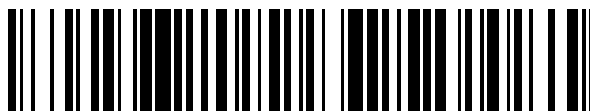


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 516 694**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)
C07K 1/04 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 9/00 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2007 E 07813239 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2049144**

54 Título: **Glicosilación de péptidos a través de secuencias de glicosilación con unión en O**

30 Prioridad:

21.07.2006 US 832461 P
18.01.2007 US 881130 P
25.01.2007 US 886616 P
04.06.2007 US 941920 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DEFREES, SHAWN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 516 694 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

Glicosilación de péptidos a través de secuencias de glicosilación con unión en O

Campo de la invención

5 La invención pertenece al campo de la modificación de polipéptidos por glicosilación. En particular, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de polipéptidos glicosilados usando secuencias cortas de glicosilación con unión en O reconocidas por enzimas.

Antecedentes de la invención

10 La presente invención se refiere a la glicosilación y modificación de polipéptidos, preferentemente polipéptidos de valor terapéutico. La administración de polipéptido glicosilados y no glicosilados para engendrar una respuesta fisiológica particular es bien conocida en las artes medicinales. Por ejemplo, la hGH tanto recombinante como purificada se usan para el tratamiento de afecciones y enfermedades asociadas con la deficiencia de hGH, por ejemplo, enanismo en los niños. Otros ejemplos incluyen el interferón, que ha conocido actividad antiviral, así como el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), que estimula la producción de glóbulos blancos.

15 La falta de sistemas de expresión que se puedan usar para la fabricación de polipéptidos con patrones de glicosilación de tipo silvestre ha limitado el uso de dichos polipéptidos como agentes terapéuticos. En la técnica se sabe que los polipéptidos glicosilados de forma incorrecta o incompleta pueden ser inmunogénicos, lo que conduce a la rápida neutralización del péptido y/o el desarrollo de una respuesta alérgica. Otras deficiencias de glicopéptidos producidos de forma recombinante incluyen potencia subóptima y eliminación rápida del torrente sanguíneo de estructuras de glicanos existentes y la unión de restos de glicosilo a restos de aminoácidos no glicosilados. Una amplia selección de glicosiltransferasas eucariotas recombinantes se ha hecho disponible, haciendo posible la síntesis enzimática *in vitro* de glicoconjugados de mamífero con patrones de glicosilación con diseño personalizado y estructuras de glicosilo. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.876.980; N° 6.030.815; N° 5.728.554; N° 5.922.577; así como el documento de patente WO/9831826; documento de patente US2003180835; y documento de patente WO 03/031464.

25 Además, se han derivado glicopéptidos con uno o más grupos de modificación no sacáridos, tales como polímeros solubles en agua. Un polímero ejemplar que se ha conjugado con péptidos es el poli(etilenglicol) ("PEG"). La conjugación al PEG, que aumenta el tamaño molecular del polipéptido, se ha usado para reducir la inmunogenicidad y para prolongar el tiempo de eliminación de polipéptidos conjugados a PEG en circulación. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.179.337 de Davis *y col.* divulga polipéptidos no inmunogénicos, tales como enzimas y hormonas polipeptídicas acopladas a polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG).

30 El principal procedimiento para la unión de PEG y sus derivados a polipéptidos implica la unión no específica a través de un resto de aminoácido (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.088.538, Patente de Estados Unidos N° 4.496.689, Patente de Estados Unidos N° 4.414.147, Patente de Estados Unidos N° 4.055.635, y documento PCT WO 87/00056). Otro procedimiento de conjugación con PEG implica la oxidación no específica de restos de glicosilo de un glicopéptido (véase, por ejemplo, el documento de patente WO 94/05332).

35 En estos procedimientos no específicos, el PEG se añade aleatoria, no específica a restos reactivos en una cadena principal polipeptídica. Este enfoque tiene inconvenientes significativos, que incluyen una falta de homogeneidad del producto final, y la posibilidad de actividad biológica o enzimática reducida del polipéptido modificado. Por lo tanto, es altamente deseable un procedimiento de derivación para polipéptidos terapéuticos que da como resultado la formación de un producto marcado específicamente, fácilmente caracterizable y sustancialmente homogéneo.

40 Agentes terapéuticos polipeptídicos homogéneos, modificados específicamente se pueden producir *in vitro* mediante el uso de enzimas. A diferencia de los procedimientos no específicos para la unión de un grupo de modificación, tal como un polímero sintético, a un polipéptido, las síntesis basadas en enzimas tienen las ventajas de regioselectividad y estereoselectividad. Dos clases principales de enzimas para su uso en la síntesis de polipéptidos marcados son las glicosiltransferasas (por ejemplo, sialiltransferasas, oligosacariltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas), y glicosidasas. Estas enzimas se pueden usar para la unión específica de azúcares que posteriormente se pueden alterar para que comprendan un grupo de modificación. Como alternativa, se pueden usar glicosiltransferasas y glicosidasas modificadas para transferir directamente azúcares modificados a una cadena principal del polipéptido (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.399.336, y las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030040037, N° 20040132640, N° 20040137557, N° 20040126838, y N° 20040142856). Además, se conocen procedimientos que combinan enfoques tanto químicos como enzimáticos (véase, por ejemplo, Yamamoto *y col.*, Carbohydr. Res. 305: 415-422 (1998) y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040137557).

55 Los hidratos de carbono se unen a glicopéptidos de varias formas de los cuales los unidos en N a asparagina y los unidos en O a serina y treonina son los más relevantes para agentes terapéuticos de glicoproteína recombinante. La glicosilación con unión en O se encuentra en glicoproteína segregadas y asociadas a la superficie celular de todas las células eucariotas. Existe una gran diversidad en las estructuras creadas mediante glicosilación con unión en O.

Dichos glicanos se producen mediante la actividad catalítica de cientos de enzimas (glicosiltransferasas) que residen en el complejo de Golgi. La diversidad existe a nivel de la estructura de glicano y en posiciones de unión de O-glicanos a las estructuras principales de las proteínas. A pesar del alto grado de diversidad potencial, es evidente que la glicosilación con unión en O es un proceso altamente regulado que muestra un alto grado de conservación entre los organismos pluricelulares.

Los anticuerpos están glicosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund (1997) *Chem. Immunol.* 65: 111- 128; Wright y Morrison (1997) *TibTECH* 15: 26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de anticuerpos influyen en su función (Wittwer y Howard. (1990) *Biochem.* 29:4175; Boyd y col., (1996) *Mol. Immunol.* 32: 1311) así como interacciones inter e intramoleculares (Goochee, y col., (1991) *Bio/Technology*, 9: 1347; Parekh, (1991) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1: 750; Hart, (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4: 1017; Jefferis y Lund mencionados anteriormente; Wyss y Wagner (1996) *Curr. Opin. Biotech.* 7: 409).

Para la IgG humana, el oligosacárido núcleo normalmente consiste en GlcNAc₂Man₃ GlcNAc, con ligeras diferencias en los números de restos externos. Por ejemplo, la variación entre IgG individuales se produce a través de unión de galactosa y/o galactosa-ácidos siálico en los dos GlcNAc terminales a través de unión de una tercera rama de GlcNAc (GlcNAc bisectriz). Se ha encontrado que la retirada del resto de hidrato de carbono, por escisión con glicosidasas o mutagénesis, afecta a la unión a C1q y FcγR y las respuestas corriente abajo tales como la activación de complementos y ADCC. (Leatherbarrow y col. *Molec. Immunol.* 22: 407-415 (1985); Duncan y col. *Nature of the carbohydrate moiety, either by glycosidase cleavage or mutagenesis, has been found to affect binding to C1q and FcγR and the downstream responses such as complement activation and ADCC.* (Leatherbarrow y col. *Molec. Immunol.* 22: 407- 415 (1985); Duncan y col. *Nature* 332: 738-740 (1988); Walker y col. *Biochem. J.* 259: 347-353 (1989)). Cuando el hidrato de carbono está presente, la naturaleza de los restos de azúcar puede influir en las funciones efectuadas de IgG (Wright y col. *J. Immunol.* 160: 3393-3402 (1998)).

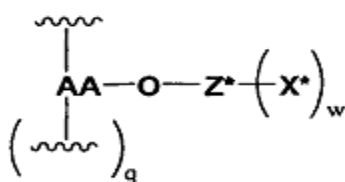
No todos los polipéptidos comprenden una secuencia de glicosilación como parte de su secuencia de aminoácidos. Además, las secuencias de glicosilación existentes pueden no ser adecuadas para la unión de un grupo de modificación. Dicha modificación puede causar, por ejemplo, una disminución indeseable de la actividad biológica del polipéptido modificado. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de procedimientos que permitan tanto la creación precisa de secuencias de glicosilación dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido como la capacidad para dirigir la modificación de forma precisa a esos sitios. La presente invención se dirige a éstas y otras necesidades.

Sumario de la invención

La presente invención describe el descubrimiento de que las reacciones de glicoconjugación enzimática se pueden dirigir específicamente a determinadas secuencias de glicosilación con unión en O dentro de un polipéptido. A continuación, los restos de glicosilo adicionales, que contienen opcionalmente un grupo de modificación, se pueden unir al glicoconjugado resultante, por vía enzimática o química. En un ejemplo, la secuencia de glicosilación dirigida se introduce en un polipéptido precursor (por ejemplo, polipéptido de tipo silvestre) por mutación creando un polipéptido mutante que incluye una secuencia de glicosilación, en el que esta secuencia de glicosilación no está presente, o no está presente en la misma posición, en el polipéptido precursor correspondiente (secuencia de glicosilación exógena). En el presente documento, dichos polipéptidos mutantes se denominan "polipéptidos secuón". En consecuencia, la presente invención proporciona polipéptidos del secuón que incluyen una o más secuencias de glicosilación con unión en O de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. En una realización, cada secuencia de glicosilación es un sustrato para una enzima, tal como una glicosiltransferasa, tal como una GalNAc-transferasa (por ejemplo, GalNAc-T2). Además, la presente invención proporciona conjugados entre un polipéptido del secuón y un grupo de modificación (por ejemplo, un grupo de modificación polimérico soluble en agua) de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Además, se divulgan procedimientos para fabricar un polipéptido del secuón así como procedimientos para fabricar y usar los conjugados de polipéptidos. Además, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen los conjugados de polipéptidos de la invención. Además, se divulgan bibliotecas de polipéptidos secuón, en las que cada miembro de dicha biblioteca incluya al menos una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención. Además, se proporcionan procedimientos para fabricar y usar dichas bibliotecas.

En un primer aspecto, la invención proporciona un conjugado covalente entre un polipéptido del secuón glicosilado o no glicosilado y un grupo de modificación polimérico. El polipéptido del secuón comprende una secuencia de glicosilación con unión en O exógena de la invención. El grupo de modificación polimérico está conjugado con el polipéptido del secuón en la secuencia de glicosilación con unión en O a través de un grupo de unión de glicosilo, en el que dicho grupo de unión de glicosilo se interpone entre y se une covalentemente tanto al polipéptido del secuón como al grupo de modificación polimérico. El polipéptido precursor no es la hormona de crecimiento humano (hGH), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón-*alfa* (INF-*alfa*), péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1), o un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

En un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado de polipéptido que incluye un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas en la que el polipéptido del secuón incluye una secuencia de glicosilación con unión en O. El conjugado de polipéptido incluye un resto de acuerdo con la Fórmula (V), en la que q puede ser 0 o 1:

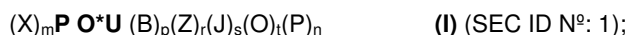


(V)

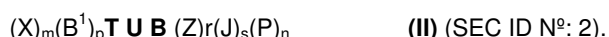
En la Fórmula (V), w es un número entero seleccionado entre 0 y 1. AA-O- es un resto derivado de un aminoácido que tiene una cadena lateral, que está sustituida con un grupo hidroxilo (por ejemplo, serina o treonina). Este aminoácido se encuentra dentro de la secuencia de glicosilación con unión en O. Cuando q es 1, entonces el aminoácido es un aminoácido interno, y cuando q es 0, entonces el aminoácido es un aminoácido N-terminal o C-terminal. En una realización, Z* es un resto de glicosilo. En otra realización, Z* es un grupo de unión de glicosilo. En una realización, X* es un grupo de modificación polimérico. En otra realización, X* es un grupo de unión de glicosilo que está unido covalentemente a un grupo de modificación polimérico. En una realización, el polipéptido precursor no es la hormona de crecimiento humano (hGH). En otra realización, el polipéptido precursor no es el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF). Además en otra realización, el polipéptido precursor no es el interferón-*alfa* (INF-*alfa*). En otra realización, el polipéptido precursor no es el péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1). En otra realización, el polipéptido precursor no es un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen un conjugado de polipéptido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un polipéptido del secun de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas que incluye una secuencia de glicosilación con unión en O exógena seleccionada entre la Fórmula (I) o la Fórmula (II):



y



En una realización, en la Fórmula (I) y en la Fórmula (II), el número entero m es 0 En otra realización, m es 1. En una realización, el número entero n es 0 En otra realización, n es 1. En una realización, el número entero p es 0 En otra realización, p es 1. En una realización, el número entero r es 0 En otra realización, r es 1. En una realización, el número entero s es 0 En otra realización, s es 1. En una realización, el número entero t es 0. En otra realización, t es 1.

En la Fórmula (I) y en la Fórmula (II), P es prolina. En una realización, O* es serina (S). En otra realización, O* es treonina (T). En una realización, U es prolina (P). En otra realización, U es el ácido glutámico (E). Además, en otra realización, U es glutamina (Q). En una realización adicional, U es el ácido aspártico (D). En una realización relacionada, U es asparagina (N). En otra realización, U es treonina (T). Además, en otra realización, U es serina (S). En una realización adicional, U es un aminoácido no cargado, tal como glicina (G) o alanina (A). X, B y B¹ son miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos no cargados. Z, J y O son miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S), tirosina (Y), metionina (M) y aminoácidos no cargados. El polipéptido precursor no es la hormona de crecimiento humano (hGH), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón-*alfa* (INF-*alfa*), péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1), o un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es XPO*P. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es XPO*EI (P)_n. Además, en otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*EI. En una realización adicional, la secuencia de glicosilación con unión en O es XPO*QA(P)_n. En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es XPO*TVS. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TVSP. Además, en otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es XPO*QGA. En una realización adicional, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*QGAP. En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es XPO*QGAM (P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es XTEO*P. Además, en otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*VL. En una realización adicional, la secuencia de glicosilación con unión en O es XPO*VL(P)_n. En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es XPO*TVL. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TVLP. Además, en otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TLYVP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es XPO*TLYV(P)_n. En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*LS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*DA(P)_n. Además, en otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*EN(P)_n. En una realización adicional, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*QD(P)_n. En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*AS(P)_n. En otra realización, la secuencia

de glicosilación con unión en O es XPO*SAV. Además, en otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*SAVP. En una realización adicional, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*SG(P)_n. En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es XTEOP*. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*DG(P)_n.

5 En las secuencias anteriores, m, n, O * y X se definen tal como anteriormente.

Además, se divulga una biblioteca de polipéptidos del secuón que incluyen una pluralidad de miembros, en la que cada miembro de la biblioteca corresponde a un polipéptido precursor común y en la que cada miembro de la biblioteca incluye una secuencia de glicosilación con unión en O exógena. En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula (I) (SEC ID N°: 1). En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula (II) (SEC ID N°: 2). La Fórmula (I) y la Fórmula (II) se han descrito anteriormente en el presente documento. En una realización, el polipéptido precursor no es la hormona de crecimiento humano (hGH). En otra realización, el polipéptido precursor no es el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF). Además, en otra realización, el polipéptido precursor no es el interferón-*alfa* (INF-*alfa*). En una realización adicional, el polipéptido precursor no es el péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1). En otra realización, el polipéptido precursor no es un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

Además, se divulga un procedimiento que incluye: expresar un polipéptido del secuón en una célula huésped, en el que el polipéptido del secuón incluye una secuencia de glicosilación con unión en O exógena de la invención. En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula (I) (SEC ID N°: 1). En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula (II) (SEC ID N°: 2). La Fórmula (I) y la Fórmula (II) se han descrito anteriormente en el presente documento. En una realización, el polipéptido precursor no es la hormona de crecimiento humano (hGH). En otra realización, el polipéptido precursor no es el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF). Además, en otra realización, el polipéptido precursor no es el interferón-*alfa* (INF-*alfa*). En una realización adicional, el polipéptido precursor no es el péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1). En otra realización, el polipéptido precursor no es un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

Además, se divulga un procedimiento para preparar un conjugado de polipéptido de la invención. El procedimiento incluye: (i) producir de forma recombinante el polipéptido del secuón; y (ii) glicosilar enzimáticamente el polipéptido del secuón en la secuencia de glicosilación con unión en O exógena. El procedimiento puede incluir adicionalmente: glicoPEGilación del polipéptido glicosilado de la etapa (ii).

Además, se divulga un procedimiento para preparar una biblioteca de polipéptidos secuón, en el que cada polipéptido del secuón corresponde a un polipéptido precursor común. El procedimiento incluye: (i) producir de forma recombinante un primer polipéptido del secuón mediante la introducción de una secuencia de glicosilación con unión en O a una primera posición de aminoácido dentro del polipéptido precursor; y (ii) producir de forma recombinante al menos un polipéptido del secuón adicional mediante la introducción de la misma secuencia de glicosilación con unión en O en una posición adicional del aminoácido en el polipéptido precursor.

Además, se divulga un procedimiento para identificar un polipéptido director. El procedimiento incluye: (i) generar una biblioteca de polipéptidos del secuón de la invención; y (ii) someter al menos a un miembro de la biblioteca a una reacción de glicosilación enzimática, transferir un resto glicosilo de una molécula dadora de glicosilo sobre al menos una de la secuencia de la glicosilación con unión en O, en la que dicho resto de glicosilo está opcionalmente derivatizado con un grupo de modificación.

Aspectos adicionales, ventajas y objetos de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada dada a continuación.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra espectros de masas MALFI-TOF de un polipéptido no glicosilado ejemplar y de un polipéptido NT-3 mutante glicosilado ejemplar (A.2 en la Tabla 16) (SEC ID N°: **). La **Figura 1A** muestra un espectro de masas MALFI-TOF de NT-3 no glicosilado. El polipéptido se expresó como cuerpos de inclusión en la cepa W3110 de *E. coli*, se volvió a plegar y se purificó. La **Figura 1B** muestra un espectro de masas MALFI-TOF de NT-3 glicosilado. El mutante NT-3 purificado se incubó con la glicosiltransferasa GalNAc-T2 y UDP-GalNAc tal como se describe en el Ejemplo 2. El producto de reacción se caracteriza por un aumento de la masa esperada de aproximadamente 203 Da (esperado: +203,2), que corresponde a la adición de un solo resto de GalNAc en comparación con el polipéptido no glicosilado.

La **Figura 2** muestra espectros de masas MALFI-TOF de un polipéptido no glicosilado ejemplar y de un polipéptido FGF-21 mutante glicosilado ejemplar (B.20 en la Tabla 18) (SEC ID N°: **). La **Figura 2A** muestra un espectro de masas MALFI-TOF de FGF-21 no glicosilado. El polipéptido se expresó como una proteína soluble en una cepa *trxB*, *gor*, *supp* de *E. coli*, se volvió a plegar y se purificó. La **Figura 2B** muestra un espectro de masas MALFI-TOF de FGF-21 glicosilado. El mutante FGF-21 purificado se incubó con la glicosiltransferasa GalNAc-T2 y UDP-GalNAc tal como se describe en el Ejemplo 4. El producto de reacción se caracteriza por un aumento de la masa esperada de aproximadamente 203 Da (esperado: +203,2, observado: 209), que corresponde a la adición de

un solo resto de GalNAc en comparación con el polipéptido no glicosilado.

La **Figura 3** muestra el resultado de la electroforesis en gel de SDS PAGE para diversos polipéptidos mutantes NT-3 humanos de no PEGilados y glicoPEGilados. Las variantes de NT-3 se purificaron y se glicoPEGilaron tal como se describe en el Ejemplo 2. Las reacciones se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con SimplyBlue SafeStain. Gel A: variante A.1 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2 (carril 1), variante A.1 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2 / ST6GalNAc1 (carril 2); marcador de peso molecular (carril 3); variante A.2 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2 (carril 4), variante A.2 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/ST6GalNAc1 (carril 5), variante A.4 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2 (carril 6), variante A.4 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/ST6GalNAc1 (carril 7); variante A.5 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2 (carril 8), Variante A.5 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/ST6GalNAc1 (carril 9); variante A.7 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2 (carril 10); Variante A.7 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/ST6GalNAc1 (carril 11); variante A.1 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/Core-1 (carril 12); variante A.1 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/Core-1/ST3Gal1 (carril 13); variante A.2 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/Core-1 (carril 14); variante A.2 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/Core-1/ST3Gal1 (carril 15), variante A.4 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/Core-1 (carril 16), variante A.4 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/Core-1/ST3Gal1 (carril 17), variante A.5 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/Core-1 (carril 18), marcador de peso molecular (carril 19); variante A.5 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/Core-1/ST3Gal1 (carril 20), variante A.7 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/Core-1 (carril 21), variante A.7 de NT-3 en la Tabla 16 (SEC ID N°: **) tratada con GalNAc-T2/Core-1/ST3Gal1 (carril 22). Las bandas en el área del recuadro inferior con un peso molecular de aproximadamente 14 kD, corresponden a los mutantes NT-3 no PEGilados. Las bandas en el área del recuadro superior con un peso molecular de aproximadamente 49-62 kD corresponden a las a las variantes glicoPEGiladas de NT-3.

La **Figura 4** muestra una secuencia de aminoácidos ejemplar para el Factor VIII.

La **Figura 5** muestra una secuencia de aminoácidos ejemplar para el Factor VIII con el dominio B suprimido (BDD).

La **Figura 6** es un resumen ejemplar de combinaciones de polipéptido precursor / secuencias de glicosilación con unión en O. Cada fila representa una forma de realización de la invención, en la que la secuencia de glicosilación con unión en O indicada (por ejemplo, PTP) se introduce en el polipéptido precursor indicado (por ejemplo, BMP-7), dando como resultado un polipéptido del secun de la invención. La secuencia de glicosilación con unión en O se puede introducir en el polipéptido precursor en diferentes posiciones de aminoácidos (por ejemplo, en el extremo N, en el extreme C o en una posición interna del aminoácido). La secuencia de glicosilación con unión en O se puede introducir en el polipéptido precursor con o sin sustitución de los aminoácidos existentes.

Descripción detallada de la invención

I. Abreviaturas

PEG, poli(etilenglicol); m-PEG, metoxi-poli(etilenglicol); PPG, poli(propilenglicol); m-PPG, metoxi-poli(propilenglicol); Fuc, fucosa o fucosilo; Gal, galactosa o galactosilo; GalNAc, N-acetilgalactosamina o N-acetilgalactosaminilo; Glc, glucosa o glucosilo; GlcNAc, N-acetilglucosamina o N-acetilglucosaminilo; Man, manosa o manosilo; ManAc, acetato de manosamina o acetato de manosaminilo; Sia, ácido siálico o sialilo; y NeuAc, N-acetil-neuramina o N-acetilneuraminilo.

II. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento en general tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio de cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos e hibridación son aquéllos bien conocidos y usados normalmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis de ácidos nucleicos y de péptidos. Las técnicas y procedimientos se realizan en general de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (véase, en general, Sambrook y *col.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se proporcionan a lo largo del presente documento. La nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio de química de síntesis orgánica y analítica que se describen a continuación son aquéllos bien conocidos y usados normalmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales, o modificaciones de las mismas para síntesis química y análisis químicos.

