas y son solubles en agua, con de 2 a aproximadamente 300 extremos, son particularmente útiles en la invención. Ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a otros poli(alquilen glicoles), tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli( $\alpha$ -hidroxi-ácido), poli(alcohol vinílico), poliofosfaceno, polioxazolona, poli(N-acrilolmorfolina) tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.629.384, y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos. Aunque puede variar el peso molecular de cada una de las cadenas de la cadena principal del polímero, éste está típicamente en el intervalo de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 100.000 Da, a menudo desde aproximadamente 6.000 Da a aproximadamente 80.000 Da.

El "área bajo la curva" o "AUC", tal como se utiliza 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 de fármaco en la circulación sistémica en el paciente como una función del tiempo desde cero a infinito.

El término "semivida" o " $t_{1/2}$ ", tal como se utiliza en esta memoria en el contexto de la administración de un fármaco peptídico a un paciente, se define como el tiempo requerido para que la concentración plasmática de un fármaco en un paciente se reduzca en un medio. Puede haber más de una semivida asociada con el fármaco peptídico dependiendo de múltiples mecanismos de aclaramiento, la redistribución y otros mecanismos bien conocidos en la técnica. Por lo general, semividas alfa y beta se definen de manera que la fase alfa está asociada con la redistribución, y la fase beta se asocia con el aclaramiento. Sin embargo, con fármacos de proteínas que están, en su mayor parte, confinados al torrente sanguíneo, puede haber al menos dos semividas de aclaramiento. Para algunos péptidos glicosilados, el aclaramiento de fase beta rápido puede ser mediado a través de receptores en macrófagos, o células endoteliales que reconocen galactosa terminal, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa o fucosa. Un aclaramiento más lento de fase beta puede ocurrir a través de filtración glomerular renal para moléculas con un radio efectivo  $< 2$  nm (aproximadamente 68 kD) y/o la absorción y el metabolismo específico o no específico en los tejidos. La glicoPEGilación puede cubrir azúcares terminales (p. ej., galactosa o N-acetilgalactosamina) y con ello bloquear el aclaramiento rápido de la fase alfa a través de receptores que reconocen estos azúcares. También puede conferir un radio efectivo más grande y con ello disminuir el volumen de distribución y la absorción de tejido, prolongando de este modo la fase beta tardía. Por lo tanto, el impacto preciso de la glicoPEGilación en semividas en fase alfa y fase beta puede variar dependiendo del tamaño, estado de glicosilación, y otros parámetros, como es bien conocido en la técnica. Una explicación adicional de "semivida" se encuentra en Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin y RD Sindelar, comps., Harwood Publishers, Amsterdam, pp 101-120).

El término "glicoconjugación," tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la conjugación mediada enzimáticamente de una especie de azúcar modificada a un aminoácido o residuo glicosilo de un polipéptido, p. ej. un péptido de G-CSF de la presente invención. Un subgénero de "glicoconjugación" es "glico-PEGilación", en la que el grupo modificador del azúcar modificado es poli(etilenglicol), y derivado de alquilo (p. ej., m-PEG) o derivado reactivo del mismo (p. ej.,  $H_2N$ -PEG, HOOC-PEG) de los mismos.

Las expresiones "a gran escala" y "a escala industrial" se utilizan indistintamente y se refieren a un ciclo de reacción que produce al menos aproximadamente 250 mg, preferiblemente al menos aproximadamente 500 mg, y más preferiblemente al menos aproximadamente 1 gramo de glicoconjugado en la compleción de un solo ciclo de reacción.

La expresión "grupo de enlace de glicosilo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un residuo de glicosilo al que está fijado de manera covalente un grupo modificador (p. ej., un resto de PEG, resto terapéutico, biomolécula); el grupo de enlace de glicosilo se une al grupo modificador al resto del conjugado. En los métodos de la invención, el "grupo de enlace de glicosilo" se une covalentemente a un péptido glicosilado o no glicosilado, enlazando con ello el agente a un residuo aminoácido y/o glicosilo del péptido. Un "grupo de enlace de glicosilo" se deriva generalmente de un "azúcar modificado" por la unión enzimática del "azúcar modificado" a un residuo aminoácido y/o de glicosilo del péptido. El grupo de enlace de glicosilo puede ser una estructura derivada de sacárido que se degrada durante la formación de la casete grupo de modificación-azúcar modificado (p. ej., oxidación  $\rightarrow$  formación de base de Schiff  $\rightarrow$  reducción) o el grupo de enlace de glicosilo puede estar intacto. Un

"grupo de enlace de glicosilo intacto" se refiere a un grupo de enlace que se deriva de un resto glicosilo en el que el monómero sacárido que enlaza el grupo modificador y el resto del conjugado no se degrada, p. ej. se oxida, p. ej., mediante metaperyodato de sodio. "Grupos de enlace de glicosilo intactos" de la invención se pueden derivar de un oligosacárido que se produce de forma natural mediante la adición de una unidad o unidades de glicosilo o separación de una o más unidades de glicosilo de una estructura de sacárido parental.

La expresión "resto que fija objetivo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a especies que se localizarán de forma selectiva en un tejido o región particular del cuerpo. La localización está mediada por el reconocimiento específico de determinantes moleculares, el tamaño molecular del agente o conjugado que fija objetivo, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y similares. Otros mecanismos de fijación de objetivo de un agente a un tejido o región particular son conocidos por los expertos en la técnica. Restos de fijación de objetivo ilustrativos incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, transferrina, HS-glicoproteína, factores de coagulación, proteínas del suero,  $\beta$ -glicoproteína, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO y similares.

Tal como se usa en esta memoria, "resto terapéutico" significa cualquier agente útil para terapia, que incluye, pero no se limita a antibióticos, agentes anti-inflamatorios, fármacos anti-tumorales, citotoxinas y agentes radiactivos. "Resto terapéutico" incluye profármacos de agentes bioactivos, construcciones en las que más de resto terapéutico está unido a un vehículo, p. ej. agentes multivalentes. Resto terapéutico también incluye proteínas y construcciones que incluyen proteínas. Proteínas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF), Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos Macrófagos (GMCSF), interferón (p. ej., interferón- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ), interleucina (p. ej., interleucina II), proteínas séricas (p. ej. factores VII, VIIa, VIII, IX y X), Gonadotropina Coriónica Humana (HCG), Hormona Estimulante del Folículo (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH) y proteínas de fusión de anticuerpos (p. ej., Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR)/proteína de fusión del dominio Fc).

Tal como se usa en esta memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que cuando se combina con el conjugado conserva la actividad de los conjugados y no es reactivo con el sistema inmunológico del sujeto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos también pueden incluir disoluciones estériles, comprimidos, incluyendo comprimidos revestidos y cápsulas. Típicamente, vehículos de este tipo contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, magnesio o estearato de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Vehículos de este tipo también pueden incluir aditivos de sabor y color u otros ingredientes. Composiciones que comprenden a este tipo de vehículos se formulan por métodos convencionales bien conocidos.

Tal como se usa en esta memoria, "administrar" significa 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 bomba mini-osmótica, al sujeto. La administración es por cualquier vía, incluyendo la parenteral, y transmucosal (p. ej., oral, nasal, vaginal, rectal o transdermal). La administración parenteral incluye, p. ej., intravenosa, intramuscular, intra-arteriolar, intradermal, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Además de ello, en los casos en los que la inyección es para el tratamiento de un tumor, p. ej. para inducir la 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 al uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

El término "mejorador" o "mejorar" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento de una patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión o disminución de los síntomas o una mejora en el bienestar físico o mental de un paciente. La mejoría de los síntomas puede basarse 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, incluida la prevención de que la enfermedad o afección se produzca en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no experimenta ni exhibe síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), la inhibición de la enfermedad (ralentizar o detener su desarrollo), proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo el tratamiento paliativo), y aliviando la enfermedad (provocando la regresión de la enfermedad).

La expresión "cantidad eficaz" o "una cantidad eficaz para" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" o cualquier expresión gramaticalmente equivalente significa la cantidad que, cuando se administra a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el tratamiento de esa enfermedad.

El término "aislado" se refiere a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que se utilizan para producir el material. Para los conjugados peptídicos de la invención, el término "aislado" se refiere a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan al material en la mezcla usada para preparar el conjugado de péptido. "Aislado" y "puro" se utilizan indistintamente. Típicamente, los conjugados de péptidos aislados de la Invención tienen un nivel de pureza que se expresa preferiblemente 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%.

5 Cuando los conjugados peptídicos son más de aproximadamente 90% puros, sus purezas también se expresan preferiblemente como 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.

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

15 "Esencialmente cada uno de los miembros de la población", tal como se utiliza 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 añadido a un péptido se añade a múltiples sitios aceptores, idénticos en el péptido. "Esencialmente cada uno de los miembros de la población" habla de la "homogeneidad" de los sitios en el péptido conjugado con un azúcar modificado y se refiere a conjugados de la invención, que son al menos aproximadamente 80%, preferiblemente al menos aproximadamente 90% y más preferiblemente al menos aproximadamente 95% homogéneos.

20 "Homogeneidad" se refiere a la consistencia estructural a lo largo de una población de restos aceptores a la que se conjugan los azúcares modificados. Por lo tanto, en un conjugado peptídico de la Invención en el que cada uno de los restos de azúcar modificado está conjugado a sitio aceptor que tiene la misma estructura que el sitio aceptor al que está conjugado cada uno de los otros azúcares modificados, el conjugado peptídico se dice que es aproximadamente 100% homogéneo. La homogeneidad se expresa típicamente como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad 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%.

25 Cuando los conjugados peptídicos son más de o igual a aproximadamente 90% homogéneos, su homogeneidad también se expresa preferiblemente como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad 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 homogeneidad. La pureza de los péptidos conjugados se determina típicamente por uno o más métodos conocidos por los expertos en la técnica, p. ej., cromatografía líquida- espectrometría de masas (LC-MS), la masa de desorción por láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDITOF), electroforesis capilar, y similares.

35 "Glicoforma sustancialmente uniforme" o un "patrón de glicosilación sustancialmente uniforme", cuando se refiere a una especie de glicopéptido se refiere al porcentaje de restos aceptores que son glicosilados por la glicosiltransferasa de interés (p. ej., fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de  $\alpha$ 1,2 fucosiltransferasa, existe un patrón de fucosilación sustancialmente uniforme si sustancialmente todos los análogos (según se definen más adelante) de la Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc-R y análogos sialilados del mismo están fucosilados en un conjugado peptídico de la invención. En las estructuras fucosiladas recogidas en esta memoria, el enlace Fuc-GlcNAc es generalmente  $\alpha$ 1,6 o  $\alpha$ 1,3, siendo  $\alpha$ 1,6 generalmente preferido. Se entenderá por parte de un experto en la técnica, que el material de partida puede contener restos de aceptor glicosilado (p. ej., restos Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc-R fucosilados). Por lo tanto, el porcentaje de glicosilación calculado incluirá restos aceptores que son glicosilados por los métodos de la invención, así como aquellos restos aceptores ya glicosilados en el material de partida.

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

45 En los casos en los que los grupos sustituyentes son especificados por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, igualmente abarcan los sustituyentes químicamente idénticos, que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, p. ej., -CH<sub>2</sub>O- también pretende señalar -OCH<sub>2</sub>-.

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 un radical de hidrocarburo cíclico, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, mono- o poli-insaturado y puede incluir radicales di- y multi-valentes, que tienen el número de átomos de carbono designados (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> significa uno a diez átomos de carbono). Ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados 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, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Ejemplos de grupos alquilo insaturados 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 pretende incluir aquellos derivados de alquilo definidos más adelante con mayor detalle tal como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que están limitados a grupos hidrocarbonados se denominan "homoalquilo".

5 El término "alquileo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de un alcano, tal como se ilustra, pero no se limita a  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , e incluye además aquellos grupos descritos más adelante como "heteroalquileo". Típicamente, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, prefiriéndose aquellos grupos que tengan 10 o menos átomos de carbono en la presente Invención. Un "alquilo inferior" o "alquileo inferior" es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta que tiene generalmente ocho o

10 menos átomos de carbono.

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

15 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 los mismos, que consisten 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 el que los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente cuaternizados. El o los heteroátomos de O, N y S y Si pueden estar colocados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está fijado al resto de la molécula. 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, tal como, por ejemplo,  $-\text{CH}_2\text{NH}\text{OCH}_3$  y  $-\text{CH}_2\text{O}\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . De manera similar, el término "heteroalquileo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, tal 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 pueden ocupar también cualquiera o ambos extremos de la cadena (p. ej., alquilenoxi, alquilendioxo, alquilenamino, alquilendiamino, y similares). Aún más, para grupos de enlace alquileo y heteroalquileo, ninguna orientación del grupo de enlace está implicada por la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo de enlace. Por ejemplo, la fórmula  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  representa tanto  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  como  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ .

20 Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Adicionalmente, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está fijado al resto de la molécula. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. 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.

25 Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se establezca lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Adicionalmente, términos tales como "haloalquilo" pretenden incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )" quiere dar a entender que incluye, pero no se limita a trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y similares.

30 El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente poliinsaturado aromático, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (preferiblemente de 1 a 3 anillos), que están condensados juntos o enlazados covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y el o los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar fijado al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 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, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo, tetrazolilo, benzo[b]furanilo, benzo[b]tienilo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-ilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación.

35 Por razones de brevedad, el término "arilo", cuando se utiliza en combinación con otros términos (p. ej., ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye tanto anillos arilo como heteroarilo según se define anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" se entiende que incluye aquellos radicales en los que un grupo arilo está fijado a un grupo alquilo (p. ej., bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares), incluyendo aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (p. ej., un grupo metileno) ha sido reemplazado, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (p. ej., fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los de términos anteriores (p. ej., "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") quiere dar a entender que incluye tanto formas sustituidas como no sustituidas del radical indicado. Sustituyentes preferidos para cada uno de los tipos de radical se proporcionan a continuación.

5 Sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos a los que a menudo se alude como alquilenilo, alqueniilo, heteroalquilenilo, heteroalqueniilo, alquiniilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueniilo y heterocicloalqueniilo) se denominan genéricamente como "sustituyentes del grupo alquilo", y pueden ser uno o más de una diversidad de grupos seleccionados de, pero no limitado a: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R'R'", -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR-C(O)NR'R'", -NR"C(O)<sub>2</sub>R', -NR-C(NR'R'R'")=NR'", -NR-C(NR'R'")=NR'", -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R", -NRSO<sub>2</sub>R', -CN y -NO<sub>2</sub> en un número que oscila entre cero y (2m' + 1), en que m' es el número total de átomos de carbono en un radical de este tipo. R', R", R'" y R''", cada uno preferiblemente de forma independiente, se refiere a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, p. ej. arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente de cada uno de grupos R', R", R'" y R''"

10 cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R" están unidos al mismo átomo de nitrógeno, estos se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R" quiere dar a entender, pero no se limita a 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. De la discusión anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (p.ej., -CF<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) y acilo (p. ej., -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, y similares).

De manera similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se denominan genéricamente como "sustituyentes del grupo arilo". Los sustituyentes se seleccionan, por ejemplo, de: halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R'R'", -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR-C(O)NR'R'", -NR"C(O)<sub>2</sub>R', -NR-C(NR'R'R'")=NR'", -NR-C(NR'R'")=NR'", -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R", -NRSO<sub>2</sub>R', -CN y -NO<sub>2</sub>, -R', -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, fluoro-alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y fluoro-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), en un número que oscila entre cero y el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático, y en donde R', R", R'" y R''" se seleccionan preferiblemente de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como cada uno de R', R", R'" y R''" cuando más de uno de estos grupos está presente. En los Esquemas que siguen, el símbolo X representa "R" como se describe anteriormente.

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente reemplazados por un sustituyente de la fórmula -TC(O)-(CRR')<sub>u</sub>-U-, en donde T y U son independientemente -NR-, -O-, -CRR'- o un enlace sencillo, y u es un número entero de 0 a 3. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente reemplazados por un sustituyente de la fórmula -A-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-B-, en donde A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>-NR' o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede estar reemplazado opcionalmente por un doble enlace. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente reemplazados por un sustituyente de la fórmula -(CRR')<sub>z</sub>-X-(CR'R'')<sub>d</sub>-, en donde z y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>- o S(O)<sub>2</sub>-NR'. Los sustituyentes R, R', R" y R'" se seleccionan preferiblemente de forma independiente de hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido.

Tal como se usa en esta memoria, el término "heteroátomo" se entiende que incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

## Introducción

La presente invención abarca un método para la modificación de la estructura de glicano en el G-CSF. El G-CSF es bien conocido en la técnica como una citoquina producida por células T activadas, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos estromales. G-CSF actúa principalmente sobre la médula ósea para aumentar la producción de leucocitos inflamatorios y actúa, además, como una hormona endocrina para iniciar la reposición de neutrófilos consumidos durante las funciones inflamatorias. G-CSF también tiene aplicaciones clínicas en sustitución de la médula ósea después de quimioterapia.

La presente invención proporciona un conjugado de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). La invención proporciona conjugados de péptidos glicosilados y no glicosilados que tienen actividad estimulante de colonias de granulocitos. Los conjugados pueden ser modificados adicionalmente por conjugación adicional con especies diversas tales como restos terapéuticos, restos de diagnóstico, restos de fijación de objetivo y similares.

La presente invención incluye, además, un método para la remodelación y/o la modificación de G-CSF. G-CSF es una herramienta valiosa en el tratamiento de numerosas enfermedades, pero como se ha establecido antes, su eficacia clínica se ha visto obstaculizada por su relativamente pobre farmacocinética.

En realizaciones ilustrativas, un péptido de G-CSF de la Invención se puede administrar a pacientes con el fin de prevenir la Infección en pacientes con cáncer sometidos a ciertos tipos de terapia de radiación, quimioterapia, y trasplantes de médula ósea, para movilizar células progenitoras para la recogida para trasplantes de células progenitoras de la sangre periférica, para el tratamiento de leucopenia crónica o relativa grave, con independencia de la causa, y para apoyar el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda. Además, el conjugado polipeptídico o composición de la invención se puede usar para el tratamiento del SIDA u otras enfermedades de inmunodeficiencia, así como infecciones bacterianas.

G-CSF ha sido clonado y secuenciado. En un ejemplo, el G-CSF tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. El experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención no se limita a las secuencias representadas en esta memoria, sino que también incluye variantes de G-CSF, como se discutió anteriormente en esta memoria.

Por lo tanto, la presente invención abarca además variantes de G-CSF, como son bien conocidos en la técnica. Como un ejemplo, pero que de ninguna manera pretende limitar la presente invención, una variante de G-CSF se ha descrito en la Patente de EE.UU. N° 6.166.183, en la que se describe un G-CSF que comprende el complemento natural de residuos de lisina y que, además, está enlazado a una o dos moléculas de polietilenglicol. Adicionalmente, las Patentes de EE.UU. N°s. 6.004.548, 5.580.755, 5.582.823, y 5.676.941 describen una variante de G-CSF en que uno o más de los residuos cisteína en las posiciones 17, 36, 42, 64 y 74 están reemplazadas por alanina o serina, alternativamente. La Patente de EE.UU. N° 5.416.195 describe una molécula de G-CSF en la que la cisteína en la posición 17, el ácido aspártico en la posición 27 y las serinas en las posiciones 65 y 66 están sustituidos con serina, serina, prolina y prolina, respectivamente. Otras variantes son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 5.399.345. Todavía otras variantes tienen un aminoácido seleccionado de las SEQ ID NOs: 3-11.

La expresión y la actividad de una molécula de G-CSF modificada de la presente invención se puede someter a ensayo utilizando métodos bien conocidos en la técnica y según se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 4.810.643. Como un ejemplo, la actividad puede medirse utilizando ensayos de captación de timidina radiomarcados. En síntesis, la médula ósea humana de donantes sanos se somete a un corte de densidad con Ficoll-Hypaque (1.077 g/mL, Pharmacia, Piscataway, NJ) y las células de baja densidad se suspenden en medio de Iscove (Gibco, La Jolla, CA) que contiene suero bovino fetal al 10%, glutamina y antibióticos. Aproximadamente  $2 \times 10^4$  células de la médula ósea humana se incuban con medio de control o el G-CSF o la presente invención en placas de 96 pocillos de fondo plano a aproximadamente  $37^\circ \text{C}$  en 5% de  $\text{CO}_2$  al aire durante aproximadamente 2 días. Los cultivos se pulsan entonces durante aproximadamente 4 horas con  $0,5 \mu\text{Ci/pocillo}$  de  $^3\text{H}$ -timidina (New England Nuclear, Boston, MA) y la absorción se mide tal como se describe, por ejemplo, en Ventua, et al. (1983, Blood 61:781). Un aumento en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en células de la médula ósea humana en comparación con las células de la médula ósea tratadas con un compuesto de control es una indicación de un compuesto de G-CSF activo y viable.

Como se discutió anteriormente, los conjugados de la invención se forman por la unión enzimática de un azúcar modificado al péptido de G-CSF glicosilado o no glicosilado. El azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido de G-CSF y el grupo de modificación en el azúcar se convierte en lo que se puede denominar en esta memoria, p. ej., un "grupo de enlace de glicosilo intacto". Al utilizar la exquisita selectividad de las enzimas, tales como glicosiltransferasas, el presente método proporciona péptidos que portan un grupo deseado en una o más ubicaciones específicas. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, un azúcar modificado está unido directamente a un lugar seleccionado en la cadena peptídica del de G-CSF o, alternativamente, el azúcar modificado se añade a un resto de hidrato de carbono de un glicopéptido. Péptidos en los que los azúcares modificados están unidos tanto a un hidrato de carbono glicopéptido como directamente a un residuo asparagina de la cadena principal del péptido de G-CSF también están dentro del alcance de la presente invención.

En contraposición con conocidas estrategias de elaboración de péptidos químicos y enzimáticos, los métodos de la invención hacen posible ensamblar péptidos y glicopéptidos que tienen un patrón de derivatización sustancialmente homogéneo; las enzimas utilizadas en la invención son generalmente selectivas para un residuo aminoácido particular o una combinación de residuos aminoácidos del péptido de G-CSF. Los métodos también son prácticos para la producción a gran escala de péptidos y glicopéptidos modificados. Por lo tanto, los métodos de la invención proporcionan un medio práctico para la preparación a gran escala de péptidos modificados y glicopéptidos. Los métodos son particularmente bien adecuados para la modificación de péptidos terapéuticos, que incluyen pero no se limitan a glicopéptidos que están glicosilados de forma incompleta durante la producción en células de cultivo de células (p. ej., células de mamífero, células de insecto, células vegetales, células fúngicas, células de levadura o células procarióticas) o plantas o animales transgénicos.

La presente invención también proporciona conjugados de péptidos de G-CSF glicosilados y no glicosilados con un aumento de la semivida terapéutica debido a, por ejemplo, una tasa de aclaramiento reducida, o una tasa de absorción reducida por el sistema inmune o reticuloendotelial (RES). Además de ello, los métodos de la invención proporcionan un medio para enmascarar los determinantes antigénicos en péptidos, reduciendo así o eliminando una respuesta inmune del huésped contra el péptido. La fijación selectiva de agentes de fijación de objetivo también

se puede utilizar para dirigir un péptido a un tejido particular o a un receptor de la superficie celular que es específico para el agente de fijación de objetivo particular.

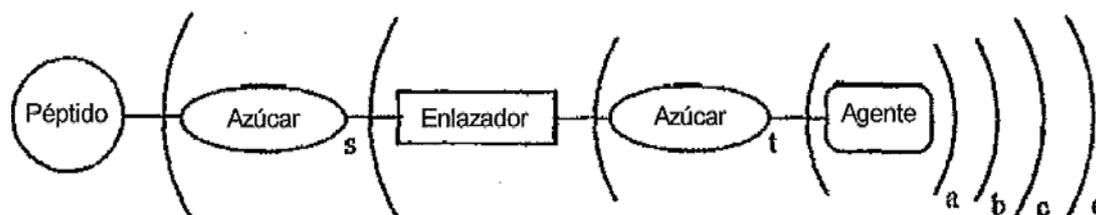
### Los conjugados

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un grupo de modificación seleccionado y un péptido de G-CSF, según se describe en las reivindicaciones.

10 El enlace entre el péptido y el resto de modificación incluye un grupo de enlace de glicosilo interpuesto entre el péptido y el resto seleccionado. Como se discute en esta memoria, el resto de modificación seleccionado es esencialmente cualquier especie que se pueda fijar a una unidad de sacárido, dando como resultado un "azúcar modificado" que es reconocido por una enzima transferasa apropiada, que añade el azúcar modificado en el péptido, o un residuo glicosilo fijado a la misma. El componente sacárido del azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido y un resto seleccionado, se convierte en la un "grupo de enlace de glicosilo", p. ej., un "grupo de enlace de glicosilo intacto". El grupo de enlace de glicosilo no está formado a partir de cualquier mono- u oligo-sacárido que, después de la modificación con el grupo de modificación, es un sustrato para una enzima que añade el azúcar modificado a un aminoácido o residuo glicosilo de un péptido.

15 El grupo de enlace de glicosilo puede ser, o puede incluir un resto sacárido que es modificado de forma degradativa antes o durante la adición del grupo de modificación. Por ejemplo, el grupo de enlace de glicosilo se puede derivar de un residuo sacárido que se produce por la degradación oxidativa de un sacárido intacto en el correspondiente aldehído, p. ej., a través de la acción de metaperyodato, y subsiguientemente se puede convertir en una base de Schiff con una amina apropiada, la cual después se reduce en la amina correspondiente.

20 Los conjugados de la Invención típicamente corresponden a la estructura general:



25 en la que los símbolos a, b, c, d y s representan un número entero no-cero positivo, y t es 0 bien es un número entero positivo. El "agente" es un agente terapéutico, un agente bioactivo, un marcador detectable, un resto soluble en agua (p. ej., PEG, m-PEG, PPG y m-PPG) o similares. El "agente" puede ser un péptido, p. ej., enzima, anticuerpo, antígeno, etc. El enlazador puede ser cualquiera de una amplia diversidad de grupos de enlace, *infra*. Alternativamente, el enlazador puede ser un enlace sencillo o un "enlazador de orden cero".

30 En una realización ilustrativa, el grupo de modificación seleccionado es un polímero soluble en agua, p. ej., m-PEG. El polímero soluble en agua está fijado covalentemente al péptido a través de un grupo de enlace de glicosilo. El grupo de enlace de glicosilo está fijado covalentemente a un residuo aminoácido o a un residuo glicosilo del péptido. La invención proporciona también conjugados en los que un residuo de aminoácido y un residuo de glicosilo están modificados con un grupo de enlace de glicosilo.

35 Un polímero soluble en agua ilustrativo es poli(etilenglicol), p. ej. metoxi-poli(etilenglicol). El poli(etilenglicol) utilizado en la presente invención no se limita a ninguna forma particular o intervalo de pesos moleculares. Para moléculas de poli(etilenglicol) no ramificadas el peso molecular es preferiblemente de entre 500 y 100.000. Un peso molecular de 2000-60.000 se utiliza preferiblemente y preferiblemente de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 30.000.

40 En otra realización, el poli(etilenglicol) es un PEG ramificado que tiene más de un resto PEG fijado. Ejemplos de PEGs ramificados se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.932.462; patente de EE.UU. N° 5.342.940; patente de EE.UU. N° 5.643.575; patente de EE.UU. N° 5.919.455; patente de EE.UU. N° 6.113.906; patente de EE.UU. N° 5.183.660, el documento WO 02/09766; Koderá Y., *Bioconjugate Chemistry* 5:283-288 (1994); y Yamasaki et al., *Agric. Biol. Chem.* 52:2125-2127, 1998. En una forma de realización preferida, el peso molecular de cada poli(etilenglicol) del PEG ramificado es menor que o igual a 40.000 dalton.

45 Además de proporcionar conjugados que se forman a través de un grupo de enlace de glicosilo enzimáticamente añadido, la presente invención proporciona conjugados que son altamente homogéneos en sus patrones de sustitución. Utilizando los métodos de la invención, es posible formar conjugados peptídicos en los que esencialmente todos los restos de azúcar modificado a lo largo de una población de conjugados de la invención se unen a un aminoácido estructuralmente idéntico o residuo glicosilo. Por lo tanto, en un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos de polímeros solubles en agua, que

se unen covalentemente al péptido a través de un grupo glicosilo, p. ej., un grupo de enlace de glicosilo intacto. En un conjugado preferido de la invención, esencialmente cada uno de los miembros de la población está unido a través del grupo de enlace de glicosilo a un residuo glicosilo del péptido, y cada uno de los residuos glicosilo del péptido al que está fijado el grupo de enlace de glicosilo tiene la misma estructura.

- 5 También se proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos de polímeros solubles en agua unidos covalentemente al mismo a través de un grupo de enlace de glicosilo. En una realización preferida, esencialmente cada uno de los miembros de la población de restos de polímeros solubles en agua está unido a un residuo aminoácido del péptido a través de un grupo de enlace de glicosilo, y cada uno de los residuos de aminoácido que tiene un grupo de enlace de glicosilo fijado al mismo tiene la misma estructura.
- 10 La presente Invención también proporciona conjugados análogos a los descritos anteriormente, en que el péptido está conjugado a un resto terapéutico, un resto de diagnóstico, un resto de fijación de objetivo, un resto de toxina o similares a través de un grupo de enlace de glicosilo intacto. Cada uno de los restos citados anteriormente puede ser una molécula pequeña, un polímero natural (p. ej., polipéptido) o polímero sintético. Cuando el resto de modificación se fija a un ácido siálico, en general se prefiere que el resto de modificación sea sustancialmente no fluorescente.
- 15 Esencialmente, cualquier péptido o agente de factor estimulante de colonias de granulocitos, que tenga cualquier secuencia, es de uso como el componente péptido de los conjugados de la presente invención. Factor estimulante de colonias de granulocitos ha sido clonado y secuenciado. En una realización ilustrativa, el péptido de G-CSF tiene la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1:

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA  
TYK  
LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCL  
SQLHSG  
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTI  
WQQMEE  
  
LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQ  
SFLEV  
SYRVLRLHAQP (SEQ ID NO: 1).

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

TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA  
TYK  
LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCL  
SQLHSG  
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTI  
WQQMEEL  
GMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQ  
SFLEVS  
YRVLRLHAQP (SEQ ID NO: 2).

5

En otras realizaciones ilustrativas, el péptido de G-CSF tiene una secuencia presentada en la SEQ ID NOS: 3-11, que figuran a continuación.

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL  
VSECA  
TYK  
LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCL  
SQLHSG  
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTI  
WQ  
QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLV  
ASHLQ  
SFLEVS  
YRVLRLHAQP (SEQ ID NO:3)

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLG  
PASSL  
PQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA  
TYK  
LCHPEELVLL  
GHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCL  
SQLHSG  
FLYQGLLQ  
ALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTI  
WQQMEELGMAPALQ  
PTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQ  
SFLEVS  
YRVLRLHA  
QP (SEQ ID NO:4)

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLG  
PASSL  
PQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL  
VSECA  
TYK  
LCHPEEL  
VLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCL  
SQLHSG  
FLYQGL  
LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTI  
WQQMEELGMAPA  
LQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQ  
SFLEVS  
YRVLRL  
HLAQP (SEQ ID NO:5)

MVTPPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA  
TY  
KLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCL  
SQLHSG  
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTI  
WQQM

EELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFL  
EVSYRVLRLHLAQP(**SEQ ID NO:6**);

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYK  
LCHPEELVLLGHTLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSHGL  
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQMEE  
LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV  
SYRVLRLHLAQP(**SEQ ID NO:7**);

MVTPPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATY  
KLCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSHGL  
LFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQOME  
ELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLE  
VSYRVLRLHLAQP(**SEQ ID NO:8**);

MQTPPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATY  
KLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSHS  
GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQOM  
EELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFL  
EVSYRVLRLHLAQP(**SEQ ID NO:9**);

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYK  
LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSHGL  
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQMEE  
LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV  
SYRVLRLHLAQP(**SEQ ID NO:10**); and

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYK  
LCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSHGL  
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQMEE  
LGMAPTTTTPTQTAMPAPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV  
SYRVLRLHLAQP(**SEQ ID NO:11**)

5 La presente invención no está en modo alguno limitada a las secuencias expuestas en esta memoria. El uso de péptidos de G-CSF de otras secuencias que están mutados para aumentar o disminuir una propiedad o modificar una característica estructural del péptido están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, péptidos de G-CSF mutantes de uso en la invención incluyen aquellos que se proporcionan con los sitios de O-glicosilación adicionales o dichos sitios en otras posiciones. Además de ello, los péptidos mutantes que incluyen uno o más sitio de N-glicosilación son de uso en la invención.

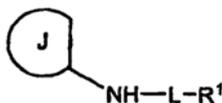
Preferiblemente, ni el amino ni el extremo carboxi del péptido de G-CSF se derivatiza con un resto de modificación polimérico.

10 Los péptidos de la invención incluyen al menos un sitio de glicosilación ligado a O o ligado a N, que está glicosilado con un residuo glicosilo que incluye un resto de modificación polimérico, p. ej., un resto PEG. En una realización ilustrativa, el PEG está unido covalentemente al péptido a través de un grupo de enlace de glicosilo intacto. El grupo de enlace de glicosilo está unido covalentemente a cualquiera de un residuo asparagina o un residuo glicosilo del péptido. Alternativamente, el grupo de enlace de glicosilo está unido a una o más unidades de glicosilo de un

glicopéptido. La invención proporciona también conjugados en los que un grupo de enlace de glicosilo está unido tanto a un residuo de aminoácido y un residuo de glicosilo.

El resto PEG está unido a un enlazador de glicosilo intacto directamente, o a través de un enlazador no-glicosilo, p. ej., alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido.

- 5 En un ejemplo, la invención utiliza una amina de azúcar modificado que tiene la fórmula:



10 en que J es un resto glicosilo (por ejemplo, un azúcar de nucleótidos), L es un enlace o un enlazador y R<sup>1</sup> es el grupo modificador, p. ej., un resto de modificación polimérico. Enlaces ilustrativos son los que se forman entre un resto NH<sub>2</sub> en el resto glicosilo y un grupo de reactividad complementaria en el grupo modificador. Por ejemplo, cuando R<sup>1</sup> incluye un resto de ácido carboxílico, este resto puede ser activado y se acopla con el resto NH<sub>2</sub> en el residuo glicosilo proporcionando un enlace que tiene la estructura NHC(O)R<sup>1</sup>. J es preferiblemente un resto glicosilo que está "intacto", no habiendo sido degradado por la exposición a condiciones que escinden la estructura piranosa o furanosa, p. ej., condiciones oxidantes, p. ej., peryodato de sodio.

15 Enlazadores ilustrativos incluyen restos alquilo y heteroalquilo. Los enlazadores incluyen grupos de enlace, por ejemplo grupos de enlace basados en acilo, p. ej., -C(O)NH-, -OC(O)NH- y similares. Los grupos de enlace son enlaces formados entre los componentes de las especies de la invención, p. ej. entre el resto glicosilo y el enlazador (L), o entre el enlazador y el grupo modificador (R<sup>1</sup>). Otros grupos de enlace ilustrativos son éteres, tioéteres y aminas. Por ejemplo, en una realización, el enlazador es un residuo aminoácido tal como un residuo glicina. El resto ácido carboxílico de la glicina se convierte en la amida correspondiente por reacción con una amina en el residuo glicosilo, y la amina de la glicina se convierte en la amida o el uretano correspondiente por reacción con un ácido carboxílico activado o carbonato del grupo modificador.

20 Otro enlazador ilustrativo es un resto PEG, p. ej., un resto PEG que está funcionalizado con un residuo aminoácido. El enlazador de PEG está conjugado con el grupo glicosilo a través del residuo aminoácido en un extremo de PEG y está unido a R<sup>1</sup> a través del otro extremo de PEG. Alternativamente, el residuo aminoácido está unido a R<sup>1</sup> y el extremo de PEG, que no está unido al aminoácido, está unido al grupo glicosilo.

30 Una especie ilustrativa de NH-L-R<sup>1</sup> tiene la fórmula: -NH{C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NH}<sub>s</sub>{C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NH}<sub>t</sub>R<sup>1</sup>, en el que los índices s y t son independientemente 0 ó 1. Los índices a, b y d son, independientemente, números enteros de 0 a 20, y c es un número entero de 1 a 2500. Otros enlazadores similares se basan en especies en las que un resto-NH está reemplazado por otro grupo, por ejemplo, -S-, -O o -CH<sub>2</sub>. Como los expertos apreciarán, uno o más de los restos entre corchetes correspondientes a los índices s y t pueden ser reemplazados por un resto alquilo o heteroalquilo sustituido o no sustituido.

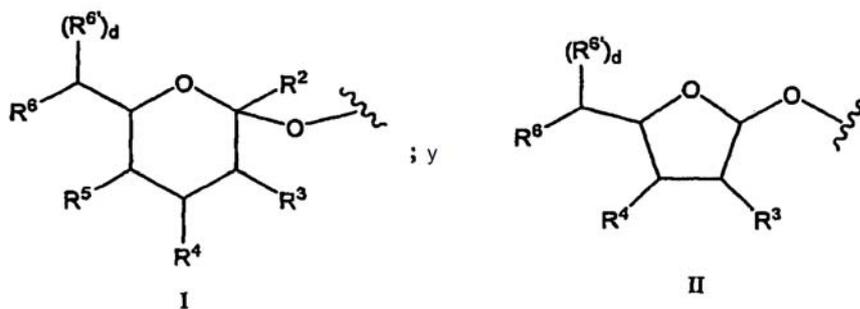
Más particularmente, la invención utiliza compuestos en los que NH-L-R<sup>1</sup> es:  
 NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NHR<sup>1</sup>, NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NHR<sup>1</sup>,  
 NHC(O)O(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NHR<sup>1</sup>,

35 NH(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>NHR<sup>1</sup>, NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NHR<sup>1</sup>, NH(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NHR<sup>1</sup> y NHR<sup>1</sup>. En estas fórmulas, los índices a, b y d se seleccionan independientemente de los números enteros de 0 a 20, preferiblemente de 1 a 5. El índice c es un número de 1 a aproximadamente 2500.