Todos los oligosacáridos que se describen en el presente documento se describen con el nombre o la abreviatura para el sacárido no reductor (es decir, Gal), seguido por la configuración del enlace glicosídico (α o β), el enlace del anillo (1 o 2), la posición del anillo del sacárido reductor implicado en el enlace (2, 3, 4, 6 u 8) y, a continuación, el nombre o abreviatura del sacárido de reducción (es decir, GlcNAc). Cada sacárido es preferentemente una piranosa. Para una

La expresión "resto de glicosilo" significa cualquier radical procedente de un resto de azúcar. "Resto de glicosilo" incluye mono y oligosacáridos e incluye "resto mimético de glicosilo".

La expresión "resto mimético de glicosilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto, que se asemeja estructuralmente a un resto de glicosilo (por ejemplo, una hexosa o una pentosa). Ejemplos de "resto mimético de glicosilo" incluyen aquéllos restos, en los que el oxígeno glucosídico o el oxígeno del anillo de un resto de glicosilo, o ambos, se han sustituido con un enlace o con otro átomo (por ejemplo, azufre), u otro resto, tal como un grupo que contiene carbono (por ejemplo, CH_2), o nitrógeno (por ejemplo, NH). Los ejemplos incluyen derivados de ciclohexilo sustituidos o sin sustituir, tioéteres cíclicos, aminas secundarias cíclicas, restos que incluyen un enlace tioglicosídico y, similares. En un ejemplo, el "resto mimético de glicosilo" se transfiere en una reacción catalizada enzimáticamente en un resto de aminoácido de un polipéptido o un resto glicosilo de un glicopéptido. Por ejemplo, éste se puede conseguir mediante la activación del "resto mimético de glicosilo" con un grupo saliente, tal como un halógeno.

La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, la expresión incluye ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una forma similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácidos nucleicos en particular también incluye implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNPs, y secuencias complementarias así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzner y *col.*, *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka y *col.*, *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); y Rossolini y *col.*, *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). La expresión ácido nucleico se usa de forma intercambiable con gen, ADNc, y ARNm codificado por un gen.

El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena de polipéptidos. Puede incluir regiones precedentes y siguientes a la región de codificación (directora y remolque) así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos individuales de codificación (exones).

El término "aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o proteína está sustancialmente libre de otros componentes celulares con los que se asocia en el estado natural. Está preferentemente en un estado homogéneo aunque puede estar en una solución seca o acuosa. En general, la pureza y la homogeneidad se determinan usando técnicas de química analítica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado se separa de los marcos de lectura abierta que flanquean el gen y que codifican una proteína que no sea el gen de interés. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o proteína da lugar sustancialmente a una banda en un gel electroforético. En particular, significa que el ácido nucleico o proteína es puro en al menos un 85 %, más preferentemente puro en al menos un 95 % puro, y lo más preferentemente puro en al menos un 99 %.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquéllos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica tal como un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales de péptidos modificados, pero conservan la misma estructura química básica como un aminoácido de origen natural. "Miméticos de aminoácidos" se refiere 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 de origen natural.

El término "aminoácido sin carga" se refiere a aminoácidos, que no incluyen un grupo funcional ácido (por ejemplo, $-\text{COOH}$) o básico (por ejemplo, $-\text{NH}_2$). Los aminoácidos básicos incluyen lisina (K) y arginina (R). Los aminoácidos ácidos incluyen ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E). Los aminoácidos sin carga incluyen, por ejemplo, glicina (G), valina (V), leucina (L), fenilalanina (F), y además aquéllos aminoácidos que incluyen grupos $-\text{OH}$ o $-\text{SH}$ (por ejemplo,

treonina (T), serina (S), tirosina (Y) y cisteína (C)).

En la técnica existen diversos procedimientos conocidos que permiten la incorporación de un derivado de aminoácido no natural o análogo en una cadena polipeptídica de una manera específica de sitio, véase, por ejemplo, el documento de patente WO 02/086075.

- 5 En el presente documento, los aminoácidos se pueden mencionar por cualquiera de los símbolos de tres letras conocidos habitualmente o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Del mismo modo, los nucleótidos, se pueden mencionar por sus códigos de una sola letra aceptados normalmente.

- 10 "Variantes modificadas de manera conservadora" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos en particular, "variantes modificadas de manera conservadora" se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente idénticas, o en las que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias sustancialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. En el presente documento, cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para la metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para el triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

- 25 En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que sustituciones individuales, supresiones o adiciones de un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteínas que altera, añade o suprime un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservadora", en el que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas de manera conservadora se suman a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos de la invención.

- 30 Cada uno de los ocho grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

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

(véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

- 40 "Péptido" se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí a través de enlaces de amida. Los péptidos de la presente invención pueden variar de tamaño, por ejemplo, a partir de dos aminoácidos a cientos o miles de aminoácidos. Un péptido más grande (por ejemplo, al menos 10, al menos 20, al menos 30 o al menos 50 restos de aminoácidos) se denomina alternativamente "polipéptido" o "proteína". Adicionalmente, se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina, homoarginina y homofenilalanina. Además, en la presente invención se pueden usar aminoácidos que no están codificados por genes. Además, también se pueden usar en la invención aminoácidos que se han modificado para que incluyan grupos reactivos, secuencias de glicosilación, polímeros, restos terapéuticos, biomoléculas y similares. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser isómeros D o L. En general, es preferente el isómero L. Además, en la presente invención también son útiles otros peptidomiméticos. Como se usa en el presente documento, "péptido" o "polipéptido" se refiere tanto a péptidos como a "polipéptidos" glicosilados y no glicosilados. Además, se incluyen polipéptidos que están glicosilados de forma incompleta por un sistema que expresa el polipéptido. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983).

- 55 En la presente solicitud, los restos de aminoácidos se numeran (en general en el superíndice) de acuerdo con sus posiciones relativas a partir del aminoácido N-terminal (por ejemplo, metionina N-terminal) del polipéptido, que se numera "1". El aminoácido N-terminal puede ser una metionina (M), numerada "1". Los números asociados con cada resto de aminoácido se pueden ajustar fácilmente para reflejar la ausencia de metionina N-terminal el extremo N del polipéptido comienza sin una metionina. Se entiende que el extremo N de un polipéptido ejemplar puede comenzar con

o sin metionina.

La expresión "polipéptido precursor" se refiere a cualquier polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácidos, que no incluye una secuencia de glicosilación con unión en O o con unión en S "exógena" de la invención. Sin embargo, un "polipéptido precursor" puede incluir una o más secuencias de glicosilación con unión en O o con unión en S de origen natural (endógenas). Por ejemplo, un polipéptido de tipo silvestre puede incluir la secuencia PTP de glicosilación con unión en O. La expresión "polipéptido precursor" se refiere a cualquier polipéptido, incluyendo polipéptidos de tipo silvestre, polipéptidos de fusión, polipéptidos sintéticos, polipéptidos recombinantes (por ejemplo, polipéptidos terapéuticos), así como cualquier variante de los mismos (por ejemplo, modificados previamente a través de uno o más aminoácidos o de sustitución, inserciones de aminoácidos, supresiones de aminoácidos y similares) siempre y cuando dicha modificación no equivalga a la formación de una secuencia de glicosilación con unión en O o con unión en S de la invención. En una realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor, o la secuencia de pares de nucleótidos que codifica el polipéptido precursor, se define y es accesible al público en cualquier forma. Por ejemplo, el polipéptido precursor es un polipéptido de tipo silvestre y la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos del polipéptido de tipo silvestre es parte de una base de datos de proteínas de acceso público (por ejemplo, Base de datos de Secuencias de Nucleótidos EMBL, NCBI Entrez, ExPasy, Protein Data Bank y similares). En otro ejemplo, el polipéptido precursor no es un polipéptido de tipo silvestre pero se usa como un polipéptido terapéutico (es decir, fármaco autorizado) y la secuencia de dicho polipéptido está disponible al público en una publicación o patente científica. Además, en otro ejemplo, la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido precursor era accesible al público de cualquier manera en el momento de la invención. En una realización, el polipéptido precursor es parte de una estructura más grande. Por ejemplo, el polipéptido precursor corresponde a la región constante (F_c) o dominio C_H2 de un anticuerpo, en el que estos dominios pueden ser parte de un anticuerpo entero. En una realización, el polipéptido precursor no es un anticuerpo de secuencia desconocida.

La expresión "polipéptido mutante" o "variante de polipéptido" se refiere a una forma de un polipéptido, en la que su secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia de aminoácidos de su forma de tipo silvestre correspondiente, forma que existe naturalmente o cualquier otra forma precursora. Un polipéptido mutante puede contener una o más mutaciones, por ejemplo, sustitución, inserción, supresión, etc., que da como resultado el polipéptido mutante.

La expresión "polipéptido del secuón" se refiere a una variante de polipéptido que incluye en su secuencia de aminoácidos una "secuencia de glicosilación con unión en O exógena" de la invención. Un "polipéptido del secuón" contiene al menos una secuencia de glicosilación con unión en O exógena, y además puede incluir una o más secuencias de glicosilación con unión en O endógenas (por ejemplo, de origen natural).

La expresión "secuencia de glicosilación con unión en O exógena" se refiere a una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención que se introduce en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido precursor (por ejemplo, polipéptido de tipo silvestre), en la que el polipéptido precursor no incluye una secuencia de glicosilación con unión en O o incluye una secuencia de glicosilación con unión en O en una posición diferente. En un ejemplo, una secuencia de glicosilación con unión en O se introduce en un polipéptido de tipo Silvestre que no tiene una secuencia de glicosilación unidad a O. En otro ejemplo, un polipéptido de tipo silvestre incluye de forma intrínseca una primera secuencia de glicosilación con unión en O en una primera posición. Una segunda glicosilación con unión en O se introduce en su polipéptido de tipo silvestre en una segunda posición. Esta modificación da como resultado un polipéptido que tiene una "secuencia de glicosilación con unión en O exógena" en la segunda posición. La secuencia de glicosilación con unión en O exógena se puede introducir en el polipéptido precursor por mutación. Como alternativa, un polipéptido con una secuencia de glicosilación con unión en O exógena se puede preparar mediante síntesis química.

La expresión "que corresponde a un polipéptido precursor" (o variaciones gramaticales de esta expresión) se usa para describir un polipéptido del secuón de la invención, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido del secuón difiere de la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor correspondiente sólo por la presencia de al menos una secuencia de glicosilación con unión en O exógena de la invención. En general, las secuencias de aminoácidos del polipéptido del secuón y del polipéptido precursor presentan un alto porcentaje de identidad. En un ejemplo, "que corresponde a un polipéptido precursor" significa que la secuencia de aminoácidos del polipéptido del secuón tiene al menos aproximadamente un 50 % de identidad, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 98 % de identidad con la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor. En otro ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido del secuón tiene al menos aproximadamente un 50 % de identidad, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 98 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido precursor.

La expresión "que introduce (o que añade, etc.) una secuencia de glicosilación (por ejemplo, una secuencia de glicosilación con unión en O) en un polipéptido precursor" (o variaciones gramaticales de la misma), o "que modifica un polipéptido precursor" para incluir una secuencia de glicosilación (o variaciones gramaticales de la misma) no se refiere necesariamente a que el polipéptido precursor sea un material de partida físico para dicha conversión, sino que el polipéptido precursor proporciona la secuencia de aminoácidos de guía para la preparación de otro polipéptido. En un ejemplo, "que introduce una secuencia de glicosilación en un polipéptido precursor" significa que el gen para el

polipéptido precursor se modifica a través de mutaciones apropiadas para crear una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del secuón. En otro ejemplo, "que introduce una secuencia de glicosilación en un polipéptido precursor" significa que el polipéptido resultante se diseña teóricamente usando la secuencia del polipéptido precursor como una guía. A continuación, el polipéptido diseñado se puede generar por medios químicos o de otro tipo.

5 La expresión "polipéptido director" se refiere a un polipéptido del secuón de la invención que se puede glicosilar de forma eficaz y/o glicoPEGilar. Para que un polipéptido del secuón de la invención se clasifique cumpla con los requisitos de un polipéptido director, dicho polipéptido, cuando se somete a condiciones de reacción adecuadas, se glicosila o se glicoPEGila con un rendimiento de la reacción de al menos aproximadamente un 50 %, preferentemente al menos aproximadamente un 60 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 70 % e incluso más
10 preferentemente de aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 % o aproximadamente un 95 %. Los más preferentes son los polipéptidos directores de la invención, que se pueden glicosilar o glicoPEGilar con un rendimiento de la reacción de más de un 95 %. En una realización preferente, el polipéptido precursor se glicosila o glicoPEGila de tal manera que solo un resto de aminoácido de cada secuencia de glicosilación con unión en O está glicosilada o glicoPEGilada (monoglicosilación).

15 El término "biblioteca" se refiere a una colección de diferentes polipéptidos que corresponden a un polipéptido precursor común. Cada especie de polipéptidos de la biblioteca se conoce como un miembro de la biblioteca. Preferentemente, la biblioteca de la presente invención representa una colección de polipéptidos de número y diversidad suficiente para proporcionar una población a partir de la cual se identifica un polipéptido director. Una biblioteca incluye al menos dos polipéptidos diferentes. En una realización, la biblioteca incluye de aproximadamente 2
20 a aproximadamente 10 miembros. En otra realización, la biblioteca incluye de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 miembros. Además, en otra realización, la biblioteca incluye de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 miembros. En una realización adicional, la biblioteca incluye de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 miembros. En otra realización, la biblioteca incluye de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 miembros. En otra realización, la biblioteca incluye más de 100 miembros. Los miembros de la biblioteca pueden ser parte de una mezcla o se pueden aislar unos de otros. En un ejemplo, los miembros de la biblioteca son parte de una mezcla que incluye opcionalmente otros componentes. Por ejemplo, al menos dos polipéptidos del secuón están presentes en un volumen de caldo de cultivo celular. En otro ejemplo, los miembros de la biblioteca se expresan cada uno por separado y se aíslan opcionalmente. Los polipéptidos del secuón aislados pueden estar contenidos opcionalmente en un envase de múltiples pocillos, en el que cada pocillo contiene un tipo diferente de polipéptido del
30 secuón.

El término dominio "CH₂" de la presente invención pretende describir un dominio CH₂ constante de cadena pesada de inmunoglobulina. En la definición de un dominio CH₂ de inmunoglobulina se hace referencia a las inmunoglobulinas en general y, en particular a la estructura del dominio de inmunoglobulinas tal como se aplica a la IgG 1 humana por Kabat E. A. (1978) Adv. Protein Chem. 32: 1-75.

35 La expresión "polipéptido que comprende un dominio CH₂" o "polipéptido que comprende al menos un dominio CH₂" pretende incluir moléculas de anticuerpos enteros, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, el dominio Fc), o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región CH₂ de una inmunoglobulina.

La expresión "conjugado de polipéptido", se refiere a especies de la invención en las que un polipéptido está glicoconjugado con un resto de azúcar (por ejemplo, azúcar modificado) tal como se establece en el presente documento. En un ejemplo representativo, el polipéptido es un polipéptido del secuón que tiene una secuencia de glicosilación con unión en O exógena.

"Próximo a un resto de prolina" o "en la proximidad de un residuo de prolina" tal como se usa en el presente documento se refiere a un aminoácido que tiene menos de aproximadamente 10 aminoácidos eliminados de un resto de prolina, preferentemente, menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos eliminados de un resto de prolina, más
45 preferentemente, menos de aproximadamente 4, 3 o 2 restos eliminados de un resto de prolina. El "resto de prolina próximo al" aminoácido puede estar en el extremo C o N del resto de prolina.

La expresión "ácido siálico" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve de carbono. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-gicolilneuramínico (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-nonulosónico (KDN) (Nadano y col., (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori y col., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). Además, se incluyen ácidos siálicos sustituidos en la posición 9 tales como un 9-O-C₁-C₆ acil-Neu5Ac tal como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y
50 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para una revisión de la familia del ácido siálico, véase, por ejemplo, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, Nueva York (1992)). La síntesis y uso de compuestos de ácido siálico en un proceso de sialilación se divulga en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.

Como se usa en el presente documento, la expresión "azúcar modificado" se refiere a un hidrato de carbono de origen

natural o natural. En una realización, el "azúcar modificado" se añade enzimáticamente en un aminoácido o un resto de glicosilo de un polipéptido usando un procedimiento de la invención. El azúcar modificado se selecciona entre un número de sustratos enzimáticos que incluyen, pero no se limitan a nucleótidos de azúcar (mono, di y trifosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo) y azúcares que ni se activan ni son nucleótidos. El "azúcar modificado" se funcionaliza covalentemente con un "grupo de modificación". Los grupos de modificación útiles incluyen, pero no se limitan a, grupos de modificación poliméricos (por ejemplo, polímeros solubles en agua), restos terapéuticos, restos de diagnóstico, biomoléculas y similares. En una realización, el grupo de modificación no es un resto glicosilo de origen natural (por ejemplo, polisacárido de origen natural). El grupo de modificación es preferentemente de origen no natural. En un ejemplo, el "grupo de modificación de origen no natural" es un grupo de modificación de polímero, en el que al menos un resto polimérico es de origen no natural. En otro ejemplo, el grupo de modificación de origen no natural es un hidrato de carbono modificado. El sitio de funcionalización con el grupo de modificar se selecciona de tal manera que no impide que el "azúcar modificado" se añada enzimáticamente a un polipéptido. "Azúcar modificado" también se refiere a cualquier resto mimético glicosilo que está funcionalizado con un grupo de modificación y que es un sustrato para una enzima natural o modificada, tal como una glicosiltransferasa.

Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo de modificación de polímero" es un grupo modificador que incluye al menos un resto polimérico (polímero). El grupo de modificación de polímero añadido a un polipéptido puede alterar una propiedad de dicho polipéptido, por ejemplo, su biodisponibilidad, actividad biológica o su vida media en el organismo. Los polímeros ejemplares incluyen polímeros solubles en agua e insolubles en agua. Un grupo de modificación de polímero puede ser lineal o ramificado y puede incluir uno o más restos de polímeros seleccionados independientemente, tales como poli(alquilenglicol) y derivados del mismo. En un ejemplo, el polímero es de origen no natural. En una realización ejemplar, el grupo de modificación de polímero incluye un polímero soluble en agua, por ejemplo, poli(etilenglicol) y derivados del mismo (PEG, m-PEG), poli(propilenglicol) y derivados del mismo (PPG, m-PPG) y similares. En una realización preferente, el poli(etilenglicol) o poli(propilenglicol) tiene un peso molecular que es sustancialmente homodisperso. En una realización, el grupo de modificación de polímero no es un polisacárido de origen natural.

La expresión "soluble en agua" se refiere a restos que tienen algún grado de solubilidad en agua detectable. Los procedimientos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua son bien conocidos en la técnica. Los polímeros solubles en agua ejemplares incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mixtas o estar formados por un solo aminoácido, por ejemplo, poli(lisina). Un polisacárido ejemplar es el poli(ácido siálico). Un poli(éter) ejemplar es el poli(etilenglicol), por ejemplo, m-PEG. La poli(etilenimina) es una poliamina ejemplar, y el ácido poli(acrílico) es un poli(ácido carboxílico) ejemplar.

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

La estructura del polímero puede ser lineal o ramificada. Las estructuras principales ramificadas del polímero en general se conocen en la técnica. Generalmente, un polímero ramificado tiene un resto de núcleo ramificado central y una pluralidad de cadenas de polímeros lineales unidos al núcleo de la rama central. El PEG se usa normalmente 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 se puede obtener de varios aminoácidos, tales como lisina o cisteína. En un ejemplo, el poli(etilenglicol) ramificado se puede representar en forma general como $R(-PEG-OH)_m$ en la que R representa el resto del núcleo, tal como glicerol o pentaeritritol, y m representa el número de ramas. Las moléculas de PEG con múltiples ramas, tales como las que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.932.462, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad, también se pueden usar como la cadena principal del polímero.

Además, son adecuados para la invención otros muchos polímeros. Las estructuras principales de polímeros que son no peptídicas y solubles en agua, son particularmente útiles en la invención. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acrilolmorfolina), tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.629.384, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, así como copolímeros, terpolímeros, y mezclas de los mismos. Aunque el peso molecular de cada cadena de la cadena principal del polímero puede variar, en general está en el intervalo de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 100.000 Da, a menudo de aproximadamente 5.000 Da a aproximadamente 80.000 Da.

El término "glicoconjugación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la conjugación mediada enzimáticamente de una especie de azúcar modificado a un aminoácido o resto de glicosilo de un polipéptido, por ejemplo, una hormona de crecimiento humano mutante de la presente invención. En un ejemplo, el azúcar modificado se une covalentemente a uno o más grupos de modificación. Un subgénero de "glicoconjugación" es la "glicol-PEGilación" o "glico-PEGilación", en la que el grupo de modificación del azúcar modificado es el poli(etilenglicol) o un derivado del mismo, tal como un derivado de alquilo (por ejemplo, m-PEG) o un derivado con un grupo funcional reactivo (por ejemplo, H₂N-PEG, HOOC-PEG).

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

La expresión "secuencia de glicosilación con unión en O" o "secuón" se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos (por ejemplo, que contiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 9 aminoácidos, preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 aminoácidos) que incluye un resto de aminoácido que tiene un grupo hidroxilo (por ejemplo, serina o treonina). En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es un sustrato para una enzima, tal como una glicosiltransferasa, preferentemente cuando forma parte de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido. En una realización habitual, la enzima transfiere un resto glicosilo en la secuencia de glicosilación con unión en O al modificar el grupo hidroxilo que se ha vestido anteriormente, que se conoce como el "sitio de glicosilación". La invención distingue entre una secuencia de glicosilación con unión en O que se está produciendo de forma natural en un polipéptido de tipo silvestre o cualquier otra forma precursora de la misma (secuencia de glicosilación con unión en O endógena) y una "secuencia de glicosilación con unión en O exógena". Un polipéptido que incluye una secuencia de glicosilación con unión en O exógena se denomina "polipéptido del secuón". La secuencia de aminoácidos de un polipéptido uso se puede modificar para que incluya una secuencia de glicosilación con unión en O exógena a través de tecnología recombinante, síntesis químicas u otros medios. La expresión "secuencia de glicosilación unidad a S" relacionada es análoga y se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos que incluye un resto de aminoácido que tiene un grupo sulfhidrilo (por ejemplo, cisteína, Me-cisteína) y que es un sustrato para una enzima, tal como una glicosiltransferasa, preferentemente cuando forma parte de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido.

La expresión, "grupo de unión a glicosilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto de glicosilo al que se une covalentemente un grupo de modificación (por ejemplo, resto de PEG, resto terapéutico, biomolécula); el grupo de unión une el grupo de modificación de glicosilo al resto del conjugado. En los procedimientos de la invención, el "grupo de unión a glicosilo" llega a estar unidos de forma covalente a un polipéptido glicosilado o sin glicosilados, uniéndose de este modo el grupo de modificación a un aminoácido y/o resto de glicosilo del polipéptido. Un "grupo de unión a glicosilo" se deriva generalmente de un "azúcar modificado" mediante la unión enzimática del "azúcar modificado" a un aminoácido y/o un resto de glicosilo del polipéptido. El grupo de unión a glicosilo puede ser una estructura derivada de sacárido que se degrada durante la formación de casete de azúcar modificado por un grupo de modificación (por ejemplo, oxidación → formación de base de Schiff → reducción), o el grupo de enlace a glicosilo puede estar intacto. Un "grupo de unión a glicosilo intacto" se refiere a un grupo de unión que se deriva de un resto de glicosilo en el que el monómero sacárido que une el grupo de modificación y al resto del conjugado no se degrada, por ejemplo, se oxida, por ejemplo, con metaperyodato sódico. Los "grupos de unión a glicosilo intactos" de la invención se pueden derivar de un oligosacárido de origen natural mediante la adición de unidad(es) de glicosilo o por retirada de una o más unidades de glicosilo de una estructura de sacárido precursor. Un "grupo de unión a glicosilo" puede incluir un resto mimético de glicosilo. Por ejemplo, la glicosil transferasa (por ejemplo, sialil transferasa), que se usa para añadir el azúcar modificado a un polipéptido glicosilado, presenta tolerancia para un sustrato mimético de glicosilo (por ejemplo, un azúcar modificado en el que el resto de azúcar es un resto mimético de glicosilo - por ejemplo, resto mimético de sialilo). La transferencia del Azúcar mimético de glicosilo modificado da como resultado un conjugado que tiene un grupo de unión a glicosilo que es un resto mimético de glicosilo.

La expresión "resto de dirección", tal como se usa en el presente documento, se refiere a especies que se localizan selectivamente en un tejido o región del cuerpo en particular. La localización está mediada por el reconocimiento específico de determinantes moleculares, el tamaño molecular del agente diana o conjugado, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y similares. Otros mecanismos de dirección de un agente a un tejido o región en particular son conocidos por los expertos en la materia. Los restos de dirección ejemplares incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, transferrina, HS-glicoproteína, factores de coagulación, proteínas del suero, β-glicoproteína, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO y similares.

Como se usa en el presente documento, "resto terapéutico" significa cualquier agente útil para terapia e incluye, pero no se limita a, antibióticos, agentes antiinflamatorios, fármacos antitumorales, citotoxinas y agentes radiactivos. "Resto terapéutico" incluye profármacos de agentes bioactivos, constructos en los que más de un resto terapéutico está unido a un vehículo, por ejemplo, agentes polivalentes. El resto terapéutico también incluye proteínas y constructos que incluyen proteínas. Las proteínas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, la Eritropoyetina (EPO), Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos (G-CSF), Factor de Estimulación de Colonias de Macrófagos (GM-CSF), Interferón (por ejemplo, interferón α, β, γ), Interleuquina (por ejemplo, Interleuquina II), proteínas séricas (por ejemplo, Factores VII, VIII, IX y X), Gonadotropina Coriónica Humana (HCG), Hormona de Estimulación de Folículos (FSH) y Hormona Luteinizante (LH) y proteínas de fusión a anticuerpos (por ejemplo, Receptor del Factor de Necrosis

Tumoral ((TNFR)/proteína de fusión al dominio Fc)).

Como se usa en el presente documento, "fármaco antitumoral" significa cualquier agente útil para combatir el cáncer que incluye, pero no se limita a, citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes de alquilación, antraciclinas, antibióticos, agentes antimetabólicos, procarbazona, hidroxiurea, asparaginasa, corticosteroides, interferones y agentes radiactivos. Además, dentro del alcance del término "fármaco antitumoral", se incluyen conjugados de polipéptidos con actividad antitumoral, por ejemplo TNF- α . Los conjugados incluyen, pero no se limitan a los formados entre una proteína terapéutica y una glicoproteína de la invención. Un conjugado representativo es el formado entre PSGL-1 y TNF- α .

Como se usa en el presente documento, "una citotoxina o agente citotóxico" se refiera cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Otras toxinas incluyen, por ejemplo, ricina, CC-1065 y análogos, las duocarmicinas. Además, otras toxinas incluyen toxina de la difteria, y veneno de serpiente (por ejemplo, veneno de cobra).

Como se usa en el presente documento, "un agente radiactivo" incluye cualquier radioisótopo que sea eficaz para el diagnóstico o la destrucción de un tumor. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, indio-111, cobalto-60. Además, los elementos radiactivos de origen natural tales como uranio, radio, y torio, que en general representan mezclas de radioisótopos, son los adecuados de un agente radiactivo. Los iones metálicos en general están quelados con un resto de quelación orgánico.

En la técnica se conocen muchos grupos de quelación útiles, éteres corona, criptandos y similares y se pueden incorporar en los compuestos de la invención (por ejemplo, EDTA, DTPA, DOTA, NTA, HDTA, *etc.* y sus análogos de fosfonato tales como DTPP, EDTP, HDTP, NTP, *etc.*). Véase, por ejemplo, Pitt y *col.*, "The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload". En, INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE; Martell, Ed.; American Chemical Society, Washington, D.C., 1980, páginas 279-312; Lindoy, THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES; Cambridge University Press, Cambridge, 1989; Dugas, BIOORGANIC CHEMISTRY; Springer-Verlag, Nueva York, 1989, y referencias contenidas en los mismos.

Además, los expertos en la materia tienen a su disposición una diversidad de vías que permiten la unión de los agentes de quelación, éteres corona y ciclodextrinas a otras moléculas. Véase, por ejemplo, Meares y *col.*, "Properties of In Vivo Chelate-Tagged Proteins and Polypeptides". En, MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS"; Feeney, y *col.*, Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., 1982, páginas 370-387; Kasina y *col.*, Bioconjugate Chem., 9: 108-117 (1998); Song y *col.*, Bioconjugate Chem., 8: 249-255 (1997).

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con el conjugado, conserva la actividad del conjugado y no es reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye sólidos y líquidos, tales como vehículos, diluyentes y disolventes. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos habituales 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 soluciones estériles, comprimidos que incluyen comprimidos revestidos y cápsulas. En general, dichos vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, determinados tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales del mismo, estearato de magnesio o de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Dichos vehículos también pueden incluir aditivos de aroma y color y otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante procedimientos convencionales bien conocidos.

Como se usa en el presente documento, "administración" significa administración oral, administración en forma de un supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal o subcutánea, o administración por inhalación, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una bomba mini-osmótica, al sujeto. La administración puede ser mediante cualquier vía que incluye parenteral, y transmucosal (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal, o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, e intracraneal. Además, cuando la inyección es para tratar un tumor, por ejemplo, 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 a, el uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, *etc.*

El término "que mejora" 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 se puede basar en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico y/o una evaluación psiquiátrica.

El término "terapia" se refiere a "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad o afección que incluye prevenir que se produzca la enfermedad o afección en un sujeto (por ejemplo, ser humano) que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no experimenta o no presenta síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), inhibir la enfermedad (ralentizar o detener su desarrollo), proporcionar alivio para los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo tratamiento paliativo), y aliviar la enfermedad (causar la regresión de la enfermedad).

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

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

Cuando los conjugados de polipéptidos son puros en más de aproximadamente un 90 %, sus purezas también se expresan preferentemente en forma de un intervalo preferentemente. El límite inferior del intervalo de pureza es de aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 96 % o aproximadamente un 98 %. El límite superior del intervalo de pureza presenta una pureza de aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 100 %.

La pureza se determina mediante cualquier procedimiento de análisis reconocido en la técnica (por ejemplo, intensidad de las bandas en un gel teñido con plata, electroforesis en gel de poliacrilamida, HPLC, espectroscopía de masas, o medios similares).

"Sustancialmente cada miembro de la población", tal como se usa en el presente documento, describe una característica de una población de conjugados de polipéptidos de la invención en los que un porcentaje seleccionado de los azúcares modificados añadidos a un polipéptido se añaden en múltiples sitios aceptores idénticos del polipéptido. "Sustancialmente cada miembro de la población" se refiere a la "homogeneidad" de los sitios del polipéptido conjugado a un azúcar modificado, y se refiere a los conjugados de la invención, que tienen una homogeneidad de aproximadamente un 80 %, preferentemente al menos aproximadamente un 90 % y más preferentemente al menos aproximadamente un 95 %.

"Homogeneidad", se refiere a la consistencia estructural a través de una población de restos aceptores a los que se conjugan los azúcares modificados. Por lo tanto, en un conjugado polipeptídico de la invención en el que cada resto de azúcar modificado se conjuga a un sitio aceptor que tiene la misma estructura que el sitio aceptor al que se conjugan todos los demás azúcares modificados, se dice que el conjugado polipeptídico tiene una homogeneidad de aproximadamente un 100 %. La homogeneidad se expresa en general en forma de un intervalo. El límite inferior del intervalo de homogeneidad para los conjugados de polipéptidos es de aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 % o aproximadamente un 80 % y el límite superior del intervalo de pureza es de aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 % o más de aproximadamente un 90 %.

Cuando los conjugados de polipéptidos tienen una homogeneidad superior o igual a aproximadamente un 90 %, su homogeneidad también se expresa preferentemente en forma de un intervalo. El límite inferior del intervalo de homogeneidad es de aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 96 % o aproximadamente un 98 %. El límite superior del intervalo de pureza tiene una homogeneidad de aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 100 %. La pureza de los conjugados de polipéptidos en general se determina mediante uno o más procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), espectrometría de masas de desorción por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDITOF), electroforesis capilar, y similares.

"Glicoforma sustancialmente uniforme" o un "patrón de glicosilación sustancialmente uniforme", cuando se refiere a una especie de glicopéptido, se refiere al porcentaje de restos aceptores que se glicosilan mediante la glicosiltransferasa de interés (por ejemplo, GalNAc transferasa). Por ejemplo, en el caso de una α 1,2 fucosiltransferasa, existe un patrón de fucosilación sustancialmente uniforme si sustancialmente todos (tal como se define a continuación) los Gal β 1,4-GlcNAc-R y los análogos sialilados de los mismos están fucosilados en un conjugado peptídico de la invención de la invención. Un experto en la materia entenderá que el material de partida puede contener restos aceptores glicosilados (por ejemplo, restos de Gal β 1,4-GlcNAc-R fucosilados). Por lo tanto, el porcentaje de glicosilación calculado incluirá los restos aceptores que se glicosilan mediante los procedimientos de la invención, así como aquéllos restos aceptores ya glicosilados en el material de partida.

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

- 5 Cuando se especifican grupos sustituyentes con sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, la igualdad que incluye los sustituyentes químicamente idénticos, que resultarían de la escritura de la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{O}-$ también pretende hacer referencia a $-\text{OCH}_2-$.

El término "alquilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique de otro modo, a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, o cíclico (es decir, cicloalquilo), o combinaciones de los mismos, que pueden estar totalmente saturados, mono- o poliinsaturados y pueden incluir radicales di- (por ejemplo, alquileo) y polivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ significa de uno a diez átomos de carbono). Los ejemplos de radicales de hidrocarburo saturado incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturado incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butenilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique de otro modo, también pretende incluir los derivados de alquilo que se definen con más detalle a continuación, tales como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se limitan a grupos hidrocarburo también se denominan "homoealquilo".

- 20 El término "alquileo" por sí mismo o como parte de otros sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, tal como se hace a modo de ejemplo, pero no limitado a $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, y además incluye los grupos que se describen a continuación como "heteroalquileo". En general, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, siendo preferentes en la presente invención esos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Un "alquilo inferior" o "alquileo inferior" es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, en general que tiene ocho o menos átomos de carbono.

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

- 30 El término "heteroalquilo," por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique de otro modo, a una cadena lineal o ramificada estable, o radical hidrocarburo cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número de átomos de carbono indicado y al menos un heteroátomo seleccionado entre el grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y de azufre se pueden oxidar opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno se puede cuaternizar opcionalmente. El o los heteroátomos O, N y S y Si se pueden colocar en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CHOCH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{NOCH}_3$, y $-\text{CH}=\text{CHN}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$. Pueden ser consecutivos hasta dos heteroátomos, tales como, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$. De forma análoga, el término "heteroalquileo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, tal como se hace a modo de ejemplo, pero no se limita a $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2-$. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxo, alquilenamino, alquilendiamino, y similares). Además opcionalmente, para los grupos de unión de alquileo y heteroalquileo, ninguna orientación del grupo de unión está implicada por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de unión. Por ejemplo, la fórmula $-\text{CO}_2\text{R}'$ representa tanto $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ como $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$.

- 45 Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique de otro modo, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Además, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofurano-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidro-tien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares.

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

El término "arilo" significa, a menos que se indique de otro modo, a un sustituyente aromático poliinsaturado, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (preferentemente de 1 a 3 anillos), que se condensan en conjunto o se unen covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O, S, Si y B, en los que los átomos de nitrógeno y azufre se oxidan

opcionalmente, y el átomo o átomos de nitrógeno se cuaternizan opcionalmente. Un grupo heteroarilo se puede unir al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 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-quinoxalino, 5-quinoxalino, 3-quinolilo, y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo de arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan entre el grupo de sustituyentes aceptables que se describen a continuación.

Por razones de brevedad, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye anillos tanto arilo como heteroarilo tal como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" pretende incluir los radicales en los que un grupo arilo se une a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo los grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) se ha sustituido, por ejemplo, con un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los términos mencionados anteriormente (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") pretende incluir formas tanto sustituidas como sin sustituir del radical indicado. A continuación se proporcionan sustituyentes preferentes para cada tipo de radical.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo los grupos denominados a menudo alquilenilo, alquenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, y heterocicloalquenilo) en general se denominan "sustituyentes del grupo alquilo", y pueden ser uno o más de una diversidad de grupos seleccionados entre, pero no limitados a: arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR'C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR'R''$, $-NR'C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-NR-C(NR'R'')=NR''''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$ en un número que varía de cero a $(2m'+1)$, en el que m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. Cada uno de R' , R'' , R''' y R'''' se refieren preferentemente de forma independiente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o sin sustituir, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente tal como cada grupo R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' se unen al mismo átomo de nitrógeno, éstos se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6, o 7 miembros. Por ejemplo, $-NR'R''$ pretende incluir, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir del análisis anterior de los sustituyentes, un experto en la materia entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos que no son grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acilo (por ejemplo, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$, y similares).

De forma similar a los sustituyentes que se han descrito para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo en general se denominan "sustituyentes del grupo arilo". Los sustituyentes se seleccionan entre, por ejemplo: alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR'C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR'R''$, $-NR'C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-NR-C(NR'R'')=NR''''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, fluoroalcoxi (C_1-C_4), y fluoroalquilo (C_1-C_4), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y en los que R' , R'' , R''' y R'''' se seleccionan preferentemente de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente tal como se hace para cada uno de los grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente en más de uno de estos grupos.

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo se pueden sustituir opcionalmente con un sustituyente de fórmula $-T-C(O)-(CRR')_q-U$, en la que T y U son independientemente $-NR-$, $-O-$, $-CRR'-$ o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 3. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo se pueden sustituir opcionalmente con un sustituyente de fórmula $-A-(CH_2)_r-B-$, en la que A y B son independientemente $-CRR'-$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'-$ o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo formado de este modo se puede sustituir opcionalmente con un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes sobre átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo se pueden sustituir opcionalmente con un sustituyente de fórmula $-(CRR')_s-X-(CR''R''')_d-$, en la que s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es $-O-$, $-NR'-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$ o $-S(O)_2NR'-$. Los sustituyentes R , R' , R'' y R''' se seleccionan preferentemente de forma independiente entre hidrógeno o alquilo (C_1-C_6) sustituido o sin sustituir.

Como se usa en el presente documento, el término "acilo" describe un sustituyente que contiene un resto de carbonilo, $C(O)R$. Las especies ejemplares para R incluyen H , halógeno, alcoxi, alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, y heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sistema de anillo condensado" significa menos a dos anillos, en el que cada anillo tiene al menos 2 átomos en común con otro anillo. Los sistemas de anillo condensado pueden incluir anillos aromáticos así como no aromáticos. Ejemplos de "sistemas de anillos condensados" son naftalenos, indoles, quinolinas, cromenos y similares.

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

El símbolo "R" es una abreviatura general que representa a un grupo sustituyente. Los grupos sustituyentes ejemplares incluyen grupos alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, y heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir.

- 10 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" incluye sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes en particular encontrados en los compuestos que se describen en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente invención contienen grupos funcionales relativamente ácidos, se pueden obtener sales de adición básica poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición básica farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico, o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen grupos funcionales relativamente básicos, se pueden obtener sales de adición ácida poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables incluyen las obtenidas a partir de ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos tales como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. Además se incluyen sales de aminoácidos tales como alginato y similares, y sales de ácidos orgánicos tales como ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge y *col.*, Journal of Pharmaceutical Science, 66: 1-19 (1977)). Determinados compuestos específicos de la presente invención contienen grupos funcionales tanto básicos como ácidos que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición básica o ácida.

- 30 Las formas neutras de los compuestos se regeneran preferentemente poniendo en contacto basal con una base o ácido y aislando el compuesto precursor de la forma convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas salinas en determinadas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero de otro modo las sales son equivalentes a la forma precursora del compuesto para los fines de la presente invención.

- 35 Además de las formas salinas, la presente invención proporciona compuestos, que se presentan en una forma de profármaco. Los profármacos de los compuestos que se describen en el presente documento son los compuestos que experimentan rápidamente cambios químicos en condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente invención. Además, los profármacos se pueden convertir en los compuestos de la presente invención mediante procedimientos químicos o bioquímicos en un entorno *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos se pueden convertir lentamente en los compuestos de la presente invención cuando se colocan en un depósito de parche transdérmico con una enzima o reactivo químico adecuados.

- 40 Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas sin solvatar así como en formas solvatadas, que incluyen formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas sin solvatar y se incluyen dentro del ámbito de la presente invención. determinados compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos que se contemplan en la presente invención y se pretende que estén dentro del ámbito de la presente invención.

- 45 Determinados compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales están incluidos dentro del ámbito de la presente invención.

- 50 Los compuestos de la invención se pueden preparar como un isómero individual (por ejemplo, enantiómero, *cis-trans*, posicional, diastereómero) o como una mezcla de isómeros. En una realización preferente, los compuestos se preparan sustancialmente como un isómero individual. En la técnica se conocen procedimientos para preparar sustancialmente compuestos isoméricamente puros. Por ejemplo, se pueden preparar mezclas enantioméricamente enriquecidas y compuestos enantioméricamente oscuros usando compuestos intermedios sintéticos que son enantioméricamente puros en combinación con reacciones que dejan la estereoquímica en un centro quiral sin cargar o que dan como resultado su inversión completa. Como alternativa, el producto final por los compuestos intermedios junto con la ruta de síntesis se puede resolver en un estereoisómero individual. En la técnica se conocen bien técnicas para invertir o dejar sin cargar un centro estereogénico en particular, y aquéllas para resolver mezclas de estereoisómeros y está bien dentro de la capacidad de un experto en la materia elegirle procedimiento apropiado para una situación en particular. Véase, en general, Furniss y *col.* (eds.), VOGEL'S ENCYCLOPEDIA OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY 5ª ED., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, páginas 809-816; y Heller, Acc.

Chem. Res. 23: 128 (1990).

Las representaciones gráficas de los compuestos racémicos, ambiescalémicos y escalémicos o enantioméricamente puros usados en el presente documento se toman de Maehr, J. Chem. Ed., 62: 114-120 (1985): las cuñas sólidas y discontinuas se usan para indicar la configuración absoluta de un elemento quiral; las líneas onduladas indican el rechazo de cualquier implicación estereoquímica que el enlace que representa pudiera generar; la líneas en negrita sólidas y discontinuas son descriptores geométricos que indican la configuración relativa mostrada, pero no implican ninguna estereoquímica absoluta; y los trazados de cuñas y líneas de puntos o discontinuas indican compuestos enantioméricamente puros de configuración absoluta indeterminada.

Las expresiones "exceso enantiomérico" y "exceso diastereomérico" se usan indistintamente en el presente documento. Los compuestos con un solo estereocentro se mencionan como que están presentes en "exceso enantiomérico", aquéllos con al menos dos centros estereogénicos se mencionan como que están presentes en "exceso diastereomérico".

Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos se pueden radiomarcarse con isótopos radiactivos, tales como por ejemplo tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, tanto si son radiactivos como no, se incluyan dentro del ámbito de la presente invención.

"Grupo funcional reactivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a grupos que incluyen, pero no se limitan a, olefinas, acetilenos, alcoholes, fenoles, éteres, óxidos, haluros, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, cianatos, isocianatos, tiocianatos, isotiocianatos, aminas, hidrazinas, hidrazonas, hidrazidas, diazo, diazonio, nitro, nitrilos, mercaptanos, sulfuros, disulfuros, sulfóxidos, sulfonas, ácidos sulfónicos, ácidos sulfínicos, acetales, cetales, anhídridos, sulfatos, ácidos sulfénicos isonitrilos, amidinas, imidas, imidatos, nitronas, hidroxilaminas, oximas, ácidos hidroxámicos, ácidos tiohidroxámicos, alenos, orto ésteres, sulfitos, enaminas, inaminas, ureas, pseudoureas, semicarbazidas, carbodiimidas, carbamatos, iminas, azidas, compuestos azo, compuestos azoxi, y compuestos nitrosos. Los grupos funcionales reactivos también incluyen los usados para preparar bioconjugados, por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidas y similares. En la técnica son bien conocidos procedimientos para preparar cada uno de estos grupos funcionales y su aplicación o modificación con una finalidad en particular está dentro de la capacidad de un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sandler y Karo, eds. ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS, Academic Press, San Diego, 1989).

Los "grupos de unión a proteínas no covalentes" son restos que interactúan con un polipéptido intacto o desnaturalizado de una forma asociativa. La interacción puede ser reversible o irreversible en un medio biológico. La incorporación de un "grupo de unión a proteínas no covalente" en un agente de quelación o complejo de la invención proporciona el agente o complejo con la capacidad de interactuar con un polipéptido de una forma no covalente. Las interacciones no covalentes ejemplares incluyen interacciones hidrófoba-hidrófoba y electrostática. Los "grupos de unión a proteínas no covalentes" ejemplares incluyen grupos aniónicos, por ejemplo, fosfato, tiofosfato, fosfonato, carboxilato, boronato, sulfato, sulfona, sulfonato, tiosulfato, y tiosulfonato.

Un "truncamiento de glicosiltransferasa" o una "glicosiltransferasa truncada" o variantes gramaticales, así como "glicosiltransferasa con supresión del dominio" o variantes gramaticales, se refieren a una glicosiltransferasa que tiene menos restos de aminoácidos que una glicosiltransferasa de origen natural, pero que conserva determinada actividad enzimática. Las glicosiltransferasas truncadas incluyen, por ejemplo, enzimas GnT1 truncadas, enzimas GalT1 truncadas, enzimas ST3GalIII truncadas, enzimas GalNAc-T2 truncadas, enzimas Core-1-GalT1 truncadas, restos de aminoácidos de aproximadamente 32 a aproximadamente 90 (véase por ejemplo, la enzima humana); enzimas ST3Gal1 truncadas, enzimas ST6GalNAc-1 truncadas, y enzimas GalNAc-T2 truncadas. Cualquier número de restos de aminoácidos se puede suprimir siempre y cuando la enzima mantenga la actividad. En algunas realizaciones, los dominios o porciones de dominios se pueden suprimir, por ejemplo, un dominio de anclaje de señal se puede suprimir dejando un truncamiento que comprende una región de tallo y un dominio catalítico; un dominio de señal de anclaje y una porción de una región troncal se pueden suprimir dejando un truncamiento que comprende la región troncal restante y un dominio catalítico; o un dominio de anclaje de señal y una región troncal se pueden suprimir dejando un truncamiento que comprende un dominio catalítico. Además, se pueden producir truncamientos de glicosiltransferasa en el extremo C de la proteína. Por ejemplo, algunas enzimas GalNAcT, tales como GalNAc-T2, tienen un dominio de lectina C-terminal que se puede suprimir sin disminuir la actividad enzimática.

"Sistema de expresión de repliegamiento" se refiere a una bacteria u otro microorganismo con un entorno intracelular oxidativo, que tiene la capacidad de desplegar la proteína que contiene disulfuro en su forma correcta/activa cuando se expresa en este microorganismo. Los ejemplos incluyen sistemas basados en E. coli (por ejemplo, Origami™ (trxB-/gor- de E.coli modificado), Origami 2™ y similares), Pseudomonas (por ejemplo, fluorescens). Para referencias de ejemplos sobre tecnología Origami™ véase, por ejemplo, Lobel y col. (2001) Endocrine 14 (2), 205-212; y Lobel y col. (2002) Protein Express. Purif. 25 (1), 124-133.