40 En una realización ilustrativa, c se selecciona de manera que el resto PEG es de aproximadamente 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 60 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 75 kDa u 80 kDa.

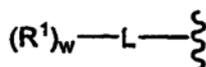
45 En la discusión que sigue, la invención se ilustra mediante referencia al uso de derivados seleccionados de furanosa y piranosa. Los expertos en la técnica reconocerán que el foco de la discusión es para mayor claridad de ilustración y que las estructuras y composiciones recogidas son de aplicación general a través del género de grupos sacáridos, grupos sacáridos modificados, grupos sacáridos activados modificados y conjugados de grupos sacáridos modificados.

Se describe en esta memoria un glicopéptido que está conjugado a un resto de modificación polimérico a través de un grupo de enlace de glicosilo intacto que tiene una fórmula que se selecciona de:



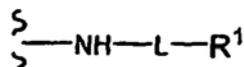
En las Fórmulas I  $R^2$  es H,  $\text{CH}_2\text{OR}^7$ ,  $\text{COOR}^7$  u  $\text{OR}^7$ , en que  $R^7$  representan H, alquilo sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido o sustituido. Cuando  $\text{COOR}^7$  es un ácido carboxílico o carboxilato, ambas formas están representadas por la designación de la estructura única  $\text{COO}^-$  o  $\text{COOH}$ . En las Fórmulas I y II, los símbolos  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^6$  representan independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido,  $\text{OR}^8$ ,  $\text{NHC(O)R}^9$ . El índice d es 0 ó 1.  $R^8$  y  $R^9$  se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, ácido siálico o ácido polisíalico. Al menos uno de  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^6$  incluye el resto de modificación polimérico, p. ej., PEG, enlazado a través de un enlace o un grupo de enlace. En un ejemplo,  $R^8$  y  $R^9$ , junto con el carbono al que están unidos, son componentes de la cadena lateral piruvilo de ácido siálico. En una realización ilustrativa adicional, esta cadena lateral está funcionalizada con el resto de modificación polimérico. En otra realización ilustrativa,  $R^8$  y  $R^9$ , junto con el carbono al que están unidos, son componentes de la cadena lateral de ácido siálico y el resto de modificación polimérico es un componente de  $R^5$ .

En un ejemplo adicionalmente descrito, el resto de modificación polimérico está unido al núcleo del azúcar, en general a través de un heteroátomo. p. ej., nitrógeno, en el núcleo a través de un enlazador, L, tal como se muestra a continuación:

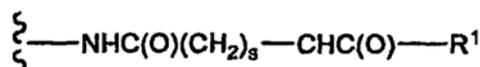


$R^1$  es el resto polimérico y L se selecciona de un enlace y un grupo enlazador. El Índice w representa un número entero seleccionado de 1-6, preferiblemente 1-3 y lo más preferiblemente 1-2. Grupos de enlace ilustrativos incluyen restos alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y ácido siálico. Un componente ilustrativo del enlazador es un resto acilo.

Un compuesto ilustrativo tiene una estructura de acuerdo con las Fórmulas I o II, en que al menos uno de  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  o  $R^6$  tiene la fórmula:

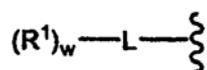


En otro ejemplo, al menos uno de  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  o  $R^6$  tiene la fórmula:



en que s es un número entero de 0 a 20 y  $R^1$  es un resto de modificación polimérico lineal.

En un ejemplo, la construcción resto de modificación polimérico-enlazador es una estructura ramificada que incluye dos o más cadenas poliméricas unidas al resto central. En esta realización, la construcción tiene la fórmula:



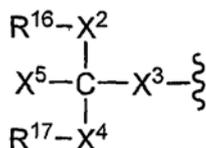
en la que  $R^1$  y L son como se discutió anteriormente y w' es un número entero de 2 a 6, preferiblemente de 2 a 4 y más preferiblemente de 2 a 3.

5 Cuando L es un enlace, éste se forma entre un grupo funcional reactivo en un precursor de R<sup>1</sup> y un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria sobre el núcleo de sacarilo. Cuando L es un enlazador de orden distinto de cero, un precursor de L puede estar en su lugar en el resto glicosilo antes de la reacción con el precursor de R<sup>1</sup>. Alternativamente, los precursores de R<sup>1</sup> y L se pueden incorporar en una casete preconformada que subsiguientemente se une al resto glicosilo. Tal como se recoge en esta memoria, la selección y preparación de precursores con grupos funcionales reactivos apropiados está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Además de ello, el acoplamiento de los precursores prosigue mediante la química que se entiende bien en la técnica.

10 En una realización ilustrativa, L es un grupo de enlace que se forma a partir de un aminoácido, o un péptido pequeño (p. ej., 1-4 residuos aminoácidos), proporcionando un azúcar modificado en el que el radical de modificación polimérico está fijado a través de un enlazador alquilo sustituido. Enlazadores ilustrativos incluyen glicina, lisina, serina y cisteína. El resto de PEG se puede fijar al resto amina del enlazador a través de un enlace amida o uretano. El PEG está enlazado a los átomos de azufre u oxígeno de cisteína y serina a través enlaces tioéter o éter, respectivamente.

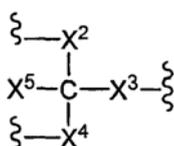
15 En una realización ilustrativa, R<sup>5</sup> incluye el resto de modificación polimérico. En otra realización ilustrativa, R<sup>5</sup> incluye tanto el resto de modificación polimérico como un enlazador, L, uniéndose el resto de modificación al resto de la molécula. Como se discutió anteriormente, L puede ser una estructura lineal o ramificada. Del mismo modo, el resto de modificación polimérico puede ser ramificado o lineal.

En una realización ilustrativa,  $(R^1)_w-L-\xi$  tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



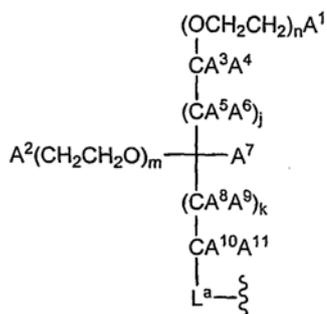
(III).

en la que el resto:



25 es el brazo del enlazador, L, y R<sup>16</sup> y R<sup>17</sup> son R<sup>1</sup>. R<sup>16</sup> y R<sup>17</sup> son independientemente restos de modificación poliméricos seleccionados. C es carbono. X<sup>5</sup> es preferiblemente un grupo no reactivo (p. ej., H, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido), y puede ser un brazo polimérico. X<sup>2</sup> y X<sup>4</sup> son fragmentos de enlace que son preferiblemente en esencia no reactivos bajo condiciones fisiológicas, que puede ser el mismo o diferente. Un enlazador ilustrativo no incluye restos ni aromáticos ni éster. Alternativamente, estos enlaces pueden incluir uno o más restos que está diseñado para degradarse bajo condiciones fisiológicamente relevantes, p. ej., ésteres, disulfuros, etc. X<sup>2</sup> y X<sup>4</sup> unen los brazos poliméricos R<sup>16</sup> y R<sup>17</sup> a C. Fragmentos de enlace ilustrativos para X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup> y X<sup>4</sup> se seleccionan independientemente e incluyen S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH y NHC(O)O, y OC(O)NH, CH<sub>2</sub>S, CH<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S, (CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>O, (CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>S o (CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>Y'-PEG, en donde Y' es S, NH, NHC(O), C(O)NH, NHC(O)O, OC(O)NH u O, y O es un número entero de 1 a 50. En una realización ilustrativa, los fragmentos de enlace X<sup>2</sup> y X<sup>4</sup> son diferentes fragmentos de enlace.

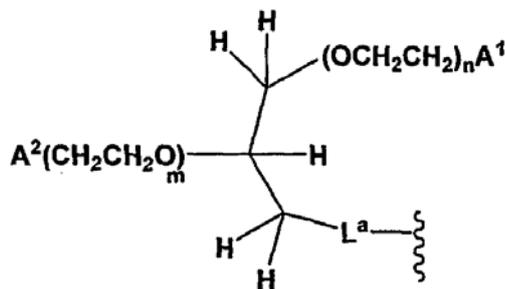
En una realización ilustrativa,  $(R^1)_w-L-\xi$  tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



(IIIa)

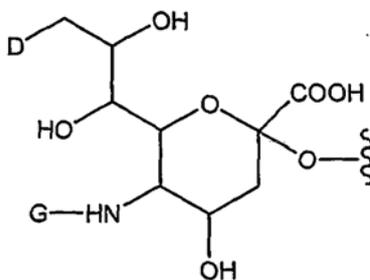
- 5 los índices  $m$  y  $n$  son números enteros seleccionados independientemente de 0 a 5000.  $\text{A}^1, \text{A}^2, \text{A}^3, \text{A}^4, \text{A}^5, \text{A}^6, \text{A}^7, \text{A}^8, \text{A}^9, \text{A}^{10}$  y  $\text{A}^{11}$  son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido,  $-\text{N}^{\text{A}^{12}}\text{A}^{\text{A}^{13}}$ ,  $-\text{O}^{\text{A}^{12}}\text{A}^{\text{A}^{13}}$  y  $-\text{Si}^{\text{A}^{12}}\text{A}^{\text{A}^{13}}$ . Los índices  $j$  y  $k$  son números enteros seleccionados independientemente de 0 a 20.  $\text{A}^{12}$  y  $\text{A}^{13}$  son miembros seleccionados independientemente entre alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido.
- 10 La Fórmula IIIa es un subconjunto de la Fórmula III. Las estructuras descritas por la Fórmula IIIa también están abarcadas por la Fórmula III.

En una realización ilustrativa,  $(\text{R}^1)_w - \text{L} - \zeta$  tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



En una realización ilustrativa,  $\text{A}^1$  y  $\text{A}^2$  son cada uno  $-\text{OCH}_3$  o H.

- 15 En una realización, la presente invención proporciona un péptido de G-CSF que comprende el resto:

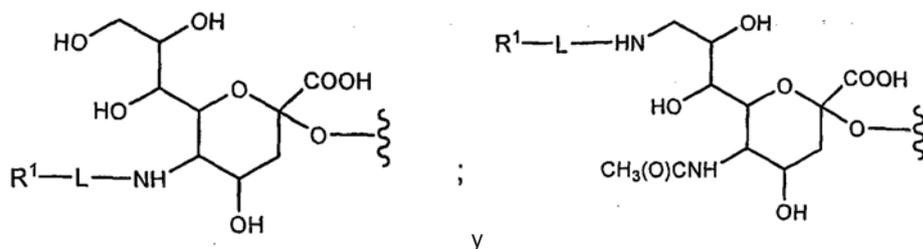


- 20 en donde D es un miembro seleccionado entre  $-\text{OH}$  y  $\text{R}^1-\text{L}-\text{NH}-$ ; G es un miembro seleccionado entre H y  $\text{R}^1-\text{L}-$  y  $\text{C}(\text{O})$ alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ );  $\text{R}^1$  es un resto que comprende un residuo poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada, y L es un enlazador, p. ej., un enlace ("orden cero"), alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. En realizaciones ilustrativas, cuando D es OH, G es  $\text{R}^1-\text{L}-$ , y cuando G es  $\text{C}(\text{O})$ alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ), D es  $\text{R}^1-\text{L}-\text{NH}-$ .

En otra realización ilustrativa, la invención proporciona un conjugado formado entre un azúcar modificado de la invención y un péptido de G-CSF sustrato. En esta realización, el resto azúcar del azúcar modificado se convierte en un grupo de enlace de glicosilo interpuesto entre el sustrato peptídico y el grupo de modificación. Un grupo de

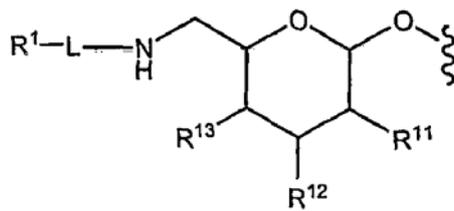
enlace de glicosilo ilustrativo es un grupo de enlace de glicosilo intacto, en que el resto o los restos glicosilo que forman el grupo de enlace no son degradados por procesos químicos (p. ej., metaperyodato de sodio) o enzimáticos (p. ej., oxidasas). Conjugados seleccionados de la invención incluyen un grupo de modificación que está unido al resto amina de un amino-sacárido, p. ej., manosamina, glucosamina, galactosamina, ácido siálico, etc. Casetes de grupo de modificación-grupo de enlace de glicosilo ilustrativas de acuerdo con este motivo se basan en una estructura de ácido siálico, tales como los que tienen las fórmulas:

5



En las fórmulas anteriores, R<sup>1</sup> y L son como se describió anteriormente. Mayores detalles acerca de la estructura de grupos R<sup>1</sup> ilustrativos se proporcionan a continuación.

10 Todavía en una realización ilustrativa adicional, el conjugado se forma entre un G-CSF sustrato y un resto sacarilo en la que el grupo de modificación está fijado a través de un enlazador en la posición carbono 6 del resto sacarilo. Por lo tanto, conjugados ilustrativos de acuerdo con esta realización tienen la fórmula:

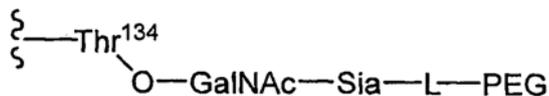


15 en la que los radicales son como se discutió anteriormente. Tales restos sacarilo incluyen, sin limitación, glucosa, glucosamina, N-acetil-glucosamina, galactosa, galactosamina, N-acetil-galactosamina, manosa, manosamina, N-acetil-manosamina y similares.

20 Debido a la versatilidad de los métodos disponibles para la modificación de residuos glicosilo en un péptido terapéutico, tal como G-CSF, las estructuras de glicosilo en los conjugados peptídicos de la invención pueden tener sustancialmente cualquier estructura. Además de ello, los glicanos pueden estar enlazados a O o enlazados a N. Como se ilustra en la discusión que sigue, cada uno de los derivados de piranosa y furanosa discutidos anteriormente puede ser un componente de un resto glicosilo de un péptido.

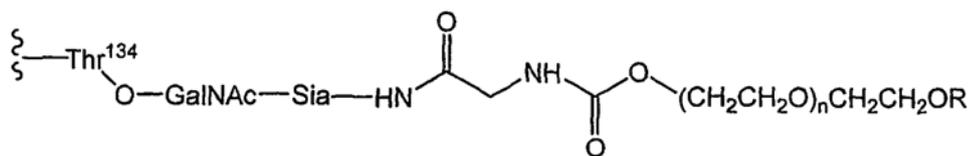
En otra realización ilustrativa, la invención proporciona un conjugado de péptido de G-CSF en el que el residuo glicosilo modificado (incluyendo el grupo de enlace de glicosilo) está en Thr133 (Thr 134, si la secuencia comienza con Met). Una fórmula ilustrativa de acuerdo con esta realización incluye el resto:

25



30 en que L es un enlazador que se selecciona de enlazadores de orden 0, restos alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. Un enlazador ilustrativo es una amida o carbamato de un aminoácido natural o no natural (por ejemplo, -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>NHC(O)-) en la que el índice s representa un número entero de 1 a 20. El resto de poli(etilenglicol) (PEG) puede tener un peso molecular de hasta aproximadamente 100 kD. Restos de PEG ilustrativos son de aproximadamente 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 60 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 75 kDa u 80 kDa. Los restos de PEG son especies de PEG lineales o ramificadas, tales como las descritas en esta memoria. El extremo del resto de PEG, que no está unido al enlazador, puede ser OH u otro resto, p. ej., un grupo O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) sustituido o no sustituido. OMe se prefiere actualmente.

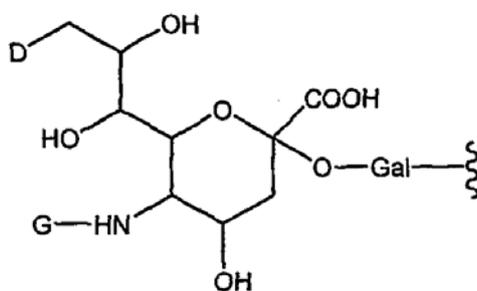
35 En una realización ilustrativa adicional, el GCSF glicopeglilado de la invención incluye la subestructura:



en la que R y n son como se discutió anteriormente. La casete brazo de enlazador-PEG está fijada al ácido siálico en cualquier posición. El nitrógeno en el carbono 5 se prefiere actualmente, aunque el hidroxilo en el carbono 9 puede ser reemplazado por una amina y puede ser funcionalizado como se muestra arriba.

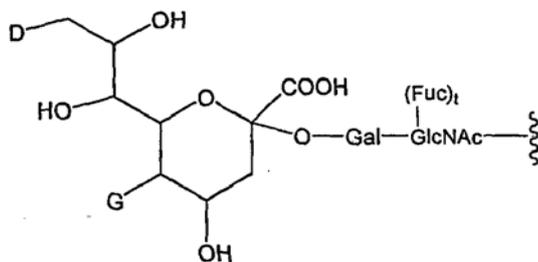
- 5 En cada una de las figuras recogidas anteriormente, el sitio de glicosilación se representa como la treonina en la posición 134. Las figuras son relevantes para un péptido de GCSF que incluye una metionina terminal. Las figuras también son relevantes para un péptido de GCSF que no incluye una metionina terminal, en cuyo caso la Thr en cada una de las figuras anteriores se marca correctamente Thr<sup>133</sup>.

La invención proporciona un péptido de G-CSF modificado que incluye un grupo glicosilo que tiene la fórmula:



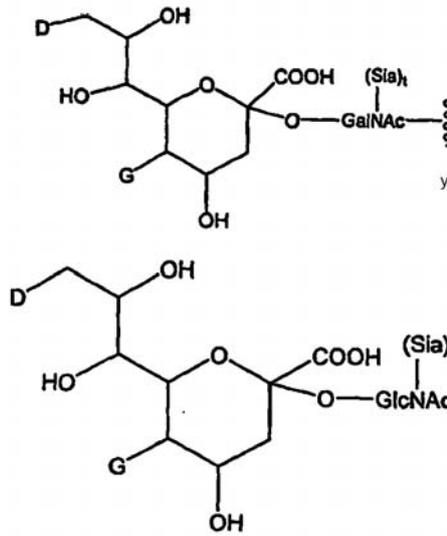
10

En otras realizaciones, el grupo tiene la fórmula:



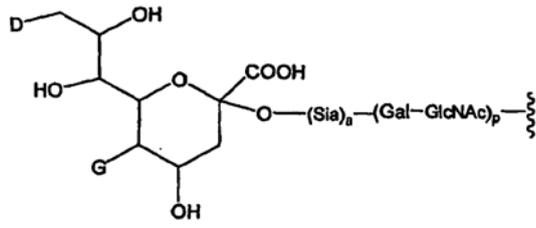
en que el índice t es 0 ó 1.

- 15 Todavía en una realización ilustrativa adicional, el grupo tiene una estructura que es un miembro seleccionado entre las siguientes fórmulas:



en que el índice t es 0 ó 1.

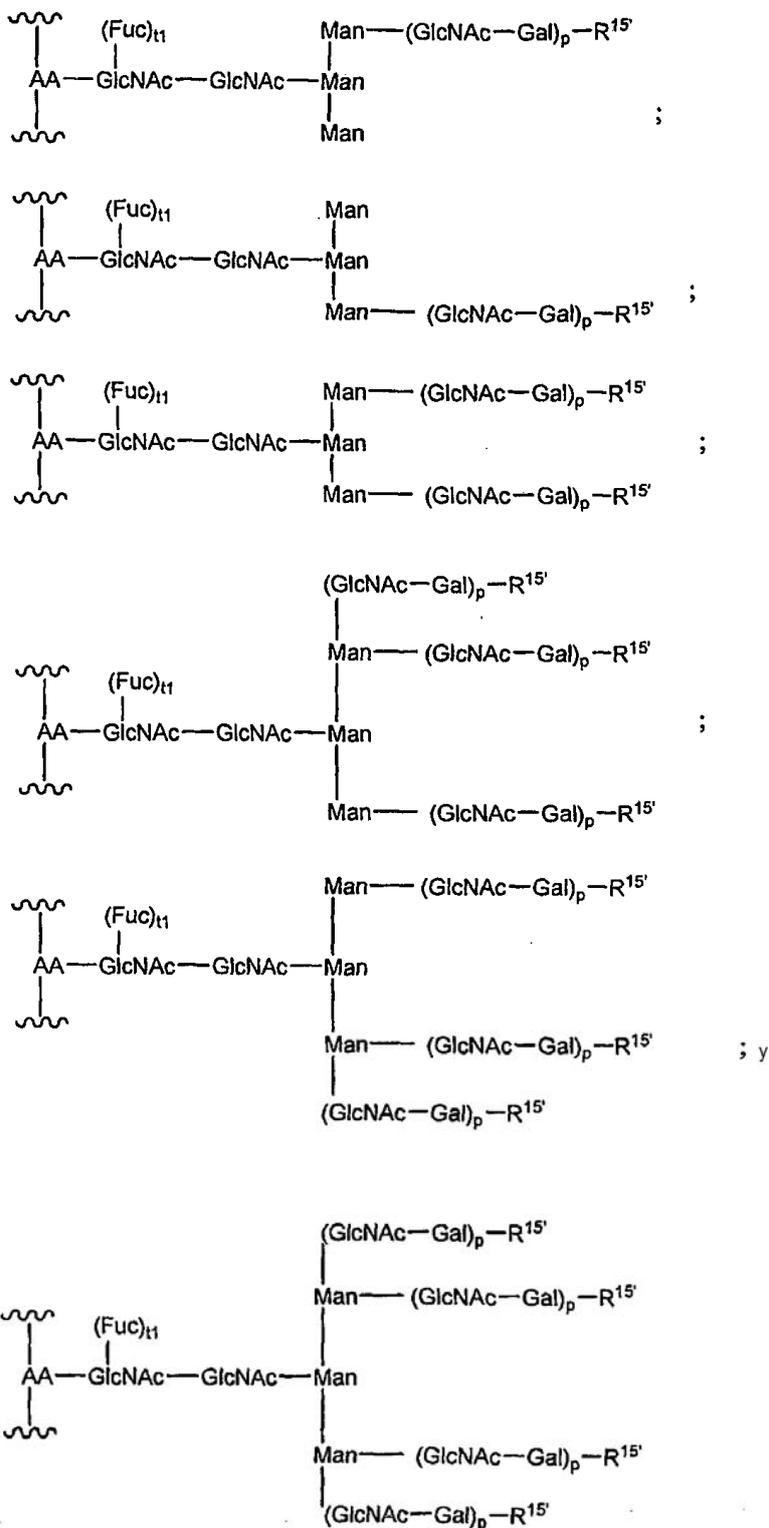
Todavía en otra realización, el grupo tiene la fórmula:



5 en que el Índice p representa un número entero de 1 a 10; y a es 0 ó 1.

En un ejemplo (que no forma parte de la invención) de acuerdo con cada una de las fórmulas recogidas anteriormente, el grupo de enlace de PEG-glicosilo está fijado en Thr 133 (Thr 134) de G-CSF.

En una realización ilustrativa, un péptido de G-CSF glicoPEGilado de la invención incluye al menos un residuo glicosilo enlazado a N, seleccionado de los residuos de glicosilo que se establecen a continuación:

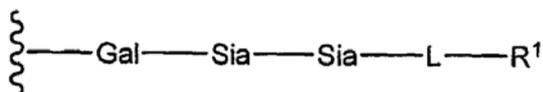


En las fórmulas anteriores, el índice t1 es 0 ó 1 y el Índice p es un número entero de 1 a 10. El símbolo  $R^{15}$  representa H, OH (p. ej. Gal-OH), un resto sialilo, un resto sialilo modificado con un polímero (es decir, un grupo de enlace de glicosilo-resto de modificación polimérico (Sia-L- $R^1$ )) o un resto sialilo al que está unido un resto sialilo modificado con un polímero (p. ej., Sia-Sia-L- $R^1$ ) ("Sia-Sia<sup>P</sup>"). Restos sacarilo modificados con polímero ilustrativos tienen una estructura de acuerdo con las Fórmulas I y II. Un péptido de G-CSF ilustrativo de la Invención incluirá al menos un glicano que tiene un  $R^{15}$  que incluye una estructura de acuerdo con las Fórmulas I o II. El oxígeno, con la valencia abierta, de las Fórmulas I y II está preferiblemente fijado a través de un enlace glicosídico a un carbono de un resto Gal o GalNAc. En una realización ilustrativa adicional, el oxígeno está unido al carbono en la posición 3 de

un residuo galactosa. En una realización ilustrativa, el ácido siálico modificado está enlazado  $\alpha$ 2,3- al residuo galactosa. En otra realización ilustrativa, el ácido siálico está enlazado  $\alpha$ 2,6- al residuo galactosa.

En otra realización ilustrativa, la Invención proporciona un conjugado de péptido de G-CSF que incluye un grupo de enlace de glicosilo, tales como los recogidos anteriormente, que está unido covalentemente a un residuo aminoácido del péptido. En una realización de acuerdo con este motivo, el resto de enlace de glicosilo está enlazado a un residuo galactosa a través de un residuo Sia:

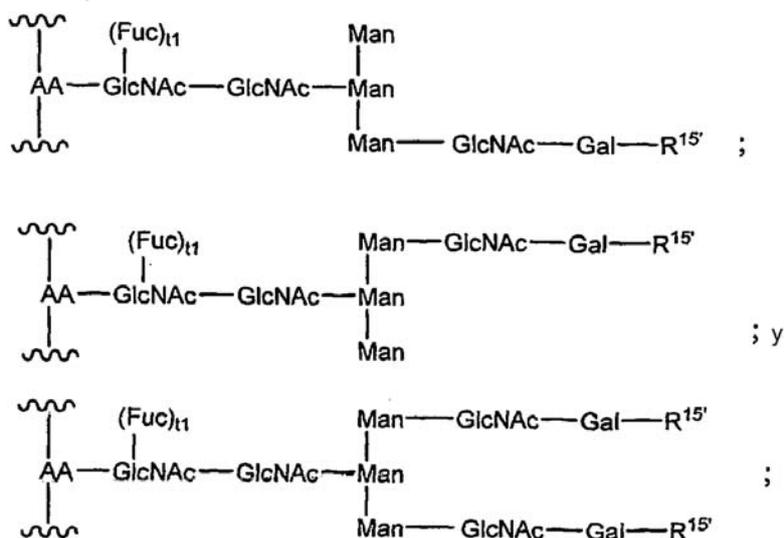
5



Una especie ilustrativa de acuerdo con este motivo se prepara conjugando Sia-L-R<sup>1</sup> a un ácido siálico terminal de un glicano utilizando una enzima que forma enlaces Sia-Sia, p. ej., CST-II, ST8Sia-II, ST8Sia-III y ST8Sia-IV.

10

En otra realización ilustrativa, los glicanos tienen una fórmula que se selecciona del grupo:



y combinaciones de los mismos.

15

Los glicanos de este grupo corresponden, en general, a los que se encuentran en un péptido de G-CSF que se produce mediante células de insecto (p. ej., Sf-9), después de la remodelación de acuerdo con los métodos recogidos en esta memoria. Por ejemplo el G-CSF derivado de insectos que se expresa con un núcleo de tri-manosilo se pone en contacto posteriormente con un donante de GlcNAc y una GlcNAc transferasa y un donante de Gal y una Gal transferasa. La adición de GlcNAc y Gal al núcleo de tri-manosilo se consigue en cualquiera de dos etapas o de una sola etapa. Un ácido siálico modificado se añade a al menos una rama del resto glicosilo tal como discute en esta memoria. Los restos Gal que no están funcionalizados con el ácido siálico modificado están opcionalmente "tapados" mediante reacción con un donante de ácido siálico en presencia de una sialil transferasa.

20

En una realización ilustrativa, al menos 60% de restos Gal terminales en una población de péptidos está tapada con ácido siálico, preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, aún más preferiblemente al menos el 90% e incluso más preferiblemente al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% está tapado con ácido siálico.

25

En cada una de las fórmulas anteriores, R<sup>15'</sup> es como se discutió anteriormente. Además de ello, un péptido de G-CSF modificado ilustrativo de la invención incluirá al menos un glicano con un resto R<sup>15'</sup> que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas I o II.

En una realización ilustrativa, el resto de enlace de glicosilo tiene la fórmula:

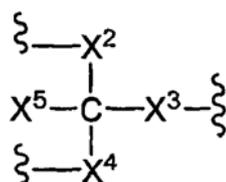


$X^3$  se hace reaccionar con un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en un enlazador, azúcar o casete de enlazador-azúcar,  $X^3$  se convierte en un componente de fragmento de enlace  $X^3$ .

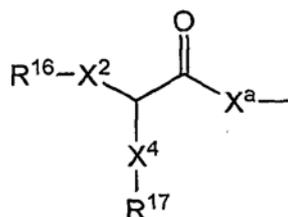
Fragmentos de enlace ilustrativos para  $X^2$ ,  $X^3$  y  $X^4$  se seleccionan independientemente e incluyen S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH y NHC(O)O, y OC(O)NH, CH<sub>2</sub>S, CH<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S, (CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>O, (CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>S o (CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>Y'-PEG, en donde Y' es S, NH, NHC(O), C(O)NH, NHC(O)O, OC(O)NH u O, y o es un número entero de 1 a 50. En una realización ilustrativa, los fragmentos de enlace  $X^2$  y  $X^4$  son fragmentos de enlace diferentes.

En una realización ilustrativa, el precursor (III), o un derivado activado del mismo, se hace reaccionar con, y con ello se une a un azúcar, un azúcar activado o un nucleótido de azúcar a través de una reacción entre  $X^3$  y un grupo de reactividad complementaria en el resto azúcar, p. ej., una amina. Alternativamente,  $X^3$  reacciona con un grupo funcional reactivo en un precursor para formar un enlazador, L. Uno o más de  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  o  $R^6$  de las Fórmulas I y II pueden incluir el resto de modificación polimérico ramificado, o este resto unido a través de L.

En una realización ilustrativa, el resto:



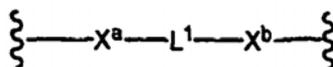
es el brazo de unión, L. En esta realización, un enlazador ilustrativo se deriva de un aminoácido natural o no natural, un análogo de aminoácido o un mimético de aminoácido, o un péptido pequeño formado a partir de uno o más de tales especies. Por ejemplo, ciertos polímeros ramificados que se encuentran en los compuestos de la invención tienen la fórmula:



(IV)

$X^a$  es un fragmento de enlace que se forma por la reacción de un grupo reactivo funcional, p. ej.,  $X^3$ , en un precursor del resto de modificación polimérico ramificado y un grupo funcional reactivo en el resto azúcar, o un precursor a un enlazador. Por ejemplo, cuando  $X^3$  es un ácido carboxílico, éste se puede activar y unir directamente a un grupo amina colgante de un amino-sacárido (p. ej., Sia, GalNH<sub>2</sub>, GlcNH<sub>2</sub>, ManNH<sub>2</sub>, etc.), formando un  $X^a$  que es una amida. Grupos funcionales reactivos ilustrativos adicionales y precursores activados se describen en lo que sigue. El índice c representa un número entero de 1 a 10. Los otros símbolos tienen la misma identidad que los discutidos anteriormente.

En otra descripción ilustrativa,  $X^a$  es un resto de enlace formado con otro enlazador:

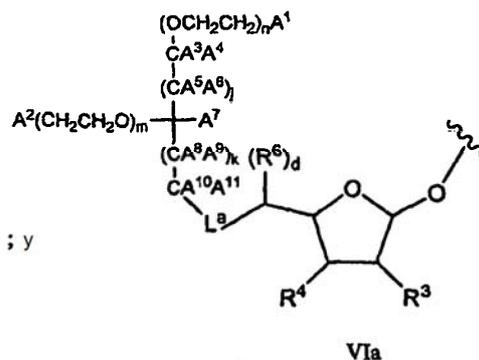
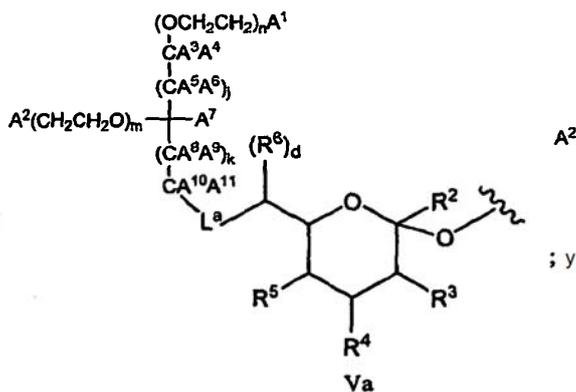
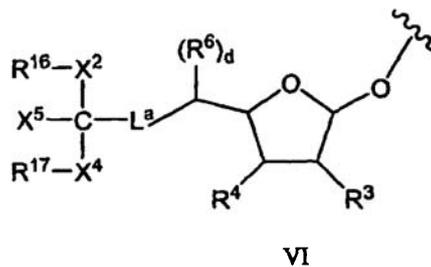
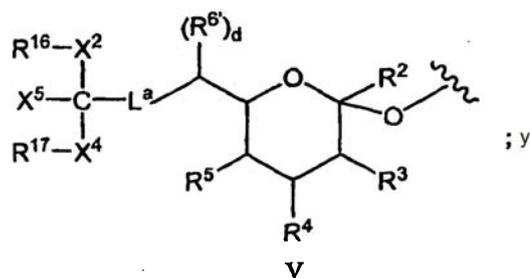


en que  $X^b$  es un segundo fragmento de enlace y se selecciona independientemente de los grupos recogidos para  $X^a$ , y, de forma parecida a L,  $L^1$  es un enlace, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido.

Especies ilustrativas para  $X^a$  y  $X^b$  incluyen S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), C(O)NH y NHC(O)O y OC(O)NH.

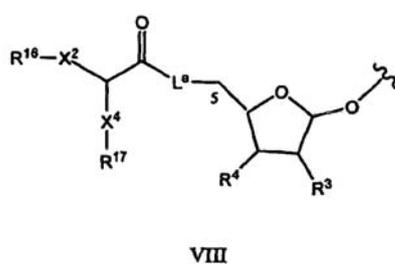
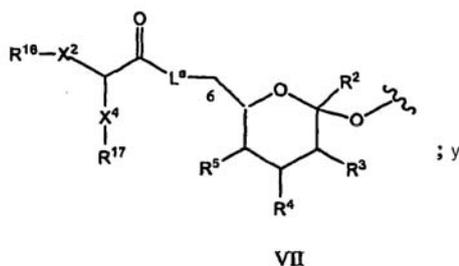
En otro ejemplo,  $X^4$  es un enlace peptídico a  $R^{17}$ , que es un aminoácido, di-péptido (p. ej., Lys-Lys) o tri-péptido (E.G., Ly-Lys-Lys) en que el o los restos alfa-amina y/o el o los heteroátomos de la cadena lateral están modificados con un resto de modificación polimérico.

En una descripción ilustrativa adicional, los conjugados de la invención incluyen un resto, p. ej., un resto  $R^{15}$  que tiene una fórmula que se selecciona de:



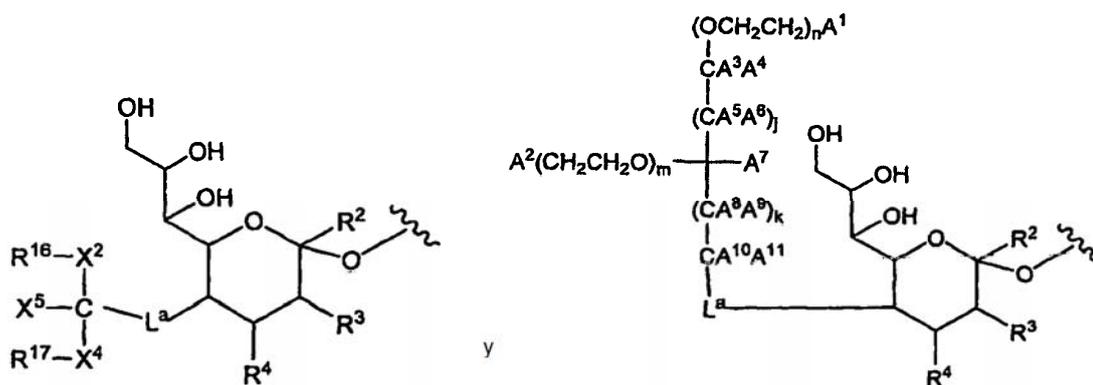
5 en que la identidad de los radicales representados por los diversos símbolos es el mismo que el comentado anteriormente. L es un enlace o un enlazador tal como se discute antes para L y L<sup>1</sup>, p. ej., alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido. En un ejemplo, L<sup>a</sup> es un resto de la cadena lateral del ácido siálico que no está funcionalizada con el resto de modificación polimérico tal como se muestra. Restos L<sup>a</sup> ilustrativos incluyen cadenas de alquilo sustituido o no sustituido que incluyen uno o más OH o NH<sub>2</sub>.