III. Introducción

La presente invención proporciona polipéptidos del secun que incluyen al menos una secuencia de glicosilación con unión en O exógena. Cada polipéptido del secun corresponde a un polipéptido precursor. En una realización, el polipéptido precursor no incluye una secuencia de glicosilación con unión en O o con unión en S. En otra realización, el polipéptido precursor (por ejemplo, polipéptido de tipo silvestre) incluye de forma natural una secuencia de glicosilación con unión en O o con unión en S. El polipéptido del secun que corresponde a dicho polipéptido precursor incluye una secuencia de glicosilación con unión en O adicional en una posición diferente. En una realización, cada secuencia de glicosilación es un sustrato para una enzima (por ejemplo, una glicosiltransferasa, tal como GalNAc-T2). La enzima cataliza la transferencia de un resto de glicosilo a partir de una molécula dadora de glicosilo a un átomo de oxígeno o de azufre de una cadena lateral de aminoácido que está sustituida con un grupo hidroxilo (por ejemplo, serina o treonina) o un grupo sulfhidrilo (por ejemplo, cisteína). El aminoácido es parte de la secuencia de glicosilación con unión en O. Los restos de glicosilo ejemplares que se pueden conjugar con la secuencia de glicosilación incluyen restos de GalNAc, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa.

La invención también proporciona conjugados de polipéptidos, en los que un resto de azúcar modificado se une directamente (por ejemplo, a través de una reacción de glicoPEGilación) o indirectamente (por ejemplo, a través de un resto de glicósido intermedio) a una secuencia de glicosilación con unión en O localizada dentro de un polipéptido. El polipéptido puede ser cualquier polipéptido que incluye polipéptidos de tipo silvestre y fármacos biológicos autorizados para los que se conocen secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos. En una realización, el polipéptido precursor es un polipéptido terapéutico de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, tal como un anticuerpo terapéutico, proteínas morfogenéticas óseas (por ejemplo, BMP-7) o factores sanguíneos (por ejemplo, Factor VI, Factor VIII o FIX). Por consiguiente, la presente invención proporciona variantes de polipéptido terapéutico que incluyen dentro de su secuencia de aminoácidos una o más secuencias a de glicosilación con unión en O exógena. La invención proporciona adicionalmente glicoconjugados de dichos polipéptidos.

Además, se proporcionan procedimientos para producir dichos conjugados de polipéptidos. Los procedimientos de glicosilación y de glicoPEGilación de la invención se pueden poner en práctica en cualquier polipéptido que incorpora una secuencia de glicosilación con unión en O o con unión en S. Los procedimientos son especialmente útiles para generar conjugados de polipéptidos de polipéptidos secun, que se diferencian del polipéptido precursor correspondiente por la inclusión de una secuencia de glicosilación exógena.

Los procedimientos de la invención proporcionan conjugados de polipéptidos con mayor vida media terapéutica debido a, por ejemplo, tasa de eliminación reducida, o tasa reducida de absorción por el sistema inmune o reticuloendotelial (RES). Además, los procedimientos de la invención proporcionan un medio para enmascarar determinantes antigénicos en polipéptidos, reduciendo o eliminando de este modo una respuesta inmune del huésped frente al polipéptido. La unión selectiva de agentes de dirección aún polipéptido usando un azúcar modificado apropiado se puede usar para dirigir un polipéptido a un tejido o receptor de superficie celular en particular que es específico para el agente de dirección en particular. Además, se proporcionan proteínas que presentan mayor resistencia a la degradación por proteólisis, un resultado que se consigue mediante la alteración de determinados sitios en la proteína que se escinden o se reconocen con enzimas proteolíticas. En una realización, dicho sitio se sustituyen o se sustituyen parcialmente con una secuencia de glicosilación con unión en O o con unión en S de la invención.

Además, los procedimientos de la invención se pueden usar para modular el "perfil de actividad biológica" de un polipéptido precursor. Los inventores han reconocido que la unión covalente de un grupo de modificación, tal como un polímero soluble en agua (por ejemplo, mPEG) a un polipéptido precursor usando los procedimientos de la invención puede alterar no solamente la disponibilidad, propiedades farmacodinámicas, inmunogenicidad, estabilidad metabólica, biodistribución y solubilidad en agua de las especies de polipéptidos resultantes, sino también puede conducir a la reducción de las actividades terapéuticas indeseadas o al aumento de las actividades terapéuticas deseadas. Por ejemplo, lo anterior se ha observado para el agente hematopoyético eritropoyetina (EPO). Por ejemplo, determinadas variantes de EPO químicamente PEGiladas mostraron actividad eritropoyética reducida mientras que la actividad protectora de tejidos del polipéptido de tipo silvestre se mantuvo. Dicho resultado se describen por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.531.121; documento de patente WO2004/096148, documento de patente WO2006/014466, documento de patente WO2006/014349, documento de patente WO2005/025606 y documento de patente WO2002/053580. Las líneas celulares ejemplares, que son útiles para la evaluación de las actividades biológicas diferenciales de los polipéptidos seleccionados se resumen en la Tabla 1, dada a continuación:

Tabla 1: Líneas celulares usadas para la evaluación biológica de diversos polipéptidos

Polipéptido	Línea celular	Actividad Biológica
EPO	UT7 SY5Y	eritropoyesis neuroprotección
BMP-7	MG-63 HK-2	osteoinducción nefrotoxicidad
NT-3	Neuro2 NIH3T3	neuroprotección (unión a TrkC) neuroprotección (unión a p75)

En una realización, un conjugado de polipéptido de la invención muestra afinidad de unión reducida o aumentada a una proteína diana biológica (por ejemplo, un receptor), un ligando natural o un ligando no natural, tal como un inhibidor. Por ejemplo, la supresión de la afinidad de unión a una clase de receptores específicos puede reducir o eliminar la señalización celular asociada y sucesos biológicos corriente abajo (por ejemplo, respuesta inmune). Por lo tanto, los procedimientos de la invención se pueden usar para crear conjugados de polipéptidos, que tienen perfiles terapéuticos idénticos, similares diferentes a los del polipéptido precursor al que corresponden los conjugados. Los procedimientos de la invención se pueden usar para identificar agentes terapéuticos glicoPEGilados con funciones biológicas específicas (por ejemplo, mejoradas) y para "hacer ajustes" en el perfil terapéutico de cualquier polipéptido terapéutico u otro polipéptido biológicamente activo. GlycoPEGylation™ es una Marca Registrada de Neose Technologies y se refiere a tecnologías que se divulgan en patentes y solicitudes de patente del mismo solicitante, por ejemplo, (documento de patente WO2007/053731; documento de patente WO2007/022512; documento de patente WO2006/127896; documento de patente WO2005/055946; documento de patente WO2006/121569; y documento de patente WO2005/070138).

IV. Composiciones

Polipéptidos

En un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido del secuón. Un polipéptido del secuón tiene una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una secuencia de glicosilación con unión en O exógena de la invención. En una realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido del secuón incluye una secuencia de glicosilación con unión en O exógena, que es un sustrato para una o más de glicosiltransferasas de tipo silvestre, mutantes o truncadas. Las glicosiltransferasas preferentes incluyen GalNAc transferasas, tales como GalNAc-T2 de longitud total o truncada (por ejemplo, GalNAc-T2 humana). Las enzimas GalNAc-T2 ejemplares se muestran en la Tabla 13 (SEC ID N^o 5: **).

En una realización ejemplar, el polipéptido del secuón de la invención se genera a través de tecnología recombinante mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido precursor correspondiente (por ejemplo, polipéptido de tipo silvestre). Los expertos en la materia conocen procedimientos para la preparación de polipéptidos recombinantes. A continuación, en el presente documento se describen procedimientos ejemplares. La secuencia de aminoácidos del polipéptido del secuón puede contener una combinación de secuencias de glicosilación con unión en O de origen natural y exógenas (es decir, de origen no natural).

El polipéptido precursor puede ser cualquier polipéptido con la condición de que dicho polipéptido precursor no sea un miembro seleccionado entre hormona de crecimiento humano (RGH), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón-alfa (INF-alfa), péptido-1 de tipo glucógeno (GLP-1) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los polipéptidos precursores ejemplares incluyen polipéptidos de tipo silvestre y fragmentos de los mismos así como polipéptidos, que se modifican a partir de sus homólogos de origen natural (por ejemplo, mediante mutación o truncamiento previo). Además, un polipéptido precursor puede ser una proteína de fusión. En otra realización, el polipéptido precursor es un polipéptido terapéutico (es decir, fármaco autorizado), tal como los que se usan en la actualidad como agentes farmacéuticos. Una selección no limitante de precursores de polipéptidos se muestra en la Figura 28 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N^o 2007 0026485 presentada el 8 de junio de 2006.

Los polipéptidos precursores ejemplares incluyen factores de coagulación sanguínea (por ejemplo, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor VIII con supresión del dominio B, Factor IX, Factor X y Factor XIII), hormonas, tales como hormona de estimulación de folículos (FSH), así como citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-12) e interferones (es decir INF-*beta*, INF-*gamma*).

Otros polipéptidos precursores ejemplares incluyen enzimas, tales como glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa (por ejemplo, Fabrazyme™), alfa-glucosidasa ácida (maltasa ácida), alfa-L-iduronidasa (por ejemplo, Aldurazyme™), peroxidasa tiroidea (TPO), beta-glucosidasa (véanse, por ejemplo, las enzimas que se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N^o 2010 0015684, y alfa-galactosidasa A (véanse, por ejemplo, las enzimas que se describen en la Patente de Estados Unidos N^o 7.125.843).

Otros polipéptidos precursores ejemplares incluyen proteínas morfogenéticas óseas (por ejemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15), neurotrofinas (por ejemplo, NT-3, NT-4, NT-5), eritropoyetinas (EPO), factores de diferenciación del crecimiento (por ejemplo, GDF-5), factor neurotrófico derivado de la línea celular de la glía (GDNF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), proteasa del factor von Willebrand (vWF), factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), α_1 -antitripsina (ATT, o inhibidor de la proteasa α_1), activador de plasminógenos de tipo tisular (TPA), hirudina, leptina, uroquinasa, Dnasa humana, insulina, proteína de superficie de la hepatitis B (HbsAg), gonadotropina coriónica humana (hCG), toxina-IL-2 de difteria química, péptido 2 de tipo glucagón (es decir GLP-2), antitrombina III (AT-III), proquetisina, CD4, α -CD20, receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), ligando-1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), complemento, transferrina, molécula de adhesión celular dependiente de la glicosilación (GlyCAM), molécula de adhesión de células neurales (N-CAM), proteína de fusión de la región Fc de IgG del receptor de TNF y extendina-4.

Además, dentro del ámbito de la invención se encuentran polipéptidos precursores que son anticuerpos. El término anticuerpo pretende incluir fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, dominios de Fc), anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos Lama, nanocuerpos y similares. Además, en el término se incluyen proteínas de fusión a anticuerpos, tales como quimeras de Ig. Los anticuerpos preferentes incluyen anticuerpos monoclonales humanizados o fragmentos de los mismos. Todos los isótopos conocidos de dichos anticuerpos están dentro del ámbito de la invención. Los anticuerpos ejemplares incluyen los de los factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento endotelial (EGF), factores de crecimiento del endotelio vascular (por ejemplo, anticuerpo monoclonal para VEGF-A, tal como ranibizumab (Lucentis™)) y factores de crecimiento de fibroblastos, tales como FGF-7, FGF-21 y FGF-23) y anticuerpos a sus receptores respectivos. Otros anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos monoclonales anti-TNF-alfa (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 10/411.043), proteína de fusión de la región Fc de IgG del receptor de TNF (por ejemplo, Enbrel™), anticuerpos monoclonales anti-HER2 (por ejemplo, Herceptin™), anticuerpos monoclonales para la proteína F del virus sincitial respiratorio (por ejemplo, Synagis™), anticuerpos monoclonales para TNF- α (por ejemplo, Remicade™), anticuerpos monoclonales para glicoproteínas, tales como IIb/IIIa (por ejemplo, Reopro™), anticuerpos monoclonales para CD20 (por ejemplo, Rituxan™), CD4 y alfa-CD3, anticuerpos monoclonales para PSGL-1 y CEA. Cualquier versión modificada (por ejemplo, mutada previamente) de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente también está dentro del ámbito de la invención.

El polipéptido precursor no es G-CSF, hGH, INF-alfa, FGF, G-CSF de tipo silvestre, hGH de tipo silvestre, INF- alfa de tipo silvestre, o un polipéptido FGF de tipo silvestre.

20 **Secuencia de Glicosilación**

Las secuencias de glicosilación de la invención incluyen secuencias de glicosilación con unión en O.

En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O de la invención está presente de forma natural en un polipéptido de tipo silvestre. Los conjugados de polipéptidos de dichos polipéptidos de tipo silvestre están dentro del ámbito de la invención. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O no está presente o no está presente en la misma posición, en un polipéptido precursor (secuencia de glicosilación con unión en O exógena). La introducción de una secuencia de glicosilación con unión en O exógena en un polipéptido precursor genera un polipéptido del secun de la invención. La secuencia de glicosilación con unión en O se puede introducir en el polipéptido precursor por mutación. En otro ejemplo, la secuencia de glicosilación con unión en O se introduce en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido precursor por síntesis química del polipéptido del secun.

La secuencia de glicosilación con unión en O de la invención puede ser cualquier secuencia corta de aminoácidos. En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O incluye de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, más preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 9 y lo más preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 restos de aminoácidos. Una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención incluye al menos un aminoácido con una cadena lateral que tiene un grupo hidroxilo (por ejemplo, serina o treonina). En una realización, este grupo hidroxilo se convierte en el sitio de glicosilación cuando el polipéptido del secun se somete a una reacción de glicosilación enzimática. Durante esta reacción de glicosilación, el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo se sustituye con un resto de glicosilo. Por lo tanto, el aminoácido que tiene el grupo hidroxilo que está modificado con un resto de glicosilo durante una reacción de glicosilación se denomina "sitio de glicosilación" o "lugar de glicosilación".

40 **Colocación de Secuencias de Glicosilación con unión en O**

En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O, cuando forma parte de un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido del secun de la invención), es un sustrato para una glicosil transferasa. En un ejemplo, la secuencia de glicosilación es un sustrato para una GalNAc transferasa (por ejemplo, GalNAc-T2 humana). En otro ejemplo, la secuencia de glicosilación es un sustrato para una enzima modificada, tal como una GalNAc transferasa con supresión del dominio de lectina (por ejemplo, GalNAc-T2 humana) o GalNAc transferasa con el dominio de lectina truncado (por ejemplo, GalNAc-T2). La eficacia, con la que cada secuencia de glicosilación con unión en O de la invención se glicosila durante una reacción de glicosilación apropiada, puede depender del tipo y de la naturaleza de la enzima, y también puede depender del contexto de la secuencia de glicosilación, especialmente la estructura tridimensional del polipéptido alrededor del sitio de glicosilación.

En general, una secuencia de glicosilación con unión en O se puede introducir en cualquier posición dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. En un ejemplo, la secuencia de glicosilación se introduce en el extremo N del polipéptido precursor (es decir, antes del primer aminoácido o inmediatamente después del primer aminoácido) (mutantes amino-terminales). En otro ejemplo, la secuencia de glicosilación se introduce cerca del extremo amino (por ejemplo, dentro de 10 restos de aminoácidos del extremo N) del polipéptido precursor. En otro ejemplo, la secuencia de glicosilación se sitúa en el extremo C del polipéptido precursor inmediatamente después del último aminoácido del polipéptido precursor (mutantes carboxi-terminales). Además, en otro ejemplo, la secuencia de glicosilación se introduce cerca del extremo C (por ejemplo, dentro de 10 restos de aminoácidos del extremo C) del polipéptido precursor. Además, en otro ejemplo, la secuencia de glicosilación con unión en O se coloca en cualquier lugar entre el extremo N y el extremo C del polipéptido precursor (mutantes internos). En general, es preferente que polipéptido

modificado sea biológicamente activo, incluso si dicha actividad biológica se ve alterada por la actividad biológica del polipéptido precursor correspondiente.

Un factor importante que influye en las eficacias de la glicosilación de polipéptidos del secuón es la accesibilidad al sitio de glicosilación (por ejemplo, una cadena lateral de treonina) para la glicosiltransferasa (por ejemplo, GalNAc transferasa) y otros asociados de reacción, incluyendo moléculas de disolvente. Si la secuencia de glicosilación se coloca dentro de un dominio interno del polipéptido, la glicosilación probablemente será ineficaz. Por lo tanto, en una realización, la secuencia de glicosilación se introduce en una región del polipéptido, que corresponde a la superficie expuesta al disolvente del polipéptido. Una conformación de polipéptidos ejemplar es una en la que el grupo hidroxilo de la secuencia de glicosilación no está orientada hacia dentro, formando enlaces de hidrógeno con otras regiones del polipéptido. Otra conformación ejemplar es una en la que es poco probable que el grupo hidroxilo formen enlaces de hidrógeno con proteínas vecinas.

En un ejemplo, la secuencia de glicosilación se crea dentro de una región específica, seleccionada previamente de la proteína precursora. En la naturaleza, la glicosilación de la cadena principal del polipéptido normalmente se produce dentro de regiones de bucle del polipéptido y en general no dentro de estructuras helicoidales o de lámina beta. Por lo tanto, en una realización, el polipéptido del secuón de la invención se genera mediante la introducción de una secuencia de glicosilación con unión en O en una zona del polipéptido precursor, que corresponde a un dominio de bucle.

Por ejemplo, la estructura cristalina de la proteína BMP-7 contiene dos regiones de bucle extendidas entre Ala⁷² y Ala⁸⁶ así como Ile⁹⁶ y Pro¹⁰³. Mutantes BMP-7 de generación, en los que la secuencia de glicosilación con unión en O se coloca dentro de esas regiones de la secuencia del polipéptido, pueden dar como resultado polipéptidos, en los que la mutación produce escasa o ninguna alteración en la estructura terciaria original del polipéptido (véase por ejemplo, el Ejemplo 1.9).

Sin embargo, los inventores han descubierto que la introducción de una secuencia de glicosilación con unión en O en una posición del aminoácido que entra dentro de una conformación de lámina beta o alfa-helicoidal también puede conducir a polipéptidos secuón, que se glicosila de forma eficaz en la secuencia de glicosilación con unión en O recién introducida. La introducción de una secuencia de glicosilación con unión en O en un dominio de lámina beta o alfa-helicoidal puede causar cambios estructurales en el polipéptido, que, a su vez, permite una glicosilación eficaz.

La estructura cristalina de una proteína se puede usar para identificar los dominios de un tipo silvestre o polipéptido precursor que son los más adecuados para la introducción de una secuencia de glicosilación con unión en O y puede permitir la selección previa de sitios de modificación prometedores.

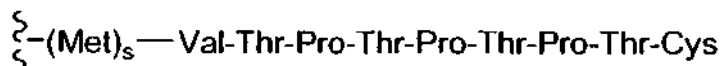
Cuando no está disponible una estructura cristalina, la secuencia de aminoácidos del polipéptido se puede usar para seleccionar previamente sitios de modificación prometedores (por ejemplo, predicción de dominios de bucle frente a dominios alfa-helicoidales). Sin embargo, incluso si se conoce la estructura tridimensional del polipéptido, la dinámica estructural y las interacciones enzima/receptor son variables en solución. Por lo tanto, la identificación de sitios de mutación adecuados así como la selección de secuencias de glicosilación adecuadas, puede implicar la creación de varios polipéptidos del secuón (por ejemplo, bibliotecas de polipéptidos del secuón de la invención) y someter a ensayo esas variantes para características deseables usando protocolos apropiados de identificación sistemática, por ejemplo, los que se describen en el presente documento.

En una realización, el polipéptido precursor es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En un ejemplo, la región constante (por ejemplo, dominio C_H2) de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se modifica con una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención. En un ejemplo, la secuencia de glicosilación con unión en O se introduce de una forma tal que una secuencia de glicosilación con unión en N de origen natural se sustituye o se vea alterada de forma funcional. En otra realización, la identificación sistemática del secuón se realiza a través de un área seleccionada del dominio C_H2 que crea una biblioteca de anticuerpos, cada uno incluyendo una secuencia de glicosilación con unión en O exógena de la invención. En otra realización más, las variantes de polipéptidos resultantes se someten a una reacción de glicosilación enzimática añadiendo un resto de glicosilo a la secuencia de glicosilación introducida. Esas variantes que están lo suficientemente glicosiladas se pueden analizar para su capacidad de unión a un receptor adecuado (por ejemplo, receptor F_c, tal como F_cγRIIIa). En una realización, dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo glicosilado presenta mayor afinidad de unión al receptor F_c cuando se compara con el anticuerpo precursor o con una versión naturalmente glicosilada del mismo. Este aspecto de la invención se describe adicionalmente en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/881.130 presentada el 18 de enero de 2007. La modificación descrita puede cambiar la función efectora del anticuerpo. En una realización, la variante del anticuerpo glicosilado presenta una función efectora reducida, por ejemplo, afinidad de unión reducida a un receptor encontrado en la superficie de un linfocito citolítico natural o en la superficie de un linfocito T citolítico.

En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O no se introduce dentro de la secuencia del polipéptido precursor, pero en su lugar la secuencia del polipéptido precursor se extiende a través de un fragmento de engarce de péptidos al extremo N o C del polipéptido precursor, en el que el fragmento de engarce de péptidos incluye una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención, tal como "PTP". El fragmento de engarce de péptidos puede tener cualquier número de aminoácidos. En una realización el fragmento de engarce de péptidos incluye al menos

aproximadamente 5, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 50 o más de 50 restos de aminoácidos. El fragmento de engarce de péptidos incluye opcionalmente un resto de aminoácido interno o terminal que tiene un grupo funcional reactivo, tal como un grupo amino (por ejemplo, lisina) o un grupo sulfhidrilo (por ejemplo, cisteína). Dicho grupo funcional reactivo se puede usar para unir el polipéptido a otro resto, tal como otro polipéptido, una citotoxina, un fármaco de molécula pequeña u otro grupo de modificación de la invención. Este aspecto de la invención se describe adicionalmente en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/881.130 presentada el 18 de enero de 2007, cuya divulgación se incorpora en el presente documento en su totalidad.

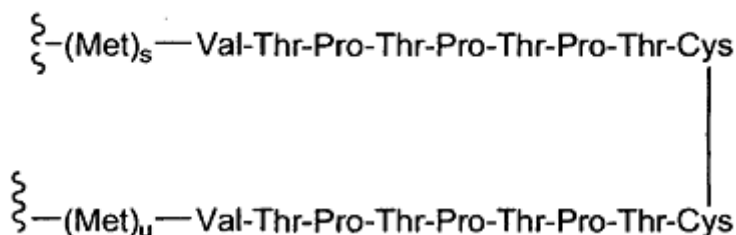
En una realización representativa, la invención proporciona un polipéptido que incluye una secuencia C-terminal que tiene la siguiente fórmula, en la que el número entero s es 0 o 1:



Los expertos en la materia observarán que se pueden usar dímeros u oligómeros de la estructura anterior para formar oligómeros superiores del polipéptido al que se une el fragmento de engarce de péptidos. En una realización ejemplar, el fragmento de engarce de péptidos incluye un resto de lisina que sirve como un punto de ramificación para el engarce, por ejemplo, el grupo amino de la lisina sirve como un punto de unión para la "rama" del engarce. En una realización ejemplar, la lisina sustituye al resto de metionina.

En una realización ejemplar, al menos un resto de treonina del fragmento de engarce de péptidos se puede glicosilar. En otra realización, dos, más preferentemente tres y aún más preferentemente cuatro de los restos de treonina del fragmento de engarce de péptidos están glicosilados.

En otra realización ejemplar, el fragmento de engarce se dimeriza con otro fragmento de engarce de estructura idéntica o diferente a través de la formación de un enlace disulfuro. Por lo tanto, los polipéptidos representativos de la invención incluyen un grupo de unión que tiene la fórmula:



en la que los índices u y s se seleccionan independientemente entre 0 y 1.

En una realización, el polipéptido precursor que se modifica con un fragmento de engarce de péptidos de la invención es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En un ejemplo de acuerdo con la presente realización, el polipéptido precursor es scFv. Los procedimientos que se describen en el presente documento se pueden usar para preparar los scFv de la presente invención en los que el scFv o el engarce se modifican con un resto de glicosilo o con un grupo de modificación unido al péptido a través de un grupo de unión a glicosilo. Los procedimientos de glicosilación y de glicoconjugación ejemplares se establecen, por ejemplo, en el documento de patente PCT/US02/32263 y en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004 0132640.

La Presencia de Restos de Aminoácidos Básicos Influye en la Eficacia de la Glicosilación

Los inventores han descubierto que la glicosilación es más eficaz cuando la secuencia de glicosilación con unión en O incluye un resto de prolina (P) cerca del sitio de glicosilación. Además, para determinadas secuencias de glicosilación con unión en O (por ejemplo, PTEI), y en algunos casos, un segundo resto de prolina inmediatamente después de la secuencia de glicosilación, (por ejemplo, PTEIP) promueve adicionalmente la eficacia de la glicosilación cuando se usa GalNAc-T2 como la glicosiltransferasa.

Sin embargo, los inventores también han descubierto que las secuencias PTxP y PSxP ejemplares, en las que x representa cualquier aminoácido, y en las que los dos restos de prolina están separadas solamente por dos aminoácidos, están sustancialmente no glicosiladas con GalNAc-T2. Por lo tanto, en una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O de la invención no incluye PSxP ni PTxP.

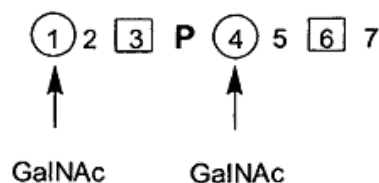
Además, los inventores han descubierto que la sustitución de un resto de aminoácido básico (por ejemplo, lisina), que a un sitio de glicosilación con unión en O, con un aminoácido sin carga, conduce a velocidades de glicosilación cuando se usan determinadas enzimas.

Por ejemplo, la enzima humana GalNAc-T2 reconoce preferentemente secuencias de glicosilación con unión en O de

la invención, en las que al menos 3 restos de aminoácidos se encuentran entre el sitio de glicosilación, (por ejemplo, un resto de treonina o de serina dentro de la secuencia de glicosilación con unión en O) y cualquier resto de lisina (K) o arginina (R). Por ejemplo, aunque la secuencia PTxyzK (en la que x, y, y z representan cualquier aminoácido no básico), se puede glicosilar con GalNAc-T2, de forma poco probable la secuencia PTxyK se va a glicosilar con GalNAc-T2. Por lo tanto, en una realización preferente, en la que se usa GalNAc-T2 para la glicosilación, la secuencia de glicosilación con unión en O de la invención se introduce en una posición dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor que no está en proximidad a un resto de lisina (K) o de arginina (R). En otra realización, la mutación se extiende para sustituir uno o más aminoácidos básicos próximos con un aminoácido no básico, tal como un aminoácido sin carga (por ejemplo, alanina) o un aminoácido ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico. En el Ejemplo 1.3 se proporcionan secuencias ejemplares.

Además, los inventores han descubierto que si dos secuencias de glicosilación con unión en O se centran alrededor de un solo resto de prolina (P en el Esquema 1, dado a continuación), GalNAc-T2 puede añadir múltiples restos de GalNAc a dicha estructura. Dependiendo de la secuencia, la enzima añade un resto de GalNAc en cualquier posición 4 o posición 1, siempre y cuando esté presente ese resto de treonina o de serina. De forma interesante, si se añade un primer resto de GalNAc en la posición 4, se puede añadir un segundo resto de GalNAc en las posiciones 3 y/o 6, si está presente un resto de aminoácido adecuado. Sin embargo, si la posición 4 no está glicosilada, entonces las posiciones 3 y 6 tampoco están glicosiladas. Esto se puede explicar mediante la unión del dominio de lectina de la enzima al resto de GalNAc añadido inicialmente y dirigiendo posteriormente la actividad catalítica a las posiciones 3 y/o 6. Por lo tanto, en una realización, con el fin de reducir la glicosilación múltiple, una glicosiltransferasa con un dominio de lectina suprimido o truncado se puede usar en la reacción de glicosilación. En la Tabla 13 del presente documento se proporcionan secuencias de aminoácidos para enzimas GalNAc-T2 truncadas.

Esquema I: Estructura General de una Secuencia de Glicosilación con unión en O a Modo de Ejemplo



En el Esquema 1, las posiciones de los aminoácidos 1-7 representan ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) o cualquier otro aminoácido sin carga.

En una realización, se incluyen determinados restos de aminoácidos en la secuencia de glicosilación con unión en O para modular la capacidad de expresión del polipéptido mutado en un organismo en particular, tal como *E. coli* (comparar, por ejemplo, el Ejemplo 1), estabilidad proteolítica, características estructurales y/u otras propiedades del polipéptido.

En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O de la invención incluye una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula (I). En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O incluye una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula (II). En otra realización más, la secuencia de glicosilación con unión en O tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula (I). En una realización más, la secuencia de glicosilación con unión en O tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula (II).

$$(X)_m P O^* U (B)_p (Z)_r (J)_s (O)_t (P)_n \quad \text{(I) (SEC ID N°: 1);}$$

y

$$(X)_m (B^1)_P T U B (Z)_r (P)_n (J)_s \quad \text{(II) (SEC ID N°: 2)}$$

En las fórmulas (I) y (II), los números enteros m, n, p, r, s y t se seleccionan independientemente entre 0 y 1. X, U, B, Z, J y O pueden ser cualquier aminoácido. En una realización preferente, U es un miembro seleccionado entre prolina (P), ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga. X, B¹ y B son preferentemente miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga. Z, J y O son preferentemente miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S), tirosina (Y), metionina (M) y aminoácidos sin carga. P es prolina, T es treonina, y S es serina.

En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*EI(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*QA(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*QAS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*QAY(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*QTY(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es

(X)_mPO*INT(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*INA(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*VGS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TGS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TVS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TVA(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TVL(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*VL(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*VGS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*QGA(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*QGAM(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mTET(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*ETQI(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*VL(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TTQ(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TLY(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TLYV(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*LS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*DA(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*EN(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*SG(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*QD(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*AS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*LS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*SS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*SMV(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*ATQ(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*SAV(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*SVG(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPEO*Y(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*SG(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*DG(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*TGS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*SAD(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*SGA(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*INA(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mTGS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mTQS(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*NQE(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mPO*GYA(P)_n. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es (X)_mMIAT(P)_n.

En una realización, en las secuencias anteriores, el número entero m es 0. En otra realización, m es 1. En una realización, el número entero n es 0. En otra realización, n es 1. En una realización, O* es serina (S). En otra realización, O* es treonina (T). P es prolina. X puede ser cualquier aminoácido. En una realización, X es ácido glutámico (E). En otra realización, X es glutamina (Q). En otra realización, X es ácido aspártico (D). En otra realización, X es asparagina (N). En otra realización, X es treonina (T). En otra realización, X es serina (S). En otra realización más, X es un aminoácido sin carga, tal como alanina (A), glicina (G) o valina (V). En las secuencias anteriores, cada T (treonina) está sustituida opcional e independientemente con S (serina) y cada serina (S) está opcional e independientemente sustituida con T (treonina).

Las secuencias de glicosilación con unión en O ejemplares de acuerdo con la presente realización, incluyen: (X)_mPTP, (X)_mPTEI(P)_n, (X)_mPTQA(P)_n, (X)_mPTQAS(P)_n, (X)_mPTQAY(P)_n, (X)_mPTQTY(P)_n, (X)_mPTINT(P)_n, (X)_mPTINA(P)_n, (X)_mPTVGS(P)_n, (X)_mPTTGS(P)_n, (X)_mPTTVS(P)_n, (X)_mPTTVA(P)_n, (X)_mPTTVL(P)_n, (X)_mPTVL(P)_n, (X)_mPTVGS(P)_n, (X)_mPTQGA(P)_n, (X)_mPTQGAM(P)_n, (X)_mTET(P)_n, (X)_mPTETQI(P)_n, (X)_mPTVL(P)_n, (X)_mPTTTQ(P)_n, (X)_mPTTLY(P)_n, (X)_mPTTLYV(P)_n, (X)_mPTLS(P)_n, (X)_mPTDA(P)_n, (X)_mPTEN(P)_n, (X)_mPSSG(P)_n, (X)_mPTQD(P)_n, (X)_mPTAS(P)_n, (X)_mPTLS(P)_n, (X)_mPTSS(P)_n, (X)_mPTSMV(P)_n, (X)_mPTATQ(P)_n, (X)_mPTSAV(P)_n, (X)_mPTSVG(P)_n, (X)_mPETY(P)_n, (X)_mPSSG(P)_n, (X)_mPSDG(P)_n, (X)_mPSTGS(P)_n, (X)_mPTSAD(P)_n, (X)_mPTSGA(P)_n, (X)_mPTINA(P)_n, (X)_mTGS(P)_n, (X)_mTQS(P)_n, (X)_mPTNQE(P)_n, (X)_mPTGYA(P)_n y (X)_mMIAT(P)_n, en las que m, n y X se definen tan como anteriormente. En una realización, en estas secuencias, cada T (treonina) está sustituida opcional e independientemente con S (serina) y cada serina (S) está sustituida opcional e independientemente con T (treonina).

En otra realización ejemplar, la secuencia de glicosilación con unión en O de la invención tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

XPO*P, XPO*QA(P)_n, XPO*EI(P)_n, XPO*INT(P)_n, XPO*TVS, (X)_mPO*TVSP, XPO*QGA, (X)_mPO*QGAP, XPO*QGAM(P)_n, (X)_mPO*VL, XPO*VL(P)_n, XPO*TVL, (X)_mPO*TVLP, (X)_mPO*TLYVP, XPO*TLYV(P)_n, (X)_mPO*DA(P)_n, (X)_mPO*QD(P)_n, (X)_mPO*AS(P)_n, XPO*SAV, (X)_mPO*SAVP y XTET(P)_n. En estas secuencias, cada T (treonina) se puede sustituir opcional e independientemente con S (serina) y cada serina (S) se puede sustituir opcional e independientemente con T (treonina). Los números enteros m y n así como X se definen tal como anteriormente.

Además, en otra realización ejemplar, la secuencia de glicosilación con unión en O de la invención tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

XPTP, XPTQA(P)_n, XPTTEI(P)_n, XPTINT(P)_n, XPTTVS, (X)_nPTTVSP, XPTQGA, (X)_mPTQGAP, XPTQGAM(P)_n, XTETP, (X)_mPTVL, XPTVL(P)_n, XPTTVL, (X)_mPTTVLP, (X)_mPTTLYVP, XPTTLYV(P)_n, (X)_mPTDA(P)_n, (X)_mPTQD(P)_n, (X)_mPTAS(P)_n, XPTSAV, (X)_mPTSAVP y XTET(P)_n. En una realización, cada T (treonina) está

sustituida opcional e independientemente con S (serina) y cada serina (S) está sustituida opcional e independientemente con T (treonina). Los números enteros m y n así como X se definen tal como anteriormente.

En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O de la invención es PTP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTEI. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTEIP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTQA. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTQAP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTINT. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTINTP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTTVS. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTTVL. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTQGAM. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTQGAMP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es TETP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTVL. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTVLP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTLSP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTDAP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTENP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTQDP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTASP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTTVSP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTQGA. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTSAV. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PTTLYV. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PSSGP. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O es PSDGP. La secuencia no se selecciona preferentemente entre PTQGA, PTQGAM, PTQGAMP, APTP y PTP, a menos que la secuencia de glicosilación con unión en O no se diseñe alrededor de un resto de prolina que está presente en el polipéptido G-CSF de tipo silvestre.

En una realización, las secuencias de glicosilación con unión en O están glicosiladas con una eficacia elevada cuando se someten a una reacción de glicosilación adecuada. Por ejemplo, el rendimiento de la reacción para una reacción de glicosilación adecuada es al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 %. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O está glicosilada con un resto de GalNAc solamente en un resto de aminoácido por secuencia de glicosilación cuando la enzima es GalNAc-T2.

Polipéptidos del Secuón

Las secuencias de glicosilación con unión en O de la invención se pueden introducir en cualquier polipéptido precursor de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, creando un polipéptido del secuón de la invención. Los polipéptidos del secuón de la invención se pueden generar usando procedimientos conocidos en la técnica y se describen a continuación en el presente documento (por ejemplo, a través de tecnología recombinante o síntesis química). En una realización, la secuencia precursora se modifica la manera tal que la secuencia de glicosilación con unión en O se inserta en la secuencia precursora añadiendo toda la longitud y el número respectivo de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor. En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O sustituye uno o más aminoácidos del polipéptido precursor. En otra realización, la variación se introduce en el polipéptido precursor, usando uno o más de los aminoácidos existentes previamente para que formen parte de la secuencia de glicosilación. Por ejemplo, un resto de prolina en el péptido precursor se mantiene y esos aminoácidos que siguen inmediatamente a la prolina se mutan para crear una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención. En otra realización más, la secuencia de glicosilación con unión en O se crea usando una combinación de inserción de aminoácidos y sustitución de aminoácidos existentes.

En determinadas realizaciones, un polipéptido precursor en particular de la invención se usa en conjunto con una secuencia de glicosilación con unión en O en particular de la invención. Las combinaciones de polipéptido precursor/secuencia de glicosilación con unión en O ejemplares se resumen en la Tabla 2 (Figura 6). Cada fila en la Figura 6 representa una realización ejemplar de la invención. Las combinaciones mostradas se pueden usar en todos los aspectos de la invención incluyendo polipéptidos secuón, bibliotecas de polipéptidos secuón, conjugados de polipéptido del secuón y procedimientos de la invención. Un experto en la materia observará que las realizaciones que se exponen en la Figura 6 para los polipéptidos precursores indicados se pueden aplicar igualmente a otros polipéptidos precursores que se establecen en el presente documento.

Bibliotecas de polipéptidos del Secuón

Una estrategia para la identificación de polipéptidos, que se glicosilan o glicoPEGilan de forma eficaz (por ejemplo, con un rendimiento satisfactorio) cuando se someten a una reacción de glicosilación o de glicoPEGilación, es insertar una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención una diversidad de posiciones diferentes dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido precursor, incluyendo por ejemplo, dominios de lámina beta y dominios alfa-helicoidales, y a continuación someter a ensayo un número de los polipéptidos del secuón resultantes para su capacidad para funcionar como sustrato eficaz para una glicosiltransferasa, tal como GalNAc-T2 humana.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una biblioteca de polipéptidos del secuón que incluye una pluralidad de miembros diferentes, en la que cada miembro de la biblioteca corresponde a un polipéptido precursor

común e incluye al menos una secuencia de glicosilación con unión en O exógena seleccionada independientemente de la invención. En una realización, cada miembro de la biblioteca incluye la misma secuencia de glicosilación con unión en O, cada uno en una posición diferente del aminoácido dentro del polipéptido precursor. En otra realización, cada miembro de la biblioteca incluye una secuencia de glicosilación con unión en O diferente, sin embargo, en la misma posición del aminoácido dentro del polipéptido precursor. En el presente documento se describen secuencias de glicosilación con unión en O, que son útiles en conjunto con las bibliotecas de la invención. En una realización, la secuencia de glicosilación con unión en O usada en una biblioteca de la invención tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula (I) (SEC ID N°: 1). En otra realización, la secuencia de glicosilación con unión en O usada en una biblioteca de la invención tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula (II) (SEC ID N°: 2). A continuación, en el presente documento se describe la Fórmula (I) y la Fórmula (II).

En una realización preferente, la secuencia de glicosilación con unión en O usada en conjunto con las bibliotecas de la invención tiene una secuencia de aminoácidos, que está entre: (X)_mPT(P)_n, (X)_mPTEI(P)_n, (X)_mPTQA(P)_n, (X)_mPTQAS(P)_n, (X)_mPTQAY(P)_n, (X)_mPTQTY(P)_n, (X)_mPTINT(P)_n, (X)_mPTINA(P)_n, (X)_mPTVGS(P)_n, (X)_mPTTGS(P)_n, (X)_mPTTVS(P)_n, (X)_mPTTVA(P)_n, (X)_mPTTVL(P)_n, (X)_mPTVL(P)_n, (X)_mPTVGS(P)_n, (X)_mPTQGA(P)_n, (X)_mPTQGAM(P)_n, (X)_mTET(P)_n, (X)_mPTETQI(P)_n, (X)_mPTVL(P)_n, (X)_mPTTTQ(P)_n, (X)_mPTTLY(P)_n, (X)_mPTTLYV(P)_n, (X)_mPTLS(P)_n, (X)_mPTDA(P)_n, (X)_mPTEN(P)_n, (X)_mPSSG(P)_n, (X)_mPTQD(P)_n, (X)_mPTAS(P)_n, (X)_mPTLS(P)_n, (X)_mPTSS(P)_n, (X)_mPTSMV(P)_n, (X)_mPTATQ(P)_n, (X)_mPTSAV(P)_n, (X)_mPTSVG(P)_n, (X)_mPETY(P)_n, (X)_mPSSG(P)_n, (X)_mPSDG(P)_n, (X)_mPSTGS(P)_n, (X)_mPTSAD(P)_n, (X)_mPTSGA(P)_n, (X)_mPTINA(P)_n, (X)_mTGS(P)_n, (X)_mTQS(P)_n, (X)_mPTNQE(P)_n, (X)_mPTGYA(P)_n y (X)_mMIAT(P)_n, en las que m y n son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1, X puede ser cualquier aminoácido y es preferentemente un miembro seleccionado entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga. Cada T (treonina) está sustituida opcional e independientemente con S (serina).

En una realización, en la que cada miembro de la biblioteca tiene una secuencia de glicosilación con unión en O común, el polipéptido precursor tiene una secuencia de aminoácidos que incluye "m" aminoácidos. En un ejemplo, la biblioteca de polipéptidos del secuón incluye (a) un primer polipéptido del secuón que tiene la secuencia de glicosilación con unión en O en una primera posición del aminoácido, (AA)_n, dentro del polipéptido precursor, en la que n es un miembro seleccionado entre 1 y m; y (b) al menos un polipéptido del secuón adicional, en el que, en cada polipéptido del secuón adicional, la secuencia de glicosilación con unión en O se introduce en una posición del aminoácido adicional, estando cada posición del aminoácido adicional seleccionada entre (AA)_{n+x} y (AA)_{n-x}, en las que x es un miembro seleccionado entre 1 y (m-n). Por ejemplo, un primer polipéptido del secuón se genera a través de la introducción de una secuencia de glicosilación con unión en O seleccionada en la primera posición del aminoácido. A continuación, los polipéptidos del secuón posteriores se pueden generar mediante la introducción de la misma secuencia de glicosilación con unión en O en una posición del aminoácido, que está localizada adicionalmente hacia el extremo N o C del polipéptido precursor.

En este contexto, cuando n-x es 0 (AA₀), entonces la secuencia de glicosilación se introduce inmediatamente antes del aminoácido N-terminal del polipéptido precursor. Un polipéptido del secuón ejemplar puede tener la secuencia parcial: "PTPM¹ ...".

La primera posición del aminoácido, (AA)_n puede estar en cualquier lugar dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido precursor. En una realización, se selecciona la primera posición del aminoácido (por ejemplo, al comienzo de un dominio de bucle).

Cada posición del aminoácido adicional puede estar en aquel lugar dentro del polipéptido precursor. En un ejemplo, la biblioteca de polipéptidos del secuón incluye un segundo polipéptido del secuón que tiene la secuencia de glicosilación con unión en O en una posición del aminoácido seleccionada entre (AA)_{n+p} y (AA)_{n-p}, en las que p se selecciona de 1 a aproximadamente 10, preferentemente de 1 a aproximadamente 8, más preferentemente de 1 a aproximadamente 6, incluso más preferentemente de 1 a aproximadamente 4 y lo más preferentemente de 1 a aproximadamente 2. En una realización, la biblioteca del polipéptidos del secuón incluye un primer polipéptido del secuón que tienen una secuencia de glicosilación con unión en O en la posición del aminoácido (AA)_n y un segundo polipéptido del secuón que tienen una secuencia de glicosilación con unión en O en la posición del aminoácido (AA)_{n+1} o (AA)_{n-1}.

En otro ejemplo, cada una de las posiciones del aminoácido adicional es inmediatamente adyacente a una posición del aminoácido seleccionada anteriormente. Además, en otro ejemplo, cada posición del aminoácido adicional se retira exactamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácido(s) a partir de una posición del aminoácido seleccionada previamente.

La introducción de una secuencia de glicosilación con unión en O o con unión en S "en una posición del aminoácido dado" del polipéptido precursor significa que la mutación se introduce comenzando inmediatamente a continuación de la posición del aminoácido dado, (hacia el extremo C). La introducción se puede producir a través de una inserción total, (sin sustituir cualquier aminoácido existente), o mediante la sustitución de cualquier número de aminoácidos existentes.

En una realización ejemplar, la biblioteca del polipéptidos del secuón se genera mediante la introducción de la secuencia de glicosilación con unión en O en posiciones del aminoácido consecutivas del polipéptido precursor, cada

uno localiza inmediatamente adyacente a la posición del aminoácido seleccionado previamente, "explorando" de ese modo la secuencia de glicosilación a través de la cadena del aminoácido, hasta que se alcanza una posición deseada del aminoácido final. Inmediatamente adyacente significa exactamente una posición del aminoácido adicional hacia el extremo N o C del polipéptido precursor. Por ejemplo, el primer mutante se crea mediante la introducción de la secuencia de glicosilación en la posición AA_n del aminoácido. El segundo miembro de la biblioteca se genera a través de la introducción del sitio de glicosilación en la posición AA_{n+1} del aminoácido, el tercer mutante en AA_{n+2} , y así sucesivamente. Este procedimiento se ha denominado "exploración del secuón". En el presente documento se proporcionan ejemplos de exploración del secuón, por ejemplo, en el Ejemplo 1.9. Un experto en la materia observará que la exploración del secuón puede implicar el diseño de la biblioteca de modo que el primer miembro tiene la secuencia de glicosilación en la posición del aminoácido, $(AA)_n$, el segundo miembro en la posición del aminoácido, $(AA)_{n+2}$, el tercero en la posición $(AA)_{n+4}$, etc. De forma análoga, los miembros de la biblioteca se pueden caracterizar mediante otras colocaciones estratégicas de la secuencia de glicosilación. Por ejemplo:

- A) miembro 1: $(AA)_n$; miembro 2: $(AA)_{n+3}$; miembro 3: $(AA)_{n+6}$; miembro 4: $(AA)_{n+9}$, etc.
- B) miembro 1: $(AA)_n$; miembro 2: $(AA)_{n+4}$; miembro 3: $(AA)_{n+8}$; miembro 4: $(AA)_{n+12}$, etc.
- C) miembro 1: $(AA)_n$; miembro 2: $(AA)_{n+5}$; miembro 3: $(AA)_{n+10}$; miembro 4: $(AA)_{n+15}$, etc.

En una realización, una primera biblioteca de polipéptidos del secuón se genera por exploración de una secuencia de glicosilación con unión en O seleccionada de la invención a través de una región del polipéptido precursor en particular (por ejemplo, desde el comienzo de una región de bucle en particular de esa región de bucle). A continuación, se genera una segunda biblioteca por exploración de la misma secuencia de glicosilación a través de otra región del polipéptido, "saltándose" esas posiciones del aminoácido, que están ubicadas entre la primera región y la segunda región. La parte de la cadena del polipéptido que se omite, por ejemplo, puede corresponder a un dominio de unión importante para la actividad biológica u otra región de la secuencia del polipéptido conocida por ser inadecuada para la glicosilación. Se puede generar cualquier número de bibliotecas adicionales mediante la realización de "exploración del secuón" para tramos adicionales del polipéptido. En una realización ejemplar, se genera una biblioteca mediante exploración de la secuencia de glicosilación con unión en O a través de todo el polipéptido introduciendo la mutación en cada posición del aminoácido dentro del polipéptido precursor.

En una realización, los miembros de la biblioteca son parte de una mezcla de polipéptidos. Por ejemplo, un cultivo celular se infecta con una pluralidad de vectores de expresión, en el que cada vector incluye la secuencia de ácidos nucleicos para un polipéptido del secuón diferente de la invención. Después de la expresión, el caldo de cultivo puede contener una pluralidad de polipéptidos del secuón diferentes, y por lo tanto incluye una biblioteca de polipéptidos del secuón. Esta técnica puede ser útil para determinar que polipéptido del secuón de una biblioteca se expresa de forma más eficaz en un sistema de expresión dado.