En aún otra realización ilustrativa, la Invención proporciona conjugados que tienen un resto, p. ej., un resto R<sup>15</sup> con las fórmulas:



10 La Identidad de los radicales representados por los diversos símbolos es la misma que la discutida anteriormente. Como apreciarán los expertos, el brazo de enlazador en las Fórmulas VII y VIII es igualmente aplicable a otros azúcares modificados recogidos en esta memoria. Por ejemplo, las especies de las Fórmulas VI y VII son los restos R<sup>15</sup> fijados a las estructuras de glicano recogidos en esta memoria.

En aún otra realización ilustrativa, el péptido de G-CSF incluye un resto R<sup>15</sup> con la fórmula:

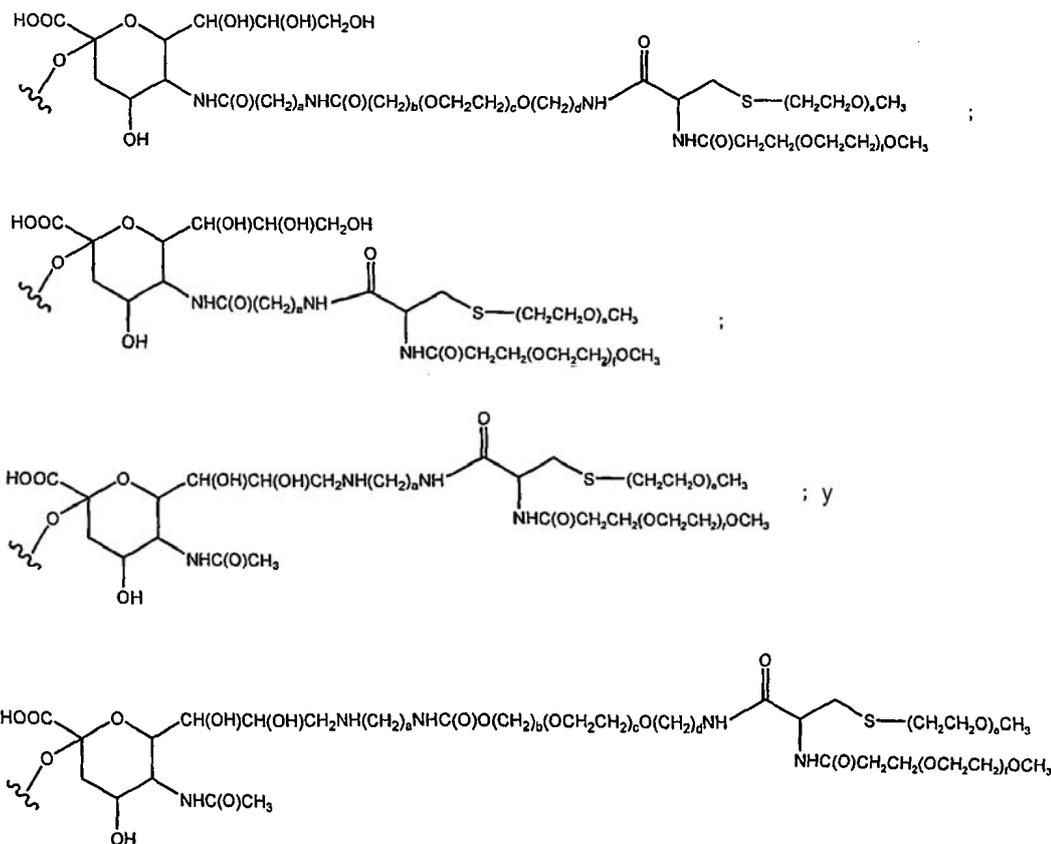


5 en que las identidades de los radicales son como se discutió anteriormente. Una especie ilustrativa para  $L^a$  es -  
 $(CH_2)_jC(O)NH(CH_2)_hC(O)NH-$ , en que los Índices  $h$  y  $j$  son números enteros del 0 al 10 independientemente  
 seleccionados. Una especie ilustrativa adicional es  $-C(O)NH-$ . Los índices  $j$  y  $k$  son números enteros seleccionados  
 10 independientemente de 0 a 20. Los índices  $m$  y  $n$  son números enteros seleccionados independientemente de 0 a  
 5000.  $A^1, A^2, A^3, A^4, A^5, A^6, A^7, A^8, A^9, A^{10}$  y  $A^{11}$  son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo  
 sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido,  
 heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido,  
 15  $-NA^{12}A^{13}$ ,  $-OA^{12}$  y  $-SIA^{12}A^{13}$ .  $A^{12}$  y  $A^{13}$  son miembros seleccionados independientemente entre alquilo sustituido o no  
 sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido  
 o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, y heteroarilo sustituido o no sustituido.

15 Las realizaciones de la invención recogidas arriba se ilustran adicionalmente por referencia a especies en las que el  
 polímero es un polímero soluble en agua, especialmente poli(etilenglicol) ("PEG"), por ejemplo, metoxi-  
 poli(etilenglicol). Los expertos apreciarán que el enfoque en las secciones que siguen es para claridad de la  
 ilustración y los diversos motivos recogidos utilizando PEG como un polímero ilustrativo son igualmente aplicables a  
 especies en las que se utiliza un polímero que no sea PEG.

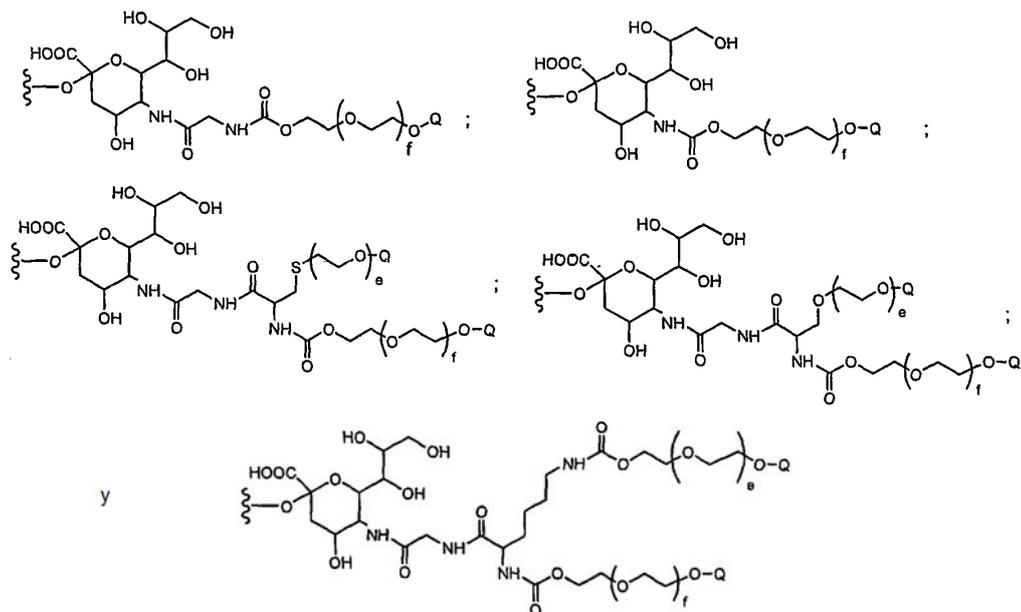
PEG de cualquier peso molecular, p. ej. de 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa,  
 40 kDa, 45 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 60 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 75 kDa o 80 kDa es de uso en la presente invención.

En una realización ilustrativa, el resto  $R^{15}$  tiene una fórmula que es un miembro seleccionado entre el grupo:



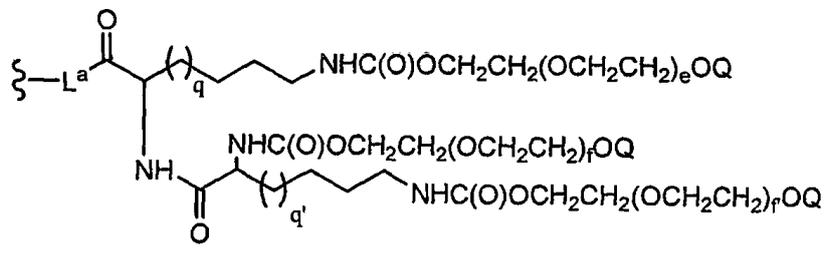
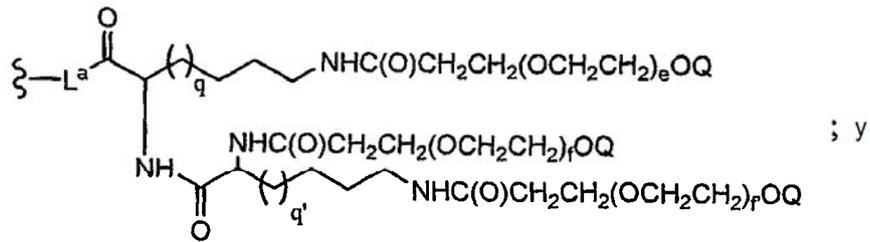
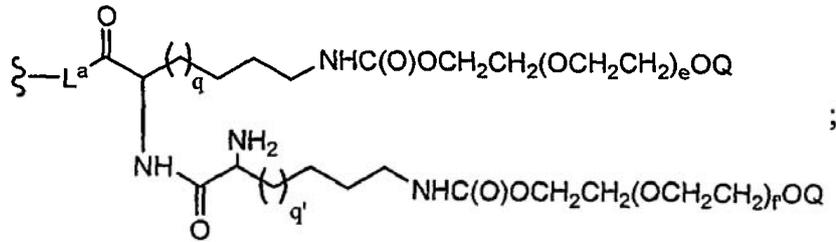
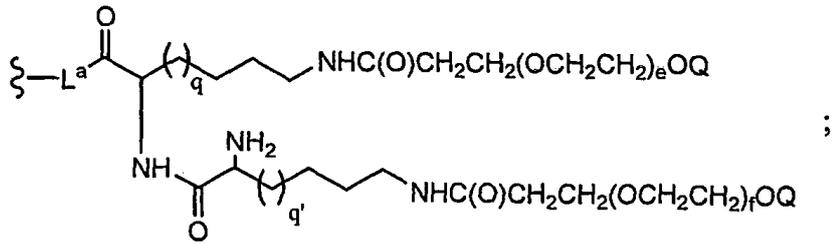
En cada una de las estructuras anteriores, el fragmento enlazador  $-\text{NH(CH}_2\text{)}_a-$  puede estar presente o ausente.

En otras realizaciones ilustrativas, el conjugado incluye un resto  $\text{R}^{15}$  seleccionado del grupo:

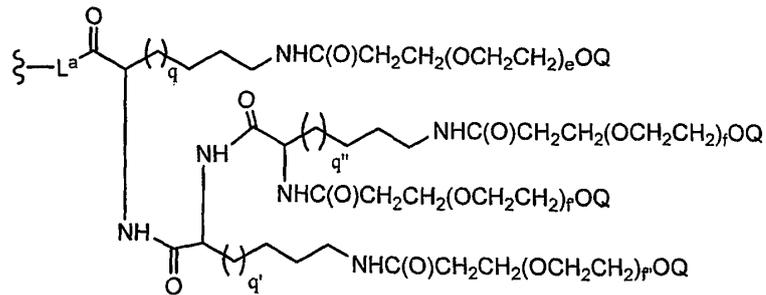
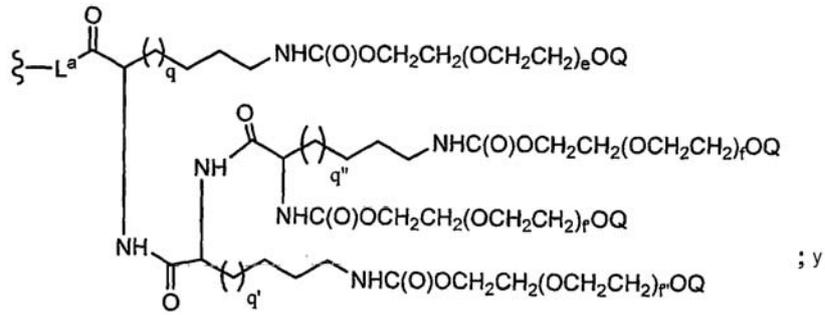


- 5 En cada una de las fórmulas anteriores, los índices e y f se seleccionan independientemente de los números enteros de 1 a 2500. En realizaciones ilustrativas adicionales, e y f se seleccionan para proporcionar un resto PEG que es aproximadamente de 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 60 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 75 kDa u 80 kDa. El símbolo Q representa alquilo sustituido o no sustituido (p. ej., alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , p. ej. metilo), heteroalquilo sustituido o no sustituido o H.

Otros polímeros ramificados tienen estructuras basadas en péptidos de di-lisina (Lys-Lys), por ejemplo:

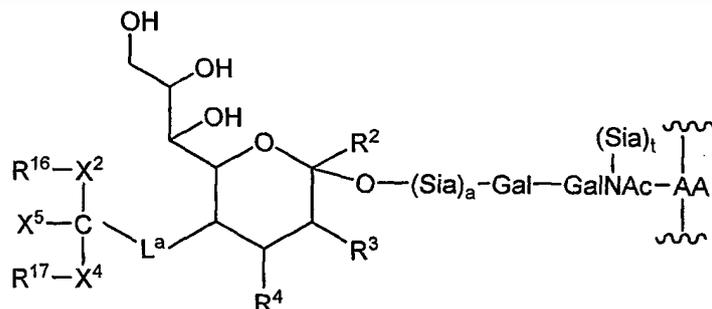
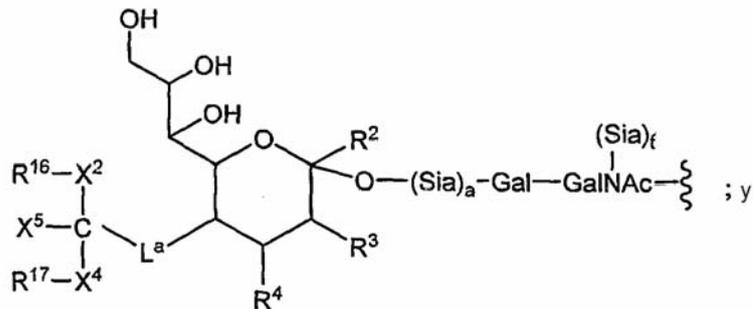
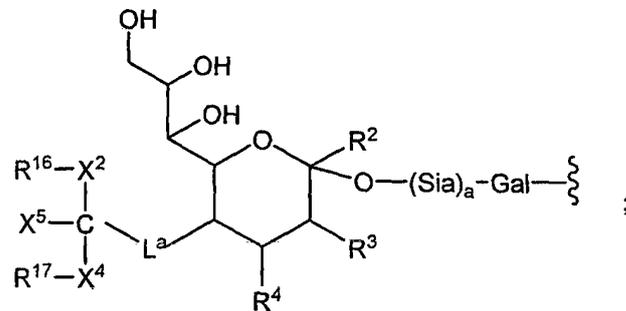


y péptidos de tri-lisina (Lys-Lys-Lys), por ejemplo:



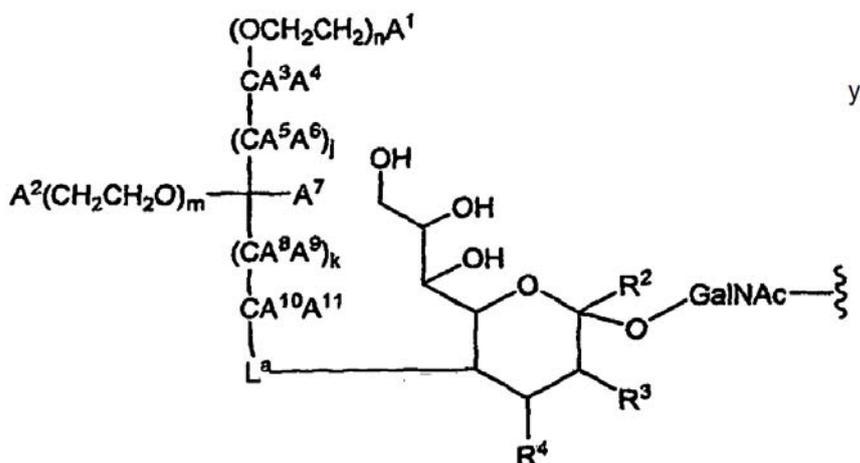
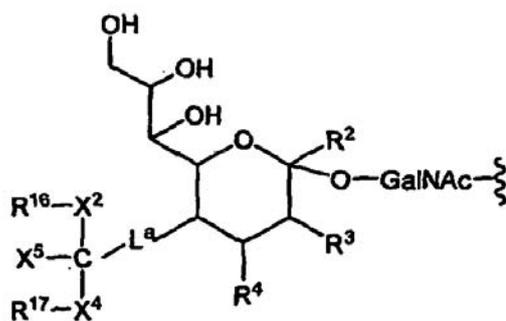
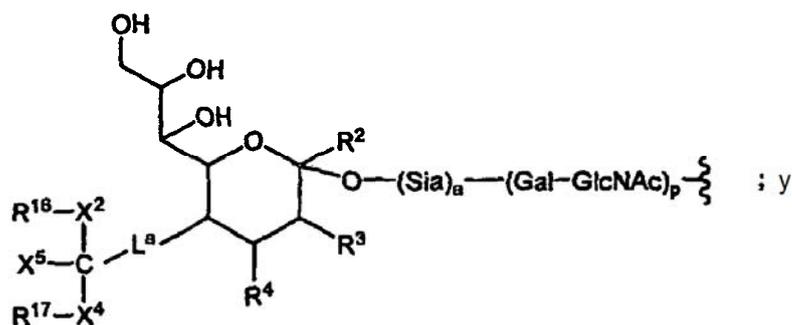
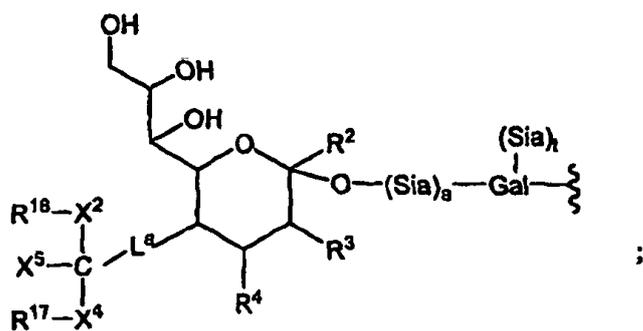
En cada una de las figuras anteriores, e, f, f' y f'' representan números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500. Los índices q, q' y q'' representan números enteros seleccionados independientemente de 1 a 20.

En otra realización ilustrativa, el péptido de G-CSF comprende un resto glicosilo seleccionado de las fórmulas:



en que  $L^a$  es un enlace o un enlazador tal como se describe en esta memoria; el índice t representa 0 ó 1 y el índice a representa 0 ó 1. Cada uno de estos grupos pueden estar incluidos como componentes de las estructuras de sacáridos mono-, bi-, tri- y tetra-antenarios recogidas anteriormente.

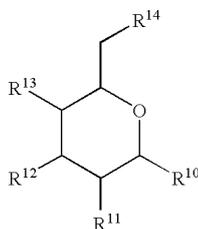
- 5 En aún otra realización, los conjugados de la invención incluyen un residuo glicosilo modificado que incluye la subestructura seleccionada de:



En que el índice a y el enlazador  $L^a$  son como discutió anteriormente. El índice p es un numero entero del 1 al 10. Los índices t y a se seleccionan independientemente entre 0 y 1. Cada uno de estos grupos se pueden incluir como componentes de las estructuras de sacáridos mono-, bi-, tri- y tetra-atenarios recogidas anteriormente.

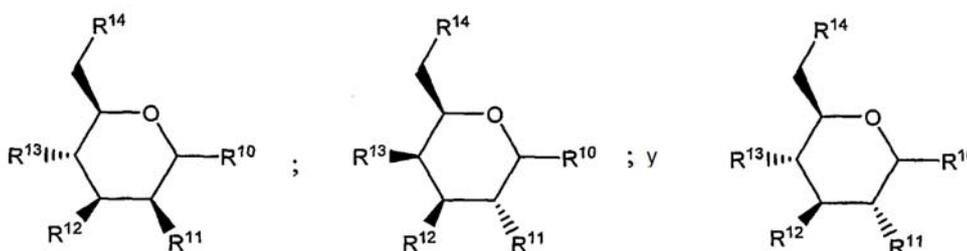
- 5 En un ejemplo adicional se describen azúcares modificados en los que la posición 6-hidroxilo se convierte en el resto amina correspondiente, que porta una casete de grupo de modificación del enlazador de como la recogida anteriormente. Grupos sacarilo ilustrtaivos que se pueden utilizar como el núcleo de estos azúcares modificados

incluyen Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc, Fuc, Xyl, Man y similares. Un azúcar modificado representativo según esta realización tiene la fórmula:



- 5 en la que R<sup>11</sup>-R<sup>14</sup> son miembros seleccionados independientemente entre H, OH, C(O)CH<sub>3</sub>, NH y NHC(O)CH<sub>3</sub>, R<sup>10</sup> es un enlace a otro residuo glicosilo (-O-glicosilo) o a un aminoácido del péptido de G-CSF (-NH-(G-CSF)). R<sup>14</sup> es OR<sup>1</sup>, NHR<sup>1</sup> o NH-L-R<sup>1</sup>. R<sup>1</sup> y NH-L-R<sup>1</sup> son como se describió anteriormente.

Conjugados seleccionados de acuerdo este motivo se basan en manosa, galactosa o glucosa, o en especies que tienen la estereoquímica de manosa, galactosa o glucosa. Las fórmulas generales de estos conjugados son:



- 10 Como se discutió anteriormente, la invención proporciona sacáridos que portan un grupo de modificación, análogos activados de estas especies y conjugados formados entre especies tales como péptidos y lípidos y un sacárido modificado de la invención.

### Azúcares Modificados

- 15 La presente invención utiliza azúcares modificados y nucleótidos de azúcares modificados para formar conjugados de los azúcares modificados. En compuestos de azúcares modificados de uso en la Invención, el resto azúcar es preferiblemente un sacárido, un desoxi-sacárido, un amino-sacárido o un sacárido de N-acilo. El término "sacárido" y sus equivalentes "sacarilo", "azúcar" y "glicosilo" se refieren a los monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros. El resto de azúcar también está funcionalizado con un grupo de modificación. El grupo de modificación está conjugado con el resto de azúcar, típicamente a través de la conjugación con una amina, sulfhidrilo o hidroxilo, p. ej., hidroxilo primario, en el resto de azúcar. En una realización ilustrativa, el grupo de modificación no está fijado a través de un resto amina en el 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.
- 20

- 25 Cualquier azúcar puede ser utilizado como el núcleo de azúcar del grupo de enlace de glicosilo de los conjugados de la invención. Núcleos de azúcar ilustrativos que son útiles en la formación de las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a glucosa, galactosa, manosa, fucosa y ácido siálico. Otros azúcares útiles incluyen amino-azúcares tales como glucosamina, galactosamina, manosamina, el análogo 5-amina de ácido siálico y similares. El núcleo de azúcar puede ser una estructura que se encuentra en la naturaleza o puede ser modificado para proporcionar un sitio para conjugar el grupo de modificación. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un derivado de ácido siálico en el que el resto 9-hidroxi está reemplazado por una amina. La amina se derivatiza fácilmente con un análogo activado de un grupo de modificación seleccionado.
- 30

Azúcares modificados ilustrativos están modificados con polímeros solubles en agua o insolubles en agua. Ejemplos de polímeros útiles se ilustran más adelante.

### Polímeros Solubles en Agua

- 35 Muchos polímeros solubles en agua son conocidos por los expertos en la técnica y son útiles en la práctica de la presente invención. Polímero soluble en agua abarca especies tales como sacáridos (p. ej., dextrano, amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poli(aminoácidos), p. ej. poli(ácido aspártico) y poli(ácido glutámico); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (p. ej., poli(ácido acrílico), poli(éteres), p. ej., poli(etilenglicol), péptidos, proteínas y similares. La presente invención puede ponerse en práctica con cualquier polímero soluble en agua, con la única limitación de que el polímero debe incluir un punto en el que se pueda fijar el resto del conjugado.

Métodos para la activación de polímeros también se pueden encontrar en el documento WO 94/17039, la patente de EE.UU. 5.324.844, los documentos WO 94/18247, WO 94/04193, la patente de EE.UU. N° 5.219.564, la patente de EE.UU. N° 5.122.614, el documento WO 90/13540, la patente de EE.UU. N° 5.281.698, y más el documento 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 de transporte de oxígeno (Patente de EE.UU. N° 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese *et al*, *Biochem App. Biotech* 11:141-45 (1985)).

5

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

- 10 La presente invención se ilustra adicionalmente por referencia a un poli(etilenglicol) conjugado. Varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG están disponibles. Véase, por ejemplo, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25:325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong *et al*, *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995); y Bhadra, *et al.*, *Pharmazie*, 57:5-29 (2002).
- 15 Vías para la preparación de moléculas de PEG reactivos y la formación de conjugados usando 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 un éster activo de un ácido polímero seleccionado de poli(óxidos de alquilenos), poli(polioles oxietilados), poli(alcoholes olefínicos) y poli(acrilomorfolina) lineales o ramificados.

20

La Patente de EE.UU. N° 6.376.604 recoge un método para la preparación de un 1-benzotriazolilcarbonato éster soluble en agua de un polímero soluble en agua y no peptídico haciendo reaccionar un hidroxilo terminal del polímero con di(1-benzotriazolil)carbonato en un disolvente orgánico. El éster activo se utiliza para formar conjugados con un agente biológicamente activo tal de como una proteína o péptido.

25

El documento WO 99/45964 describe un conjugado que comprende un agente biológicamente activo y un polímero activado, soluble en agua, que comprende una cadena principal de polímero que tiene al menos un extremo enlazado a la cadena principal del polímero a través de un enlace estable, en donde al menos un extremo comprende un resto de ramificación que tiene grupos reactivos proximales enlazados al resto de ramificación, en que el agente biológicamente activo está enlazado 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 grupos funcionales reactivos. Los grupos reactivos libres están disponibles para reaccionar con una especie biológicamente activa, tal como una proteína o péptido, formando conjugados entre el poli(etilenglicol) y las especies biológicamente activas. La Patente de EE.UU. N° 5.446.090 describe un enlazador bifuncional de PEG y su uso en la formación de conjugados que tienen un péptido ONU en cada uno de extremos de enlazador de PEG.

30

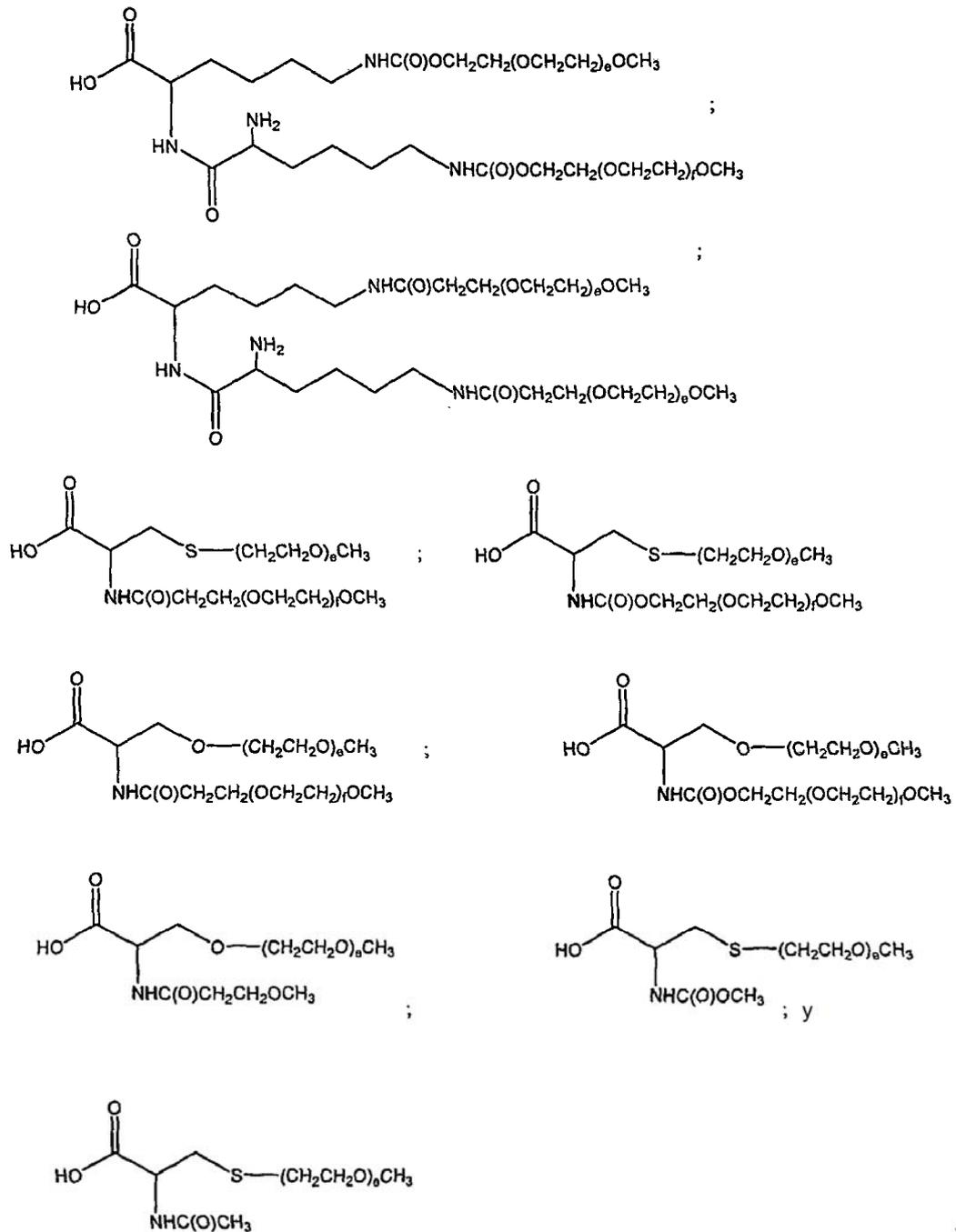
35

Conjugados que incluyen enlaces de PEG degradables se describen en los documentos WO 99/34833 y WO 99/14259, así como en la Patente de EE.UU. N° 6.348.558. Tales enlaces degradables son aplicables en la presente invención.

Los métodos reconocidos en la técnica de la activación de polímeros recogidos anteriormente son de uso en esta memoria y también para la conjugación de estos polímeros ramificados a otras especies, p. ej., azúcares, nucleótidos de azúcares y similares.

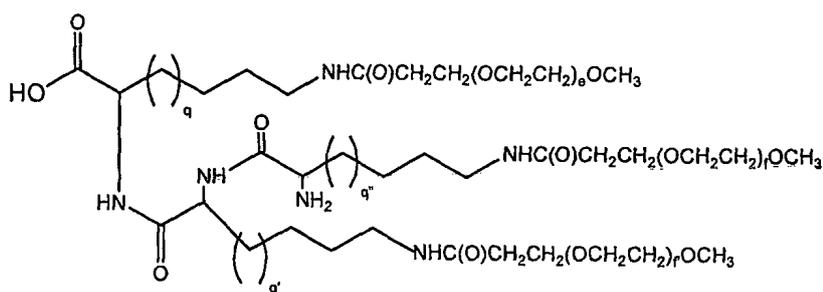
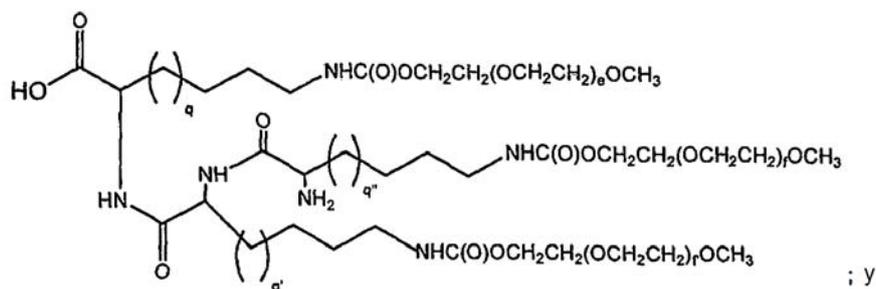
40

Los azúcares modificados se preparan haciendo reaccionar el núcleo de glicosilo (o un enlazador en el núcleo) con un resto de modificación polimérico (o un enlazador en el resto de modificación polimérico). La discusión que sigue proporciona ejemplos de restos de modificación poliméricos seleccionados de uso en la invención. Por ejemplo, restos de modificación poliméricos representativos incluyen estructuras que se basan en aminoácidos que contienen cadenas laterales, p. ej., serina, cisteína, lisina, y péptidos pequeños, p. ej., lys-lys. Estructuras ilustrativas incluyen:



Los expertos apreciarán que la amina libre en las estructuras de di-lisina también se puede pegar a través de un enlace amida o uretano con un resto PEG.

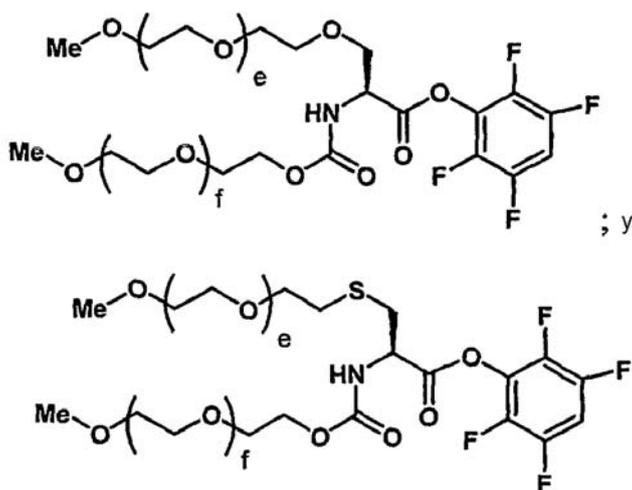
5 En aún otra realización, el resto PEG ramificado se basa en un péptido de tri-lisina. La tri-lisina puede estar mono-, di-, tri- o tetra-PEGilada. Especies ilustrativas de acuerdo con esta realización tienen las fórmulas:



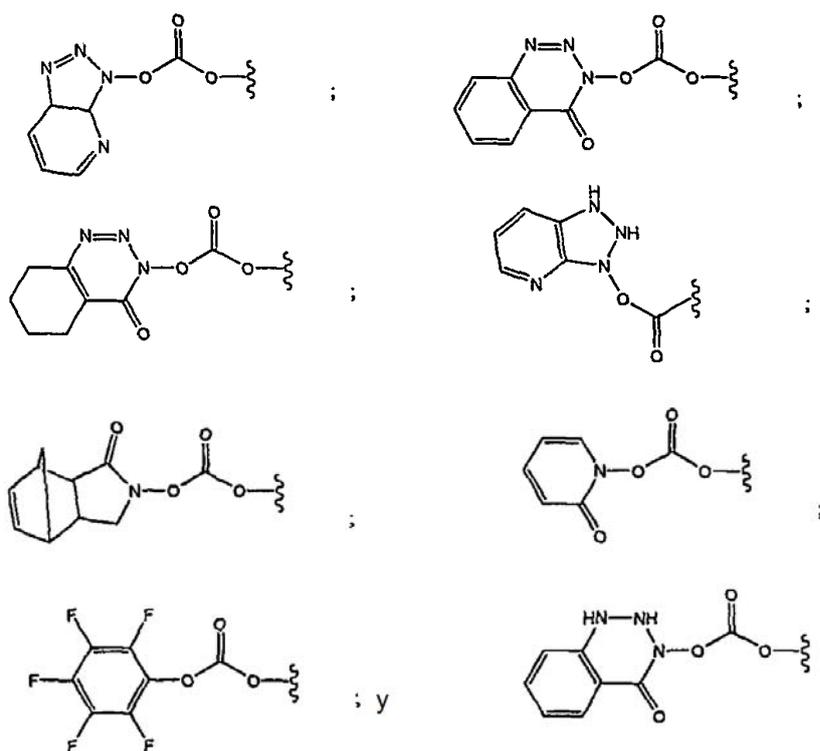
en la que e, f y f' se seleccionan independientemente de números enteros del 1 al 2500; y q, q' y q'' se seleccionan independientemente de números enteros del 1 al 20.

5 Como será evidente para los expertos, los polímeros ramificados de uso en la invención incluyen variaciones sobre los temas recogidos anteriormente. Por ejemplo el conjugado de di-lisina-PEG mostrado arriba puede incluir tres subunidades poliméricas, la tercera unida a la  $\alpha$ -amina se muestra como no modificada en la estructura anterior. Del mismo modo, el uso de un tri-lisina funcionalizada con tres o cuatro subunidades poliméricas marcadas con el resto de modificación polimérico de una manera deseada está dentro del alcance de la invención.