En otra realización, los miembros de la biblioteca existen aislados entre sí. Por ejemplo, se pueden aislar al menos dos de los polipéptidos del secuón de la mezcla anterior. En conjunto, los polipéptidos aislados representan una biblioteca. Como alternativa, cada polipéptido del secuón de la biblioteca se expresa de forma separada y los polipéptidos del secuón se aíslan opcionalmente. En otro ejemplo, cada miembro de la biblioteca se sintetiza por medios químicos y se purifica opcionalmente.

Polipéptidos del Secuón ejemplares

Un polipéptido precursor ejemplar es el BMP-7 recombinante humano. La selección de BMP-7 como un polipéptido precursor ejemplar es para fines ilustrativos y no pretende limitar el ámbito de la invención. Un experto en la materia observará que cualquier polipéptido precursor (por ejemplo, los que se establecen en el presente documento) es igualmente adecuado para las siguientes modificaciones ejemplares. Cualquier variante de polipéptido obtenida de este modo entra dentro del ámbito de la invención. Las variantes de BMP-7 biológicamente activas de la presente invención incluyen cualquier polipéptido BMP-7, parcial o total, que incluye al menos una modificación que nos da como resultado la pérdida básica o total de su actividad biológica tal como se mide mediante cualquier ensayo funcional adecuado conocido por un experto en la materia. La siguiente secuencia (140 aminoácidos) representa una porción biológicamente activa de la secuencia de BMP-7 de longitud total (secuencia S.1):

**M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (SEC ID N°: **)**

Los polipéptidos de la variante BMP-7 ejemplares, que se basan en la secuencia del polipéptido precursor anterior, se enumeran en las Tablas 3-11, dadas a continuación. En una realización preferente, los polipéptidos del secuón se generan tomando los requisitos del sustrato de la glicosiltransferasa en consideración. Por ejemplo, cuando se usa una GalNAc-T2 de longitud total o truncada (preferentemente GalNAc-T2 humana) como la glicosiltransferasa, cualquier resto de aminoácido básico, tal como lisina (K) o arginina (R), que se encuentran cerca (por ejemplo, dentro de tres restos de aminoácidos) del sitio de glicosilación, (por ejemplo, treonina) se sustituye opcionalmente con otro

aminoácido. En las Tablas 1-10, dadas a continuación, dichos aminoácidos básicos se marcan mediante subrayado. El aminoácido de sustitución es preferentemente un aminoácido sin carga, tal como alanina.

En una realización ejemplar, se introducen mutaciones en la secuencia S.1 de aminoácidos BMP-7 de tipo silvestre que sustituye al número correspondiente de aminoácidos en la secuencia precursora, dando como resultado un polipéptido del secun que contiene el mismo número de restos de aminoácidos que el polipéptido precursor. Por ejemplo, sustituyendo directamente tres aminoácidos normalmente en BMP-7 con la secuencia de glicosilación con unión en O "prolina-treonina-prolina" (PTP) y a continuación desplazando secuencialmente la secuencia PTP hacia el extremo C del polipéptido proporciona 137 variantes de BMP-7 incluyendo cada una PTP. Las secuencias ejemplares de acuerdo con la presente realización se enumeran en la Tabla 3, dada a continuación.

10 Tabla 3: Biblioteca ejemplar de variantes de BMP-7 que incluyen 140 aminoácidos en las que tres aminoácidos existentes se sustituyen con la secuencia de glicosilación "PTP" con unión en O

Los aminoácidos básicos que se encuentran cerca del sitio de glicosilación, que se pueden sustituir opcionalmente con un aminoácido sin carga, se marcan mediante subrayado.

Introducción en la posición 1, sustituyendo 3 aminoácidos existentes:

M¹PTPSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Introducción en la posición 2, sustituyendo 3 aminoácidos existentes:

M¹SPTPKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Introducción en la posición 3, sustituyendo 3 aminoácidos existentes:

M¹STPTPQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQD
WIIAPEGYAAYYCEGECAFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAI
SVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

20 Se pueden generar variantes de BMP-7 adicionales mediante "exploración" de la secuencia de glicosilación a través de toda la secuencia de la forma anterior. Todas las secuencias de BMP-7 variantes obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención. El polipéptido del secun final generado de este modo tiene la secuencia siguiente:

Introducción en la posición 137, sustituyendo 3 aminoácidos existentes:

M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACPTP

25 En otra realización ejemplar, la secuencia de glicosilación con unión en O se introduce en la secuencia S.1 de aminoácidos BMP-7 de tipo silvestre (SEC ID N°: **) mediante la adición de uno o más aminoácidos a la secuencia precursora. Por ejemplo, la secuencia de glicosilación PTP con unión en O se añade a la secuencia BMP-7 precursora sustituyendo 2, 1 o ninguno de los aminoácidos en la secuencia precursora. En este ejemplo, el número máximo de restos de aminoácidos añadidos corresponde a la longitud de la secuencia de glicosilación insertada. En una
30 realización ejemplar, la secuencia precursora se extiende exactamente en un aminoácido. Por ejemplo, la secuencia de glicosilación PTP con unión en O se añade al péptido BMP-7 precursor sustituyendo 2 aminoácidos normalmente presentes en BMP-7. Las secuencias ejemplares de acuerdo con la presente realización se enumeran en la Tabla 4, dada a continuación.

35 Tabla 4: Biblioteca ejemplar de polipéptidos BMP-7 mutantes que incluyen 141 aminoácidos, en la que dos aminoácidos existentes se sustituyen con la secuencia de glicosilación "PTP" con unión en O

Los aminoácidos básicos que se encuentran cerca del sitio de glicosilación, que se pueden sustituir opcionalmente con un aminoácido sin carga, se marcan mediante subrayado.

Introducción en la posición 1, sustituyendo 2 aminoácidos (ST)

M¹PTPGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

5 Introducción en la posición 2, sustituyendo 2 aminoácidos (TG)

M¹SPTPSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Introducción en la posición 3, sustituyendo 2 aminoácidos (GS)

M¹STPTPKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Introducción en la posición 4, sustituyendo 2 aminoácidos (SK)

M¹STGPTPKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

10

Introducción en la posición 5, sustituyendo 2 aminoácidos (KQ)

M¹STGSPTPKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Se pueden generar variantes de BMP-7 adicionales mediante "exploración" de la secuencia de glicosilación a través de toda la secuencia de la forma anterior hasta que se consigue la secuencia siguiente:

15 Introducción en la posición 138, sustituyendo 2 aminoácidos existentes (CH):

M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGPTP

Todas las variantes de BMP-7 obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención.

20 Otro ejemplo implica la adición de una secuencia de glicosilación con unión en O (por ejemplo, PTP) al polipéptido precursor (por ejemplo, BMP-7) sustituyendo 1 aminoácido normalmente presente en el polipéptido precursor (doble inserción de aminoácido). Las secuencias ejemplares de acuerdo con la presente realización se enumeran en la Tabla 5, dada a continuación.

Tabla 5: Biblioteca ejemplar de mutantes BMP-7 que incluyen PTP; sustitución de un aminoácido existente (142 aminoácidos)

Los aminoácidos básicos que se encuentran cerca del sitio de glicosilación, que se pueden sustituir opcionalmente con un aminoácido sin carga, se marcan mediante subrayado.

Introducción en la posición 1, sustituyendo 1 aminoácido (S)

M¹PTPTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

5 Introducción en la posición 2, sustituyendo 1 aminoácido (T)

M¹SPTPGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Introducción en la posición 3, sustituyendo 1 aminoácido (G)

M¹STPTPSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Introducción en la posición 4, sustituyendo 1 aminoácido (S)

10 **M¹STGPTPKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW**
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Introducción en la posición 5, sustituyendo 1 aminoácido (K)

M¹STGSPTPKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Se pueden generar variantes de BMP-7 adicionales mediante "exploración" de la secuencia de glicosilación a través de toda la secuencia de la forma anterior hasta que se consigue la secuencia siguiente:

15 Introducción en la posición 139, sustituyendo 1 aminoácido existente (H):

M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCPTP

Todas las variantes de BMP-7 obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención.

20 Además, otro ejemplo implica la creación de una secuencia de glicosilación con unión en O dentro del polipéptido precursor (por ejemplo, BMP-7) sustituyendo ninguno de los aminoácidos normalmente presentes en el polipéptido precursor ir añadiendo toda la longitud de la secuencia de glicosilación, (por ejemplo, triple inserción de aminoácidos para PTP). Las secuencias ejemplares de acuerdo con la presente realización se enumeran en la Tabla 6, dada a continuación.

Tabla 6: Biblioteca ejemplar de variantes de BMP-7 que incluyen PTP; adición de 3 aminoácidos (143 aminoácidos)

Los aminoácidos básicos que se encuentran cerca del sitio de glicosilación, que se pueden sustituir opcionalmente con un aminoácido sin carga, se marcan mediante subrayado.

Introducción en la posición 1, añadiendo 3 aminoácidos

**M¹PTPSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG
WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ
LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

5 Introducción en la posición 2, añadiendo 3 aminoácidos

**M¹SPTPTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG
WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ
LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

Introducción en la posición 3, añadiendo 3 aminoácidos

**M¹STPTPGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG
WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ
LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

Introducción en la posición 4, añadiendo 3 aminoácidos

**M¹STGPTPSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG
WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ
LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

10

Se pueden generar mutantes de BMP-7 adicionales mediante "exploración" de la secuencia de glicosilación a través de toda la secuencia en la forma anterior hasta que se consigue una secuencia final:

Introducción en la posición 140, añadiendo 3 aminoácidos:

**M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCHPTP**

15 Introducción en la posición 140, añadiendo 3 aminoácidos:

Todas las variantes de BMP-7 obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención.

20 Las variantes de BMP-7 análogas a las de los ejemplos en Tablas 1-5 se pueden generar usando cualquiera de las secuencias de glicosilación con unión en O de la invención. Todas las variantes de BMP-7 resultantes están dentro del ámbito de la invención. Por ejemplo, en lugar de PTP, se pueden usar las secuencias PTINT o PTTVS. En una realización ejemplar, PTINT se introduce en el polipéptido precursor sustituyendo 5 aminoácidos normalmente presentes en BMP-7. Las secuencias ejemplares de acuerdo con la presente realización se enumeran en la Tabla 7, dada a continuación.

Tabla 7: Biblioteca ejemplar de variantes de BMP-7 que incluyen PTINT; sustitución de 5 aminoácidos (140 aminoácidos)

M¹PTINTQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQD
WIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAI
SVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

M¹SPTINTRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQD
WIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAI
SVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

M¹STPTINTSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQD
WIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAI
SVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

M¹STGPTINTQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQD
WIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAI
SVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Se pueden generar mutantes de BMP-7 adicionales mediante "exploración" de la secuencia de glicosilación a través de toda la secuencia en la forma anterior hasta que se consigue una secuencia final:

M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRPTINT

- 5 Todas las secuencias de BMP-7 mutante obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención.

En otro ejemplo, la secuencia de glicosilación PTINT con unión en O se añade al polipéptido precursor (por ejemplo, BMP-7) en acerca de cualquiera del extremo N o C de la secuencia precursora, añadiendo de 1 a 5 aminoácidos al polipéptido precursor. Las secuencias ejemplares de acuerdo con la presente realización se enumeran en la Tabla 8, dada a continuación.

- 10 **Tabla 8: Bibliotecas ejemplares de variantes de BMP-7 que incluyen PTINT** (141 - 145 aminoácidos)

Mutantes amino-terminales:

Introducción en la posición 1, añadiendo 5 aminoácidos

Amino-terminal Mutantes:

M¹PTINTSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRD
LGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAP
TQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

- 15 Introducción en la posición 1, añadiendo 4 aminoácidos, sustituyendo 1 aminoácido (S)

M¹PTINTTSGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDL
GWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPT
QLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Introducción en la posición 1, añadiendo 3 aminoácidos, sustituyendo 2 aminoácidos (ST)

**M¹PTINTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG
WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ
LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

Introducción en la posición 1, añadiendo 2 aminoácidos, sustituyendo 3 aminoácidos (STG)

**M¹PTINTSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

5 Introducción en la posición 1, añadiendo 1 aminoácido, sustituyendo 4 aminoácidos (STGS)

**M¹PTINTKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

Mutantes carboxi-terminales

Introducción en la posición 140, añadiendo 5 aminoácidos

**M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCHPTINT**

10 Introducción en la posición 139, añadiendo 4 aminoácidos, sustituyendo 1 aminoácido (H)

**M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCPTINT**

Introducción en la posición 138, añadiendo 3 aminoácidos, sustituyendo 2 aminoácidos (CH)

**M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGPTINT**

Introducción en la posición 137, añadiendo 2 aminoácidos, sustituyendo 3 aminoácidos (GCH)

**M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACPTINT**

15

Introducción en la posición 136, añadiendo 1 aminoácidos, sustituyendo 4 aminoácidos (CGCH)

M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRAPTINT

Además, otro ejemplo implica la inserción de la secuencia de glicosilación PTTVS con unión en O (SEC ID N°: **) en el polipéptido precursor (por ejemplo, BMP-7), añadiendo de 1 a 5 aminoácidos a la secuencia precursora. Las secuencias ejemplares de acuerdo con la presente realización se enumeran en la Tabla 9, dada a continuación.

5

Tabla 9: Biblioteca ejemplar de variantes de BMP-7 que incluyen PTTVS

Los aminoácidos básicos que se encuentran cerca del sitio de glicosilación, que se pueden sustituir opcionalmente con un aminoácido sin carga, se marcan mediante subrayado.

Inserción de un aminoácido

M¹PTTVSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW
 QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL
 NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

M¹SPTTVSQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

M¹STPTTVSRSQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

- 10 Se pueden generar mutantes de BMP-7 adicionales mediante "exploración" de la secuencia de glicosilación a través de toda la secuencia en la forma anterior hasta que se consigue una secuencia final:

M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRAPTTVS

Todas las variantes de BMP-7 obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención.

Inserción de dos aminoácidos

M¹PTTVSSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

M¹SPTTVSSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

M¹STPTTVSSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGW
QDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQL
NAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Se pueden generar variantes de BMP-7 adicionales mediante "exploración" de la secuencia de glicosilación a través de toda la secuencia en la forma anterior hasta que se consigue una secuencia final:

M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACPTTVS

5

Todas las variantes de BMP-7 obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención.

Inserción de tres aminoácidos

M¹PTTVSGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG
WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ
LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

M¹SPTTVSSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG
WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ
LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

M¹STPTTVSSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLG
WQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQ
LNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

Se pueden generar variantes de BMP-7 adicionales mediante "exploración" de la secuencia de glicosilación a través de toda la secuencia en la forma anterior hasta que se consigue una secuencia final:

10

M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGPTTVS

Todas las variantes de BMP-7 obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención.

Inserción de cuatro aminoácidos

**M¹PTTVSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDL
GWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPT
QLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

**M¹SPTTVSGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDL
GWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPT
QLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

**M¹STPTTVSSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDL
GWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPT
QLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

- 5 Se pueden generar variantes de BMP-7 adicionales mediante "exploración" de la secuencia de glicosilación a través de toda la secuencia en la forma anterior hasta que se consigue una secuencia final:

**M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCPTTVS**

Todas las variantes de BMP-7 obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención.

Inserción de cinco aminoácidos

**M¹PTTVSSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRD
LGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAP
TQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

**M¹SPTTVSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRD
LGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAP
TQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

**M¹STPTTVSGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRD
LGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAP
TQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH**

- 10 Se pueden generar variantes de BMP-7 adicionales mediante "exploración" de la secuencia de glicosilación a través de toda la secuencia en la forma anterior hasta que se consigue una secuencia final:

M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
 DWIIAPEGYAAYYCEGECAFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVVPKPCCAPTQLN
 AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCHPTTVS

Todas las variantes de BMP-7 obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención.

Otros ejemplos para polipéptidos del secunón que contienen secuencias de glicosilación con unión en O se divulgan en las Solicitudes de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/710.401 presentada el 22 de agosto de 2005; y N° 60/720.030, presentada el 23 de septiembre de 2005; documento de patente WO2004/99231 y documento de patente WO2004/10327, que se incorporan en el presente documento por referencia para todos los fines.

En un ejemplo, la secuencia de glicosilación con unión en O (por ejemplo, PTP) se coloca en todas dos posiciones posibles del aminoácido dentro de regiones seleccionadas del polipéptido por sustitución de los aminoácidos existentes y/o por inserción. Las secuencias ejemplares de acuerdo con la presente realización se enumeran en la Tabla 10 y en la Tabla 11, dadas a continuación.

Tabla 10: Biblioteca ejemplar de variantes de BMP-7 que incluyen PTP entre A⁷³ y A⁸²

Sustitución de aminoácidos existentes

---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³--- (precursor)
 ---P⁷³TPPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³PTPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPTPSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPPTPYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLPTPMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLNPTPNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLNSPTPA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLNSYPTP⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---

Tabla 11: Biblioteca ejemplar de variantes de BMP-7 que incluyen PTP entre I⁹⁵ y P¹⁰³

Los aminoácidos básicos que se encuentran cerca del sitio de glicosilación, que se pueden sustituir opcionalmente con un aminoácido sin carga, se marcan mediante subrayado.

Sustitución de aminoácidos existentes

---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵TPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵PTPTVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPTPVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPPTPPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPEPTPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPEPTPPP¹⁰³---
 ---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVPTP¹⁰³---

Inserción (con un aminoácido añadido) entre aminoácidos existentes

---P⁷³TPPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³PTPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPTPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPPTPSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLPTPYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---
 ---A⁷³FPLNPTPMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVVPK¹⁰³---

---A⁷³FPLNS**PT**PNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVPKP¹⁰³---

---A⁷³FPLNS**YPT**PA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVPKP¹⁰³---

---A⁷³FPLNS**YMP**TP⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵NPETVPKP¹⁰³---

Inserción (con un aminoácido añadido) entre aminoácidos existentes

---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFP⁹⁵**TP**ETVPKP¹⁰³---

---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵**PT**PETVPKP¹⁰³---

---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵**NPT**PETVPKP¹⁰³---

---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵**NPPT**PVPKP¹⁰³---

---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵**NPEPT**PPKP¹⁰³---

---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵**NPETPT**PKP¹⁰³---

---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵**NPETVP**TPP¹⁰³---

---A⁷³FPLNSYMNA⁸²TNHAIVQTLVHFI⁹⁵**NPETVP**PTP¹⁰³---

Las sustituciones e inserciones anteriores se pueden fabricar usando cualquier secuencia de glicosilación con unión en O de la invención. Todas las variantes de BMP-7 obtenidas de este modo están dentro del ámbito de la invención.

5 En otra realización ejemplar, una o más secuencias de glicosilación con unión en O, tales como las que se han expuesto anteriormente se insertan en un Factor de coagulación sanguínea, por ejemplo, polipéptido del Factor VII, Factor VIII o Factor IX. Como se establece en el contexto de BMP-7, la secuencia de glicosilación con unión en O se puede insertar en cualquiera de los diversos motivos ejemplificados con BMP-7. Por ejemplo, la secuencia de glicosilación con unión en O se puede insertar en la secuencia de tipo silvestre sin sustituir ningún aminoácido nativo en la secuencia de tipo silvestre. En una realización ejemplar, la secuencia de glicosilación con unión en O se inserta en o cerca del extremo N o C del polipéptido. En otra realización ejemplar, uno o más restos de aminoácidos nativos para la secuencia del polipéptido de tipo silvestre se retiran antes de la inserción en el sitio de glicosilación con unión en O. Además, en otra realización ejemplar, uno o más restos de aminoácidos nativos para la secuencia de tipo silvestre son un componente de la secuencia de glicosilación con unión en O (por ejemplo, una prolina) y la secuencia de glicosilación con unión en O incluye el aminoácido o aminoácidos de tipo silvestre. El aminoácido o aminoácidos de tipo silvestre puede estar en cualquier extremo de la secuencia de glicosilación con unión en O o interno en la secuencia de glicosilación con unión en O.

Además, cualquier secuencia de glicosilación con unión en N preexistente se puede sustituir con una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención. Además, una secuencia de glicosilación con unión en O se puede insertar adyacente a una o más secuencias de glicosilación con unión en N. En una realización preferente, la presencia de la secuencia de glicosilación con unión en O evita la glicosilación de la secuencia de glicosilación con unión en N.

25 En un ejemplo representativo, el polipéptido precursor es el Factor VIII. En la presente realización, la secuencia de glicosilación con unión en O se puede insertar en el dominio A, B, o C de acuerdo con cualquiera de los motivos que se han expuesto anteriormente. Más de un sitio de glicosilación con unión en O se puede insertar en un solo dominio o en más de un dominio; de nuevo, de acuerdo con cualquiera de los motivos mencionados anteriormente. Por ejemplo, un sitio de glicosilación con unión en O se puede insertar en cada uno de los dominios A, B y C, los dominios A y C, los dominios A y B o los dominios B y C. Como alternativa, una secuencia de glicosilación con unión en O puede flanquear el dominio A y B o el dominio B y C. Una secuencia de aminoácidos ejemplar para el Factor VIII se proporciona en la Figura 4.

30 En otra realización ejemplar, el polipéptido del Factor VIII es un polipéptido del Factor VIII con el dominio B suprimido (BDD). En la presente realización, la secuencia de glicosilación con unión en O se puede insertar en el engarce del péptido uniendo las subunidades de 80 Kd y 90 Kd del heterodímero del Factor VIII. Como alternativa, la secuencia de glicosilación con unión en O puede flanquear el dominio A y el engarce o el dominio C y el engarce. Como se ha expuesto anteriormente en el contexto BMP-7, la secuencia de glicosilación con unión en O se puede insertarse en sustitución de los aminoácidos existentes, o se puede insertar sustituyendo uno o más aminoácidos del polipéptido precursor. Una secuencia ejemplar para el Factor VIII con el dominio B suprimido (BDD) se proporciona en la Figura 5.

Otros polipéptidos del Factor VII con el dominio B suprimido también son adecuados para uso con la invención, incluyendo, por ejemplo, el polipéptido del Factor VII con el dominio B suprimido que se divulga en Sandberg y col., Seminars in Hematology 38 (2): 4-12 (2000).

40 Como será evidente para un experto en la materia, los polipéptidos que incluyen más de una secuencia de glicosilación con unión en O mutante de la invención también están dentro del ámbito de la presente invención. Se pueden introducir mutaciones adicionales que permitan la modulación de las propiedades del polipéptido, tales como por

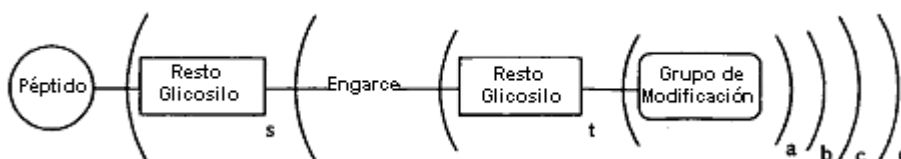
ejemplo, actividad biológica, estabilidad metabólica (por ejemplo, proteólisis reducida), farmacocinética y similares.

Una vez que se prepara una diversidad de variantes, se pueden evaluar para su capacidad para funcionar como un sustrato para glicosilación o glicoPEGilación con unión en O, por ejemplo usando una GalNAc transferasa, tal como GalNAc-T2. La glicosilación y/o glicoPEGilación satisfactoria se puede detectar y cuantificar usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como espectroscopía de masas (por ejemplo, MALDI-TOF o Q-TOF), electroforesis en gel (por ejemplo, en combinación con densitometría) o análisis cromatográficos (por ejemplo, HPLC). Se pueden usar ensayos biológicos, tales como ensayos de inhibición enzimática, ensayos de unión a receptores y/o ensayos basados en células para analizar las actividades biológicas de un polipéptido o conjugado de polipéptido dado. Las estrategias de evaluación se describen con más detalle en el presente documento, a continuación (véase por ejemplo, "Identification of Lead polypeptides", Ejemplo 2, Ejemplo 4 y Figuras 1-3). Estará dentro de las capacidades de una persona experta en la materia seleccionar y/o desarrollar un sistema de ensayo apropiado útil para la evaluación química y biológica de cada polipéptido.

Conjugados de Polipéptidos

En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado covalente entre un polipéptido glicosilado o no glicosilado (por ejemplo, un polipéptido del secuen) y un grupo de modificación seleccionado (por ejemplo, un grupo de modificación polimérico), en el que el grupo de modificación se conjuga con el polipéptido a través de un grupo de unión a glicosilo (por ejemplo, un grupo de unión a glicosilo intacto) de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. El grupo de unión a glicosilo se interpone entre y se une covalentemente tanto al polipéptido como al grupo de modificación. El grupo de unión a glicosilo se une directamente a un resto de aminoácido de la secuencia de glicosilación con unión en O de la invención, o, como alternativa, se une a una secuencia de glicosilación con unión en O a través de uno o más restos adicionales de glicosilo. En ese documento se exponen procedimientos para preparar los conjugados de la invención y en las Patentes de Estados Unidos N° 5.876.980; N° 6.030.815; N° 5.728.554; y N° 5.922.577, así como en el documento de patente WO 98/31826; documento de patente WO2003/031464; documento de patente WO2005/070138; documento de patente WO2004/99231; documento de patente WO2004/10327; documento de patente WO2006/074279; y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003180835.

En general, los conjugados de la invención corresponderán a la estructura general:



en la que los símbolos a, b, c, d y s representan un número entero positivo, distinto de cero; y t es 0 o un número entero positivo. El "grupo de modificación" incluye un agente terapéutico, un agente bioactivo, una marca detectable, un polímero (por ejemplo, polímero soluble en agua) o similares. el conector puede ser cualquiera de una serie amplia de grupos de unión, a continuación. Como alternativa, el engarce puede ser un enlace sencillo. La identidad del polipéptido no tiene limitación.

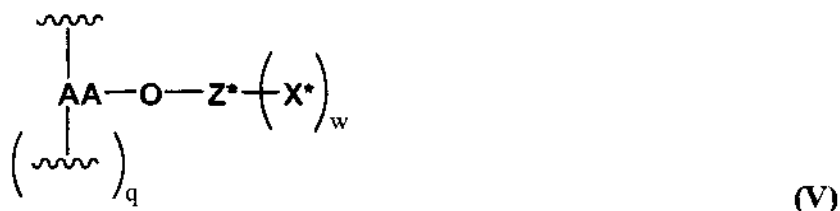
Los conjugados de polipéptidos ejemplares incluyen un resto de GalNAc con unión en O que se une a la secuencia de glicosilación con unión en O (por ejemplo, a través de la acción de una GalNAc transferasa). En una realización, la GalNAc por sí misma se derivatiza con un grupo de modificación y representa el grupo de unión a glicosilo. En otra realización, los restos de glicosilo adicional se unen al resto de GalNAc. Por ejemplo, un resto de Gal o Sia, cada uno de los cuales puede actuar como el grupo de unión a glicosilo, se añade al grupo GalNAc. En realizaciones representativas, el resto de sacárido con unión en O es GalNAc-X*, GalNAc-Gal-X*, GalNAc-Sia-X*, GalNAc-Gal-Sia-X*, o GalNAc-Gal-Gal-Sia-X*, en los que X* es un grupo de modificación.

El polipéptido está preferentemente glicosilado en O en la secuencia de glicosilación con unión en O con un resto de GalNAc. Se pueden añadir restos de azúcar adicionales al resto de con unión en O GalNAc usando una glicosiltransferasa que se sabe que añade a GalNAc, tales como Core-1-Gal transferasas y ST6GalNAc transferasas (por ejemplo, ST6GalNAc-1). Como alternativa, se puede añadir más de un resto de azúcar al polipéptido directamente o al resto de GalNAc con unión en O ya existente. Las glicosiltransferasas útiles para la presente realización incluyen ST3Gal transferasas (por ejemplo, ST3Gal1 y CST-I o CST-II) y ST8-sialiltransferasas. En conjunto con estos procedimientos pueden dar como resultado estructuras de glicosilo que incluyen dos o más restos de azúcar.

En una realización, la presente invención proporciona conjugados de polipéptidos que son altamente homogéneos en sus patrones de sustitución. Usando los procedimientos de la invención, es posible formar conjugados de polipéptidos en los que sustancialmente todos los restos de azúcar modificado a través de la población de conjugados de la invención se unen a un resto de aminoácido o de glicosilo estructuralmente idénticos. Por lo tanto, en una realización ejemplar, la invención proporciona un conjugado de polipéptido del secuen que incluye uno o más restos poliméricos solubles en agua unidos covalentemente a un resto de aminoácido (por ejemplo, serina o treonina) dentro de una secuencia de glicosilación con unión en O a través de a grupo de unión a glicosilo. En un ejemplo, cada resto de

aminoácido que tiene un grupo de unión a glicosilo unido al mismo tiene la misma estructura. En otra realización ejemplar, sustancialmente cada miembro de la población de restos poliméricos solubles en agua se une a través de un grupo de unión a glicosilo a un resto de glicosilo del polipéptido, y cada resto de glicosilo del polipéptido al que se une el grupo de unión a glicosilo tiene la misma estructura.

- 5 En un aspecto, la invención proporciona un conjugado covalente de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas que comprende un polipéptido del secunón que tiene una secuencia de glicosilación con unión en O (por ejemplo, una secuencia de glicosilación con unión en O exógena), comprendiendo dicho conjugado de polipéptido un resto de acuerdo con la Fórmula (V):

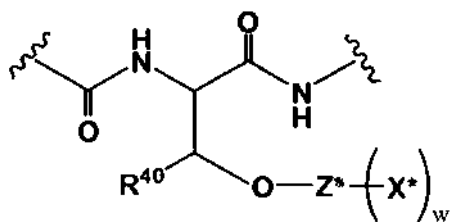


- 10 En la Fórmula (V), w es un número entero seleccionado entre 0 y 1. AA-O- es un resto derivado de un aminoácido dentro de la secuencia de glicosilación con unión en O. en general, el resto AA-O- se deriva de un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo (OH) (por ejemplo, serina o treonina). En una realización, el número entero q es 0 y el aminoácido es un aminoácido N-terminal o C-terminal. En otra realización, q es 1 y el aminoácido es un aminoácido interno. Z* es un resto de glicosilo, que se selecciona entre mono- y oligosacáridos. Z* puede ser un resto mimético de glicosilo.

- 15 En una realización, w en la Fórmula (V) es 1 y el conjugado de polipéptido de la invención incluya al menos un grupo de modificación. En un ejemplo, X* es un grupo de modificación (por ejemplo, un grupo de modificación polimérico). En otro ejemplo, X* es un grupo de unión a glicosilo unido covalentemente a un grupo de modificación. En una realización ejemplar, X* en la Fórmula (V) incluye un resto de sialilo (Sia). En otra realización, X* incluye un resto de galactosilo (Gal). En otra realización más, X* incluye una combinación de restos de Sia y Gal (por ejemplo, un resto de Gal-Sia). En una realización más, X* incluye un resto de GalNAc. En una realización preferente, X* es un resto de Sia.

- 20 En una realización ejemplar, Z* en la Fórmula (V) incluye un resto de Gal. En otra realización ejemplar, Z* incluye un resto de GalNAc. En otra realización más, Z* incluye un resto de GlcNAc. En una realización más, Z* incluye un resto de Xilo, Glc o Sia. Z* también puede ser una combinación de restos de Gal, GalNAc, GlcNAc, Sia, Xyl y Glc. En una realización, Z* incluye un resto mimético de GalNAc. En una realización, Z* es un resto de GalNAc. En otra realización, Z* es un resto de GalNAc-Gal. En otra realización más, Z* es un resto de GalNAc-Sia. En una realización más Z* es un resto de GalNAc-Gal-Sia.

En una realización ejemplar, el conjugado covalentes incluye un resto que tiene la fórmula siguiente, en la que R⁴⁰ es H o alquilo C₁-C₃ sin sustituir:

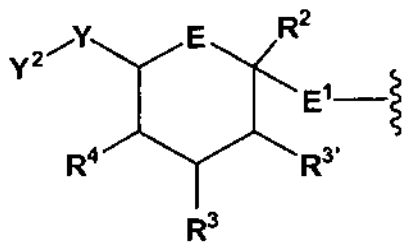


- 30 En una realización preferente, R⁴⁰ en la fórmula anterior es metilo.

Grupo de Unión a Glicosilo

- 35 El componente sacárido del azúcar modificado, cuando se interpone entre el polipéptido y un grupo de modificación, se convierte en un "grupo de unión a glicosilo." En una realización ejemplar, el grupo de unión a glicosilo se forma a partir de un mono- u oligosacárido que, después de la modificación con un grupo de modificación, es un sustrato para una glicosiltransferasa apropiada. En otra realización ejemplar, el grupo de unión a glicosilo se forma a partir de un resto mimético de glicosilo. Los conjugados de polipéptidos de la invención pueden incluir grupos de unión a glicosilo que son mono- o polivalentes (por ejemplo, estructuras antenarias). Por lo tanto, los conjugados de la invención incluyen ambas especies en las que un resto seleccionado se une a un polipéptido a través de un grupo de unión a glicosilo monovalente. Además, dentro de la invención se incluyen conjugados en los que más de un grupo de modificación se une a un polipéptido a través de un grupo de unión polivalente.

En una realización ejemplar, X* en la Fórmula (V) incluye un resto de acuerdo con la Fórmula (VI):

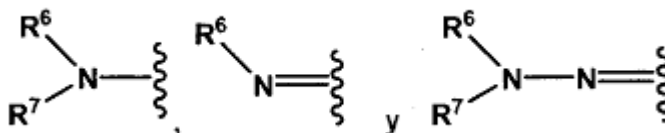


(VI)

En una realización, en la Fórmula (VI), E es O. En otra realización, E es S. además, en otra realización, E es NR²⁷ o CHR²⁸, en los que R²⁷ y R²⁸ son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir y heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir. En una realización, E¹ es O. En otra realización E¹ es S.

En una realización, en la Fórmula (VI), R² es H. En otra realización, R² es -R¹. Además, en otra realización R² es -CH₂R¹. En una realización más, R² es -C(X¹)R¹. En estas realizaciones, R² es OR⁹, SR⁹, NR¹⁰R¹¹, alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir, en los que R⁹ es un miembro seleccionado entre H, un ión metálico, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y acilo. R¹⁰ y R¹¹ son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y acilo. En una realización, X¹ es O. En otra realización, X¹ es un miembro seleccionado entre alquenoil sustituido o sin sustituir, S y NR⁸, en el que R⁸ es un miembro seleccionado entre H, OH, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir.

En una realización, en la Fórmula (VI), Y es CH₂. En otra realización, Y es CH(OH)CH₂. En otra realización más, Y es CH(OH)CH(OH)CH₂. En una realización más, Y es CH. En una realización Y es CH(OH)CH. En otra realización Y es CH(OH)CH(OH)CH. En otra realización más, Y es CH(OH). En una realización más, Y es CH(OH)CH(OH). En una realización Y es CH(OH)CH(OH)CH(OH). Y² es un miembro seleccionado entre H, OR⁶, R⁶, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir,

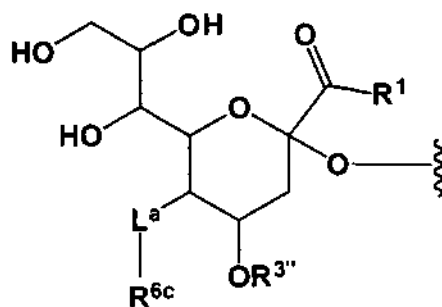


en los que R⁶ y R⁷ son miembros seleccionados independientemente entre H L^a-R^{6b}, C(O)R^{6b}, C(O)-L^a-R^{6b}, C(O)NH-L^a-R^{6b}, C(O)-L^a-R^{6b}, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir. R^{6b} es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y un grupo de modificación.

En la Fórmula (VI), R³, R^{3'} y R⁴ son miembros seleccionados independientemente entre H, OR³ⁿ, SR³ⁿ, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, -L^a-R^{6c}, -C(O)-L^a-R^{6c}, -NH-L^a-R^{6c}, =N-L^a-R^{6c} y -NHC(O)-L^a-R^{6c}, -NHC(O)NH-L^a-R^{6c}, -NHC(O)O-L^a-R^{6c}, en la que R³ⁿ es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir. R^{6c} es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, NR¹³R¹⁴ y un grupo de modificación, en el que R¹³ y R¹⁴ son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir.

En las realizaciones anteriores, cada L^a es un miembro seleccionado independientemente entre un enlace y un grupo de engarce.

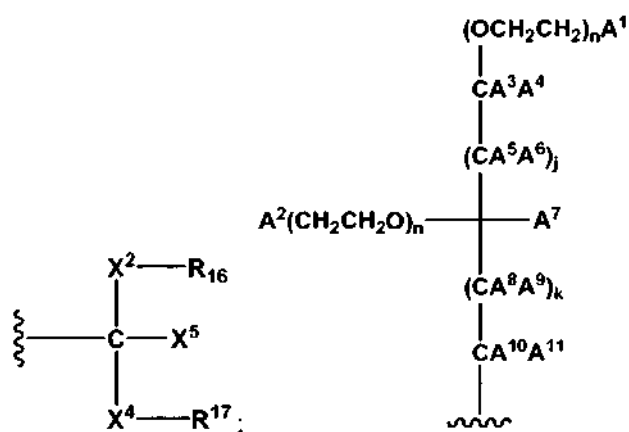
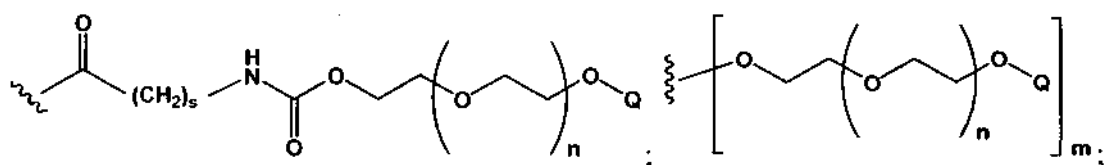
En otra realización, X* en la Fórmula (VI) incluye un resto de acuerdo con la Fórmula (VII):



(VII)

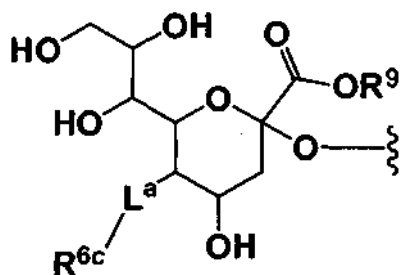
en la que R^1 , L^a , $R^{3''}$ y R^{6c} son tal como se han definido anteriormente. En una realización, en la Fórmula (VII), R^1 es OR^9 . En un ejemplo de acuerdo con la presente realización, R^9 es H, una carga negativa o un contraión metálico.

En otra realización más, al menos uno de R^{6b} (Fórmula VI) y R^{6c} (Fórmula VI o Fórmula VII) es un miembro seleccionado entre:



en el que s , j y k son números enteros seleccionados independientemente de 0 a 20; cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 2500; y m es un número entero de 1-5, Q es un miembro seleccionado entre H y alquilo C_1 - C_6 . R^{16} y R^{17} son restos de polímeros seleccionados independientemente; X^2 y X^4 son fragmentos de unión seleccionados independientemente que unen los restos poliméricos R^{16} y R^{17} a C. X^5 es un grupo no reactivo. 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 sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, $-NA^{12}A^{13}$, $-OA^{12}$ y $-SiA^{12}A^{13}$ en los que A^{12} y A^{13} son miembros seleccionados independientemente entre alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

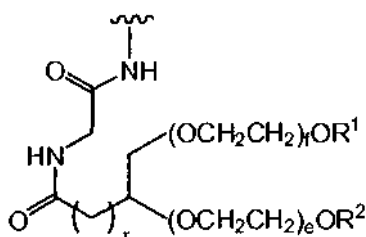
En otra realización, X^* en la Fórmula (VI) incluye un resto de acuerdo con la Fórmula (III):



(III)

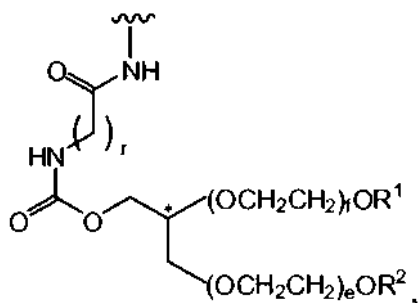
en la que R^9 es H, una carga negativa individual o un contraión metálico. (En el presente documento, $-L^a-R^{6c}$ también se denomina R^p).

En una realización, en la Fórmula (VIII), $-L^a-R^{6c}$ es:



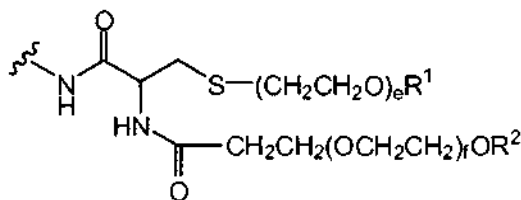
5

En otra realización, en la Fórmula (VIII), $-L^a-R^{6c}$ es:

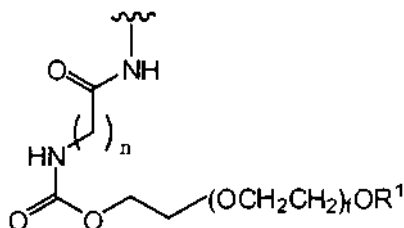


en la que el centro estereogénico indicado con "*" puede ser racémico o definido. En una realización, el centro estereogénico tiene la configuración (S). En otra realización, el centro estereogénico tiene la configuración (R).

10 En otra realización más, en la Fórmula (VIII), $-L^a-R^{6c}$ es:



En otra realización más, en la Fórmula (VIII), $-L^a-R^{6c}$ es:



En cada una de las realizaciones anteriores de Fórmula (VIII), *r* es un número entero seleccionado de 1 a 20 y *f* y *e* son números enteros seleccionados independientemente entre 1-5000.

Grupo de Modificación

El grupo de modificación de la invención puede ser cualquier resto químico. Los grupos de modificación ejemplares se analizan a continuación. Los grupos de modificación se pueden seleccionar por su capacidad para alterar las propiedades (por ejemplo, propiedades biológicas o fisicoquímicas) de un polipéptido dado. Las propiedades de polipéptidos ejemplares que se pueden alterar mediante el uso de grupos de modificación incluyen, pero no se limitan a, farmacocinética, farmacodinámica, estabilidad metabólica, biodistribución, solubilidad en agua, lipofílica, capacidades de dirección a tejidos y el perfil de actividad terapéutica. Los grupos de modificación preferentes son los que mejoran la farmacodinámica y la farmacocinética de un conjugado de polipéptido de la invención que se ha modificado con dicho grupo de modificación. Otros grupos de modificación pueden ser útiles para la modificación de polipéptidos que se pueden usar en aplicaciones de diagnóstico o en sistemas de ensayo biológico *in vitro*.

Por ejemplo, la vida media *in vivo* de los glicopéptidos terapéuticos se puede elevar con restos de polietilenglicol (PEG). La modificación química de polipéptidos con PEG (PEGilación) aumenta su tamaño molecular y en general disminuye la accesibilidad a la superficie y al grupo funcional, cada uno de los cuales son dependientes del número y del tamaño de los restos de PEG unidos al polipéptido. De forma frecuente, esta modificación da como resultado una mejora de la vida media en plasma y de la estabilidad proteolítica, así como una disminución de la inmunogenicidad y de la absorción hepática (Chaffee y col. J. Clin. Invest. 89: 1643-1651 (1992); Pyatak y col. Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol. 29: 113-127 (1980)). Por ejemplo, se ha informado que la PEGilación de la interleuquina-2 aumenta su potencial antitumoral *in vivo* (Katre y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 1487-1491 (1987)) y la PEGilación de un F(ab')₂ derivado del anticuerpo monoclonal A7 ha mejorado su localización tumoral (Kitamura y col. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 1387-1394 (1990)). Por lo tanto, en otra realización, la vida media *in vivo* de un polipéptido derivatizado con un resto de PEG mediante un procedimiento de la invención aumenta con respecto a la vida media *in vivo* del polipéptido precursor no derivatizado.

El aumento de la vida media del polipéptido *in vivo* se expresa mejor como un intervalo de aumento de porcentaje con respecto al polipéptido precursor. El límite inferior del intervalo de aumento de porcentaje es de aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 100 %, aproximadamente un 150 % o aproximadamente un 200 %. El límite superior del intervalo es de aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 100 %, aproximadamente un 150 %, o más de aproximadamente un 250 %.

Grupos de Modificación de Polímeros solubles en Agua

En una realización, el grupo de modificación es un grupo de modificación de polímero seleccionado entre lineal y ramificado. En un ejemplo, el grupo de modificación incluye uno o más restos de polímero, en los que cada resto de polímero se selecciona independientemente.

Los expertos en la materia conocen muchos polímeros solubles en agua y son útiles en la práctica de la presente invención. La expresión polímero soluble en agua incluye especies tales como sacáridos (por ejemplo, dextrano, amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanas, heparinas, etc.); poli(aminoácidos), por ejemplo, poli(ácido aspártico) y poli(ácido glutámico); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(éteres), por ejemplo, poli(etilenglicol); péptidos, proteínas, y similares. La presente invención se puede poner en práctica con cualquier polímero soluble en agua con la única limitación de que el polímero debe incluir un punto en el que se pueda unir el resto del conjugado.

El uso de derivados reactivos del grupo de modificación (por ejemplo, un análogo de PEG reactivo) para unir el grupo de modificación a uno, los restos de polipéptido está dentro del ámbito de la presente invención. La invención no se limita mediante la identidad del análogo reactivo.

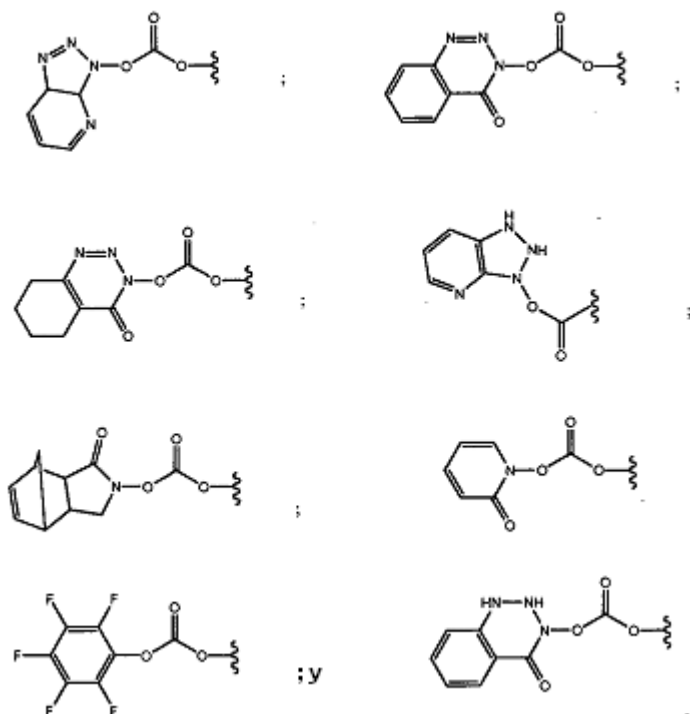
En una realización preferente, el grupo de modificación es PEG o un análogo de PEG. En el mercado están disponibles muchos derivados activados de poli(etilenglicol) y se describen en la bibliografía. Estarían dentro de las capacidades de un experto en la materia elegir, y sintetizar si fuera necesario, un derivado de PEG activado apropiado con el que preparar un sustrato útil en la presente invención. Véase, Abuchowski y col. Cancer Biochem. Biophys., 7: 175-186 (1984); Abuchowski y col., J. Biol. Chem., 252: 3582-3586 (1977); Jackson y col., Anal. Biochem., 165: 114-127 (1987); Koide y col., Biochem Biophys. Res. Commun., 111: 659-667 (1983), tresilato (Nilsson y col., Methods Enzymol., 104: 56-69 (1984); Delgado y col., Biotechnol. Appl. Biochem., 12: 119-128 (1990)); ésteres activos derivados de N-hidroxisuccinimida (Buckmann y col., Makromol. Chem., 182: 1379-1384 (1981); Joppich y col., Makromol. Chem., 180: 1381-1384 (1979); Abuchowski y col., Cancer Biochem. Biophys., 7: 175-186 (1984); Katre y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 1487-1491 (1987); Kitamura y col., Cancer Res., 51: 4310-4315 (1991); Boccu y col., Z. Naturforsch., 38C: 94-99 (1983), carbonatos (Zalipsky y col., POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, Harris, Ed., Plenum Press, Nueva York, 1992, páginas 347-370; Zalipsky y col., Biotechnol. Appl. Biochem., 15: 100-114 (1992); Veronese y col., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141-152 (1985)), formiatos de imidazolilo (Beauchamp y col., Anal. Biochem., 131: 25-33 (1983); Berger y col., Blood, 71: 1641-1647 (1988)), 4-ditiopiridinas (Woghiren y col., Bioconjugate Chem., 4: 314-318 (1993)), isocianatos (Byun y col., ASAIO

Journal, M649-M-653 (1992)) y epóxidos (Patente de Estados Unidos N° 4.806.595, expedida por Noishiki y col., (1989). Otros grupos de unión incluyen la unión a uretano entre grupos amino y PEG activado. Véase, Veronese, y col., Appl. Biochem. Biotechnol., 11: 141-152 (1985).