10 Los restos de modificación poliméricos pueden ser activados para la reacción con el núcleo de glicosilo. Estructuras ilustrativas de especies activadas (p. ej., los carbonatos y ésteres activos) incluyen:

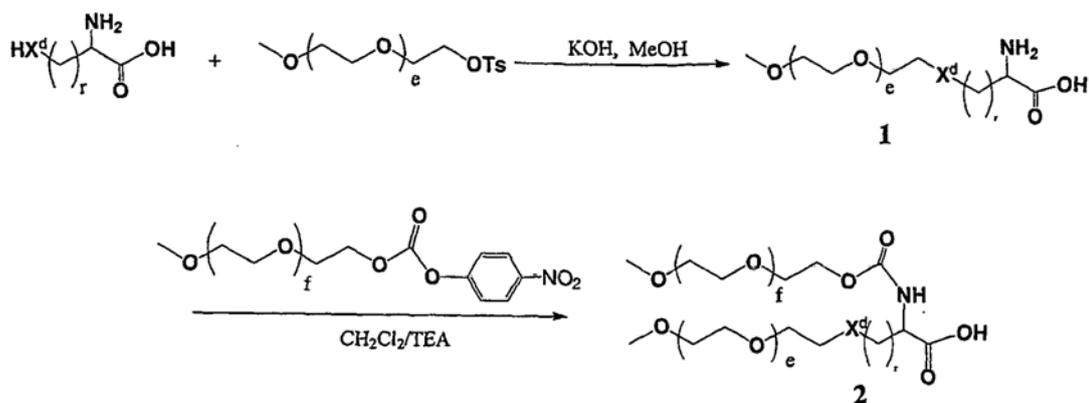


Otros grupos activantes o lábiles, adecuados para la activación de PEGs lineales y ramificados de uso en la preparación de los compuestos recogidos en esta memoria incluyen, pero no se limitan a las especies:



Moléculas de PEG que son activadas con estas y otras especies y métodos de preparar los PEGs activados se recogen en el documento WO 04/083259.

- 5 Los expertos en la técnica apreciarán que uno o más de los brazos de m-PEG de los polímeros ramificados arriba mostrados pueden estar reemplazados por un resto PEG con un extremo diferente, p. ej., OH, COOH, NH<sub>2</sub>, alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, etc. Además de ello, las estructuras anteriores se modifican fácilmente insertando enlaces alquilo (o separando átomos de carbono) entre el átomo de carbono α y el grupo funcional de la cadena lateral de aminoácido. Por lo tanto, los derivados "homo" y homólogos superiores, así como homólogos inferiores están dentro del alcance de núcleos para PEGs ramificados de uso en la presente invención.
- 10 Las especies de PEG ramificado recogidas en esta memoria se preparan fácilmente por métodos tales como la expuesta en el esquema siguiente:



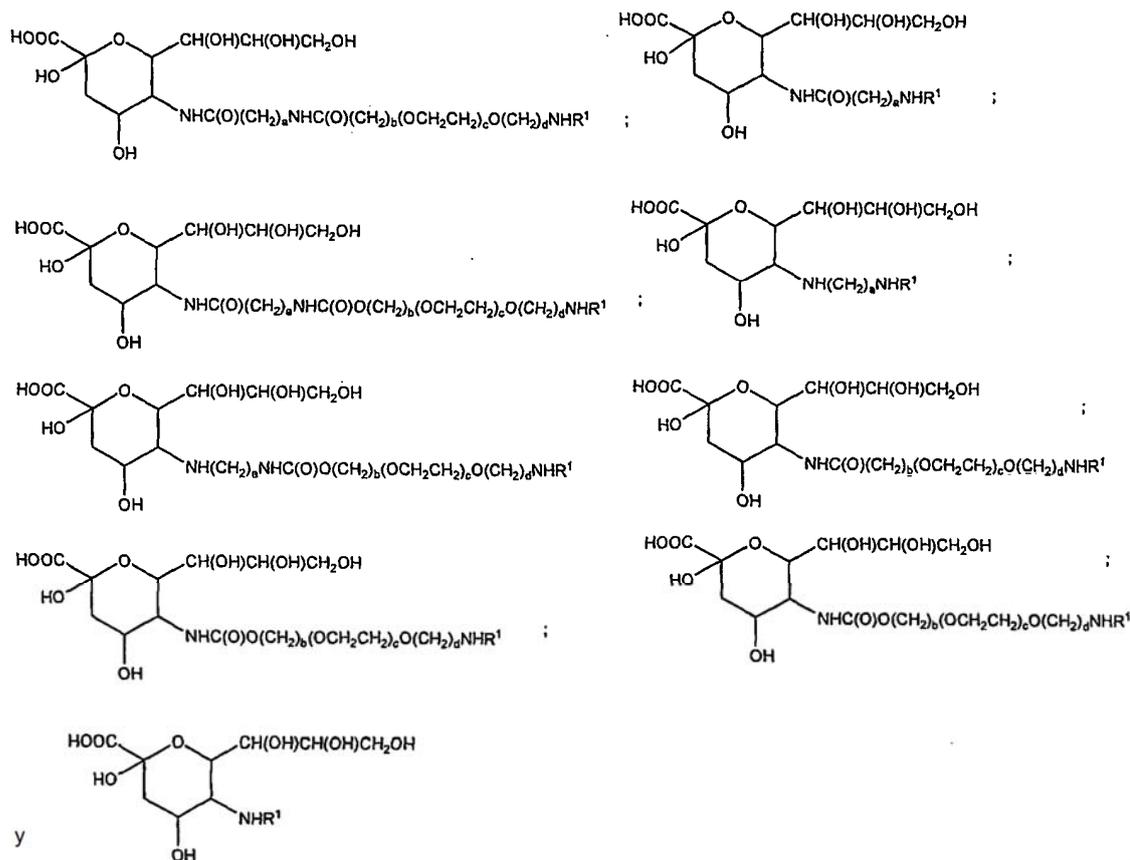
15 en que X<sup>d</sup> es O o S y r es un número entero del 1 al 5. Los índices e y f se seleccionan independientemente de números enteros del 1 al 2500. En una realización ilustrativa, uno o ambos de estos índices se seleccionan de tal manera que el polímero es de un peso molecular de aproximadamente 10 kD, 15 kD o 20 kD.

Por lo tanto, de acuerdo con este esquema, un aminoácido natural o no natural se pone en contacto con un derivado de m-PEG activado, en este caso, el tosilato, formando 1 por alquilación de la cadena lateral heteroátomo X<sup>d</sup>. El aminoácido m-PEG mono-funcionalizado se somete a condiciones de N-acilación con un derivado de m-PEG reactivo, conformando de esta manera m-PEG ramificado 2. Como apreciará un experto, el grupo lábil tosilato puede

ser reemplazado por cualquier grupo lábil adecuado, p. ej., halógeno, mesilato, triflato, etc. De manera similar, el carbonato reactivo utilizado para acilar la amina puede ser reemplazado por un éster activo, p. ej., N-hidroxisuccinimida, etc., o el ácido se puede activar *in situ* utilizando un agente deshidratante tal como dicitohexilcarbodiimida, carbonildiimidazol, etc.

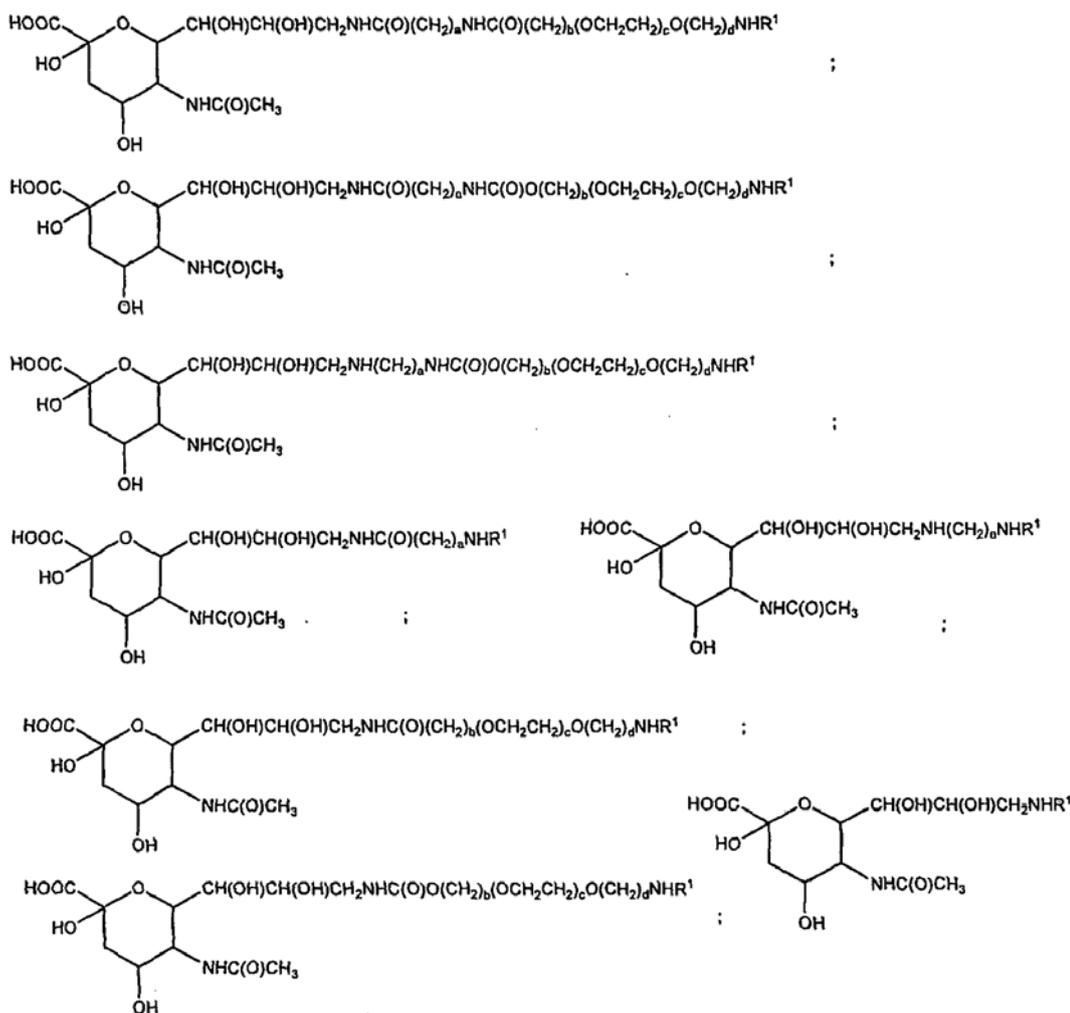
5 En otras realizaciones ilustrativas, el resto urea se reemplaza por un grupo tal como una amida.

En una realización ilustrativa, el azúcar modificado es ácido siálico y compuestos de azúcar modificados seleccionados de uso en la invención tienen las fórmulas:



10 Los índices a, b y d son números enteros del 0 al 20. El índice c es un número entero del 1 al 2500. Las estructuras expuestas anteriormente pueden ser componentes de R<sup>15</sup>.

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



Las estructuras expuestas anteriormente pueden ser componentes de R<sup>15</sup>.

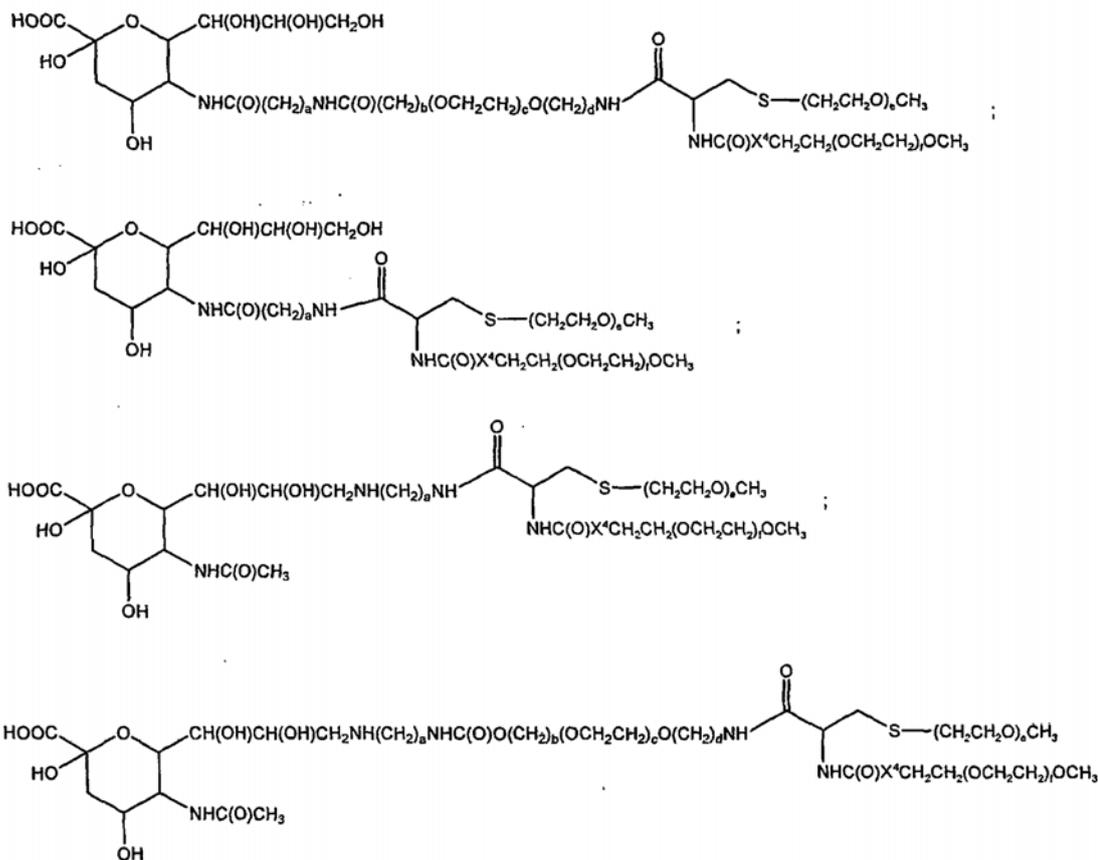
Como los expertos en la técnica apreciarán, el resto de ácido siálico en los compuestos ilustrativos anteriores se puede reemplazar por cualquier otro amino-sacárido incluyendo, pero no limitado a, glucosamina, galactosamina, manosamina, sus derivados de N-acilo, y similares.

5

Aunque la presente invención se ilustra en las secciones precedentes con referencia a PEG, como los expertos apreciarán, una serie de restos de modificación poliméricos es de uso en los compuestos y métodos recogidos en esta memoria.

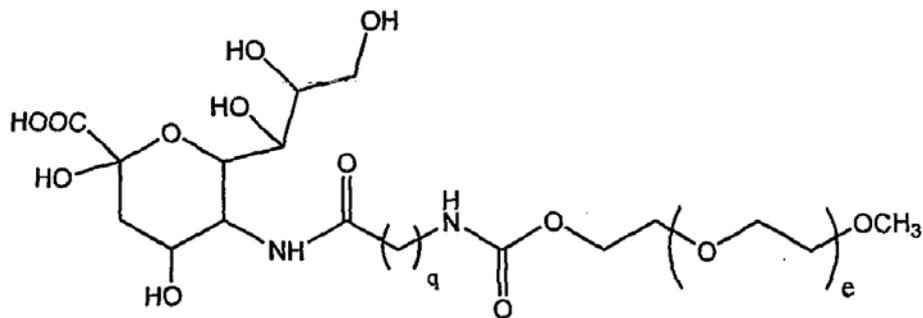
En realizaciones seleccionadas, R<sup>1</sup> o L-R<sup>1</sup> es un PEG ramificado, por ejemplo uno de las especies indicadas anteriormente. Azúcares modificados ilustrativos de acuerdo con esta realización incluyen:

10



en la que  $X^4$  es un enlace u O. En cada una de las estructuras de arriba, el enlazador alquilamina  $-(CH_2)_3-NH$  puede estar presente o ausente. Las estructuras establecidas anteriormente pueden ser componentes de  $R^{15}/R^{15}$ .

- 5 Como se discute en esta memoria, los ácidos siálicos modificados con polímeros de uso en la invención también pueden ser estructuras lineales. Por lo tanto, la invención proporciona conjugados que incluyen un resto de ácido siálico derivado de una estructura tal como:



en la que q y e son como se discutió anteriormente.

**Polímeros insolubles en agua**

- 10 En otra realización, análoga a las discutidas anteriormente, los azúcares modificados incluyen un polímero insoluble en agua, en lugar de un polímero soluble en agua. Los conjugados de la invención también pueden incluir uno o más polímeros insolubles en agua. Esta realización de la invención se ilustra mediante el uso del conjugado como un vehículo con el que se puede entregar un péptido terapéutico de una manera controlada. Sistemas de suministro de fármacos poliméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Dunn *et al.*, comps. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Los expertos en la técnica apreciarán que sustancialmente cualquier sistema de administración de fármacos conocido es aplicable a los conjugados de la presente invención.

Los motivos indicados anteriormente para R<sup>1</sup>, L-R<sup>1</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>15'</sup> y otros radicales son igualmente aplicables a polímeros insolubles en agua, que se pueden incorporar en Las estructuras lineales y ramificadas sin limitación utilizando la química de fácil acceso para los expertos en la técnica.

5 Polímeros insolubles en agua representativos incluyen, pero no se limitan a, polifosfazinas, poli(alcoholes vinílicos), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poliacrilamidas, poli(alquilenglicoles), poli(óxidos de alquileo), poli(tereftalatos de alquileo), poli(éteres de vinilo), poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicolidas, 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), 10 poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), poliestireno, polivinil-pirrolidona, Pluronic y polivinilfenol y copolímeros de los mismos.

15 Polímeros naturales modificados sintéticamente de uso en los conjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, alquil celulosas, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, y nitrocelulosas. Miembros particularmente preferidos de las clases generales de polímeros naturales modificados sintéticamente incluyen, pero no se limitan a, metil-celulosa, etil-celulosa, hidroxipropil-celulosa, hidroxipropil-metil-celulosa, celulosa de hidroxibutilo-metilo, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butirato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboximetil-celulosa, triacetato de celulosa, sal sódica sulfato de celulosa y polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos y ácido algínico.

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

25 Polímeros biodegradables representativos de uso en los conjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a polilactidas, poliglicolidas y copolímeros de los mismos, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co- caprolactona), poli(lactida-co-glicólida), polianhídridos, polioctoésteres, mezclas y copolímeros de los mismos. De uso particular son composiciones que forman geles, tales como las que incluyen colágeno, Pluronic 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 parte de su estructura, una molécula bio-reabsorbible. Un ejemplo de un polímero de este tipo es uno que incluye un copolímero insoluble en agua, que tiene una región bioabsorbible, una región hidrófila y una pluralidad de grupos funcionales reticulables por cadena de polímero.

35 Para los propósitos de la presente invención, "materiales insolubles en agua" incluye materiales que son sustancialmente insolubles en agua o en entornos que contienen agua. Por lo tanto, aunque ciertas regiones o segmentos del copolímero pueden ser hidrófilos o incluso solubles en agua, la molécula de polímero, como un todo, no a cualquier medida sustancial se disuelve en agua.

Para los propósitos de la presente invención, la expresión "molécula bio-reabsorbible" incluye una región que es capaz de ser metabolizada o rota y reabsorbida y/o eliminada por el cuerpo a través de rutas de excreción normal. Estos metabolitos o productos de degradación son de preferencia sustancialmente no tóxicos para el cuerpo.

40 La región bio-reabsorbible puede ser hidrófoba o hidrófila, siempre que la composición del copolímero en su conjunto no se haga soluble en agua. Por lo tanto, la región bio-reabsorbible se selecciona en base a la preferencia de que el polímero, como un todo, siga siendo insoluble en agua. En consecuencia, las propiedades relativas, es decir, los tipos de grupos funcionales contenidos por, y las proporciones relativas de la región bio-reabsorbible, y la región hidrófila se seleccionan para asegurar que las composiciones bio-reabsorbibles útiles sigan siendo insoluble 45 en agua.

Polímeros reabsorbibles ilustrativos incluyen, por ejemplo, copolímeros de bloques reabsorbibles de poli(ácido hidroxí- $\alpha$ -carboxílico)/poli(oxialquileo) producidos sintéticamente, (véase, Cohn *et al.*, Patente de EE.UU. N° 4.826.945). Estos copolímeros no están reticulados y son solubles en agua para que el cuerpo pueda excretar las composiciones de copolímeros de bloques degradados. Véase, Younes *et al.*, *J Biomed Mater Res.* 21: 1301-1316 50 (1987), y Cohn *et al.*, *J Biomed Mater. Res.* 22: 993-1009 (1988).

Polímeros bio-reabsorbibles actualmente preferidos incluyen uno o más componentes seleccionados de poli(ésteres), poli(hidroxiácidos), poli(lactonas), poli(amidas), poli(éster-amidas), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(fosfazinas), poli(fosfoésteres), poli(tioésteres), polisacáridos y mezclas de los mismos. Más preferiblemente aún, el polímero bio-reabsorbible incluye un componente poli(hidroxi)ácido. De los 55 poli(hidroxi)ácidos se prefieren ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido policaproico, ácido polibutírico, ácido polivalérico y copolímeros y mezclas de los mismos.

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

5 Copolímeros de orden superior también se pueden utilizar en la presente invención. Por ejemplo, Casey *et al.*, Patente de EE.UU. N° 4.438.253, que se expidió el 20 de marzo de 1984, describe copolímeros de tres bloques producidos a partir de la transesterificación de poli(ácido glicólico) y un poli alquilen glicol) terminado en hidroxilo. Tales composiciones se describen para su uso como suturas monofilamento reabsorbibles. La flexibilidad de tales composiciones es controlada por la incorporación de un ortocarbonato aromático, tal como ortocarbonato de tetra-p-tolilo en la estructura de copolímero.

10 También se pueden utilizar otros polímeros a base de 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 de múltiples bloques biodegradables que tienen bloques ordenados secuencialmente de polilactida y/o poliglicolida, producidos por polimerización de apertura de anillo de lactida y/o glicolida en ya sea un diol oligomérico o un residuo de diamina ordenó, seguido de extensión de la cadena con un compuesto difuncional tal como un diisocianato, cloruro de diacilo o diclorosilano.

15 Regiones bio-reabsorbibles de recubrimientos, útiles en la presente invención, pueden ser diseñadas para ser hidrolítica y/o enzimáticamente escindibles. Para los propósitos de la presente invención, "hidrolíticamente escindible" se refiere a la susceptibilidad del copolímero, especialmente de la región bio-reabsorbible, a la hidrólisis en agua o en un ambiente que contiene agua. De manera similar, "enzimáticamente escindible", tal como se usa en esta memoria, se refiere a la susceptibilidad del copolímero, especialmente la región bio-reabsorbible, a la escisión por enzimas endógenas o exógenas.

20 Cuando se coloca dentro del cuerpo, la región hidrófila puede ser procesada en fragmentos excretables y/o metabolizables. Por lo tanto, la región hidrófila puede incluir, por ejemplo, poliéteres, poli(óxidos de alquileno), polioles, poli(vinilpirrolidina), poli(alcohol vinílico), poli(alquil-oxazolininas), polisacáridos, hidratos de carbono, péptidos, proteínas y copolímeros y mezclas de los mismos. Además, la región hidrófila puede ser también, por ejemplo, un poli(óxido de alquileno). Tales poli(óxidos de alquileno) pueden incluir, por ejemplo, poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno) y mezclas y copolímeros de los mismos.

25 Los polímeros que son componentes de hidrogeles 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 formadores de hidrogel incluyen, pero no se limitan a poli(ácidos acrílicos), carboximetilcelulosa de sodio, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, 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 bio-reabsorbibles. Además de ello, las composiciones de hidrogel pueden incluir subunidades que exhiben una o más de estas propiedades.

30 Composiciones de hidrogeles biocompatibles, cuya integridad puede ser controlada a través de reticulación son conocidas y se prefieren actualmente para su uso en los métodos de la invención. Por ejemplo, Hubbell *et al.*, Patente de EE.UU. N° 5.410.016, que se expidió el 25 de abril de 1995, y 5.529.914, que se expidió el 25 de junio de 1996, describen sistemas solubles en agua, que son copolímeros de bloques reticulados que tienen un segmento de bloque central soluble en agua emparedado entre dos extensiones hidrolíticamente lábiles. Tales copolímeros son, además, de extremos cerrados con funcionalidades acrilato fotopolimerizables. Cuando se reticulan, estos sistemas se convierten en hidrogeles. El bloque central soluble en agua de tales copolímeros puede incluir poli(etilenglicol); mientras que las extensiones hidrolíticamente lábiles pueden ser un poli( $\alpha$ -hidroxiácido), tales como ácido poliglicólico o ácido poliláctico. Véase, Sawhney *et al.*, *Macromolecules* 26: 581-587 (1993).

35 En otro ejemplo, el gel es un gel termorreversible. Actualmente se prefieren geles termorreversibles que incluyen componentes tales como Pluronic, colágeno, gelatina, ácido hialurónico, polisacáridos, hidrogel de poliuretano, hidrogel de poliuretano-urea y combinaciones de los mismos.

40 En aún otro ejemplo, el conjugado de la invención incluye un componente de un liposoma. Los liposomas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Eppstein *et al.*, Patente de EE.UU. N° 4.522.811. Por ejemplo, formulaciones de liposomas se pueden preparar disolviendo lípido(s) apropiado(s) (tales como estearoil-fosfatidil-etanolamina, estearoil-fosfatidil-colina, araquidil-fosfatidil-colina, y colesterol) en un disolvente inorgánico que después se evapora, dejando una película delgada de lípido seco en la superficie del recipiente. Una disolución acuosa del compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable se introduce entonces en el recipiente. El recipiente se agita manualmente para liberar el material lipídico de los lados del recipiente y para dispersar los agregados de lípidos, formando de este modo la suspensión liposomal.

45 Las micropartículas y los métodos citados anteriormente de preparación de las micropartículas se ofrecen a modo de ejemplo y no están destinados a definir el alcance de micropartículas de uso. Resultará evidente para los expertos

en la técnica que una gran variedad de micropartículas, fabricadas por diferentes métodos, es de uso en la presente invención.

5 Los formatos estructurales discutidos anteriormente en el contexto de los polímeros solubles en agua, tanto de cadena lineal como ramificada son asimismo generalmente aplicables con respecto a los polímeros insolubles en agua. Así, por ejemplo, los núcleos de ramificación de cisteína, serina, dilisina y trilisina se pueden funcionalizar con dos restos de polímeros insolubles en agua. Los métodos utilizados para producir estas especies son generalmente estrechamente análogos a los utilizados para producir los polímeros solubles en agua.

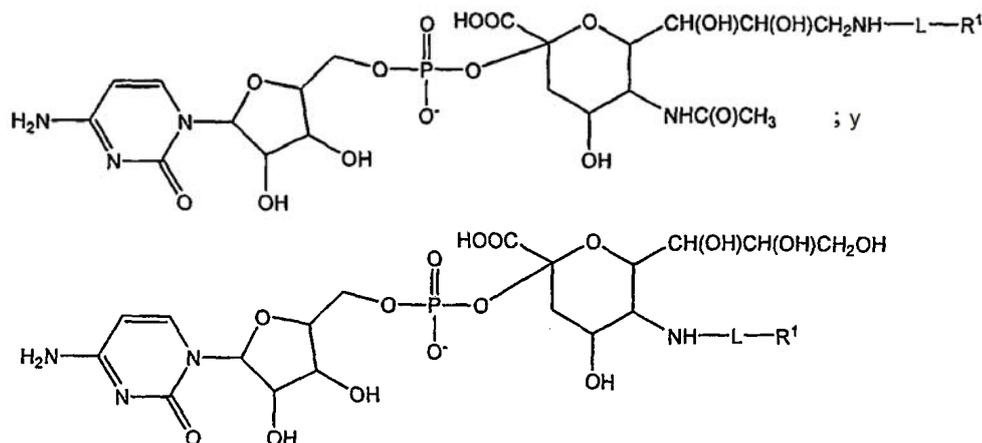
### Los Métodos

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

15 En realizaciones ilustrativas, se forma el conjugado entre un resto de modificación polimérico y un péptido glicosilado o no glicosilado. El polímero se conjuga con el péptido a través de un grupo de enlace de glicosilo, que está interpuesto entre y está unido covalentemente tanto al péptido (o residuo de glicosilo) como al grupo de modificación (p. ej., polímero soluble en agua). El método incluye poner en contacto el péptido con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una enzima, p. ej. una glicosiltransferasa que conjuga el azúcar modificado al sustrato. La reacción se lleva a cabo bajo condiciones apropiadas para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido. El resto azúcar del azúcar modificado se selecciona preferiblemente de azúcares de nucleótidos.

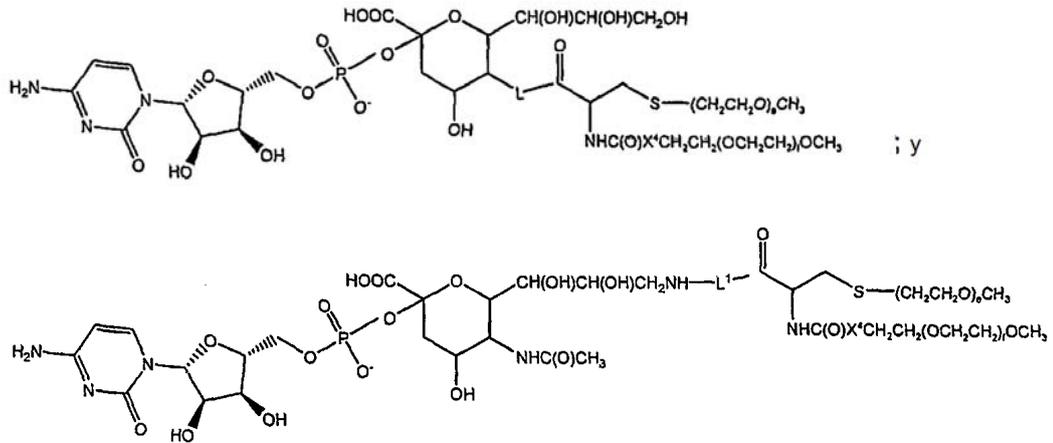
20 En una realización ilustrativa, el azúcar modificado, tales como los expuestos anteriormente, se activa como los azúcares de nucleótidos correspondientes. Nucleótidos de azúcar ilustrativos que se utilizan en la presente invención en su forma modificada incluyen mono-, di- o tri-fosfatos de nucleótidos o análogos de los mismos. En una realización preferida, el azúcar-nucleótido modificado se selecciona de un UDP-glicósido, CMP-glicósido o un PIB-glicósido. Incluso más preferiblemente, la parte de nucleótidos de azúcar de los nucleótidos de azúcar modificado se selecciona de UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, GDP-manosa, GDP-fucosa, 25 CMP-ácido siálico, o CMP-NeuAc. En una realización ilustrativa, el fosfato de nucleótido está unido a C-1.

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



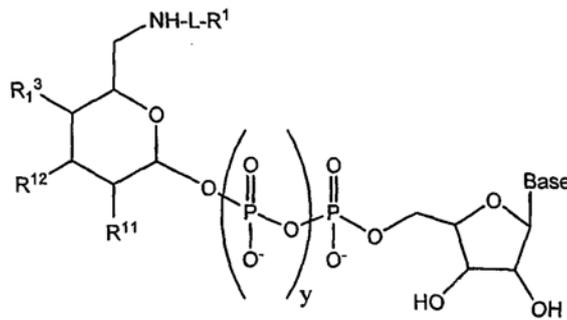
30 en que L-R<sup>1</sup> es como se discutió anteriormente, y L<sup>1</sup>-R<sup>1</sup> representa un enlazador unido al grupo de modificación. Al igual que con L, especies enlazadoras ilustrativas de acuerdo con L<sup>1</sup> incluyen un enlace, restos alquilo o heteroalquilo.

35 Además de ello, como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona el uso de azúcares de nucleótidos que son modificados con un polímero soluble en agua, que es o bien de cadena lineal o ramificada. Por ejemplo, compuestos que tienen la fórmula que se muestra a continuación son de uso para preparar conjugados dentro del alcance de la presente invención:



en la que  $X^4$  es O o un enlace.

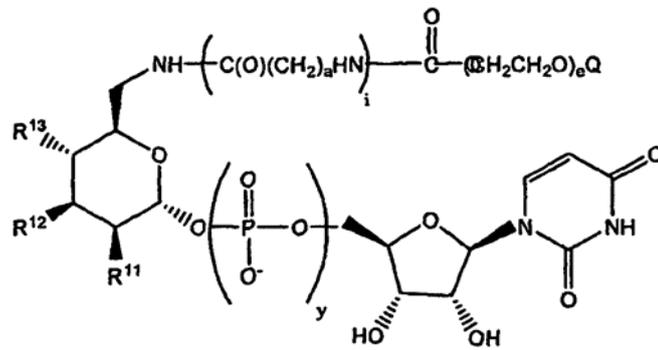
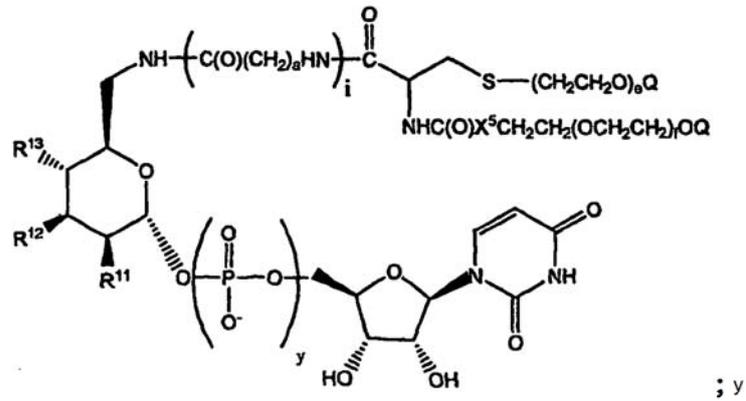
La invención también proporciona el uso de nucleótidos modificados con  $L-R^1$  en la posición del carbono 6. Especies ilustrativas de acuerdo con esta realización incluyen:



5

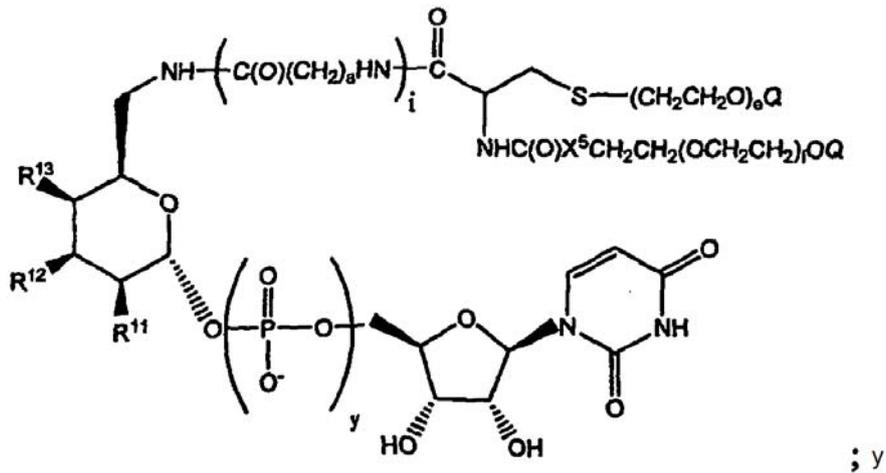
en la que los grupos R y L representan restos como se discutió anteriormente. El índice "y" es 0, 1 ó 2. En una realización ilustrativa, L es un enlace entre NH y  $R^1$ . La base es una base de ácido nucleico.

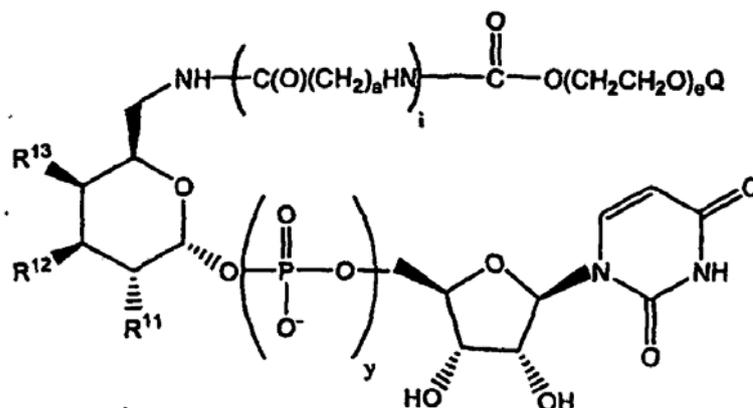
Azúcares de nucleótidos ilustrativos de uso en la invención en la que se modifica el carbono en la posición 6 incluyen especies que tienen la estereoquímica de GDP-manosa, p. ej.:



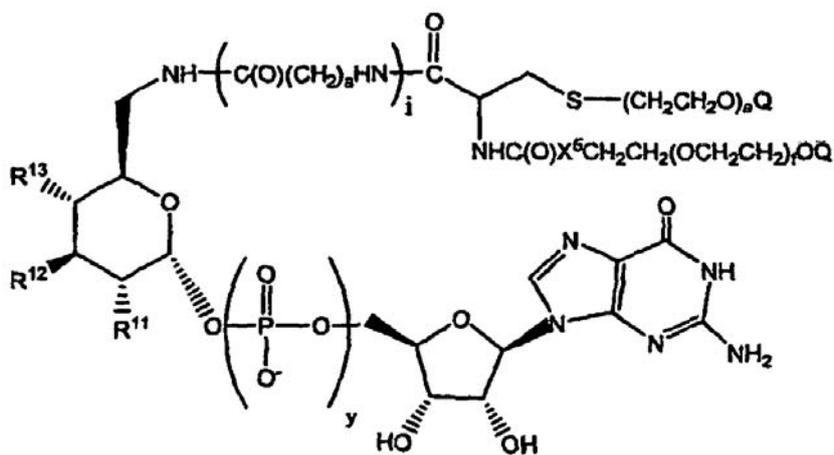
5 en la que X<sup>5</sup> es un enlace u O. El índice *i* representa 0 ó 1. El índice *a* representa un número entero del 1 al 20. Los índices *e* y *f* representan independientemente números enteros del 1 al 2500. Q, como se discutió anteriormente, es H o alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido o no sustituido. Como los expertos apreciarán, el derivado de serina, en el que S está reemplazado por O también cae dentro de este motivo en general.

Todavía en un ejemplo adicional se describe que el conjugado en el que el azúcar modificado se basa en la estereoquímica de UDP-galactosa. Un azúcar de nucleótidos ilustrativo de uso tiene la estructura:

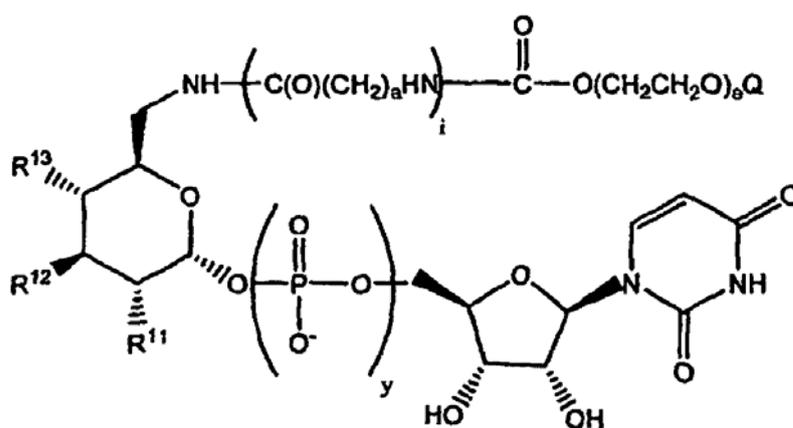




En otro ejemplo, el azúcar de nucleótidos se basa en la estereoquímica de la glucosa. Especies ilustrativas tienen las fórmulas:



; y



- 5 En general, el resto azúcar o casete de resto azúcar-enlazador y los grupos de casete de PEG o PEG-enlazador están enlazados entre sí mediante el uso de grupos reactivos, que típicamente son transformados por el proceso de enlace en un nuevo grupo funcional orgánico o especie no reactiva. El o los grupos funcionales reactivos de azúcar se encuentra en cualquier posición en el resto de azúcar. Grupos reactivos y 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. Clases actualmente favorecidas de reacciones disponibles con restos azúcar reactivos son aquellas que proceden en condiciones relativamente suaves. Éstas incluyen, pero no se limitan a sustituciones nucleofílicas (p. ej., reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrófilas (p. ej.,
- 10

reacciones de enamina) y adiciones a carbono-carbono y múltiples enlaces carbono-heteroátomo (p. ej., reacción de Michael, la adición de Diels-Alder). Éstas y otras reacciones útiles se discuten en, por ejemplo, en March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3<sup>a</sup> 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, DC, 1982.

Grupos funcionales reactivos útiles que cuelgan de un núcleo de azúcar o grupo de modificación incluyen, pero no se limitan a:

- (a) grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos, incluyendo, pero no limitados a ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, imidazoles de acilo, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, alquilo, alquenilo, alquinilo y ésteres aromáticos;
- (b) grupos hidroxilo, que pueden ser convertidos, p. ej., en ésteres, éteres, aldehídos, etc.
- (c) grupos haloalquilo, en el que el haluro puede ser desplazado más tarde con un grupo nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión, o un ion alcóxido, lo que resulta en la fijación covalente de un grupo nuevo en el grupo funcional del átomo de halógeno;
- (d) grupos dienófilos, que son capaces de participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos maleimido;
- (e) grupos aldehído o cetona, de manera que la posterior derivatización 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 su posterior reacción con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas;
- (g) grupos tiol, que pueden, por ejemplo, convertirse en disulfuros o pueden reaccionar con haluros de acilo;
- (h) grupos amina o sulfhidrilo, que pueden, por ejemplo, acilarse, alquilarse u oxidarse;
- (i) alquenos, que pueden sufrir, por ejemplo, cicloadiciones, acilación, adición de Michael, etc.; y
- (j) epóxidos, que pueden reaccionar, por ejemplo, con aminas y compuestos de hidroxilo.

Los grupos funcionales reactivos pueden elegirse de manera que no participan en, ni interfieren con, las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o grupo de modificación. Alternativamente, un grupo funcional reactivo se puede proteger de participar en la reacción por la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica entienden cómo proteger un grupo funcional particular de manera que no interfiera con un conjunto seleccionado 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 la discusión que sigue se recoge una serie de ejemplos específicos de azúcares modificados que son útiles en la práctica de la presente invención. En las formas de realización ilustrativas, un derivado de ácido siálico se utiliza como el núcleo de azúcar al que está unido el grupo de modificación. El foco de la discusión sobre los derivados de ácido siálico es para mayor claridad de la ilustración solamente y no debe interpretarse para limitar el alcance de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que una diversidad de otros restos de azúcar puede ser activada y derivatizada de una manera análoga a la que se recoge utilizando ácido siálico como un ejemplo. Por ejemplo, están disponibles numerosos métodos para la modificación de galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y fucosa, por nombrar unos pocos sustratos de azúcar que se modifican fácilmente mediante métodos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Elhalabi *et al.*, *Curr. Med. Chem.* 6: 93 (1999); y Schafer *et al.*, *J. Org. Chem.* 65: 24 (2000).

En una realización ilustrativa, el azúcar modificado se basa en un resto de 6-amino-N-acetil-glicosilo. Como se muestra en la FIG. 5 para N-acetilgalactosamina, el resto de 6-amino-azúcar se prepara fácilmente por métodos estándar.

En el esquema anterior, el índice n representa un número entero de 1 a 2500. En una realización ilustrativa, este índice se selecciona de manera que el polímero es de un peso molecular de aproximadamente 10 kD, 15 kD o 20 kD. El símbolo "A" representa un grupo activador, p. ej., un halo, un componente de un éster activado (p. ej., un éster de N-hidroxisuccinimida), un componente de un carbonato (p. ej., carbonato de p-nitrofenilo) y similares. Los expertos en la técnica apreciarán que otros azúcares de nucleótidos de PEG-amida se preparan fácilmente por este y métodos análogos.

- 5 El péptido acceptor se sintetiza típicamente *de novo*, o se expresa de forma recombinante en una célula procariota (p. ej., célula bacteriana tal como *E. coli*) o en una célula eucariota tal como un mamífero, de levadura, de insecto, fúngica o célula vegetal. El péptido puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento. Además de ello, el péptido puede ser un péptido de tipo salvaje o mutado. En una realización ilustrativa, el péptido incluye una mutación que añade uno o más sitios de glicosilación N- u O-enlazados a la secuencia de péptido.
- 10 El método de la invención proporciona también la modificación de péptidos incompletamente glicosilados que se producen de manera recombinante. Muchos glicoproteínas producidas de forma recombinante están incompletamente glicosiladas, dejando al descubierto residuos de hidratos de carbono que pueden tener propiedades indeseables, p. ej., la inmunogenicidad, el reconocimiento por parte de las RES. Empleando un azúcar modificado en un método de la invención, el péptido puede ser simultáneamente glicosilado adicionalmente y derivatizado con, p. ej., un polímero soluble en agua, agente terapéutico o similar. El resto azúcar del azúcar modificado puede ser el residuo que adecuadamente se conjuga con el acceptor en un péptido totalmente glicosilado, u otro resto de azúcar con propiedades deseables.
- 15 Los expertos apreciarán que la invención puede ponerse en práctica usando sustancialmente cualquier péptido o glicopéptido de cualquier fuente. Péptidos ilustrativos con los que la invención se puede poner en práctica se recogen en el documento WO 03/031464, y las referencias recogidas en los mismos.
- 20 Los péptidos modificados mediante los métodos de la invención pueden ser péptidos sintéticos o de tipo salvaje o pueden ser péptidos mutados, producidos por métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio. La glicosilación de péptidos está típicamente enlazada a N o enlazada a O. Un enlace a N ilustrativo es la fijación del azúcar modificado a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de un grupo hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación enlazada a O se refiere a la fijación de un azúcar (p. ej., N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa) a la cadena lateral hidroxilo de un ácido hidroxiamino, preferiblemente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar aminoácidos inusuales o no naturales, p. ej., 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.
- 25 Además de ello, además de péptidos, los métodos de la presente invención se pueden poner en práctica con otras estructuras biológicas (p. ej., glicolípidos, lípidos, esfingoides, ceramidas, células enteras, y similares, que contienen un sitio de glicosilación).
- 30 La adición de sitios de glicosilación a un péptido u otra estructura se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga uno o más sitios de glicosilación. La adición también puede hacerse por la incorporación de una o más especies que presentan un grupo -OH, preferiblemente residuos serina o treonina, dentro de la secuencia del péptido (para sitios de glicosilación enlazados a O). La adición se puede hacer por mutación o por síntesis química completa del péptido. La secuencia de aminoácidos del péptido se altera preferiblemente a través de cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el péptido en bases preseleccionadas, de modo que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La o las mutaciones de ADN se hacen preferiblemente usando métodos conocidos en la técnica.
- 35 En un ejemplo, el sitio de glicosilación se añade por revolver polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican un péptido candidato pueden ser modulados con los protocolos de combinación aleatoria de ADN. Combinación aleatoria de ADN es un proceso de recombinación recursiva y mutación, realizado por fragmentación aleatoria de un grupo de genes relacionados, seguido por re-ensamblaje de los fragmentos por un proceso similar a la reacción en cadena de la polimerasa. Véase, p. ej., Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751 (1994); Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994); y las Patentes de EE.UU. N°s 5.605.793, 5.837.458, 5.830.721 y 5.811.238.
- 40 Péptidos ilustrativos con los que se puede poner en práctica la presente invención, métodos de añadir o separar sitios de glicosilación, y añadir o separar estructuras o subestructuras de glicosilo se describen en detalle en el documento WO03/031464 y solicitudes de EE.UU. y PCT relacionadas.
- 45 La presente invención también se aprovecha de añadir a (o separar de) un péptido uno o más residuos glicosilo seleccionados, después de lo cual un azúcar modificado está conjugado a al menos uno de los residuos glicosilo seleccionados del péptido. La presente realización es útil, por ejemplo, cuando se desea conjugar el azúcar modificado a un residuo glicosilo seleccionado que no está presente en un péptido o no está presente en una cantidad deseada. Por lo tanto, antes de acoplar un azúcar modificado a un péptido, el residuo glicosilo seleccionado se conjuga al péptido por 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 separación de un residuo de hidrato de carbono del glicopéptido. Véase, por ejemplo, el documento WO 98/31826.
- 50
- 55

La adición o separación de cualquiera de los restos hidrato de carbono presentes en el glicopéptido se lleva a cabo ya sea química o enzimática. Una desglicosilación química ilustrativa se produce por la exposición de la variante polipeptídica al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayoría o de todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el péptido intacto. La desglicosilación química se describe por Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 (1987) y por Edge *et al.*, *Anal. Biochem.* 118: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono en las variantes polipeptídicas puede lograrse mediante el uso de una diversidad de endo- y exo-glicosidasas, tal como se describe por Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* 138: 350 (1987).

En un ejemplo, el péptido se desialila de forma esencialmente completa con neuraminidasa antes de realizar las etapas de glicoconjugación o remodelación en el péptido. Después de la glicoconjugación o remodelación, el péptido está opcionalmente re-sialilado usando una sialil transferasa. En una realización ilustrativa, la re-sialilación se produce esencialmente en cada uno (p. ej. > 80%, preferiblemente mayor que 85%, mayor que 90%, preferiblemente mayor que 95% y más preferiblemente mayor que 96%, 97%, 98% o 99%) de los aceptores sacarilo terminales en una población de aceptores de sialilo. En una realización preferida, el sacárido tiene un patrón de sialilación sustancialmente uniforme (es decir, patrón de glicosilación sustancialmente uniforme).

La adición química de restos glicosilo se lleva a cabo por cualquier método reconocido en la técnica. La adición enzimática de restos azúcar se consigue preferiblemente utilizando una modificación de los métodos recogidos en este documento, sustituyendo unidades de glicosilo nativos por los azúcares modificados utilizados en la invención. Otros métodos de adición de restos de azúcar se dan a conocer en las Patentes de EE.UU. N.ºs 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554 y 5.922.577.

Puntos de fijación ilustrativos para un residuo glicosilo seleccionado incluyen, pero no se limitan a: (a) sitios de consenso para la glicosilación enlazada a N, y sitios para la glicosilación enlazada 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 cisteína; (f) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (g) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (h) el grupo amida de glutamina. Métodos ilustrativos de uso en la presente invención se describen en el documento WO 87/05330 publicado 11 de septiembre 1987, y en Aplin y Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM. págs. 259-306 (1981).

También se describe un método para unir dos o más péptidos a través de un grupo de enlace. El grupo de enlace es de cualquier estructura útil y se puede seleccionar de estructuras de cadena lineal y ramificada. Preferiblemente, cada uno de los extremos del enlazador, que está fijado a un péptido, incluye un azúcar modificado (es decir, un grupo de enlace de glicosilo intacto naciente).

También se describe que dos péptidos están enlazados entre sí a través de un resto enlazador que incluye un polímero (por ejemplo, enlazador de PEG). La construcción se ajusta a la estructura general expuesta en lo comentado anteriormente. Como se describe en esta memoria, la construcción de la invención incluye dos grupos de enlace de glicosilo intactos (es decir,  $s + t = 1$ ). El enfoque en un enlazador de PEG que incluye dos grupos glicosilo es para fines de claridad y no debe interpretarse como limitante de la identidad de brazos de enlazador de uso en esta realización de la invención.

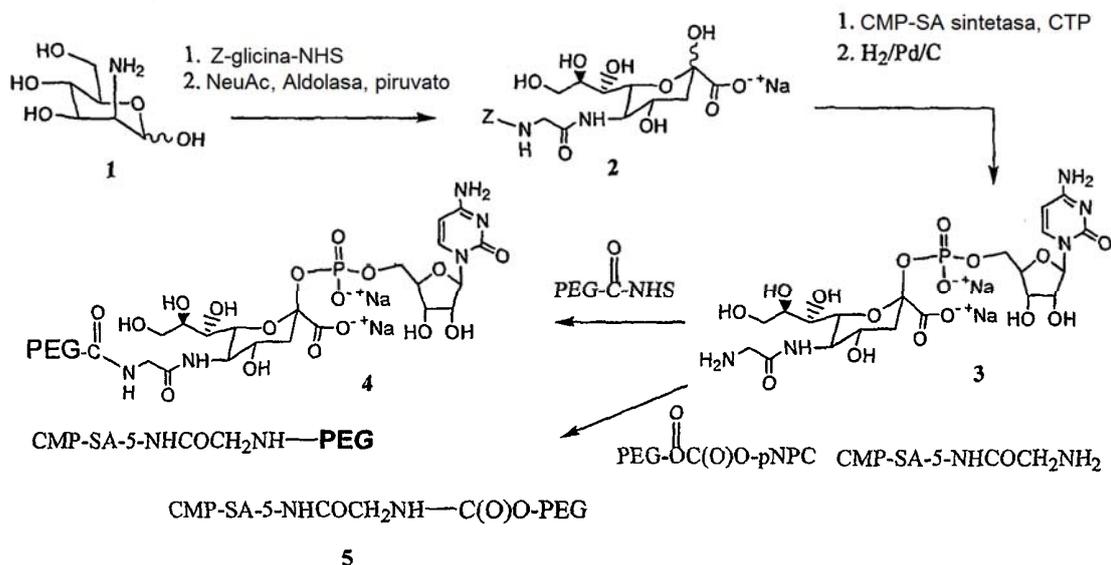
Por lo tanto, un resto de PEG se funcionaliza en un primer extremo con una primera unidad de glicosilo y en un segundo extremo con una segunda unidad de glicosilo. Las primera y segunda unidades de glicosilo son preferiblemente sustratos para diferentes transferasas, permitiendo la fijación ortogonal de los primer y segundo péptidos a las primera y segunda unidades de glicosilo, respectivamente. En la práctica, el enlazador (glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup> se pone en contacto con el primer péptido y una primera transferasa para la que la primera unidad de glicosilo es un sustrato, formando de ese modo (péptido)<sup>1</sup>-(glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup>. Transferasa y/o péptido que no ha reaccionado se retira entonces opcionalmente de la mezcla de reacción. El segundo péptido y una segunda transferasa para la que la segunda unidad de glicosilo es un sustrato se añaden al conjugado (péptido)<sup>1</sup>-(glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup>, formando (péptido)<sup>1</sup>-(glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup>-(péptido)<sup>2</sup>; al menos uno de los residuos de glicosilo está enlazado ya sea directamente o indirectamente con O. Los expertos en la técnica apreciarán que el método esbozado anteriormente también es aplicable a la formación de conjugados entre más de dos péptidos, por ejemplo, mediante el uso de un PEG ramificado, dendrímico, poli(aminoácido), polisacárido o similares.

También se describe que el péptido, que se ha modificado por un método de la invención, es un glicopéptido que se produce en células de mamífero (p. ej., células CHO) o en un animal transgénico y, por tanto, contiene cadenas de oligosacáridos enlazadas a N y/u O, que están incompletamente sialiladas. Las cadenas de oligosacáridos del glicopéptido que carecen de un ácido siálico y que contienen un residuo galactosa terminal pueden ser PEGiladas, PPGiladas o modificadas 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 aminoácido protegido (p. ej., glicina), convirtiendo el residuo amina del azúcar en el correspondiente aducto amida de aminoácido protegido. El aducto se trata con una aldolasa para formar  $\alpha$ -hidroxi-carboxilato 2. El compuesto 2 se convierte en el derivado CMP correspondiente por la acción de CMP-SA sintetasa, seguido de hidrogenación catalítica del derivado CMP para producir el compuesto 3. La amina introducida a través de la formación del aducto de glicina se utiliza como un

lugar de fijación de PEG por reacción del compuesto 3 con un derivado de PEG o de PPG activado (p. ej., PEG-C(O)NHS, PEG-OC(O)O-p-nitrofenilo), produciendo especies tales como 4 ó 5, respectivamente.

**Esquema 1**



**5 Conjugación de azúcares modificados a péptidos**

Los azúcares modificados con PEG se conjugan a un péptido glicosilado o no glicosilado utilizando una enzima adecuada para mediar en la conjugación. Preferiblemente, las concentraciones del o de los azúcares donantes modificados, de la o las enzimas y del o de los péptidos aceptores se seleccionan de manera que la glicosilación continúa hasta que se consume el aceptor. Las consideraciones que se discuten a continuación, aun cuando se recogen en el contexto de una sialil transferasa, son generalmente aplicables a otras reacciones de glicosil transferasa.

Se conoce un cierto número de métodos de uso de glicosil transferasas para sintetizar estructuras de oligosacáridos deseadas y son generalmente aplicables a la presente invención. Métodos ilustrativos se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/32491, Ito *et al.*, *Pure Appl. Chem.* 65: 753 (1993), Patentes de EE.UU. N<sup>o</sup>s. 5.352.670, 5.374.541, 5.545.553, Patentes de EE.UU. N<sup>o</sup>s. 6.399.336 y 6.440.703 de propiedad común, y las solicitudes PCT publicadas de propiedad común, WO 03/031464, WO 04/033651, WO 04/099231.

La presente invención se pone en práctica utilizando una única glicosil transferasa o una combinación de glicosil transferasas. Por ejemplo, se puede utilizar una combinación de una sialil transferasa y una galactosil transferasa. En aquellas realizaciones que utilizan más de una enzima, las enzimas y los sustratos se combinan preferiblemente en una mezcla de reacción inicial, o las enzimas y los reactivos para una segunda reacción enzimática se añaden al medio de reacción una vez que la primera reacción enzimática es completa o casi completa. Mediante la realización de dos reacciones enzimáticas en secuencia en un único recipiente, los rendimientos globales se mejoran frente a los procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Por otra parte, se reduce la limpieza y la eliminación de disolventes extras y subproductos.

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

También se describe un método que hace uso de una o más exo-o endo-glicosidasas. La glicosidasa es típicamente un mutante, que está diseñado para formar enlaces de glicosilo en lugar de romper a los mismos. El mutante glicanasa incluye típicamente una sustitución de un residuo aminoácido de un sitio de residuo aminoácido ácido activo. Por ejemplo, cuando la endoglicanasa es endo-H, los residuos del sitio activo sustituidos serán típicamente Asp en la posición 130, Glu en la posición 132 o una combinación de los mismos. Los aminoácidos se reemplazan generalmente por serina, alanina, asparagina o glutamina.

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

También se describe que cada una de las enzimas utilizadas para producir un conjugado de la invención está presente en una cantidad catalítica. La cantidad catalítica de una enzima particular varía según la concentración del sustrato de esa enzima, así como según las condiciones de reacción tales como temperatura, tiempo y valor de pH. Medios para determinar la cantidad catalítica de una enzima dada en virtud de las concentraciones de sustrato y condiciones de reacción preseleccionadas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

La temperatura a la que un proceso anterior se lleva a cabo puede variar de justo por encima de la congelación a la temperatura a la cual la enzima más sensible se desnaturaliza. Intervalos de temperaturas preferidos son de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 55 °C, y más preferiblemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C. En otra realización ejemplar, uno o más componentes del presente método se llevan a cabo a una temperatura elevada utilizando una enzima termófila.

La mezcla de reacción se mantiene durante un período de tiempo suficiente para que el aceptor sea glicosilado, formando de este modo el conjugado deseado. Algunos de los conjugados a menudo se pueden detectar después de pocas horas, obteniéndose habitualmente cantidades recuperables por lo general en el espacio de 24 h o menos. Los expertos en la técnica entienden que la velocidad de la reacción depende de un cierto número de factores variables (p. ej., concentración de la enzima, concentración de los donantes, concentración del aceptor, temperatura, volumen de disolvente), que están optimizados para un sistema seleccionado.

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

En la discusión que sigue, la invención se ilustra mediante la conjugación de restos de ácido siálico modificados a un péptido glicosilado. El ácido siálico modificado ilustrativo se marca con PEG. El foco de la siguiente discusión sobre el uso de ácido siálico modificado con PEG y péptidos glicosilados es para mayor claridad de ilustración y no pretende implicar que la invención esté limitada a la conjugación de estos dos participantes. Un experto entiende que la discusión es aplicable en general a las adiciones de restos glicosilo modificados distintos de ácido siálico. Por otra parte, la discusión es igualmente aplicable a la modificación de una unidad de glicosilo con agentes distintos de PEG, incluidos otros restos de PEG, restos terapéuticos y biomoléculas.

Se puede utilizar un enfoque enzimático para la introducción selectiva de hidratos de carbono PEGilados o PPGilados en un péptido o glicopéptido. El método utiliza azúcares modificados que contienen PEG, PPG, o un grupo funcional reactivo enmascarado, y se combina con la glicosil transferasa o glicosil sintasa apropiadas. Mediante la selección de la glicosil transferasa que hará el enlace deseado de hidratos de carbono y utilizando el azúcar modificado como sustrato donante, el PEG o PPG pueden ser introducidos directamente en la cadena principal del péptido, en residuos de azúcar existentes de un glicopéptido o en residuos de azúcar que se han añadido a un péptido.

Un aceptor para una sialil transferasa está presente en el péptido que ha de ser modificado, ya sea como una estructura que se produce de forma natural o se coloca allí de forma recombinante, enzimática o químicamente. Aceptores adecuados incluyen, por ejemplo, aceptores de galactosilo tales como Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, Gal $\beta$ 1,4GalNAc, Gal $\beta$ 1,3GalNAc, lacto-N-tetraosa, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc, Gal $\beta$ 1,3Ara, Gal $\beta$ 1,6GlcNAc, Gal $\beta$ 1,4Glc (lactosa), y otros aceptores conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Paulson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253: 5617-5624 (1978)). Sialil transferasas ilustrativas se recogen en esta memoria.

Un aceptor para la sialil transferasa está presente en el glicopéptido que ha de ser modificado tras la síntesis *in vivo* del glicopéptido. Tales glicopéptidos se pueden sialilar utilizando los métodos reivindicados sin modificación previa del patrón de glicosilación del glicopéptido. Alternativamente, los métodos de la invención se pueden utilizar para sialilar un péptido que no incluye un aceptor adecuado; uno modifica primero el péptido para incluir un aceptor mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. En una realización ilustrativa, un residuo GalNAc se añade por la acción de una GalNAc transferasa.

También se describe que el aceptor galactosilo se ensambla fijando un residuo galactosa a un aceptor apropiado enlazado al péptido, p. ej., un GlcNAc. El método incluye incubar el péptido que ha de ser modificado con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de una galactosil transferasa (por ejemplo, Gal $\beta$ 1,3 o Gal $\beta$ 1,4), y un donante de galactosilo adecuado (p. ej., UDP-galactosa). Se deja que la reacción proceda sustancialmente hasta su compleción o, alternativamente, la reacción se termina cuando se añade una cantidad

preseleccionada del residuo galactosa. Otros métodos de ensamblar un aceptor sacárido seleccionado resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

5 En aún otro ejemplo, los oligosacáridos enlazados a glicopéptidos son primero "recortados", ya sea en su totalidad o en parte, para exponer ya sea un aceptor para la sialil transferasa o un resto al que se pueden añadir uno o más residuos apropiados para obtener un aceptor adecuado. Enzimas tales como glicosil transferasas y endoglicosidasas (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.716.812) son útiles para las reacciones de fijación y recorte. En otra realización de este método, los restos de ácido siálico del péptido se separan esencialmente por completo (p. ej., al menos 90, al menos 95 o al menos 99%), exponiendo un aceptor para un ácido siálico modificado.

10 En la discusión que sigue, el método de la invención se ejemplifica mediante el uso de azúcares modificados que tienen un resto PEG fijado a los mismos. El foco de la discusión es para claridad de la ilustración. Los expertos apreciarán que la discusión es igualmente relevante para aquellas realizaciones en las que el azúcar modificado tiene un resto terapéutico, biomolécula o similares.

15 En un ejemplo, en el que un resto de hidrato de carbono se "recorta" antes de la adición del azúcar modificado, alta manosa se recorta de nuevo a la estructura biantenaria de primera generación. Un azúcar modificado que porta un resto de PEG está conjugado a uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el "recorte de nuevo". En un ejemplo, se añade un resto PEG a través de un resto GlcNAc conjugado con el resto PEG. La GlcNAc modificada se une a uno o ambos de los residuos de manosa terminales de la estructura biantenaria. Alternativamente, una GlcNAc no modificada puede añadirse a uno o ambos de los extremos de las especies ramificadas.

20 En otra realización ilustrativa, se añade un resto PEG a uno o ambos de los residuos de manosa terminales de la estructura biantenaria a través de un azúcar modificado que tiene un residuo galactosa que está conjugado con un residuo de GlcNAc añadido a los residuos de manosa terminales. Alternativamente, una Gal no modificada puede añadirse a uno o ambos residuos GlcNAc terminales.

En aún un ejemplo adicional, se añade un resto PEG a un residuo Gal usando un ácido siálico modificado tal como los discutidos anteriormente.

25 En otro ejemplo, una estructura de alta manosa se "recorta de nuevo" a la manosa de la cual la estructura biantenaria se ramifica. En un ejemplo, se añade un resto PEG a través de una GlcNAc modificada con el polímero. Alternativamente, una GlcNAc no modificada se añade a la manosa, seguido de una Gal con un resto de PEG fijado. Todavía en otra realización, los residuos GlcNAc y Gal no modificados se añaden secuencialmente a la manosa, seguido de un resto de ácido siálico modificado con un resto PEG.

30 Una alta estructura de manosa también se puede recortar de nuevo al núcleo tri-manosilo elemental.

35 En un ejemplo, la alta manosa se "recorta de nuevo" a la GlcNAc a la que la primera manosa se fija. La GlcNAc se conjuga a un residuo Gal que porta un resto PEG. Alternativamente, se añade una Gal no modificada a la GlcNAc, seguido de la adición de un ácido siálico modificado con un azúcar soluble en agua. En aún otro ejemplo, la GlcNAc terminal se conjuga con Gal y posteriormente la GlcNAc se fucosila con una fucosa modificado que porta un resto PEG.

40 La alta manosa también se puede recortar de nuevo para formar la primera GlcNAc fijada a la Asn del péptido. En un ejemplo, la GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc)<sub>a</sub> se conjuga con haGlcNAc que porta un polímero soluble en agua. En otro ejemplo, la GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc)<sub>a</sub> se modifica con Gal, que porta un polímero soluble en agua. En aún una realización adicional, la GlcNAc se modifica con Gal, seguido de la conjugación a la Gal de un ácido siálico modificado con un resto PEG.

Otros ejemplos se recogen en las Publicaciones de solicitudes de Patente de propiedad común de EE.UU.: 20040132640; 20040063911; 20040137557; solicitudes de Patente de EE.UU. N°s: 10/369. 979; 10/410. 913; 10/360. 770; 10/410. 945 y PCT/US02/32263.

45 Los Ejemplos recogidos anteriormente proporcionan una ilustración del poder de los métodos recogidos en esta memoria. Utilizando los métodos descritos en esta memoria es posible "recortar de nuevo" y construir un residuo de hidrato de carbono sustancialmente de cualquier estructura deseada. El azúcar modificado se puede añadir a los extremos del resto hidrato de carbono como se ha recogido anteriormente, o puede encontrarse entre el núcleo del péptido y el extremo del hidrato de carbono.

50 En un ejemplo, un ácido siálico existente se retira de un glicopéptido usando una sialidasa, desenmascarando con ello la totalidad o la mayor parte de los residuos de galactosilo subyacentes. Alternativamente, un péptido o glicopéptido se marca con residuos galactosa, o un residuo de oligosacárido que termina en una unidad de galactosa. Después de la exposición o de la adición de los residuos galactosa, se utiliza una sialil transferasa adecuada para añadir un ácido siálico modificado.

En otra realización ilustrativa, se utiliza una enzima que transfiere ácido siálico a ácido siálico. Este método puede ponerse en práctica sin el tratamiento de un glicano sialilado con una sialidasa para exponer los residuos glicano debajo del ácido siálico. Un ácido siálico ilustrativo, modificado con polímero, es un ácido siálico modificado con poli(etilenglicol). Otras enzimas ilustrativas que añaden ácido siálico y restos ácido siálico modificados a glicanos que incluyen un residuo ácido siálico o que intercambian un residuo de ácido siálico existente a un glicano de estas especies incluyen ST3Gal3, CST-II, ST8Sia-II, ST8Sia-III y ST8Sia-IV.

Todavía en un enfoque adicional, una funcionalidad reactiva enmascarado está presente en el ácido siálico. El grupo reactivo enmascarado no se ve preferiblemente afectado por las condiciones usadas para fijar el ácido siálico modificado al G-CSF. Después de la fijación covalente del ácido siálico modificado al péptido, se retira la máscara y el péptido se conjuga con un agente tal como PEG. El agente se conjuga al péptido de una manera específica mediante su reacción con el grupo reactivo desenmascarado en el residuo de azúcar modificado.

Se puede utilizar cualquier azúcar modificado con su glicosil transferasa apropiada, dependiendo de los azúcares terminales de las cadenas laterales de oligosacáridos del glicopéptido. Como se discutió anteriormente, el azúcar terminal del glicopéptido requerido para la introducción de la estructura PEGilada se puede introducir de forma natural durante la expresión o se puede producir después de la expresión utilizando la o las glicosidasas, glicosiltransferasas o mezcla de una o más glicosidasas y glicosiltransferasas apropiadas.

En una realización adicional ilustrativa, UDP-galactosa-PEG se hace reaccionar con  $\beta$ 1,4-galactosiltransferasa, transfiriendo con ello la galactosa modificada a la estructura de N-acetilglucosamina terminal apropiada. Los residuos de GlcNAc terminal en el glicopéptido se pueden producir durante la expresión, como puede ocurrir en sistemas de expresión tales como mamíferos, insectos, plantas u hongos, pero también pueden ser producidos tratando el glicopéptido con una sialidasa y/o glicosidasa y/o glicosil transferasa, según se requiera.

En otra realización ilustrativa, una transferasa GlcNAc, tal como GNT1-5, se utiliza para transferir GlcNAc PEGilada a un residuo de manosa terminal en un glicopéptido. Todavía en una realización ilustrativa adicional, una de las estructuras de glicano enlazadas a N y/u O se separan enzimáticamente a partir de un glicopéptido para exponer un aminoácido o un residuo glicosilo terminal que posteriormente se conjuga con el azúcar modificado. Por ejemplo, se utiliza una endoglicanasa para separar las estructuras enlazadas a N de un glicopéptido para exponer una GlcNAc terminal como una Asn enlazada a GlcNAc en el glicopéptido. UDP-Gal-PEG y la galactosil transferasa adecuada se utiliza para introducir la funcionalidad de PEG-galactosa en la GlcNAc expuesta.

En una realización alternativa, el azúcar modificado se añade directamente a la cadena principal del péptido usando una glicosiltransferasa conocida por transferir residuos azúcar a la cadena principal del péptido. Glicosiltransferasas ilustrativas útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, transferasas GalNAc (GalNAc T1-14), transferasas GlcNAc, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, xilosiltransferasas, manosiltransferasas y similares. El uso de esta estrategia permite la adición directa de azúcares modificados a péptidos que carecen de hidratos de carbono o, alternativamente, a glicopéptidos existentes. En ambos casos, la adición del azúcar modificado se produce en posiciones específicas sobre la cadena principal del péptido tal como se define por la especificidad para el sustrato de la glicosiltransferasa y no de una manera aleatoria tal como se produce durante la modificación de una cadena principal del péptido de una proteína usando métodos químicos. Una serie de agentes se puede introducir en proteínas o glicopéptidos que carecen de la secuencia del péptido sustrato glicosiltransferasa mediante el diseño de la secuencia de aminoácido apropiado en la cadena de polipéptido.

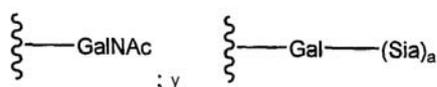
Adicionalmente, se describe que se pueden utilizar una o más etapas adicionales de modificación química o enzimática después de la conjugación del azúcar modificado al péptido. En una realización ilustrativa, se utiliza una enzima (p. ej., fucosiltransferasa) para añadir una unidad de glicosilo (p. ej., fucosa) en el azúcar terminal modificado fijado al péptido. En otro ejemplo, se utiliza una reacción enzimática para "tapar" los sitios a los que el azúcar modificado no consiguió conjugarse. Alternativamente, se utiliza una reacción química para alterar la estructura del azúcar modificado conjugado. Por ejemplo, el azúcar modificado conjugado se hace reaccionar con agentes que estabilizan o desestabilizan su enlace con el componente de péptido al que está unido el azúcar modificado. En otro ejemplo, se desprotegió un componente del azúcar modificado de acuerdo con su conjugación al péptido. Un experto apreciará que hay una serie de procesos enzimáticos y químicos que son útiles en los métodos de la invención en una etapa después de que el azúcar modificado se haya conjugado al péptido. La elaboración adicional del conjugado de azúcar-péptido modificado está dentro del alcance de la invención.

Las enzimas y condiciones de reacción para la preparación de los conjugados de la presente invención se discuten en detalle en la matriz de la presente solicitud, así como en las solicitudes de patente PCT publicadas WO 03/031464, WO 04/033651, WO 04/099231 de propiedad común.

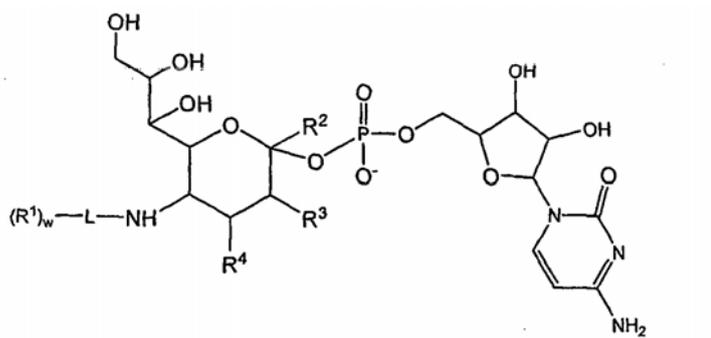
En una realización seleccionada, un péptido de G-CSF, expresado en células de insecto, es remodelado de tal manera que los glicanos en el glicopéptido remodelado incluyen un residuo de glicosilo GlcNAc-Gal. La adición de GlcNAc y Gal puede ocurrir como reacciones separadas o como una sola reacción en un solo recipiente. En este ejemplo, se utilizan GlcNAc transferasa I y Gal-transferasa. El resto sialilo modificado se añade utilizando ST3Gal-III.

En otra realización, la adición de GalNAc, Gal y Sia modificado también puede ocurrir en un solo recipiente de reacción, utilizando las enzimas indicadas anteriormente. Cada una de las etapas de remodelación enzimática y de glicoPEGilación se llevan a cabo de forma individual.

- 5 Cuando el péptido se expresa en células de mamífero, son de uso diferentes métodos. En una realización, el péptido se conjuga sin necesidad de remodelación antes de la conjugación por contacto del péptido con una sialil transferasa que transfiere el ácido siálico modificado directamente sobre un ácido siálico, formando Sia-Sia-L-R<sup>1</sup>, o intercambia un ácido siálico en el péptido para el ácido siálico modificado, formando Sia-L-R<sup>1</sup>. Una enzima ilustrativa de uso en este método es CST-II. Otras enzimas que añaden ácido siálico a ácido siálico son conocidas por los expertos en la técnica y ejemplos de tales enzimas se recogen las figuras adjuntas.
- 10 Todavía en otro método de preparación de los conjugados de la invención, el péptido expresado en un sistema de mamífero se desialila utilizando una sialidasa. El residuo Gal expuesto se sialila con un ácido siálico modificado usando una sialil transferasa específica para glicanos enlazados a O, proporcionando un péptido de G-CSF con un glucano modificado enlazado a O. El péptido de G-CSF modificado desialilado está opcionalmente parcial o totalmente re-sialilado mediante el uso de una sialil transferasa tal como ST3GalIII.
- 15 En otro aspecto, la invención proporciona un método de producir un G-CSF PEGilado de la invención. El método incluye: (a) poner en contacto un sustrato de péptido de G-CSF que comprende un grupo glicosilo seleccionado de:



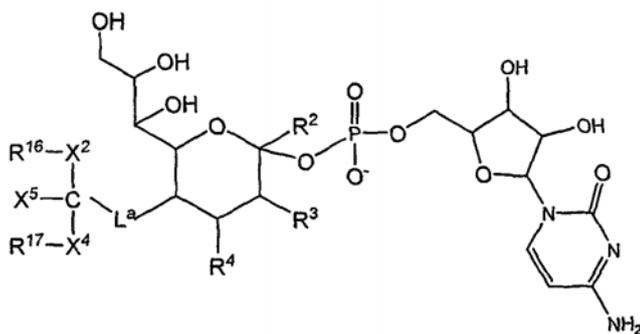
con un donante de ácido siálico-PEG que tiene la fórmula:



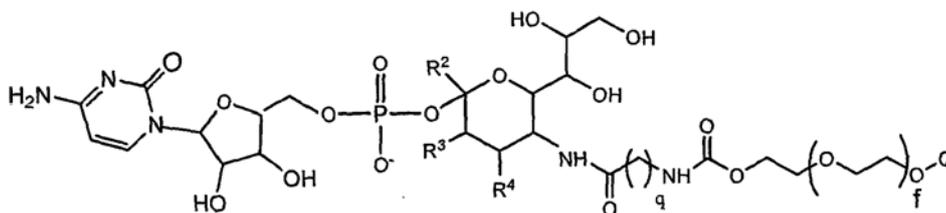
- 20 y una enzima que transfiere ácido siálico-PEG de dicho donante a un miembro seleccionado entre la GalNAc, Gal y la Sia de dicho grupo glicosilo, en condiciones apropiadas para dicha transferencia. Un donante de ácido siálico modificado ilustrativo es CMP-ácido siálico modificado, a través de un resto enlazador, con un polímero, p. ej., un resto de poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada. Como se discute en esta memoria, el péptido está opcionalmente glicosilado con GalNAc y/o Gal y/o Sia ("remodelado") antes de fijar el azúcar modificado. Las etapas de remodelación pueden ocurrir en secuencia en el mismo recipiente sin purificación del péptido glicosilado entre las etapas. Alternativamente, después de una o más etapas de remodelación, el péptido glicosilado puede purificarse antes de someterlo a la próxima etapa de glicosilación o glicoPEGilación.

- 30 Como se ilustra en los Ejemplos y se analiza más adelante, la disposición de un resto aceptor para el PEG-azúcar se lleva a cabo en cualquier número deseado de etapas. Por ejemplo, en una realización, la adición de GalNAc al péptido puede ser seguida de una segunda etapa en la que el PEG-azúcar se conjuga a la GalNAc en el mismo recipiente de reacción. Alternativamente, estas dos etapas pueden llevarse a cabo en un solo recipiente aproximadamente de forma simultánea.

En una realización ilustrativa, el donante de ácido siálico-PEG tiene la fórmula:



En otra realización ilustrativa, el donante de ácido siálico-PEG tiene la fórmula:



5 En una realización adicional, el péptido de G-CSF se expresa en un sistema de expresión apropiado antes de ser glicopegilado o remodelado. Sistemas de expresión ilustrativos incluyen células Sf-9/baculovirus y de ovario de hámster chino (CHO).

10 En otra realización ilustrativa, la invención proporciona métodos de formación de un conjugado de G-CSF, tales como los recogidos en esta memoria, en que el G-CSF en el conjugado está esencialmente no oxidado. La oxidación de residuos metionina de PEG-G-CSF puede ser detectada por secuenciación N-terminal y representación en mapa de péptidos. La oxidación o su ausencia se puede confirmar mediante RP-HPLC. Por ejemplo, utilizando  
 15 RP-HPLC, se detectó un pico además del pico principal de PEG-G-CSF, que representa una especie de PEG-G-CSF en la que se oxida metionina (Met-Ox). Para G-CSF este pico ha sido identificado como la oxidación Met127/Met138, eluyendo 0,2 min antes del pico principal. Además, se ha identificado un pequeño pico que eluye aproximadamente 3 min antes que el pico principal como la oxidación Met122. La oxidación Met1 se detectó mediante RP-HPLC utilizando el método a 60 °C, pero co-eluye con el pico principal. Esta oxidación de la metionina N-terminal se detecta por la representación en mapa de péptidos y se la alude como G1-Ox.

20 Por lo tanto, en una realización ilustrativa, la invención proporciona una población de conjugados de G-CSF, tal como se describe en esta memoria, en que menos de 10%, preferiblemente menos de 5%, más preferiblemente menos de 1%, más preferiblemente menos de 0,5%, todavía más preferiblemente menos de 0,1%, preferiblemente menos de 0,05%, más preferiblemente menos de 0,01%, incluso más preferiblemente menos de 0,005% y aún más preferiblemente menos de 0,001% de los miembros de la población incluyen un residuo metionina seleccionado de Met127, Met138, Met 122, Met N-terminal y combinaciones de los mismos que se oxida.

25 En un método ilustrativo de acuerdo con la invención, la conjugación enzimática del azúcar modificado al péptido se realiza en condiciones que impiden o retardan la oxidación de residuos de metionina del péptido. En una realización ilustrativa, la mezcla de reacción incluye metionina añadida. Métodos ilustrativos de la invención usan hasta aproximadamente 20 mM de metionina en la mezcla de reacción de conjugación.

### Purificación de conjugados de G-CSF

30 Los productos producidos por los procedimientos anteriores pueden utilizarse sin purificación. Sin embargo, habitualmente se prefiere recuperar el producto y uno o más de los compuestos intermedios, p. ej., azúcares de nucleótidos, especies de PEG ramificadas y lineales, azúcares modificados y azúcares de nucleótidos modificados. Se pueden utilizar técnicas estándares bien conocidas para la recuperación de sacáridos glicosilados tales como cromatografía de capa delgada o gruesa, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico, o filtración de membrana. Se prefiere el uso de la filtración de membrana, más preferiblemente utilizando una membrana osmótica inversa, o una o más técnicas cromatográficas en columna para la recuperación como se  
 35 discute aquí en lo que sigue y en la bibliografía citada en esta memoria. Por ejemplo, se puede utilizar la filtración de membrana, en donde las membranas tienen un corte de peso molecular de aproximadamente 3000 a aproximadamente 10000 para separar proteínas tales como glicosil transferasas. La nanofiltración u ósmosis inversa se puede utilizar entonces para separar sales y/o purificar los sacáridos de productos (véase, p. ej., el documento WO 98/15581). Membranas de nanofiltro son una clase de membranas de ósmosis inversa que dejan pasar sales

monovalentes, pero retienen sales polivalentes y solutos no cargados mayores que aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Dalton, dependiendo de la membrana utilizada. Por lo tanto, en una aplicación típica, los sacáridos preparados por los métodos de la presente invención quedarán retenidos en la membrana y las sales contaminantes pasarán a su través.

5 Si el péptido se produce intracelularmente, como una primera etapa, se separan los desechos de partículas, ya sean células hospedantes o fragmentos lisados. Tras la glicoPEGilación, el péptido PEGilado se purifica por métodos reconocidos en la técnica, por ejemplo mediante centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, la proteína puede concentrarse con un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, seguido de la separación de la variante polipeptídica de otras impurezas mediante una o más etapas seleccionadas de cromatografía de  
10 inmunoafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (p. ej., sobre dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía en Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, Mono-Q, MONO-S, lentejas de lectina- Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Éter Toyopearl, Butilo Toyopearl, Fenilo Toyopearl, o proteína A Sepharose, cromatografía de SDS-PAGE, cromatografía de sílice, cromato-enfoque, HPLC de fase inversa (p. ej., gel de sílice con grupos alifáticos adjuntos), gel de filtración utilizando, p. ej., tamiz  
15 molecular Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía sobre columnas que se unen selectivamente al polipéptido, y precipitación con etanol o sulfato de amonio.

Glicopéptidos modificados, producidos en cultivo se aíslan habitualmente por extracción inicial a partir de células, enzimas, etc., seguido de uno o más de etapas de concentración, precipitación por sales, intercambio iónico acuoso o de cromatografía de exclusión por tamaño. Adicionalmente, la glicoproteína modificada puede ser purificada por  
20 cromatografía de afinidad. Finalmente, la HPLC se puede emplear para las etapas finales de purificación.

Un inhibidor de la proteasa, p. ej., fluoruro de metilsulfonilo (PMSF) puede incluirse en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos o conservantes para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

Dentro de otro ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que producen el glicopéptido modificado de la invención se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una  
25 unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender un ligando para el péptido, una molécula de lectina o de anticuerpo unida a un soporte adecuado. Alternativamente, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos DEAE  
30 colgantes. Matrices adecuadas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Los grupos sulfopropilo son particularmente preferidos.

Otros métodos de uso en la purificación incluyen cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de hidroxapatito, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía sobre Blue Sepharose. Estos y otros métodos útiles se ilustran en la Patente Orovisional de EE.UU. co-asignada N° (N° de expediente del Agente 40853-01-5168-  
35 P1, presentada el 6 de mayo de 2005).

Una o más etapas de RP-HPLC empleando medios de RP-HPLC hidrófobos, p. ej., gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes, se pueden emplear para purificar adicionalmente una composición de  
40 conjugado polipeptídico. También pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una glicoproteína modificada homogénea o esencialmente homogénea.

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

En un ejemplo, la purificación se lleva a cabo por los métodos recogidos la Patente Provisional de EE.UU. N ° 60/665.588, presentada el 24 de marzo 2005, de propiedad común y co-asignada.

50 En otro ejemplo, la purificación se efectúa por cromatografía SPHP utilizando un tampón apropiado como eluyente. Tampones ilustrativos incluyen tampones citrato y acetato, prefiriéndose actualmente el citrato.

En un ejemplo adicional, una sal fosfato, p. ej. fosfato de sodio, se añade a la mezcla de reacción de conjugación enzimática. La mezcla de reacción se centrifuga y la mezcla resultante se purifica por SPHP. En esta realización, la metionina libre, que no está unida covalentemente al péptido de G-CSF, está presente o ausente durante la etapa de purificación.

55 Un proceso de purificación ilustrativo, tal como se recogió anteriormente, da como resultado el aislamiento de una población de conjugados de G-CSF, tal como se describe en esta memoria, en el que menos de 10%,

preferiblemente menos de 5%, más preferiblemente menos de 1%, más preferiblemente menos de 0,5%, aún más preferiblemente menos de 0,1%, preferiblemente menos de 0,05%, más preferiblemente menos de 0,01%, incluso más preferiblemente menos de 0,005% y aún más preferiblemente menos de 0,001% de los miembros de la población incluyen un residuo metionina seleccionado de Met127, Met138, Met 122, Met N-terminal y combinaciones de los mismos que se oxida.

En aún otro ejemplo, la composición de conjugado de G-CSF purificado incluye una población de péptidos de G-CSF, en la que menos de 10%, preferiblemente menos de 5%, más preferiblemente menos de 1%, más preferiblemente menos de 0,5%, aún más preferiblemente menos de 0,1%, preferiblemente menos de 0,05%, más preferiblemente menos de 0,01%, incluso más preferiblemente menos de 0,005% y aún más preferiblemente menos de 0,001% de la población de péptidos se asocia en un agregado de péptido tal como se determina por el tamaño-cromatografía de exclusión.

### Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un resto PEG que no se produce de forma natural, resto terapéutico o biomolécula y un péptido glicosilado o no glicosilado. El polímero, resto terapéutico o biomolécula está conjugado con el péptido a través de un grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente tanto al péptido como al 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. Formulaciones adecuadas para uso en la presente invención se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mace Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17<sup>a</sup> ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos para la administración de fármacos, véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990).

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier manera apropiada de administración, incluyendo, por ejemplo, la administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo comprende preferiblemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se puede emplear 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. Microesferas biodegradables (p. ej., polilactato, poliglicolato) también se pueden emplear como vehículos para las composiciones farmacéuticas de esta invención. Microesferas biodegradables adecuadas se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N<sup>os</sup>. 4.897.268 y 5.075.109.

Comúnmente, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, p. ej., por vía intravenosa. Por lo tanto, la invención proporciona composiciones para la administración parenteral que incluyen el compuesto disuelto o suspendido en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso, p. ej. agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes para el 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 en condiciones estériles. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso tal como están, o se pueden liofilizar, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones oscilará típicamente entre 3 y 11, más preferiblemente de 5 a 9 y lo más preferiblemente entre 7 y 8.

Los glicopéptidos de la invención se pueden incorporar en liposomas formados a partir de lípidos formadores de vesículas estándar. Está disponible una diversidad de métodos para preparar liposomas, tal como se describe, p. ej., en Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng* 9: 467 (1980), las Patentes de EE.UU. N<sup>os</sup>. 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028. La fijación como objetivo de liposomas utilizando una diversidad de agentes de fijación de objetivo (por ejemplo, los sialil galactósidos de la invención) es bien conocida en la técnica (véase, p. ej., las Patentes de EE.UU. N<sup>os</sup>. 4.957.773 y 4.603.044).

Se pueden utilizar métodos estándar para el acoplamiento de agentes de fijación de objetivo a liposomas. Estos métodos implican generalmente la incorporación en liposomas de componentes lipídicos tales como fosfatidiletanolamina, que pueden activarse para la fijación de agentes de fijación de objetivo, o compuestos lipófilos derivatizados tales como glicopéptidos derivatizados de lípidos de la invención.

Mecanismos de fijación de objetivo requieren generalmente que los agentes de fijación de objetivo sean colocados 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 fijarse a una molécula de lípido antes de la formación del liposoma utilizando 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). Alternativamente, el liposoma se puede formar de tal manera que una

- parte de conector se incorpora primero en la membrana en el momento de la formación de la membrana. La parte de conector debe tener una porción lipófila, que está firmemente embebida y anclada en la membrana. También debe tener una parte reactiva, que está disponible químicamente sobre la superficie acuosa del liposoma. La parte reactiva se selecciona de modo que sea químicamente adecuada para formar un enlace químico estable con el agente de fijación de objetivo o los hidratos de carbono, que se añade más tarde. En algunos casos, es posible fijar el agente de fijación de objetivo a la molécula de conector directamente, pero en la mayoría de los casos es más adecuado usar una tercera molécula para actuar como un puente químico, enlazando así la molécula de conector que se encuentra en la membrana con el agente de fijación de objetivo o hidratos de carbono 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, compuestos marcados se pueden utilizar para localizar zonas de inflamación o metástasis tumoral en un paciente del que se sospecha que tiene una inflamación. Para este uso, los compuestos pueden marcarse con  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$  o tritio.
- El ingrediente activo utilizado en las composiciones farmacéuticas de la presente invención es G-CSF glicopeglado y sus derivados que tienen las propiedades biológicas de estimular la producción de granulocitos. Preferiblemente, la composición de G-CSF de la presente invención se administra por vía parenteral (por ejemplo, IV, IM, SC o IP). Se espera que dosis eficaces varíen considerablemente dependiendo de la afección a ser tratada y de la vía de administración, pero se espera que estén en el intervalo de aproximadamente 0,1 (~ 7U) a 100 (~ 7000 U)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal del material activo. Dosis preferibles para el tratamiento de afecciones anémicas son aproximadamente 50 a aproximadamente 300 unidades/kg tres veces a la semana. Debido a que la presente invención proporciona un G-CSF con un tiempo de permanencia *in vivo* mejorado, las dosificaciones indicadas se reducirán opcionalmente cuando se administre una composición de la invención.
- Métodos de preparación para las especies de uso en la preparación de las composiciones de la invención se recogen generalmente en diversas publicaciones de patentes, p. ej., US 20040137557, WO 04/083258 y WO 04/033651. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar los conjugados, y los métodos y de la presente invención, pero no para limitar la invención reivindicada.
- En una realización ilustrativa, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que incluye una población de conjugados de G-CSF, tales como los descritos en esta memoria, en combinación con un diluyente farmacéuticamente aceptable. Una formulación preferida de la invención incluye un tampón, un detergente, y un poliol.
- Una formulación ilustrativa incluye el conjugado de péptido en una cantidad de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL, preferiblemente de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 75 mg/mL, y más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL.
- Una formulación ilustrativa incluye un tampón a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 75 mM, y más preferiblemente de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM.
- En una formulación ilustrativa, el detergente está presente en una cantidad de aproximadamente 0,00001% a aproximadamente 10%, preferiblemente de aproximadamente 0,00005% a aproximadamente 1%, más preferiblemente de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 0,1%, más preferiblemente de aproximadamente 0,0005% a aproximadamente 0,005%, y aún más preferiblemente de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,01%.
- En una formulación ilustrativa, el poliol está presente en una cantidad de aproximadamente 1 mg/mL a 100 mg/mL, preferiblemente de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 75 mg/mL, más preferiblemente de aproximadamente 15 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL.
- En una formulación ilustrativa, el pH de la formulación es de aproximadamente 3 a aproximadamente 7,5, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 6,5 y más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 6. Cualquiera que sea la estructura del conjugado de péptido, se prefiere generalmente que se pueda formular a un pH que está dentro de un intervalo de aproximadamente 0,5 unidades de pH del pI del péptido.
- En una formulación ilustrativa, el detergente es de Tween, p. ej., Tween 20. En una realización ilustrativa adicional el poliol es sorbitol. En otra realización, el tampón es acetato sódico.
- Una formulación ilustrativa de la invención incluye el conjugado de G-CSF (2 mg/mL) en una mezcla con NaOAc 10 mM, Tween 20 al 0,003% y 50 mg/mL de sorbitol a pH 4,0.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

**GlicoPEGilación de G-CSF producida en células CHO***a. Preparación de Asialo-Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos (G-CSF)*

5 G-CSF producido en células CHO se disolvió a razón de 2,5 mg/mL en Tris 50 mM Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM y se concentró hasta 500 µL en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. La disolución se incubó con 300 mU/mL de neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32 °C. Para vigilar la reacción, una pequeña parte alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y se realiza un gel de IEF. La mezcla de reacción se añade luego a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa prelavado (volumen de reacción de 800 µL/mL) y las perlas lavadas se hacen girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavaron 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 mL de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 mL del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinaron. El sobrenadante se dializó a 4 °C frente a Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 1 M, NaN<sub>3</sub> al 0,05% y luego dos veces más frente a Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 1 M, NaN<sub>3</sub> al 0,05%. Después, la disolución dializada se concentró utilizando un filtro centrífugo Centricon Plus 20 y se almacenó a -20 °C. Las condiciones para el gel de IEF se llevaron a cabo de acuerdo con los procesos y reactivos suministrados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y desialilado se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF MS.

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

20 G-CSF desialilado se disolvió a razón de 2,5 mg/mL en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN<sub>3</sub> al 0,05%, pH 7,2. La disolución se incubó con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/mL de ST3Gal1 a 32 °C durante 2 días. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purificó utilizando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1) y se recogieron fracciones. El producto de la reacción se analizó mediante SDS-PAGE y análisis de IEF según los procesos y reactivos suministrados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y pegilado se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF MS.

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

25 G-CSF producido en células CHO, que contiene un glicano enlazado a O y alfa-2 3 sialilado, se disolvió a razón de 2,5 mg/mL en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN<sub>3</sub> al 0,05%, pH 7,2. La disolución se incubó con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/mL de CST-II a 32 °C durante 2 días. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purificó utilizando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1) y se recogieron fracciones de base. El producto de la reacción se analizó utilizando SDS-PAGE y análisis de IEF de acuerdo con los procesos y reactivos suministrados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y pegilado se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF MS.

*d. Preparación de G-CSF-(alfa-2,6)-sialil-PEG*

35 G-CSF, que contiene sólo GalNAc enlazada a O, se disuelve a razón de 2,5 mg/mL en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN<sub>3</sub> al 0,05%, pH 7,2. La disolución se incubó con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/mL de ST6GalNAcI o II a 32 °C durante 2 días. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purificó utilizando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón PBS (pH 7,1) y se recogieron fracciones. El producto de la reacción se analizó mediante SDS-PAGE y análisis de IEF según los procesos y reactivos suministrados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y pegilado se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF MS.

40 El G-CSF producido en células CHO se trató con sialidasa de *Arthrobacter* y después se purificó por exclusión de tamaño en Superdex 75 y se trató con ST3Gal1 o ST3 Gal2 y luego con CMP-SA-PEG de 20 kDa. La molécula resultante se purificó por intercambio iónico y filtración en gel y el análisis por SDS-PAGE demostró que la PEGilación era completa. Esta es la primera demostración de glicoPEGilación de un glicano enlazado a O.

**Ejemplo 2****Método de dos enzimas en dos recipientes**

45 El siguiente ejemplo ilustra la preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG en dos etapas secuenciales, en donde cada uno de los productos intermedios se purifica antes de que se utilice en la etapa siguiente.

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

50 G-CSF (960 mcg) en 3,2 mL de tampón empaquetado se concentró por ultrafiltración utilizando un filtro UF (MWCO 5K) y luego se reconstituyó con 1 mL de tampón MES 25 mM (pH 6,2, NaN<sub>3</sub> al 0,005%). A continuación, UDP-GalNAc (6 mg, 9,24 mM), GalNAc-T2 (40 µL, 0,04 U) y MnCl<sub>2</sub> 100 mM se añadieron (40 µL, 4 mM) y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente.

Después de 24 h, MALDI indicó que la reacción era completa. La mezcla de reacción se sometió directamente a purificación por HPLC usando SEC (Superdex 75 y Superdex 200) y un tampón de elución que comprende PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 4,9 y Tween 80 al 0,005%). El pico recogido de G-CSF-GalNAc se concentró utilizando un filtro Centricon de MWCO de 5 kDa a aproximadamente 150  $\mu$ L y se ajustó el volumen a 1 mL utilizando PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 4,9 y Tween 80 al 0,005%). Concentración final de proteína de 1 mg/mL ( $A_{280}$ ), rendimiento del 100%. La muestra se almacenó a 4 °C.

*b. Preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG utilizando G-CSF-GalNAc purificada, CMP-SA-PEG (20 kDa) y ST6GalNAc-I de ratón (pH 6,2)*

La disolución de G-CSF-GalNAc que contiene 1 mg de proteína se intercambió en tampón de tampón MES 25 mM (pH 6,2,  $\text{NaN}_3$  al 0,005%) y se añadió CMP-SA-PEG (20 kDa) (5 mg, 0,25 mol). Después de disolver, se añadió  $\text{MnCl}_2$  (100  $\mu$ L, disolución 100 mM) y ST6GalNAc-I (100  $\mu$ L, enzima de ratón) y la mezcla de reacción se sacudió lentamente a 32 °C durante tres días. La mezcla de reacción se concentró por ultrafiltración (MWCO de 5K) y se intercambió el tampón con NaOAc 25 mM (pH 4,9) una vez y después se concentró a 1 mL de volumen total. El producto se purificó después utilizando SP-Sepharose (A: NaOAc 25 mM + Tween 80 al 0,005% pH 4,5; B: NaOAc 25 mM + Tween 80 al 0,005% pH 4,5 NaCl 2 M) a un tiempo de retención de 13-18 min y SEC (Superdex 75; PBS-pH 7,2, Tween 80 al 0,005%) en el tiempo de retención de 8,6 min (Superdex 75, caudal 1 mL/min). Se recogieron las fracciones deseadas, se concentraron hasta 0,5 mL y se almacenaron a 4 °C.

### **Ejemplo 3**

#### ***Método de un solo recipiente para hacer el G-CSF-GalNAc-SA-PEG con simultánea adición de enzimas***

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

*a. Proceso en un solo recipiente utilizando ST6GalNAc-I de ratón (pH 6,0)*

G-CSF (960  $\mu$ g de proteína disuelta en 3,2 mL de tampón de la formulación del producto) se concentró por ultrafiltración (MWCO de 5K) a 0,5 mL y se reconstituyó con tampón MES 25 mM (pH 6,0,  $\text{NaN}_3$  al 0,005%) hasta un volumen total de alrededor de 1 mL o una concentración de proteínas de 1 mg/mL. Luego se añadieron UDP-GalNAc (6 mg, 9,21 mmol), GalNAc-T2 (80  $\mu$ L, 80 mU), CMP-SA-PEG (20 kDa) (6 mg, 0,3  $\mu$ mol) y después se añadieron la enzima ST6GalNAc-I de ratón (120  $\mu$ L) y  $\text{MnCl}_2$  100 mM (50  $\mu$ L). La disolución se sacudió a 32 °C durante 48 h, y se purificó mediante cromatografía de condiciones estándar de SP-Sepharose. Se obtuvo un total de 0,5 mg de proteína ( $A_{280}$ ), o un rendimiento global de aproximadamente el 50%. La estructura del producto se confirmó por análisis con tanto MALDI y SDS-PAGE.

*b. Proceso en un solo recipiente utilizando ST6GalNAc-I de pollo (pH 6,0)*

14,4 mg de G-CSF se concentraron a un volumen final de 3 mL, se intercambió el tampón con tampón MES 25 mM (pH 6,0,  $\text{NaN}_3$  al 0,05%, Tween 80 al 0,004%) y el volumen se ajustó a 13 mL. Luego se añadieron UDP-GalNAc (90 mg, 150  $\mu$ mol), GalNAc-T2 (0,59 U), CMP-SA-PEG de 20 kDa (90 mg), ST6GalNAc-I de pollo (0,44 U), y  $\text{MnCl}_2$  100 mM (600  $\mu$ L). La mezcla resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 60 h. La mezcla de reacción se concentró después utilizando una UF (MWCO 5K) y centrifugación. El residuo (aproximadamente 2 mL) se disolvió en tampón NaOAc 25 mM (pH 4,5) y se concentró de nuevo a 5 mL de volumen final. Esta muestra se purificó usando SP-Sepharose durante aproximadamente 10-23 min, SEC (Superdex 75, 17 min, caudal 0,5 mL/min) y un SEC adicional (Superdex 200, 23 min, caudal 0,5 mL/min), para proporcionar 3,6 mg (25% de rendimiento global) de G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20 kDa ( $A_{280}$  y método BCA).

### **Ejemplo 4**

#### ***Método en un solo recipiente para hacer G-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEG con adición secuencial de enzimas***

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

*a. Partiendo de GalNAc-G-CSF*

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

G-CSF (960 mcg) en 3,2 mL de tampón empaquetado se concentró por ultrafiltración utilizando un filtro UF (MWCO 5K) y luego se reconstituyó con 1 mL de tampón MES 25 mM (pH 6,2,  $\text{NaN}_3$  al 0,005%). Luego se añadieron UDP-GalNAc (6 mg, 9,24 mM), GalNAc-T2 (40  $\mu$ L, 0,04 U) y  $\text{MnCl}_2$  100 mM (40  $\mu$ L, 4 mM) y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente.

*2. Preparación de G-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEG de G-CSF-GalNAc, UDP-galactosa, SA-PEG-20 kDa, y las enzimas apropiadas*

El UDP-galactosa (4 mg, 6,5  $\mu$ mol), núcleo-1-Gal-T (320  $\mu$ L, 160 mU), CMP-SA-PEG-20 kDa (8 mg, 0,4  $\mu$ mol), ST3Gal2 (80  $\mu$ L, 0,07 mU) y  $MnCl_2$  100 mM (80  $\mu$ L) se añadieron directamente a la mezcla de reacción en bruto de la G-CSF-GalNAc (1,5 mg) en 1,5 mL de tampón MES 25 mM (pH 6.0) de la etapa a de arriba. La mezcla resultante se incubó a 32 °C durante 60 h. La mezcla de reacción se centrifugó y la disolución se concentró usando ultrafiltración (MWCO de 5K) a 0,2 mL, y luego se volvió a disolver con NaOAc 25 mM (pH 4,5) hasta un volumen final de 1 mL. El producto se purificó usando SP-Sepharose (tiempo de retención entre 10-15 min), la fracción pico se concentró utilizando un filtro giratorio (MWCO 5K) y el residuo se purificó usando adicionalmente SEC (Superdex 75, tiempo de retención de 10,2 min). Después de la concentración usando un filtro giratorio (MWCO 5K), la proteína se diluyó a 1 mL usando tampón de formulación con PBS, 2,5% de manitol, polisorbato al 0,005%, pH 6,5 y se formuló a una concentración de proteínas de 850  $\mu$ g de proteína por mL ( $A_{280}$ ). El rendimiento global fue del 55%.

### Ejemplo 5

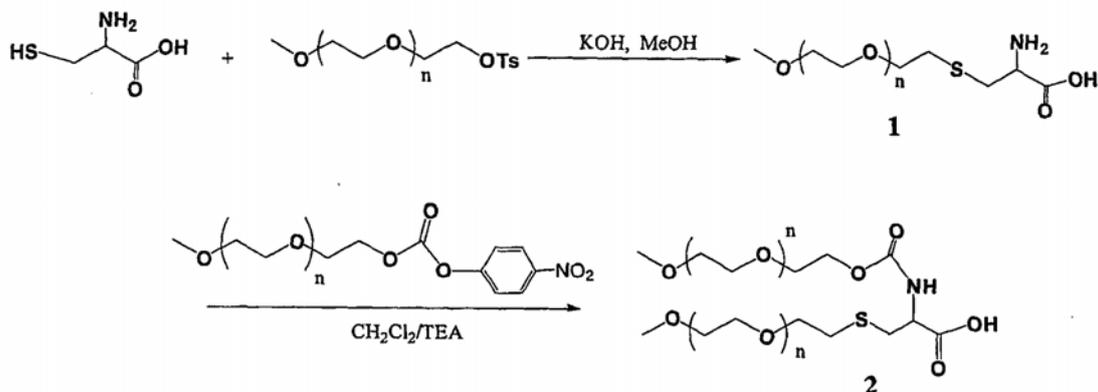
#### Método en un solo recipiente para hacer el G-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEG con adición simultánea de enzimas

##### a. Partiendo de G-CSF.

G-CSF (960 mcg, 3,2 mL) se concentró por ultrafiltración (MWCO de 5K) y se reconstituyó con tampón MES 25 mM (pH 6,0,  $NaN_3$  al 0,005%). El volumen total de la disolución de G-CSF era aproximadamente 1 mg/mL. Se añadieron UDP-GalNAc (6 mg), GalNAc-T2 (80  $\mu$ L, ~ 80  $\mu$ U), UDP-Gal (6 mg), Núcleo1 GalT (160  $\mu$ L, 80  $\mu$ U), CMP-SA-PEG (20K) (6 mg) y una sialiltransferasa, p. ej. ST3Gal1 (160  $\mu$ L, 120  $\mu$ U),  $MnCl_2$  100 mM (40  $\mu$ L). La mezcla resultante se incubó a 32 °C durante 48 h. La purificación se realizó tal como se describe a continuación usando IEX y SEC. La fracción resultante que contiene el producto se concentró mediante ultrafiltración (MWCO 5K) y el volumen se ajustó a aproximadamente 1 mL con tampón. Se determinó que la concentración de proteínas era 0,392 mg/mL por  $A_{280}$ , dando un rendimiento global del 40% de G-CSF.

### Ejemplo 6

#### Preparación de cisteína de PEG<sub>2</sub> (2)



##### a. Síntesis del Compuesto 1

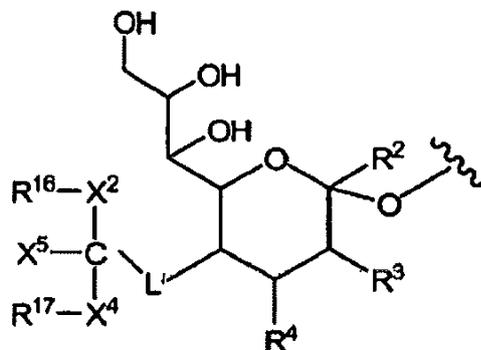
Hidróxido de potasio (84,2 mg, 1,5 mmol, en forma de polvo) se añadió a una disolución de L-cisteína (93,7 mg, 0,75 mmol) en metanol anhidro (20 L) bajo argón. La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 30 min, y luego se añadió mPEG-O-tosilato de masa molecular de 20 kilodalton (Ts; 1,0 g, 0,05 mmol) en varias porciones a lo largo 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 20 kilodalton de mPEG-O-tosilato. Después, la disolución se neutralizó con ácido acético, se ajustó el pH a pH 5,0 y se cargó en una columna de cromatografía de fase inversa (sílice C-18). La columna se eluyó con un gradiente de metanol/agua (el producto eluye a aproximadamente 70% de metanol), la elución de producto se vigiló por dispersión de luz por evaporación, y las fracciones apropiadas se recogieron y diluyeron con agua (500 mL). Esta disolución se sometió a cromatografía (intercambio iónico, XK 50 Q, perlas BIG, 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 disolución fue capturada a continuación en una columna de fase inversa (C-18 de sílice) y se eluyó con un gradiente de metanol/agua como se describe anteriormente. Las fracciones del producto se combinaron, se concentraron, se redisolieron en agua y se liofilizaron para dar 453 mg (44%) de un sólido de color blanco (1). Los datos estructurales para el compuesto fueron los siguientes:  $^1H$ -RMN (500 MHz;  $D_2O$ )  $\delta$  2,83 (t, 2H, O-C-CH<sub>2</sub>-S), 3,05 (q, 1H, S-CHH-CHN), 3,18 (q, 1H, (q, 1H, S-CHH-CHN), 3,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3,7 (t, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3,95 (q, 1H, CHN). La pureza del producto se confirmó por SDS-PAGE.

*b. Síntesis del Compuesto 2 (cisteína de PEG<sub>2</sub>)*

Se añadió trietilamina (~ 0,5 mL) gota a gota a una disolución del compuesto 1 (440 mg, 22  $\mu$ mol) disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (30 mL) hasta que la solución era de carácter básico. Una solución de 20 kilodalton de carbonato de mPEG-Op-nitrofenilo (660 mg, 33  $\mu$ mol) y N-hidroxisuccinimida (3,6 mg, 30,8 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) se añadió en varias porciones a lo largo de 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se separó después 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 disolución de carácter básico se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se neutralizó con ácido acético a un pH 7,0. Después, la disolución se cargó en una columna de cromatografía de fase inversa (sílice C-18). La columna se eluyó con un gradiente de metanol/agua (el producto eluye a aproximadamente el 70% de metanol), la elución de producto se vigiló por dispersión de luz por evaporación, y las fracciones apropiadas se recogieron y diluyeron con agua (500 mL). Esta disolución se sometió a cromatografía (intercambio iónico, XK 50 Q, perlas BIG, 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 disolución fue capturado a continuación en una columna de fase inversa (C-18 de sílice) y se eluyó con un gradiente de metanol/agua como se describe anteriormente. Las fracciones del producto se combinaron, se concentraron, se redisolviaron en agua y se liofilizaron para dar 575 mg (70%) de un sólido de color blanco (2). Los datos estructurales para el compuesto fueron los siguientes: <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz; D<sub>2</sub>O)  $\delta$  2,83 (t, 2H, O-C-CH<sub>2</sub>-S), 2,95 (t, 2H, O-C-CH<sub>2</sub>-S), 3,12 (q, 1H, S-CHH-CHN), 3,39 (s, 3H CH<sub>3</sub>O), 3,71 (t, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O). La pureza del producto se confirmó por SDS-PAGE.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos que comprende un grupo de enlace de glicosilo fijado a un residuo aminoácido de dicho péptido, comprendiendo dicho grupo de enlace de glicosilo un residuo sialilo modificado que tiene la fórmula:



5

en donde

$R^2$  es H,  $CH_2OR^7$ ,  $COOR^7$  u  $OR^7$ ,

en donde

$R^7$  representa H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido;

10  $R^3$  y  $R^4$  son miembros independientemente seleccionados de H, alquilo sustituido o no sustituido,  $OR^8$ ,  $NHC(O)R^9$ ,

en donde

$R^8$  y  $R^9$  se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido o ácido siálico;

15 L es un enlazador seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido,

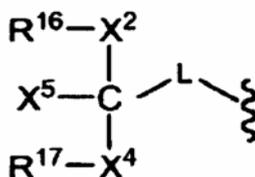
$R^{16}$  y  $R^{17}$  se seleccionan independientemente de brazos poliméricos;

$X^2$  y  $X^4$  se seleccionan independientemente de fragmentos de enlace que unen restos poliméricos  $R^{16}$  y  $R^{17}$  a C; y

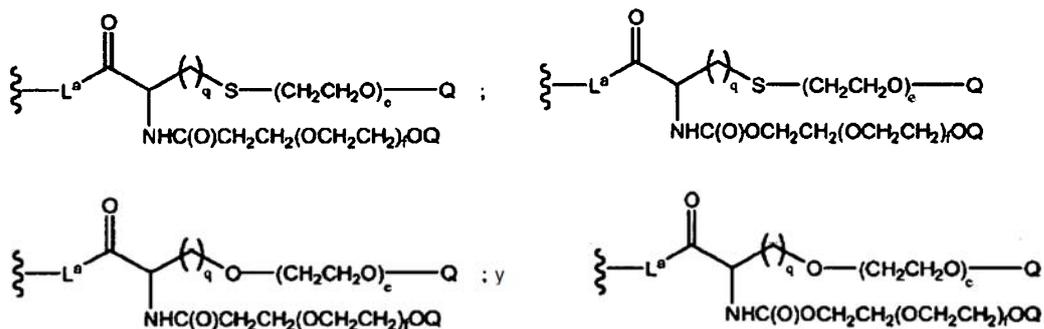
20  $X^5$  es un grupo no reactivo,

en donde dicho residuo aminoácido es un residuo asparagina.

2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el resto:



tiene una fórmula que es un miembro seleccionado entre:



en donde

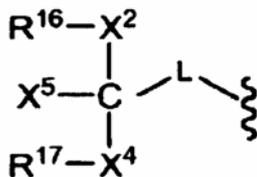
Q se selecciona entre H y alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido o no sustituido;

e y f son números enteros seleccionados independientemente desde 1 hasta 2500; y

5 q es un número entero de 0 a 20;

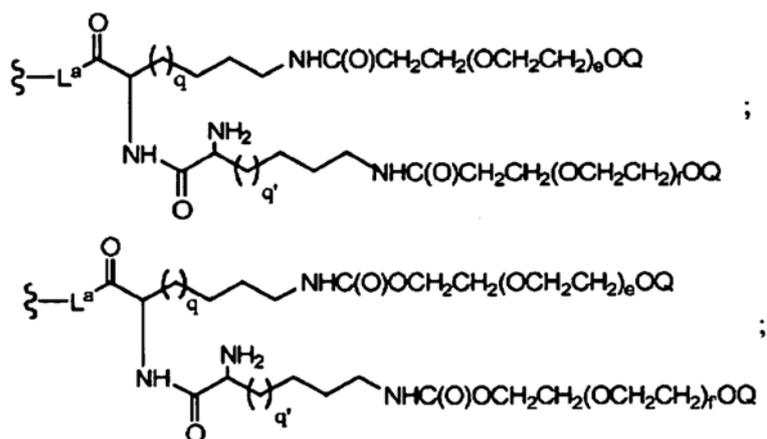
L<sup>a</sup> es un enlazador seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

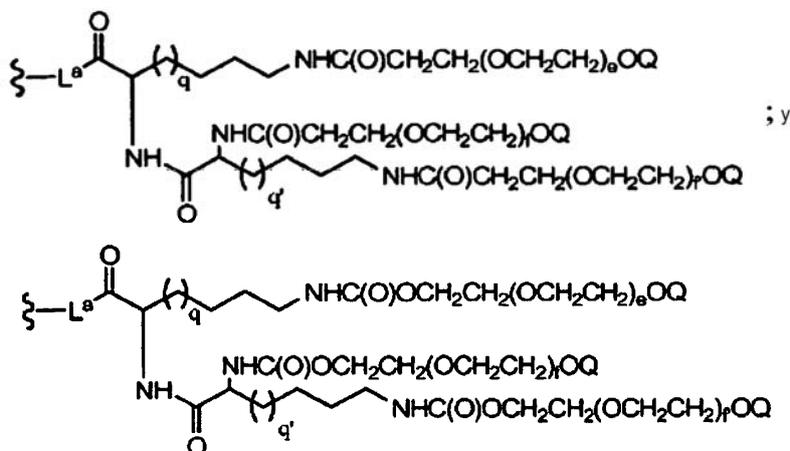
3. El péptido de acuerdo con reivindicación 1, en donde el resto:



10

tiene una fórmula que es un miembro seleccionado entre:





en donde

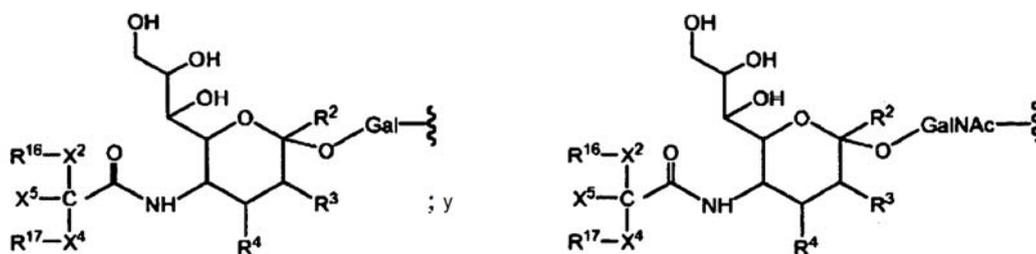
Q se selecciona entre H y alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido o no sustituido;

e, f y f' son números enteros seleccionados independientemente desde 1 hasta 2500; y

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

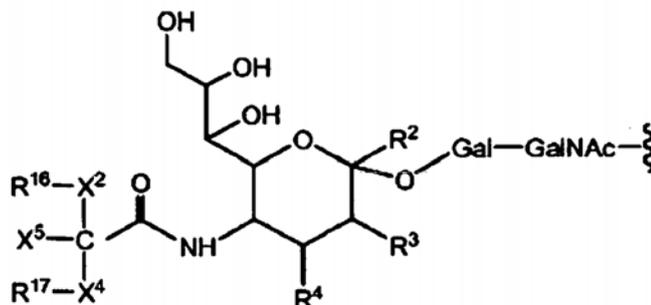
L<sup>a</sup> es un enlazador seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

4. El péptido de acuerdo con reivindicación 1, en el que dicho grupo de enlace de glicosilo tiene una fórmula seleccionada de:

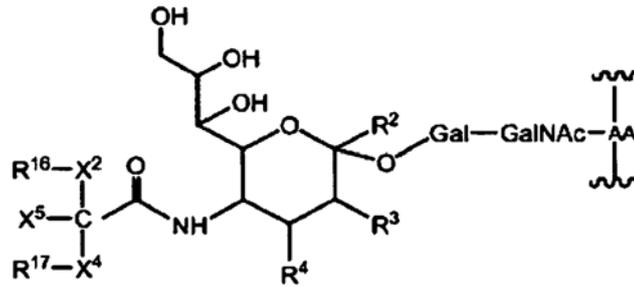


10

5. El péptido de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho grupo de enlace de glicosilo tiene la fórmula:



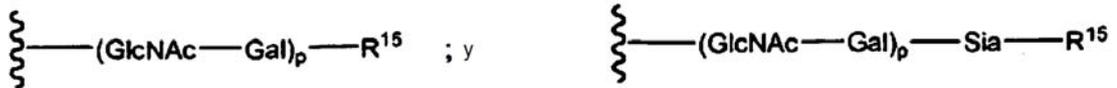
6. El péptido de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho grupo de enlace de glicosilo fijado a dicho residuo aminoácido tiene la fórmula:



en donde

AA es dicho residuo aminoácido de dicho péptido.

- 5 7. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho péptido comprende al menos un grupo de enlace de glicosilo que comprende una subestructura que tiene la fórmula:

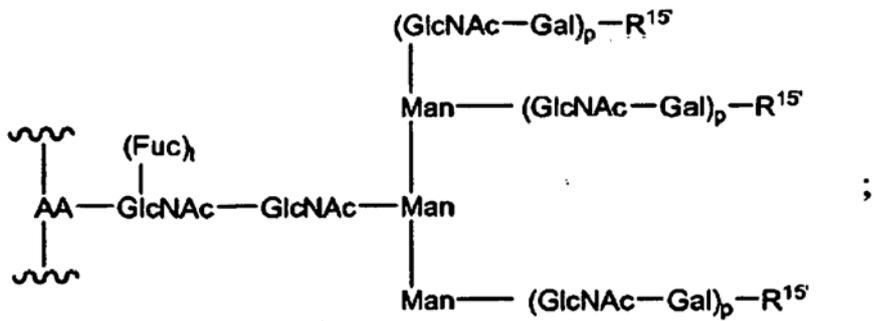
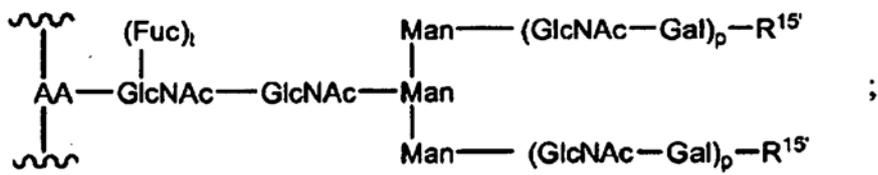
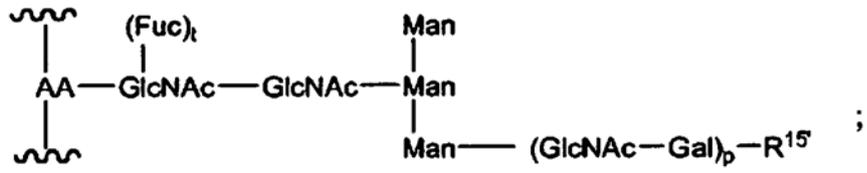
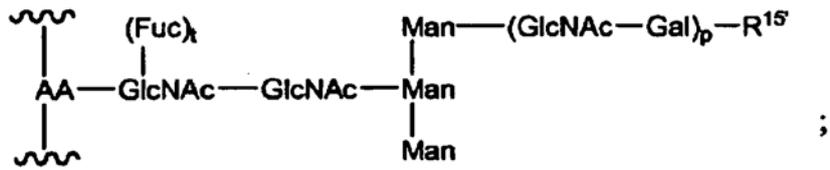


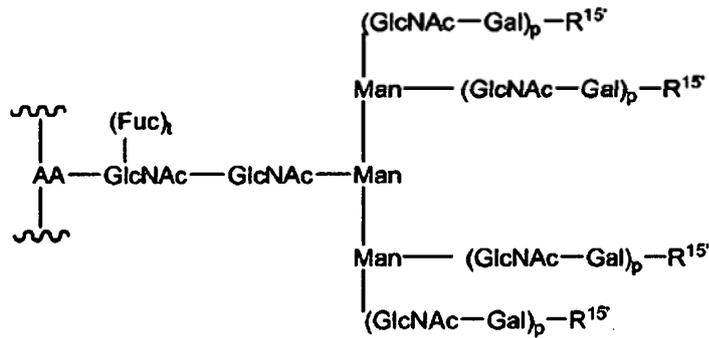
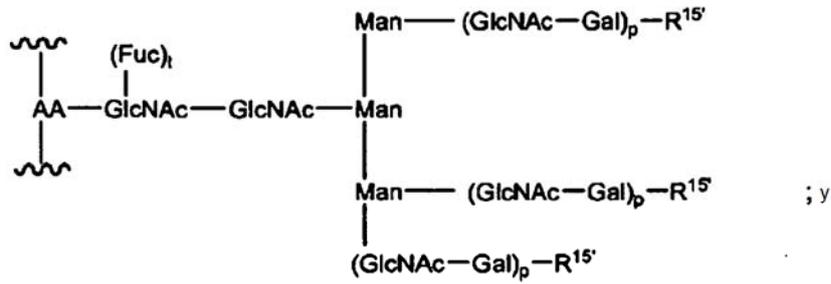
en donde

$\text{R}^{15}$  es dicho residuo sialilo modificado; y

p es un número entero de 1 a 10.

- 10 8. El péptido de acuerdo con reivindicación 7, en donde dicho al menos un grupo de enlace de glicosilo fijado a un aminoácido de dicho péptido tiene una fórmula seleccionada de:





y combinaciones de los mismos,

en donde

AA es dicho residuo aminoácido de dicho péptido;

5 t es un número entero igual a 0 ó 1;

p es un número entero de 1 a 10; y

R<sup>15'</sup> es un miembro seleccionado entre H, OH, ácido siálico, dicho residuo sialilo modificado y Sia-Sia<sup>P</sup>

en donde

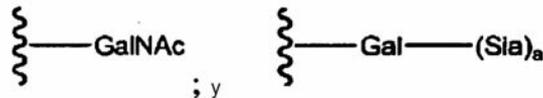
Sia<sup>P</sup> es dicho residuo sialilo modificado,

10 en donde al menos un R<sup>15'</sup> se selecciona de dicho residuo sialilo modificado y Sia-Sia<sup>P</sup>.

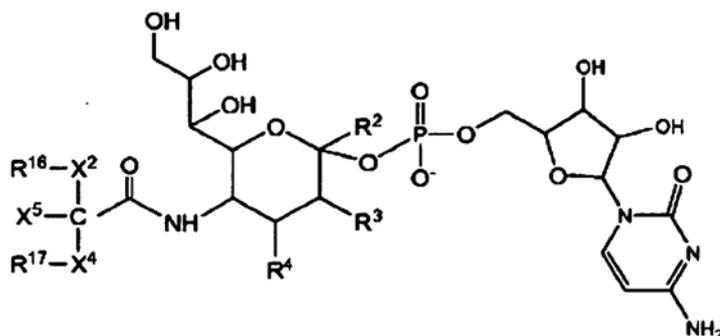
9. El péptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dicho péptido es un péptido de factor estimulante de colonias de granulocitos bioactivo.

10. Un método de preparación de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho método:

15 (a) poner en contacto un sustrato peptídico de factor estimulante de colonias de granulocitos que comprende un resto glicosilo seleccionado de:



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



en donde

a es 0 ó 1; y

5 (b) poner en contacto un producto de la etapa (a) con una enzima que transfiere ácido siálico-PEG de dicho donante a la Gal de dicho resto glicosilo, en condiciones apropiadas para dicha transferencia.

11. El método de la reivindicación 10, que comprende, además, antes de la etapa (a):

(b) expresar dicho sustrato peptídico de factor estimulante de colonias de granulocitos en un hospedante adecuado.

12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho hospedante se selecciona de una célula de insecto y una célula de mamífero.

10 13. El método de la reivindicación 12, en el que dicha célula de insecto es una línea de células de *Spodoptera frugiperda*.

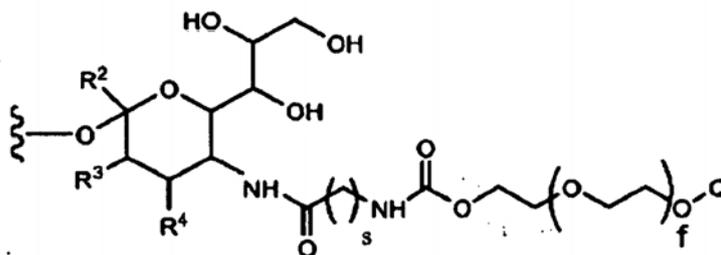
14. Un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para estimular la producción de leucocitos inflamatorios en un mamífero para tratar leucopenia crónica o relativa grave, leucemia mieloide aguda, SIDA y/u otras enfermedades de inmunodeficiencia.

15 15. Un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para tratar una infección.

16. Una formulación farmacéutica que comprende el péptido de factor estimulante de colonias de granulocitos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. Un péptido de factor estimulante de colonias de granulocitos que comprende un grupo de enlace de glicosilo fijado a un residuo aminoácido de dicho péptido, comprendiendo dicho grupo de enlace de glicosilo un residuo sialilo modificado que tiene la fórmula:

20



en donde

R<sup>2</sup> es H, CH<sub>2</sub>OR<sup>7</sup>, COOR<sup>7</sup>, COO<sup>-</sup> u OR<sup>7</sup>

en donde

25 R<sup>7</sup> representa H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido;

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o no sustituido, OR<sup>8</sup>, NHC(O)R<sup>9</sup>

en donde

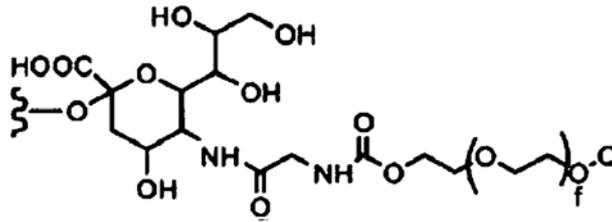
R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido o ácido siálico;

s es un número entero de 1 a 20;

f es un número entero de 1 a 2500; y

- 5 Q es un miembro seleccionado entre H y alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido o no sustituido, en donde dicho residuo aminoácido es asparagina.

18. El péptido de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicho residuo sialil modificado tiene la fórmula:



19. El péptido de acuerdo con la reivindicación 17, en donde Q se selecciona de H y CH<sub>3</sub>.

- 10 20. El péptido de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicho péptido comprende al menos un grupo de enlace de glicosilo que comprende una subestructura que tiene la fórmula:

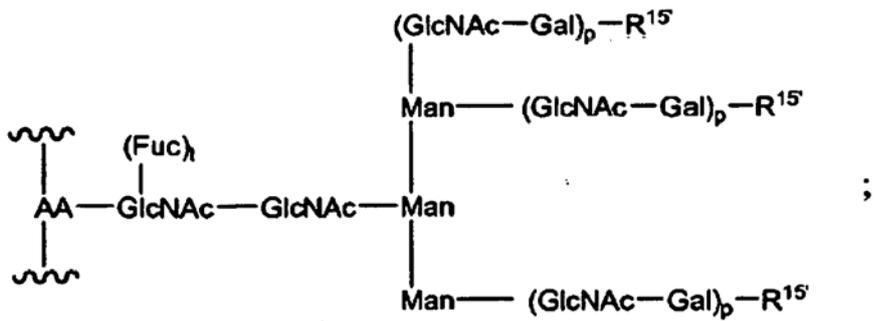
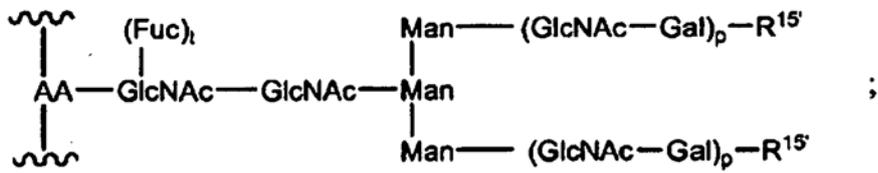
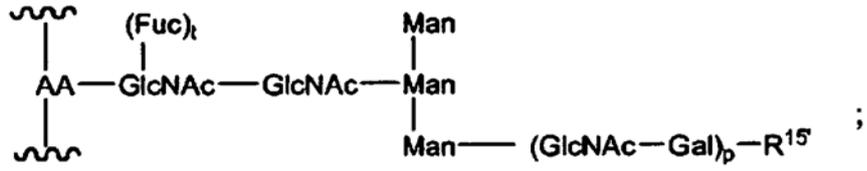
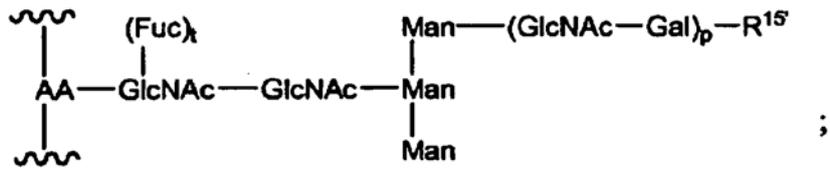


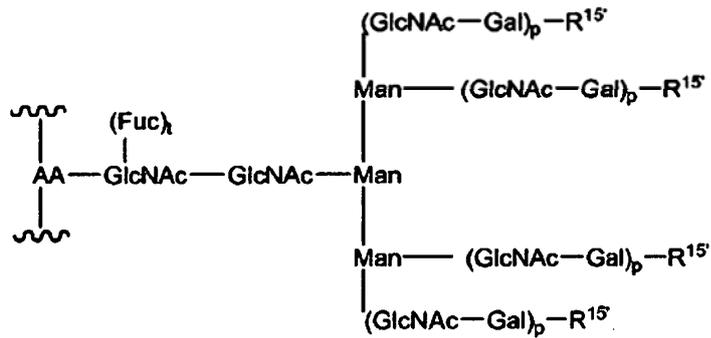
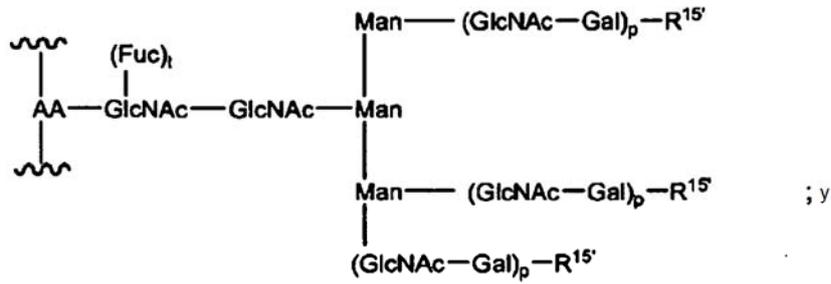
en donde

R<sup>15</sup> es dicho residuo sialilo modificado; y

- 15 p es un número entero de 1 a 10.

21. El péptido de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicho al menos un grupo de enlace de glicosilo fijado a un aminoácido de dicho péptido tiene una fórmula seleccionada de:





y combinaciones de los mismos,

en donde

AA es dicho residuo aminoácido de dicho péptido;

5 t es un número entero igual a 0 ó 1;

p es un número entero de 1 a 10; y

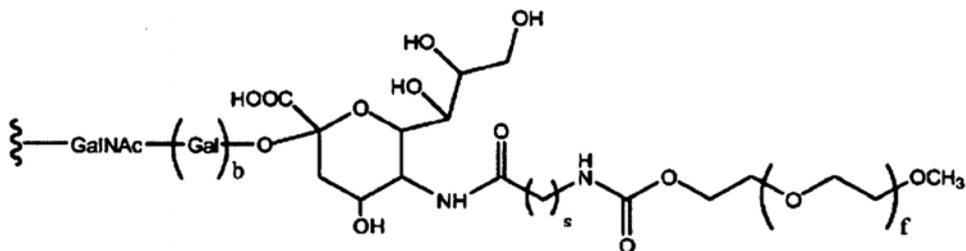
R<sup>15'</sup> es un miembro seleccionado entre H, OH, ácido siálico, dicho residuo sialilo modificado y Sia-Sia<sup>P</sup>

en donde

Sia<sup>P</sup> es dicho residuo sialilo modificado,

10 en donde al menos un R<sup>15'</sup> se selecciona de dicho residuo sialilo modificado y Sia-Sia<sup>P</sup>.

22. El péptido de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicho grupo de enlace de glicosilo comprende



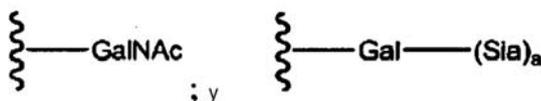
en que

b es 0 ó 1.

15 23. El péptido de acuerdo con reivindicación 22, en donde s es 1; y f es un número entero de aproximadamente 200 a aproximadamente 300.

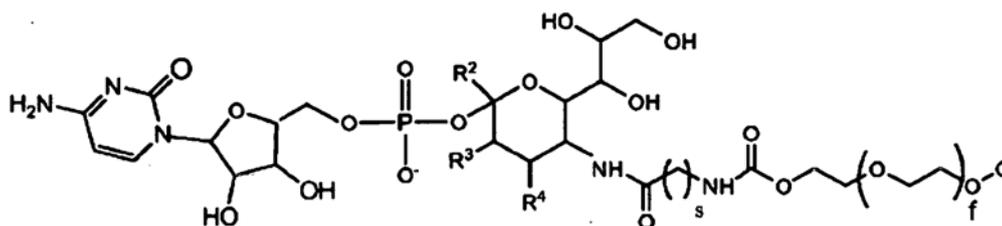
24. Un método de preparación de un péptido de factor estimulante de colonias de granulocitos acuerdo con reivindicación 17, comprendiendo dicho método:

(a) poner en contacto un sustrato peptídico de factor estimulante de colonias de granulocitos que comprende un resto glicosilo seleccionado de:



5

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



en donde

a es 0 ó 1; y

10 (b) poner en contacto un producto de la etapa (a) con una enzima que transfiere PEG-ácido siálico de dicho donante a la GalNAc, Gal o Sia de dicho resto glicosilo, en condiciones apropiadas para dicha transferencia.

25 El método de la reivindicación 24, que comprende, además, antes de la etapa (a):

(b) expresar dicho sustrato péptido de factor estimulante de colonias de granulocitos en un hospedante adecuado.

15 26. El método de la reivindicación 25, en el que dicho hospedante es una célula de insecto.

27. El método de la reivindicación 26, en el que dicha célula de insecto es una línea de células de *Spodoptera frugiperda*.

28. El método de la reivindicación 24, que comprende, además, poner en contacto dicho péptido con metionina.

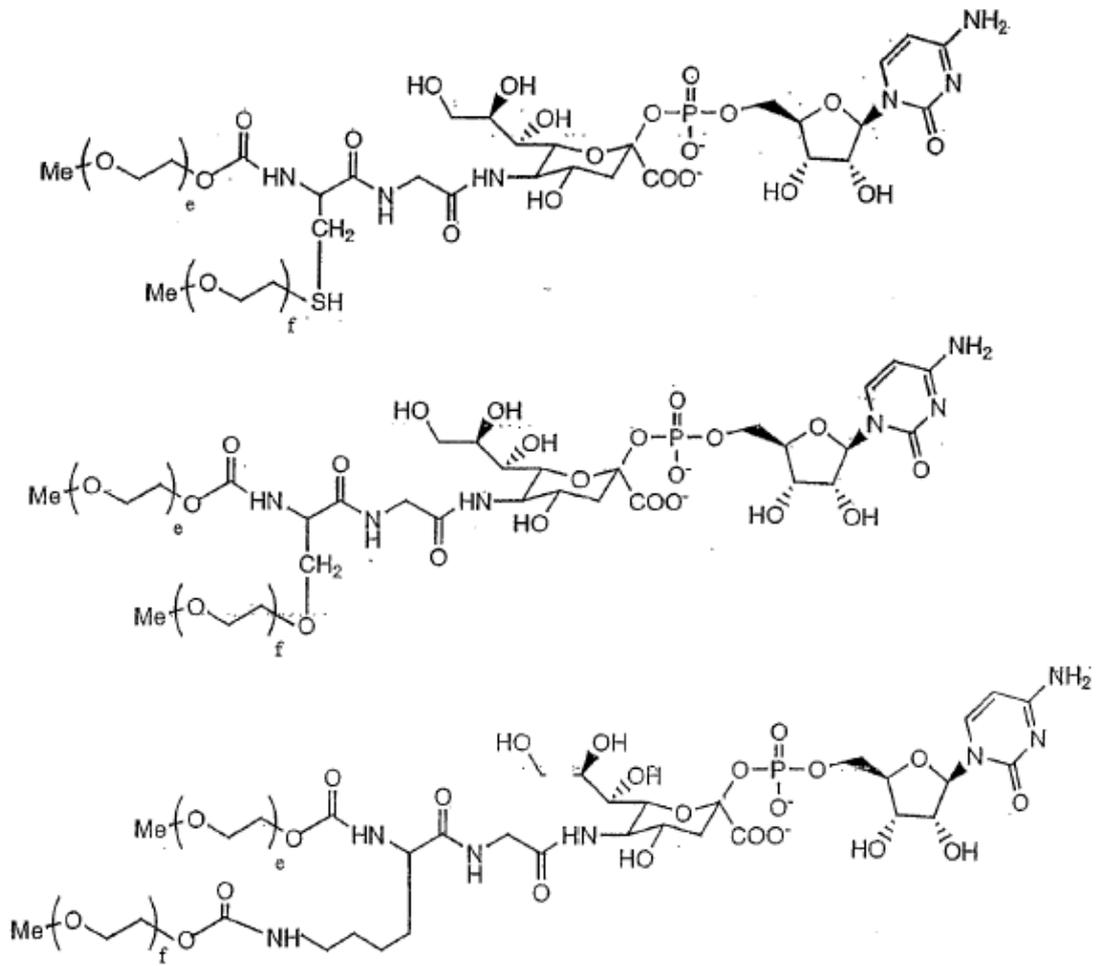
20 29. El método de la reivindicación 24, que comprende además, después de la etapa (b), purificar dicho péptido, en el que la metionina libre está presente durante dicha purificación.

30. El péptido de acuerdo con la reivindicación 17, para uso en un método para estimular la producción de leucocitos inflamatorios para tratar leucopenia crónica o relativa grave, leucemia mieloide aguda, SIDA y/u otras enfermedades de inmunodeficiencia en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar el péptido a dicho mamífero.

25 31. El péptido de acuerdo con la reivindicación 17, para uso en un método de tratamiento de una infección en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo dicho método la etapa de administrar al sujeto una cantidad del péptido eficaz para mejorar dicha afección en dicho sujeto.

32. Una formulación farmacéutica que comprende el péptido de factor estimulante de colonias de granulocitos según la reivindicación 17, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1A



**FIGURA 1B**

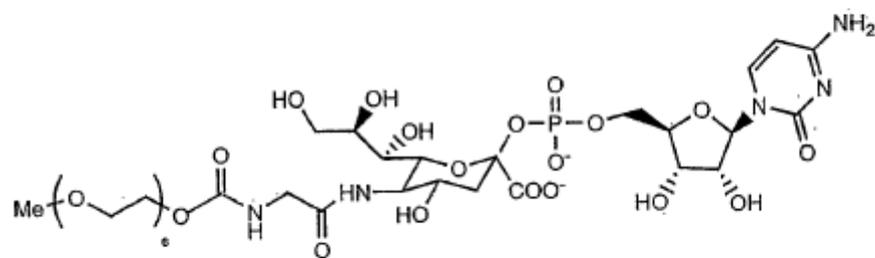


FIGURA 2

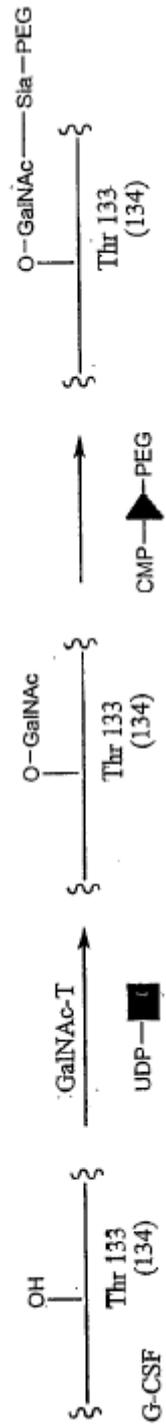


FIGURA 3

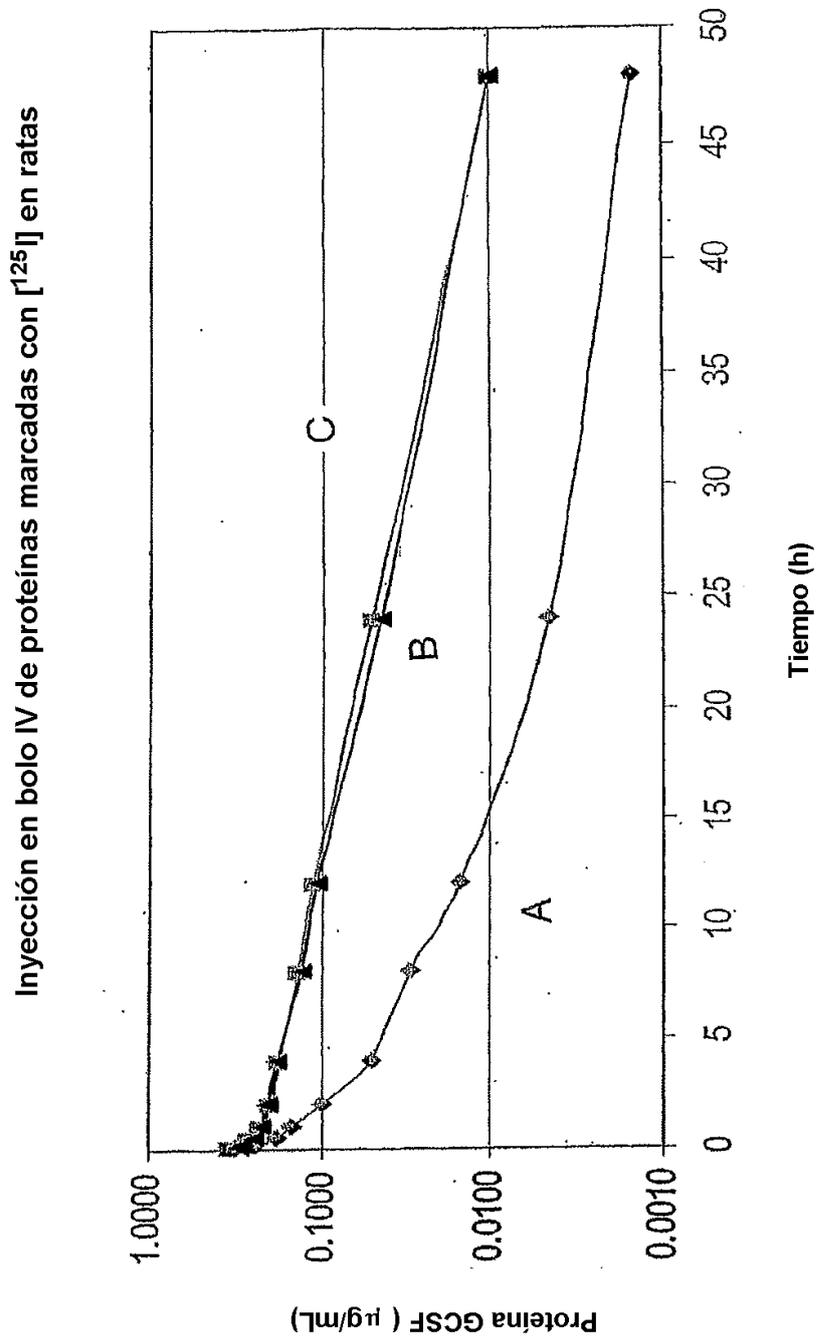


FIGURA 4

Respuesta WBC en ratones a variantes de GCSF (250  $\mu$ g/Kg)  
administradas i.v. a las 0 horas

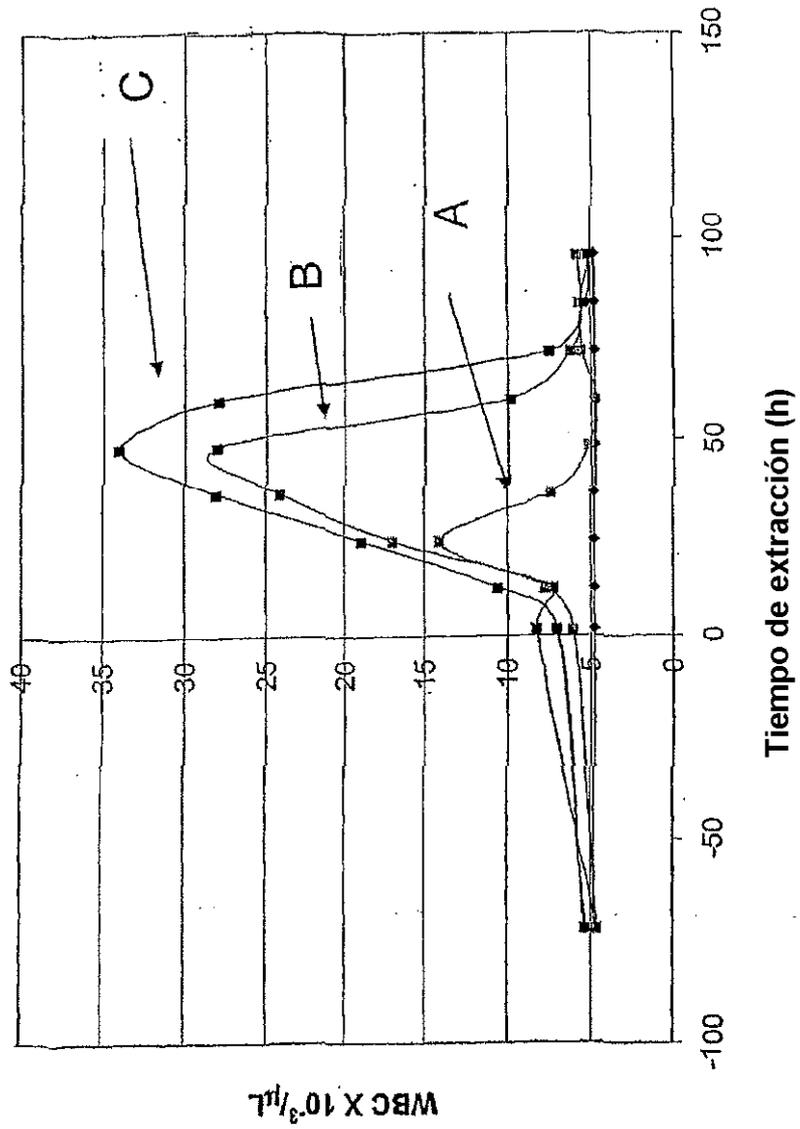
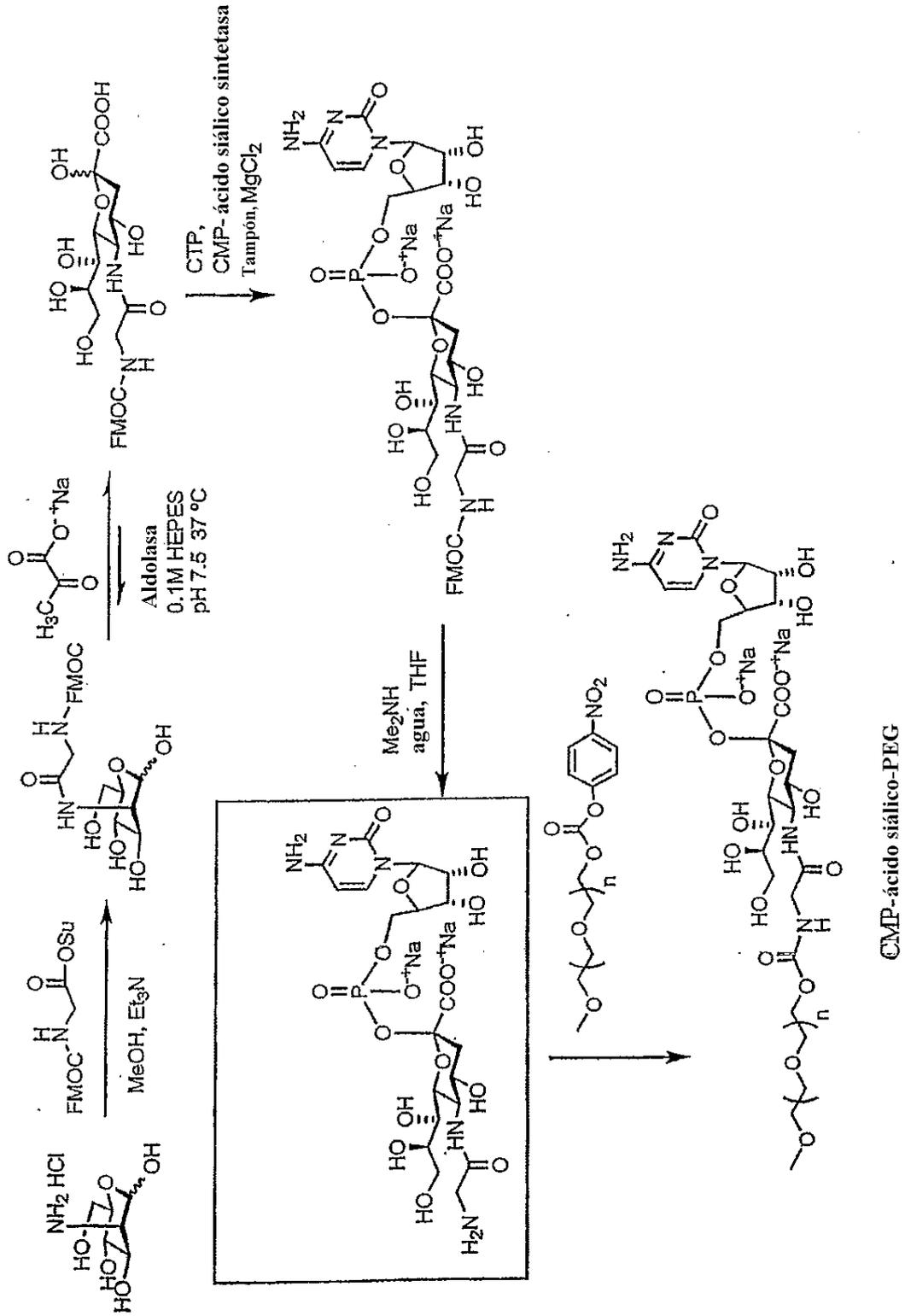


FIGURA 5



**FIGURA 6**

**variante 175 de aminoácido**

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA  
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS  
QLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFAT  
TTWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
VASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP (SEQ ID NO: 1).

**variante 174 de aminoácido**

TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA  
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS  
QLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFAT  
TTWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
VASHLQSFLEVSYRVLRLHLAQP (SEQ ID NO: 2).

FIGURA 7A

Proteina	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
At1g08280	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC011438 BT004583 NCL003070	AAF18241.1 AA042829.1 NP_172305.1	Q84W00 Q9SGD2	
At1g08660/F22O13.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC0Q3981 AY064135 AY124807 NC_003070 NM_180609	AAF99778.1 AAL36042.1 AAM70516.1 NP_172342.1 NP_850940.1	Q8VZJ0 Q9FRR9	
At3g48820/T21J18_90	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AY080589 AY133816 AL132963 NM_114741	AAL85966.1 AAM91750.1 CAB87910.1 NP_190451.1	Q8RY00 Q9M301	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3GAL-IV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ584673	CAE48298.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (St3Gal-V)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ585768	CAE51392.1		
A-co2,6-sialiltransferasa (Siat7b)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620651	CAF05850.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (SIAT8A)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.8	AJ699418	CAG27880.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (Siat8D)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ699421	CAG27883.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia-III (Siat8C)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ704563	CAG28696.1		
CMP $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (ST6Gal I)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.1	Y15111 NM_177517	CAA75385.1 NP_803483.1	018974	
sialiltransferasa 8 (fragmento)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AF450088	AAL47018.1	Q8WN13	
sialiltransferasa ST3Gal-II (Siat4B)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748841	CAG44450.1		
sialiltransferasa ST3Gal-III (Siat6)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748842	CAG44451.1		
sialiltransferasa ST3Gal-VI (Siat10)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748843	CAG44452.1		
ST3Gal I	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ305086	CAC24698.1	Q9BEG4	
St6GalNAc-VI	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620949	CAF06586.1		
CDS4	<i>Branchiostoma floridae</i>	n.d.	AF391289	AAM18873.1	Q8T771	
polisialiltransferasa (PST) (fragmento) ST8Sia IV	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210729	AAF17105.1	Q9TT09	
polisialiltransferasa (STX) (fragmento) ST8Sia II	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210318	AAF17104.1	Q9TT10	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona intestinalis</i>	n.d.	AJ626815	CAF25173.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona savignyi</i>	n.d.	AJ626814	CAF25172.1		
$\alpha$ -2,8-polisialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Cricetulus griseus</i>	2.4.99.-	Z46801	AAE28634 CAA86822.1	Q64690	
Gal $\beta$ -1,3/4-GlcNAc $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa St3Gal I	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY266675	AAP22942.1	Q80WLO	
Gal $\beta$ -1,3/4-GlcNAc $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa St3Gal II (fragmento)	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY266676	AAP22943.1	Q80WK9	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783740	CAH04017.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783741	CAH04018.1		

FIGURA 7B

Proteína	Organismo		Nº EC	GenBank / GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ626821	CAF25179.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744809	CAG32845.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal V-r (relacionada con Siat5)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783742	CAH04019.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6Gal(Siat1)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744801	CAG32837.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II(Siat7B)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ634459	CAG25680.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646874	CAG26703.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646883	CAG26712.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sial (Siat8A) (fragmento)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715535	CAG29374.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8SialI (Siat 8C) (fragmento)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715543	CAG29382.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IV (Siat 8D) (fragmento)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715545	CAG29384.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E) (fragmento)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715546	CAG29385.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VI (Siat 8F) (fragmento)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715551	CAG29390.1		
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ627627	CAF29495.1		
N-glican $\alpha$ -2,8-sialiltransferasa		<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC050483 AY055462 NM_153662	AAH50483.1 AAL17875.1 NP_705948.1	Q7ZU51 Q8QH83	
ST3Gal III-relacionada con (siat6r)		<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC053179 AJ626820 NM_200355	AAH53179.1 CAF25178.1 NP_956649.1	Q7T3B9	
St3Gal-V		<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ619960	CAF04061.1		
st6GalNAc-VI		<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC060932 AJ620947	AAH60932.1 CAF06584.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (CG4871)ST6Gal		<i>Drosophila melanogaster</i>	2.4.99.1	AE003465 AF218237 AF397532 AE003465 NMJD79129 NM_166684	AAF47256.1 AAG13185.1 AAK92126.1 AAM70791.1 NIP_523853.1 NP_726474.1	Q9GU23 Q9W121	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-VI)		<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585767 AJ627204	CAE51391.1 CAF25503.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I		<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.4	X80503 MM_205217	CAA56666.1 NP_990548.1	Q11200	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (fragmento)		<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF035250	AAC14163.1	O73724	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3GAL-II)		<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585761	CAE51385.2		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (Siat7b)		<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ620653	CAF05852.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I		<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	X75558 NM_205241	CAA53235.1 NP_990572.1	Q92182	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa		<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.3	-	AAE68028.1	Q92183	

FIGURA 7C

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank/GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
ST6GalNAc 1			- X74946 NM_205240	AAE68029.1 CAA52902.1 NP_990571.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	X77775 NM_205233	AAE68030.1 CAA54813.1 NP_990564.1	Q92184	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (SIAT7C) (fragmento)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ634455	CAG25677.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (SIAT7E) (fragmento)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ646877	CAG26706.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (GD3 Sintasa) ST8Sial	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	U73176	AAC28888.1	P79783	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (SIAT8B)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699419	CAG27881.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (SIAT8C)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699420	CAG27882.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (SIAT8F)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699424	CAG27886.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia-V (SIAT8C)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ704564	CAG28697.1		
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6- sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ627629	CAF29497.1		
GM3 sintasa (SIAT9)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.9	AY515255	AAS83519.1		
polisialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF008194	AAB95120.1	042399	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	L29555 AF059321 L13972 AF155238 AF186191 BC018357 NM_003033 NM_173344	AAA36612.1 AAC17874.1 AAC37574.1 AAD39238.1 AAG29876.1 AAH18357.1 NP_003024.1 NPJ775479.1	Q11201 060677 Q9UN51	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	U63090 BC036777 X96667 NM_006927	AAB40389.1 AAH36777.1 CAA65447.1 NP_008858.1	Q16842 000654	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (SiaT6)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.6	L23768 BC050380 AF425851 AF425852 AF425853 AF425854 AF425855 AF425856 AF425857 AF425858 AF425859 AF425860 AF425861 AF425862 AF425863 AF425864 AF425865 AF425866 AF425867 AY167992 AY167993 AY167994	AAA35778.1 AAH50380.1 AA013859.1 AA013860.1 AA013861.1 AA013862.1 AA013863.1 AA013864.1 AA013865.1 AA013866.1 AA013867.1 AA013868.1 AA013869.1 AA013870.1 AA013871.1 AA013872.1 AA013873.1 AA013874.1 AA013875.1 AAO38806.1 AAO38807.1 AAO38808.1	Q11203 Q86UR6 Q86UR7 Q86UR8 Q86UR9 Q86US0 Q86US1 Q86US2 Q8IX43 Q8IX44 Q8IX45 Q8IX46 Q8IX47 Q8IX48 381X49 381X50 381X51 381X52 381X53 381X54 381X55 381X56	

FIGURA 7D

Proteína	Organismo		Nº EC	GenBank / GenPept		Swiss	PDB
						Prot	/3D
				AY167995 AY167996 AY167997 AY167998 NM_006279 NM_174964 NM_174965 NM_174966 NM_174967 NM_174969 NM_174970 NM_174972	AAO38809.1 AAO38810.1 AAO38811.1 AAO38812.1 NP_006270.1 NP_777624.1 NP_777625.1 NP_777626.1 NP_777627.1 NP_777629.1 NP_777630.1 NP_777632.1	Q8IX57 Q8IX58	
<b>α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV</b>		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L23767 AF035249 BC010645 AY040826 AF516602 AF516603 AF516604 AF525084 X74570 CR456858 NM_006278	AAA16460.1 AAC14162.1 AAH10645.1 AAK93790.1 AAM66431.1 AAM66432.1 AAM66433.1 AAM81378.1 CAA52662.1 CAG33139.1 NP_006269.1	Q11206 Q60497 Q96QQ9 Q8N6A6 Q8N6A7 Q8NFD3 Q8NFG7	
<b>α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI</b>		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	AF119391 BC023312 AB022918 AX877828 AX886023 NM_006100	AAD39131.1 AAH23312.1 BAA77609.1 CAE89895.1 CAF00161.1 NP_006091.1	Q9Y274	
<b>α-2,6-sialiltransferasa (ST6Gal II; KIAA1877)</b>		<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC008680 AB058780 AB059555 AJ512141 AX795193 AX795193 NM_032528	AAH08680.1 BAB47506.1 BAC24793.1 CAD54408.1 CAE48260.1 CAE48261.1 NP_115917.1	Q86Y44 Q8IUG7 Q96HE4 Q96JF0	
<b>α-2,6-sialiltransferasa (ST6GALNAC III)</b>		<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC059363 AY358540 AK09121.5 AJ507291 NM_152996	AAH59363.1 AAQ88904.1 BAC03611.1 CAD45371.1 NP_694541.1	Q8N259 Q8NDV1	
<b>α-2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc V)</b>		<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC001201 AK056241 AL035409 AJ507292 NM_030965	AAH01201.1 BAB71127.1 OAB72344.1 CAD45372.1 NP_112227.1	Q9BVH7	
<b>α-2,6-sialiltransferasa (SThM) ST6GalNAc II</b>		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U14550 BC040455 AJ251053 NM_006456	AAA52228.1 AAH40455.1 CAB61434.1 NP_006447.1	Q9UJ37 Q12971	
<b>α-2,6-sialyltransferase ST6Gal I</b>		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.1	BC031476 BC040009 A17362 A23699 X17247 X54363 X62822 NM_003032 NMJ73216	AAH31476.1 AAH40009.1 CAA01327.1 CAA01686.1 CAA35111.1 CAA38246.1 CAA44634.1 NP_003023.1 NP_775323.1	P15907	
<b>α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I</b>		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.3	BC022462 AY096001 AY358918 AK000113 Y11339	AAH22462.1 AAM22800.1 AAQ89277.1 BAA90953.1 CAA72179.2	Q8TBJ6 Q9NSC7 Q9NXQ7	

FIGURA 7E

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
				NM_018414	NP_060884.1	
$\alpha$ -2,8-polisialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L41680 BC027866 BC053657 NM_005668	AAC41775.1 AAH27866.1 AAH53657.1 NP_005659.1	Q8N1F4 Q92187 Q92693	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.8	L32867 L43494 BC046158 - AY569975 D26360 X77922 NM_003034	AAA62366.1 AAC37586.1 AAH46158.1 AAQ53140.1 AAS75783.1 BAA05391.1 CAA54891.1 NP_003025.1	Q86X71 Q92185 Q93064	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L29556 U82762 U33551 BC069584 NM_006011	AAA36613.1 AAB51242.1 AAC24458.1 AAH69584.1 NP_006002.1	Q92186 Q92470 Q92746	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF004668 AF003092 NM_015879	AAB87642.1 AAC15901.2 NP_056963.1	043173 Q9NS41	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U91641 CR457037 NM_013305	AAC51727.1 CAG33318.1 NP_037437.1	O15466	
ENSP00000020221 (fragmento)		n.d.	AC023295			
Lactosilceramida $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal V)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.9	AF105026 AF119415 BC065936 AY152815 AAP65066 AY359105 AB018356 AX876536 NM_003896	AAD14634.1 AAF66146.1 AAH65936.1 AA016866.1 AAP65066.1 AAQ89463.1 BAA33950.1 CAE89320.1 NP_003887.2	Q9UNP4 O94902	
N-acetilgalactosaminide $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc VI)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	BC006564 BC007802 BC016299 AY358672 AB035173 AK023900 AJ507293 AX880950 CR457318 NM_013443	AAH06564.1 AAH07802.1 AAH16299.1 AAQ89035.1 BAA87035.1 BAB14715.1 CAD45373.1 CAE91145.1 CAG33599.1 NP_038471.2	Q969X2 Q9H8A2 Q9ULB8	
N-acetilgalactosaminida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa IV (ST6GalNAc IV)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF127142 BC036705 - AB035172 AK000600 Y17461 AJ271734 AX061620 AX068265 AX969252 NM_014403 NM_175039	AAF00102.1 AAH36705.1 AAP63349.1 BAA87034.1 BAA91281.1 CAB44354.1 CAC07404.1 CAC24981.1 CAC27250.1 CAF14360.1 NP_055218.3 NP_778204.1	Q9H4F1 Q9NWU6 Q9UKU1 Q9ULB9 Q9Y3G3 Q9Y3G4	
ST8SIA-VI (fragmento)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AJ621583 XM_291725	CAF21722.1 XP_291725.2		
producto proteínico no denominado	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AK021929 AX881696	BAB13940.1 CAE91353.1	Q9HAA9	
Gal $\beta$ -1,3/4-GlcNAc $\alpha$ -	<i>Mesocricetus</i>	2.4.99.6	AJ245699	CAB53394.1	Q9QXF6	

FIGURA 7F

Proteína	Organismo		Nº EC	GenBank / GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
2,3-sialiltransferasa (ST3Gal III)		<i>auratus</i>					
Galβ-1,3/4-GlcNAc α-2,3-sialiltransferasa (ST3Gal IV)		<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.6	AJ245700	CAB53395.1	Q9QXF5	
GD3 sintasa (fragmento) ST8Sia I		<i>Mesocricetus auratus</i>	n.d.	AF141657	AAD33879.1	Q9WUL1	
polisialiltransferasa (ST8Sia IV)		<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.-	AJ245701	CAB53396.1	Q9QXF4	
α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>St3gal1</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF214028 AK031344 AK078469 X73523 NM_009177	AAF60973.1 BAC27356.1 BAC37290.1 CAA51919.1 NP_033203.1	P54751 Q11202 Q9JL30	
α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal II	<i>St3gal2</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC015264 BC066064 AK034554 AK034863 AK053827 X76989 NM_009179 NM_178048	AAH15264.1 AAH66064.1 BAC28752.1 BAC28859.1 BAC35543.1 CAA54294.1 NP_033205.1 NP_835149.1	Q11204 Q8BPL0 Q8BSA0 Q8BSE9 Q91WH6	
α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal III	<i>St3gal3</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.	BC006710 AK005053 AK013016 X84234 NM_009176	AAH067.10.1 BAB23779.1 BAB28598.1 CAA59013.1 NP_033202.2	P97325 Q922X5 Q9CZ48 Q9DBB6	
α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV	<i>St3gal4</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC011121 BC050773 D28941 AK008543 AB061305 X95809 NM_009178	AAH11121.1 AAH50773.1 BAA06068.1 BAB25732.1 BAB47508.1 CAA65076.1 NP_033204.2	P97354 Q61325 Q91Y74 Q921R5 Q9CVE8	
α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI	<i>St3gal6</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF119390 BC052338 AB063326 AK033562 AK041173 NM_018784	AAD39130.1 AAH52338.1 BAB79494.1 BAC28360.1 BAC30851.1 NP_061254	Q80UR7 Q8BLV1 Q8VIB3 Q9WVG2	
α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II	<i>St6galnac2</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	NM_009180 BC010208 AB027198 AK004613 X93999 X94000 NM_009180	6677963 AAH10208.1 BAB00637.1 BAB23410.1 CAA63821.1 CAA63822.1 NP_033206.2	P70277 Q9DC24 Q9JJM5	
α-2,6-sialiltransferasa ST6Gal I	<i>St6gal1</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.1	BC027833 D16106. AK034768 AK084124 NM_145933	AAE68031.1 AAH27833.1 BAA03680.1 BAC28828.1 BAC39120.1 NP_666045.1	Q64685 Q8BM62 Q8K1L1	
α-2,6-sialiltransferasa ST6Gal II	<i>St6gal2</i>	<i>Mus musculus</i>	n.d.	AK082566 AB095093 AK129462 NM_172829	BAC38534.1 BAC87752.1 BAC98272.1 NP_766417.1	Q8BUU4	
α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I	<i>St6galnac1</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.3	Y11274 NM_011371	CAA72137.1 NP_035501.1	Q9QZ39 Q9JJP5	
α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III	<i>St6galnac3</i>	<i>Mus musculus</i>	n.d.	BC058387 AK034804 Y11342 Y11343	AAH58387.1 BAC28836.1 CAA72181.2 CAB95031.1	39WUV2 39JHP5	

FIGURA 7G

Proteína	Organismo		Nº EC.	GenBank/GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
				NM_011372	NP_035502		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV	<i>St6galnac4</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.7	BC056451 AK085730 AJ007310 Y15779 Y15780 Y19055 Y19057 NM_011373	AAH56451.1 BAC39523.1 CAA07446.1 CAB43507.1 CAB43514.1 CAB93946.1 CAB93948.1 NP_035503.1	Q8C3J2 Q9JHP2 Q9R2B6 088725 Q9JHP0 Q9QUP9 Q9R2B5	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I	<i>St8sia1</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	L38677 BC024821 AK046188 AK052444 X84235 AJ401102 NMJ311374	AAA91869.1 AAH24821.1 BAC32625.1 BAC34994.1 CAA59014.1 CAC20706.1 NP_035504.1	064468 Q64687 Q8BL76 Q8BWI0 Q8K1C1 Q9EPK0	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (ST8Sia VI)	<i>St8sia6</i>	<i>Mus musculus</i>	n.d.	AB059554 AK085105 NM_145838	BAC01265.1 BAC39367.1 NP_665837.1	Q8BI43 Q8K4T1	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II	<i>St8sia2</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	X83562 X99646 X99647 X99648 X99649 X99650 X99651 NM_009181	CAA58548.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 NP_033207.1	O35696	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IV	<i>St8sia4</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	BC060112 AK003690 AK041723 AJ223956 X86000 Y09484 NM_009183	AAH60112.1 BAB22941.1 BAC31044.1 CAA11685.1 CAA59992.1 CAA70692.1 NP_033209.1	Q64692 Q8BY70	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V	<i>St8sia5</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC034855 AK078670 X98014 X98014 X98014 NM_013666 NM_153124 NM_177416	AAH34855.1 BAC37354.1 CAA66642.1 CAA66643.1 CAA66644.1 NP_038694.1 NP_694764.1 NP_803135.1	P70126 P70127 P70128 Q8BJW0 Q8JZQ3	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III	<i>St8sia3</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC075645 AK015874 X80502 NM_009182	AAH75645.1 BAB30012.1 CAA56665.1 NPJ333208.1	Q64689 Q9CUJ6	
GD1 sintasa (ST6GalNAc V)	<i>St6galnac5</i>	<i>Mus musculus</i>	n.d.	BC055737 AB030836 AB028840 AK034387 AK038434 AK042683 NM_012028	AAH55737.1 BAA85747.1 BAA89292.1 BAC28693.1 BAC29997.1 BAC31331.1 NP_036158.2	Q8CAM7 Q8CBX.1 Q9QYJ1 Q9R0K6	
GM3 sintasa ( $\alpha$ -2,3- sialiltransferasa) ST3Gal V	<i>St3gal5</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.9	AF119416 - AB01.8048 AB013302 AK012961 V15003 NM_011375	AAF66147.1 AAP65063.1 BAA33491.1 BAA76467.1 3AB28571.1 CAA75235.1 NP_035505.1	O88829 Q9CZ65 Q9QWF9	
N- acetilgalactosaminida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc VI)	<i>St6galnac6</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC036985 AB035174 AB035123 AK030648	AAH36985.1 BAA87036.1 BAA95940.1 BAC27064.1	Q8CDC3 Q8JZW3 Q9JM95 Q9R0G9	

FIGURA 7H

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank / GenRept		Swiss Prot	PDB /3D
				NM_016973	NP_Q58669.1	
M138L	<i>Myxoma virus</i>	n.d.	U46578 AF170726 NCL001132	AAD00069.1 AAE61323.1 AAE61326.1 AAF15026.1 NP_051852.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (St3Gal-I)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ585760	CAE51384.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (SiatI)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ620649	CAF05848.1		
$\alpha$ -2,8-polisialiltransferasa IV (ST8Sia IV)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB094402	BAC77411.1	Q7T2X5	
GalNAc $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (RtST6GalNAc)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB097943	BAC77520.1	Q7T2X4	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV OJ1217_F02.7	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2.4.99.-	AF121967	AAF28871.1	Q9N257	
OSJNBa0043L24.2 o OSJNBb0002J11.9	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AL731626 AL662969	CAD41185.1 CAE04714.1		
P0683f02.18 o P0489B03.1	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AP003289 AP003794	BAB63715.1 BAB90552.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAcV (Siat7E) (fragmento)	<i>Oryzias latipes</i>	n.d.	AJ646876	CAG26705.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744803	CAG32839.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744804	CAG32840.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626819	CAF25177.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626824	CAF25182.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI (Siat 10)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744808	CAG32844.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (Sia7A)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748740	CAG38615.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (Sia7B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748741	CAG38616.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (Siat7C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ634454	CAG25676.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646870	CAG26699.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAe V (Siat7E)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646875	CAG26704.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646882	CAG26711.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa 8A (Siat8A)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.8	AJ697658	CAG26896.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa 8B (Siat8B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697659	CAG26897.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa 8C (Siat8C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697660	CAG26898.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa 8D (Siat8D)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697661	CAG26899.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697662	CAG26900.1		

FIGURA 71

Proteina	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
<b>8E (Siat8E)</b>						
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa <b>8F (Siat8F)</b>	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697663	CAG26901.1		
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa I (ST6Gal I; SiatI)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.1	AJ627624	CAF29492.1		
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ627625	CAF29493.1		
<b>GM3 sintasa ST3Gal V (Siat9)</b>	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744807	CAG32843.1		
<b>S138L</b>	<i>Rabbit fibroma virus Kasza</i>	n.d.	NC_001266	NP_052025		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa <b>ST3Gal III</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.6	M97754 NM_031697	AAA42146.1 NP_113885.1	Q02734	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa <b>ST3Gal IV (Siat4c)</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626825	CAF25183.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa <b>ST3Gal VI</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626743	CAF25053.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa <b>ST3Gal II</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	X76988 NM_031695	CAA54293.1 NP_113883.1	Q11205	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa <b>ST6Gal I</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.1	M18769 M83143	AAA41196.1 AAB07233.1	P13721	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa <b>ST6GalNAc I (Siat7A)</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634458	CAG25684.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa <b>ST6GalNAc II (Siat7B)</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634457	CAG25679.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa <b>ST6GalNAc III</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L29554 BC072501 NM_019123	AAC42086.1 AAH72501.1 NP_061996.1	Q64686	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa <b>ST6GalNAc IV (Siat7D)</b> (fragmento)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646871	CAG26700.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa <b>ST6GalNAc V (Siat7E)</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646872	CAG26701.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa <b>ST6GalNAc VI (Siat7F)</b> (fragmento)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646881	CAG26710.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) <b>ST8Sia I</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U53883 D45255	AAC27541.1 BAA08213.1	P70554 P97713	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (SIAT8E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699422	CAG27884.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (SIAT8F)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699423	CAG27885.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa <b>ST8Sia II</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L13445 NM_057156	AAA42147.1 NP_476497.1	Q07977 Q64688	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa <b>ST8Sia III</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U55938 NM_013029	AAB50061.1 NP_037161.1	P97877	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa <b>ST8Sia IV</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U90215	AAB49989.1	O08563	
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ627626	CAF29494.1		
<b>GM3 sintasa ST3Gal V</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AB018049 NM_031337	BAA33492.1 NP_112627.1	O88830	

FIGURA 7J

Proteína	Organismo		Nº EC	GenBank/GenPept		Swiss	PDB
						Prot	/3D
sialiltransferasa ST3Gal-I (Siat4A)		<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ748840	CAG44449.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (3t3Gal-II)		<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ585763	CAE51387.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (Siat7b)		<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ620650	CAF05849.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (St6galnac)		<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	n.d.	AJ699425	CAG27887.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3GAL-III)		<i>Sus scrota</i>	n.d.	AJ585765	CAE51389.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3GAL-IV)		<i>Sus scrota</i>	n.d.	AJ584674	CAE48299.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I		<i>Sus scrota</i>	2.4.99.4	M97753	AAA31125.1	Q02745	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (fragmento) ST6Gal I		<i>Sus scrota</i>	2.4.99.1	AF136746	AAD33059.1	Q9XSG8	
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNac-V)		<i>Sus scrota</i>	n.d.	AJ620948	CAF06585.2		
sialiltransferasa (fragmento) ST6Gal 1		<i>sus scrota</i>	n.d.	AF041031	AAC15633.1	O62717	
ST6GALNAC-V		<i>Sus scrota</i>	n.d.	AJ620948	CAF06585.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Siat5-r)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744805	CAG32841.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal 1 (Siat4)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626816	CAF25174.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5) (fragmento)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626817	CAF25175.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626818	CAF25176.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6Gal 1 (SiatI)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744800	CAG32836.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNac II (Siat7B)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634460	CAG25681.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNac II B (relacionada con Siat7B)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634461	CAG25682.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNac III (Siat7C) (fragmento)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634456	CAG25678.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNac IV (siat7D) (fragmento)		<i>Takifugu rubripes</i>	2.4.99.3	Y17466 AJ646869	CAB44338.1 CAG26698.1	Q9W6U6	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNac V (Siat7E) (fragmento)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646873	CAG26702.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNac VI (Siat7F) (fragmento)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646880	CAG26709.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715534	CAG29373.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8SialI(Siat8B) (fragmento).		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715538	CAG29377.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa STBSia III (Siat 8C) (fragmento)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715541	CAG29380.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IIIr (Siat 8Cr)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715542	CAG29381.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E)		<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715547	CAG29386.1		

FIGURA 7K

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank/GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
(fragmento)						
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VI (Siat 8F) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715549	CAG29388.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VIr (Siat 8Fr)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715550	CAG29389.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Siat5-r)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744806	CAG32842.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744802	CAG32838.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ626822	CAF25180.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ634462	CAG25683.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ646879	CAG26708.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia 1 (Siat 8A) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715536	CAG29375.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8SialI (Siat8B) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715537	CAG29376.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715539	CAG29378.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IIIr (Siat 8Cr) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715540	CAG29379.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715548	CAG29387.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (St3Gal-II)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585762	CAE51386.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (St3Gal-VI)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585766	CAE51390.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa St3Gal-III (Siat6)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585764 AJ626823	CAE51388.1 CAF25181.1		
$\alpha$ -2,8-polisialiltransferasa	<i>Xenopus laevis</i>	2.4.99.-	AB007468	BAA32617.1	O93234	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia-I (Siat8A;GD3 sintasa)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AY272056 AY272057 AJ704562	AAQ16162.1 AAQ16163.1 GAG28695.1		
Desconocido (Proteína para MGC:81265)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	BC068760	AAH68760.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (3Gal-VI)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ626744	CAF25054.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Siat4c)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ622908	CAF22058.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ646878	CAG26707.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ715544	CAG29383.1		
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ627628	CAF29496.1		
sialiltransferasa St8Sial	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AY652775	AAT67042		
poli- $\alpha$ -2,8-sialosil sialiltransferasa (NeuS)	<i>Escherichia coli K1</i>	2.4.-.-	M76370 C60598	AAA24213.1 CAA43053.1	Q57269	
polisialiltransferasa	<i>Escherichia coli K92</i>	2.4.-.-	M88479	AAA24215.1	Q47404	

FIGURA 7L

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank / GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
$\alpha$ -2,8 polisialiltransferasa SiaD	<i>Neisseria meningitidis</i> B1940	2.4.-.-	M95053 X78068	AAA20478.1 CAA54985.1	Q51281 Q51145	
SynE	<i>Neisseria meningitidis</i> FAM18	n.d.	U75650	AAB53842.1	006435	
polisialiltransferasa (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M1019	n.d.	AY234192	AAO85290.1		
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M209	n.d.	AY281046	AAP34769.1		
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3045	n.d.	AY281044	AAP34767.1		
polisialiltransferasa (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3315	n.d.	AY234191	AA085289.1		
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3515	n.d.	AY281047	AAP34770.1		
polisialiltransferasa (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M4211	n.d.	AY234190	AA085288.1		
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M4642	n.d.	AY281048	AAP34771.1		
polisialiltransferasa (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M5177	n.d.	AY234193	AA085291.1		
SiaD	<i>Neisseria meningitidis</i> M5178	n.d.	AY281043	AAP34766.1		
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M980	n.d.	AY281045	AAP34768.1		
NMB0067	<i>Neisseria meningitidis</i> MCS8	n.d.	NC_003112	NP_273131		
Lst	<i>Aeromonas punctata</i> Sch3	n.d.	AF126256	AAS66624.1		
ORF2	<i>Haemophilus influenzae</i> A2	n.d.	M94855	AAA24979.1		
HI1699	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	n.d.	U32842 NC_000907	AAC23345.1 NP_439841.1	Q48211	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> F62	2.4.99.4	U60664	AAC44539.1 AAE67205.1	P72074	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria meningitidis</i> 126E, NRCC4010	2.4.99.4	U60662	AAC44544.2		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria meningitidis</i> 406Y, NRCC 4030	2.4.99.4	U60661	AAC44543.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (NMB0922)	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	2.4.99.4	U60660 AE002443 NC_003112	AAC44541.1 AAF41330.1 NP_273962.1	P72097	
NMA1118	<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	n.d.	AL162755 NC_003116	CAB84380.1 NP_283887.1	Q9JUV5	
PM0508	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d.	AE006086 NC_002663	AAK02592.1 NP_245445.1	Q9CNC4	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB25	n.d.	AF519787	AAM82550.1	Q8KS93	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB3	n.d.	AF519788	AAM82551.1	Q8KS92	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB39	n.d.	AF519789	AAM82552.1		
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB53	n.d.	AF519790	AAM82553.1		
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB57	n.d.	AF519791	AAM82554.1	Q8KS91	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB71	n.d.	AF519793	AAM82556.1	Q8KS89	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i>	n.d.	AF519792	AAM82555.1	Q8KS90	

FIGURA 7M

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank/GenPept		Swiss	PDB
					Prot	/3D
	SARB8					
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC10V	n.d.	AF519779	AAM88840.1	Q8KS99	
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC12	n.d.	AF519781	AAM88842.1		
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC13I	n.d.	AF519782	AAM88843.1	Q8KS98	
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC14I	n.d.	AF519783	AAM88844.1	Q8KS97	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC15II	n.d.	AF519784	AAM88845.1	Q8KS96	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC16II.	n.d.	AF519785	AAM88846.1	Q8KS95	
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC3I	n.d.	AF519772	AAM88834.1	Q8KSA4	
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC4I	n.d.	AF519773	AAM88835.1	Q8KSA3	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC5IIa	n.d.	AF519774	AAM88836.1		
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARCBIIa	n.d.	AF519775	AAM88837.1	Q8KSA2	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC8	n.d.	AF519777	AAM88838.1	Q8KSA1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC9V	n.d.	AF519778	AAM88839.1	Q8KSA0	
UDP-glucosa: $\alpha$ -1,2- glucosiltransferasa (WaaH)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> SARC5	2.4.1.-	AF511116	AAM48166.1		
$\alpha$ -2,3/-2,8- sialiltransferasa bifuncional (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43449	n.d.	AF401529	AAL06004.1	Q93CZ5	
Cst	<i>Campylobacter jejuni</i> 81-176	n.d.	AF305571	AAL09368.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Cst-III)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43429	2.4.99.-	AY044156	AAK73183.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Cst-III)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43430	2.4.99.-	AF400047	AAK85419.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43432	2.4.99.-	AF215659	AAG43979.1	Q9F0M9	
$\alpha$ -2,3/8- sialiltransferasa (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43438	n.d.	AF400048	AAK91725.1	Q93MQ0	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa cst-II	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43446	2.4.99.-	AF167344	AAF34137.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43456	2.4.99.-	AF401528	AAL05990.1	Q93D05	
$\alpha$ -2,3/- $\alpha$ -2,8- sialiltransferasa (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 43460	2:4.99.-	AY044868	AAK96001.1	Q938X6	
$\alpha$ -2,3/8- sialiltransferasa (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 700297	n.d.	AF216647	AAL36462.1		
ORF	<i>Campylobacter jejuni</i> GB11	n.d.	AY422197	AAR82875.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa cstIII	<i>Campylobacter jejuni</i> MSC57360	2.4.99.-	AF195055	AAG29922.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa cstIII Cj1140	<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	2.4.99.-	AL139077 NC_002163	CAB73395.1 NP_282288.1	Q9PNF4	
$\alpha$ -2,3/ $\alpha$ -2,8- sialiltransferasa II (cstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:10	n.d.	AX934427	AA096669.1 CAF04167.1		
$\alpha$ -2,3/ $\alpha$ -2,8- sialiltransferasa II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:19	n.d.	AX934431	CAF04169.1		
$\alpha$ -2,3/ $\alpha$ -2,8- sialiltransferasa II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:36	n.d.	AX934436	CAF04171.1		
$\alpha$ -2,3/ $\alpha$ -2,8-	<i>Campylobacter</i>	n.d.	AX934434	CAF04170.1		

FIGURA 7N

Proteína	Organismo	Nº EC	GenBank/GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
sialiltransferasa II (CstII)	<i>jejuni</i> O:4					
$\alpha$ -2,3/ $\alpha$ -2,8-sialiltransferasa II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:41	n.d.	- - AX934429	AAO96670.1 AAT17967.1 CAF04168.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa cst-I	<i>Campylobacter jejuni</i> OH4384	2.4.99.-	AF130466	AAF13495.1 AAS36261.1.	Q9RGF1	
$\alpha$ -2,3/-2,8-sialiltransferasa bifuncional (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> OH4384	2.4.99.-	AF130984 AX934425	AAF31771.1 CAF04166.1	1R07 1R08	C A
HI0352 (fragmento)	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd.	n.d.	U32720 X57315 NC 000907	AAC22013.1 CAA40567.1 NP_438516.1	P24324	
PM1174	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d.	AE006157 NC_002663	AAK03258.1 NP_246111.1	Q9CLP3	
Secuencia 10 de la patente US 6503744	Desconocido.	n.d.		AA096672.1		
Secuencia 10 de la patente US 6699705	Desconocido.	n.d.		AAT17969.1		
Secuencia 12 de la patente US 6699705	Desconocido.	n.d.		AAT17970.1		
Secuencia 2 de la patente US 6709834	Desconocido.	n.d.		AAT23232.1		
Secuencia 3 de la patente US 6503744	Desconocido.	n.d.		AA096668.1		
Secuencia 3 de la patente US 6699705	Desconocido.	n.d.		AAT17965.1		
Secuencia 34 de la patente US 6503744	Desconocido.	n.d.		AA096684.1		
Secuencia 35 de la patente US 6503744 (fragmento)	Desconocido.	n.d.		AA096685.1 AAS36262.1		
Secuencia 48 de la patente US 6699705	Desconocido.	n.d.		AAT17988.1		
Secuencia 5 de la patente US 6699705	Desconocido.	n.d.		AAT17966.1		
Secuencia 9 de la patente US 6503744	Desconocido.	n.d.		AA096671.1		