Se pueden encontrar procedimientos para la activación de polímeros en el documento de patente WO 94/17039, Patente de Estados Unidos N° 5.324.844, documento de patente WO 94/18247, documento de patente WO 94/04193, Patente de Estados Unidos N° 5.219.564, Patente de Estados Unidos N° 5.122.614, documento de patente WO 90/13540, Patente de Estados Unidos N° 5.281.698, y además en el documento de patente WO 93/15189, y para la conjugación entre polímeros activados y péptidos, por ejemplo Factor VIII de Coagulación (documento de patente WO 94/15625), hemoglobina (documento de patente WO 94/09027), molécula portadora de oxígeno (Patente de Estados Unidos N° 4,412,989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese y col., App. Biochem. Biotech. 11: 141-45 (1985)).

En la técnica se conocen moléculas de PEG activado útiles en la presente invención y procedimientos para fabricar esos reactivos y se describen, por ejemplo, en el documento de patente WO04/083259.

Los grupos de activación, o salientes, apropiados para la activación de los PEG lineales de uso en la preparación de los compuestos que se exponen en el presente documento incluyen, pero no se limitan a las especies:



los polímeros solubles en agua ejemplares son aquéllos en los que una proporción sustancial de las moléculas del polímero en una muestra del polímero tienen aproximadamente el mismo peso molecular; dichos polímeros son "homodispersos".

La presente invención se ilustra adicionalmente por referencia a un conjugado de poli(etilenglicol). Están disponibles varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG. Véase, por ejemplo, Harris, Macromol. Chem. Phys. C25: 325-373 (1985); Scouten, Methods in Enzymology 135: 30-65 (1987); Wong y col., Enzyme Microb. Technol. 14: 866-874 (1992); Delgado y col., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249-304 (1992); Zalipsky, Bioconjugate Chem. 6: 150-165 (1995); y Bhadra, y col., Pharmazie, 57: 5-29 (2002). En la técnica se conocen rutas para preparar moléculas reactivas de PEG y para formar conjugados usando las moléculas reactivas. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.672.662 divulga un conjugado de un éster activo soluble en agua y que se puede aislar de un polímero ácido seleccionado entre poli(óxidos de alquileo) lineales o ramificados, poli(poliolios oxietilados), poli(alcoholes olefinicos), y poli(acrilomorfolina).

La Patente de Estados Unidos N° 6.376.604 expone un procedimiento para la fabricación de un éster de 1-benzotriazolilcarbonato soluble en agua de un polímero soluble en agua y no peptídico por reacción de un hidroxilo terminal del polímero con carbonato de di(1-benzotriazoilo) en un disolvente orgánico. El éster activo se usa para formar conjugados con un agente biológicamente activo tal como un polipéptido.

El documento de patente WO 99/45964 describe un conjugado que comprende un agente biológicamente activo y un polímero soluble en agua activado que comprende una cadena principal de polímero que tiene al menos un extremo

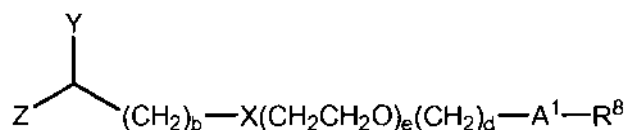
unido a la cadena principal del polímero a través de un enlace estable, en el que al menos un extremo comprende un resto de ramificación que tiene grupos reactivos proximales unidos al resto de ramificación, en el que el agente biológicamente activo está unido a al menos uno de los grupos reactivos proximales. Otros poli(etilenglicoles) ramificados se describen en el documento de patente WO 96/21469. La Patente de Estados Unidos N° 5.932.462 describe un conjugado formado con una molécula de PEG ramificado que incluye un extremo ramificado que incluye grupos funcionales reactivos. Los grupos reactivos libres están disponibles para reaccionar con una especie biológicamente activa, tal como un polipéptido, formando conjugados entre el poli(etilenglicol) y las especies biológicamente. La Patente de Estados Unidos N° 5.446.090 describe un engarce de PEG bifuncional y su uso en la formación de conjugados que tienen un péptido en cada uno de los extremos del engarce de PEG.

Los conjugados que incluyen enlaces de PEG degradables se describen en el documento de patente WO 99/34833; y en el documento de patente WO 99/14259, así como en la Patente de Estados Unidos N° 6.348.558. Dichos enlaces degradables se aplican en la presente invención.

Los procedimientos reconocidos en la técnica de activación de polímeros que se han expuesto anteriormente son de uso en el contexto de la presente invención en la formación de los polímeros ramificados que se exponen en el presente documento y además para la conjugación de estos primeros ramificados con otras especies, por ejemplo, azúcares, nucleótidos de azúcar y similares.

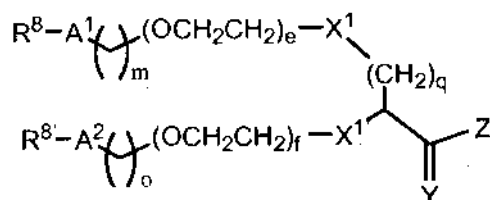
Un polímero soluble en agua ejemplar es el poli(etilenglicol), por ejemplo, metoxipoli(etilenglicol). El poli(etilenglicol) usado en la presente invención no está restringido a ninguna forma o intervalo de peso molecular en particular. Para las moléculas de poli(etilenglicol) sin ramificar, el peso molecular está preferentemente entre 500 y 100.000. un peso molecular de 2000-60.000 se usa preferentemente y más preferentemente de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 40.000.

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



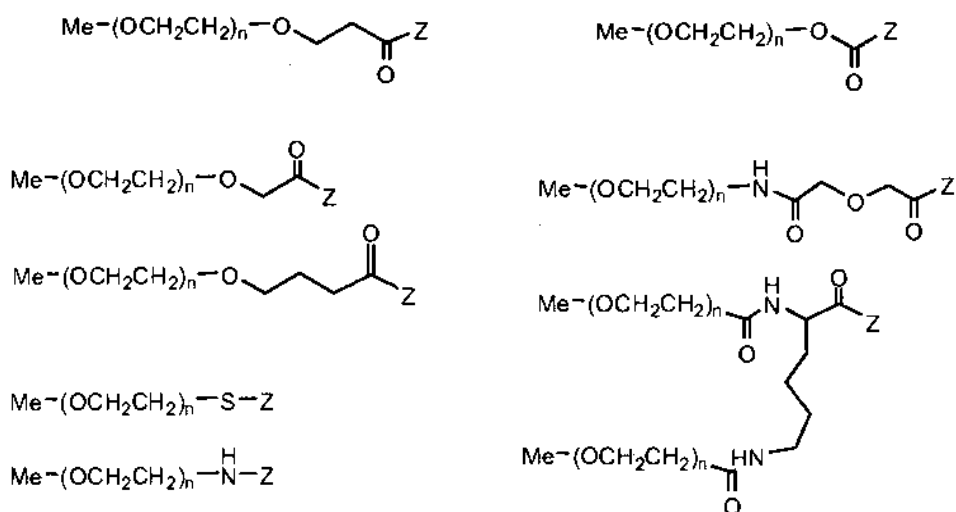
en la que R^8 es H, OH, NH_2 , alquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, por ejemplo, acetal, OHC- , $\text{H}_2\text{N-}(\text{CH}_2)_q$, $\text{HS-}(\text{CH}_2)_q$, o $-(\text{CH}_2)_q\text{C}(\text{Y})\text{Z}^1$. El índice "e" representa un número entero de 1 a 2500. Los índices b, d, y q representan independientemente números enteros de 0 a 20. Los símbolos Z y Z^1 representan independientemente OH, NH_2 , grupos salientes, por ejemplo, imidazol, p-nitrofenilo, HOBt, tetrazol, haluro, S-R^9 , la porción de alcohol de ésteres activados; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{Y}^1)\text{V}$, o $-(\text{CH}_2)_p\text{U}(\text{CH}_2)_s\text{C}(\text{Y}^1)_v$. El símbolo Y representa H(2), =O, =S, =N- R^{10} . Los símbolos X, Y, Y^1 , A^1 , y U representan independientemente los restos O, S, N- R^{11} . El símbolo V representa OH, NH_2 , halógeno, S-R^{12} , el componente de alcohol de ésteres activados, el componente de amina de amidas activadas, nucleótidos de azúcar, y proteínas. Los índices p, c, s y v son miembros seleccionados independientemente entre los números enteros de 0 a 20. Los símbolos R^9 , R^{10} , R^{11} y R^{12} representan independientemente H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

El poli(etilenglicol) útil en la formación del conjugado de la invención es lineal o ramificado. Las moléculas de poli(etilenglicol) ramificado adecuadas para uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, las que se describen con la fórmula siguiente :



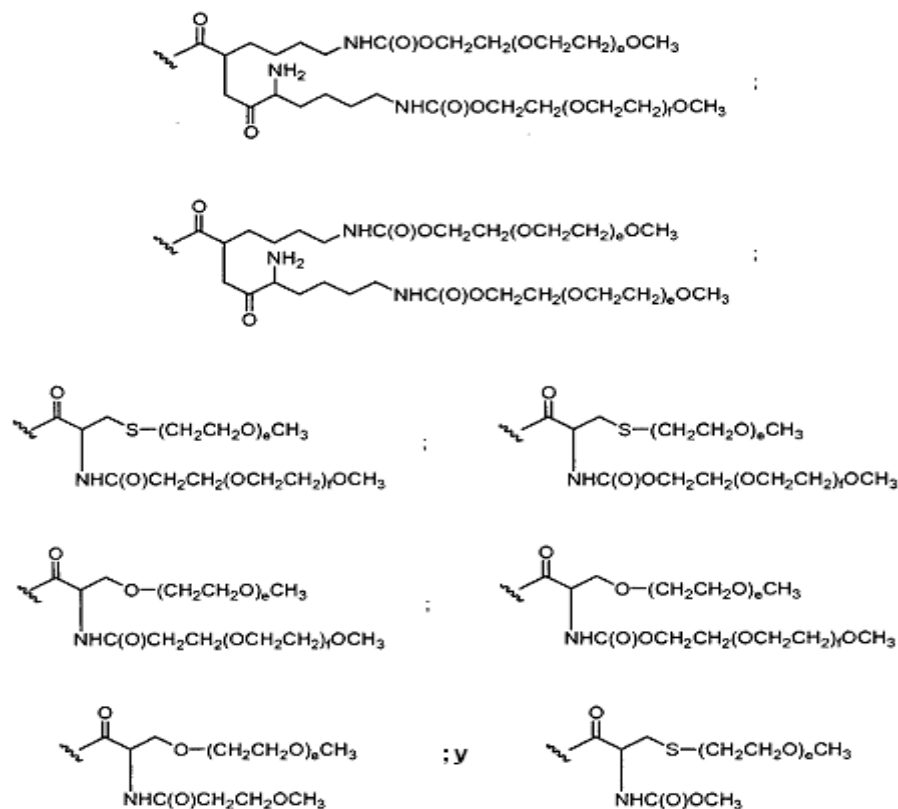
en la que R^8 y R^8 son miembros seleccionados independientemente entre los grupos definidos para R^8 , mencionados anteriormente. A^1 y A^2 son miembros seleccionados independientemente entre los grupos definidos para A^1 , mencionados anteriormente. Los índices e, f, o, y q son tal como se han descrito anteriormente. Z e Y son tal como se han descrito anteriormente. X^1 y X^{11} son miembros seleccionados independientemente entre S, $\text{SC}(\text{O})\text{NH}$, $\text{HNC}(\text{O})\text{S}$, $\text{SC}(\text{O})\text{O}$, O, NH, $\text{NHC}(\text{O})$, $(\text{O})\text{CNH}$ y $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$, $\text{OC}(\text{O})\text{NH}$.

En otras realizaciones ejemplares, el PEG ramificado se basa en un núcleo de cisteína, serina o di-lisina. En otras realizaciones ejemplares, la molécula de poli(etilenglicol) se selecciona entre las estructuras siguientes:



- 5 En una realización adicional, el poli(etilenglicol) es un PEG ramificado que tiene más de un resto de PEG unido. Ejemplos de PEG ramificados se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.932.462; Patente de Estados Unidos N° 5.342.940; Patente de Estados Unidos N° 5.643.575; Patente de Estados Unidos N° 5.919.455; Patente de Estados Unidos N° 6.113.906; Patente de Estados Unidos N° 5.183.660; documento de patente WO 02/09766; Koderá Y., Bioconjugate Chemistry 5: 283-288 (1994); e Yamasaki y *col.*, Agric. Biol. Chem., 52: 2125-2127, 1998. En una
- 10 realización preferente, el peso molecular de cada poli(etilenglicol) del PEG ramificado es menor o igual que 40.000 daltons.

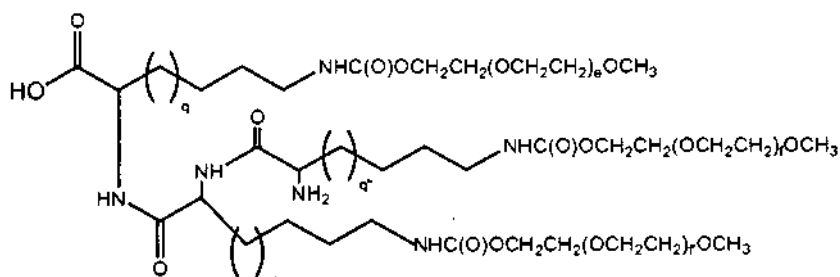
Los restos de modificación de polímeros representativos incluyen estructuras que se basan en aminoácidos que contienen cadenas laterales, por ejemplo, serina, cisteína, lisina, y péptidos pequeños, por ejemplo, lys-lys. Las estructuras ejemplares incluyen:



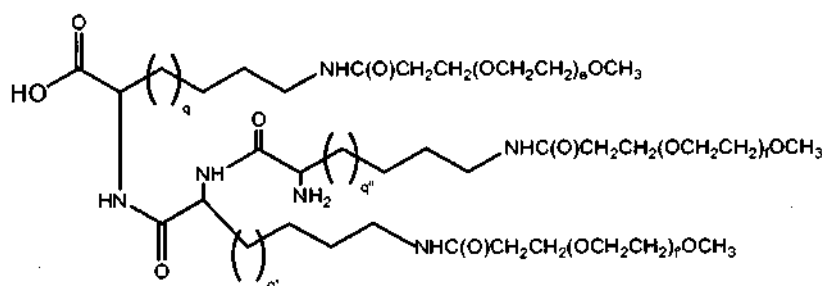
Los expertos la materia observaran que la amina libre en las estructuras de di-lisina también se pueden pegar a través de un enlace de amida o uretano con un resto de PEG.

En otra realización más, el resto de modificación de polímeros es un resto de PEG modificado que se basa en un péptido de tri-lisina. La tri-lisina puede estar mono-, di-, tri-, o tetra-PEG-ilada. Las especies ejemplares de acuerdo con la presente realización tienen las fórmulas:

5



y



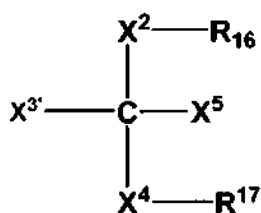
10

en las que los índices e, f y f son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500; y los índices q, q' y q'' son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 20.

15

Como será evidente para los expertos en la materia, los primeros ramificados de uso en la invención incluyen variaciones en los temas que se han expuesto anteriormente. Por ejemplo, el conjugado de di-lisina-PEG que se ha mostrado anteriormente puede incluir tres subunidades poliméricas, la tercera unida a la α -amina que se muestra como sin modificar en la estructura anterior. De forma análoga, el uso de una tri-lisina funcionalizada con tres o cuatro subunidades poliméricas marcadas con el resto de modificación de polímeros de una forma deseada está dentro del ámbito de la invención.

Un precursor ejemplar útil para formar un conjugado de polipéptido con un grupo de modificación ramificado que incluye uno o más restos del polímero (por ejemplo, PEG) tiene la fórmula:



20

En una realización, las especies de polímeros ramificados de acuerdo con esta fórmula son sustancialmente polímeros solubles en agua pura. X^3 es un resto que incluye un grupo funcional ionizable (por ejemplo, OH, COOH, H_2PO_4 , HSO_3 , NH_2 , y sales del mismo, etc.) u otro grupo funcional reactivo, por ejemplo, a continuación. C es carbono. X^5 es un grupo no reactivo (por ejemplo, H, CH_3 , OH y similares). En una realización, X^5 no es preferentemente un resto de polímero. R^{16} y R^{17} se seleccionan independientemente entre grupos no reactivos (por ejemplo, H, alquilo sin sustituir, heteroalquilo sin sustituir) y ramas de polímeros (por ejemplo, PEG). X^2 y X^4 son fragmentos de unión que preferentemente son sustancialmente no reactivos en condiciones fisiológicas. X^2 y X^4 se seleccionan independientemente. Un engarce ejemplar no incluye ni restos aromáticos ni de éster. Como alternativa, estos engarces pueden incluir uno o más restos que se diseñan para degradarse en condiciones fisiológicamente relevantes, por ejemplo, ésteres, disulfuros, etc. X^2 y X^4 unen las ramas de polímero R^{16} y R^{17} a C. En una realización, cuando X^3 se hace reaccionar con un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en un engarce, azúcar o casete de engarce-azúcar, X^3 se convierte en un componente de un fragmento de unión.

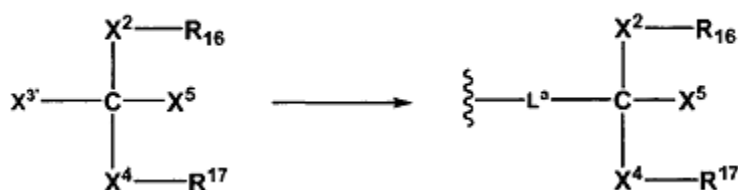
25

30

Los fragmentos de unión ejemplares que incluyen X^2 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, CH₂S, CH₂O, CH₂CH₂O, CH₂CH₂S, (CH₂)₆O, (CH₂)₆S o (CH₂)₆Y'-PEG en el que, Y' es S, NH, NHC(O), C(O)NH, NHC(O)O, OC(O)NH, un O y o es un número entero de 1 a 50. En una realización ejemplar, los fragmentos de unión X^2 y X^4 son fragmentos de unión diferentes.

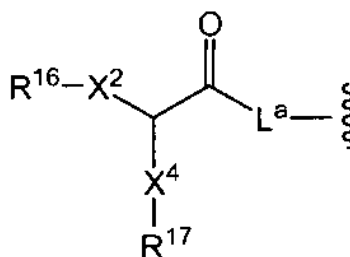
- 5 En una realización ejemplar, uno de los precursores mencionados anteriormente o un derivado activado de los mismos, se hace reaccionar con, y por lo tanto se une a un azúcar, un azúcar activado o un nucleótido de azúcar a través de una reacción entre X^{3a} y un grupo de reactividad complementaria en el resto de azúcar, por ejemplo, una amina. Como alternativa, X^{3a} reacciona con un grupo funcional reactivo en un precursor al engarce L^a de acuerdo con el Esquema 2, dado a continuación.

Esquema 2:



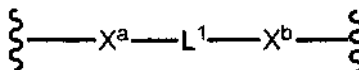
10

En una realización ejemplar, el grupo de modificación se deriva de un aminoácido natural o no natural, análogo de aminoácido o mimético de aminoácido, o un péptido pequeño formado a partir de una o más de dichas especies. Por ejemplo, determinados polímeros ramificados encontrados en los compuestos de la invención tienen la fórmula:



- 15 En este ejemplo, el fragmento de unión C(O)L^a se forma mediante la reacción de un grupo funcional reactivo, por ejemplo, X^{3a} , en un precursor del resto de modificación de polímero ramificado y un grupo funcional reactivo en el resto de azúcar, o un precursor a un engarce. Por ejemplo, cuando X^{3a} es un ácido carboxílico, se puede activar y unir directamente a un grupo amina colgante de un amino-sacárido (por ejemplo, Sia, GalNH₂, GlcNH₂, ManNH₂, etc.), que forma una amida. los grupos funcionales reactivos adicionales ejemplares y precursores activados se describen en lo sucesivo en el presente documento. Los símbolos tienen la misma identidad que los que se han analizado anteriormente.
- 20

En otra realización ejemplar L^a es un resto de unión que tiene la estructura:



- 25 en la que X^a y X^b son fragmentos de unión seleccionados independientemente y L^1 se selecciona entre un enlace, alquilo sustituido o sin sustituir o heteroalquilo sustituido o sin sustituir.

Las especies ejemplares 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.

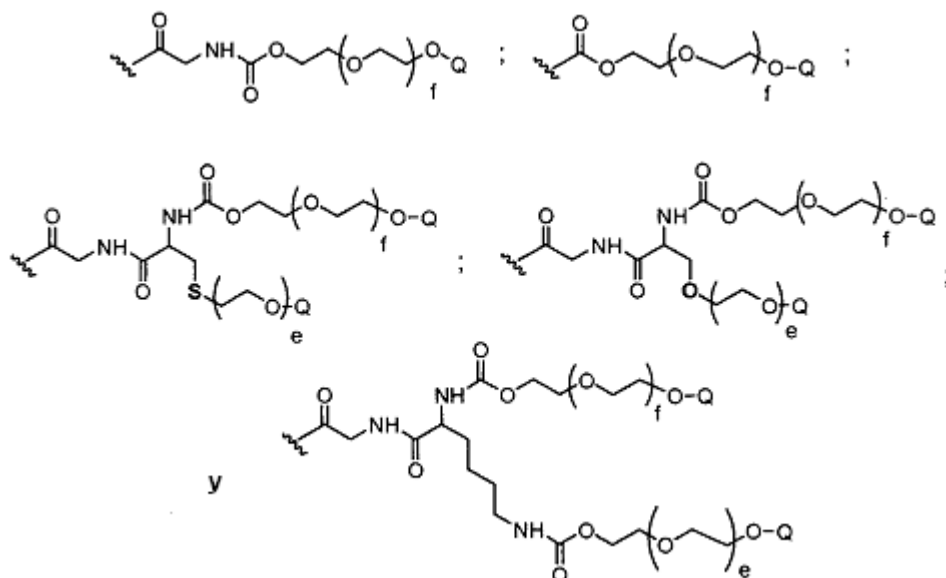
- 30 En otra realización ejemplar, X^4 es un enlace peptídico a R^{17} , que es un aminoácido, dipéptido (por ejemplo, Lys-Lys) o tripéptido (por ejemplo, Lys-Lys-Lys) en el que el resto o restos de alfa-amino y/o heteroátomo o heteroátomos de cadena lateral se modifican con un resto de modificación de polímeros.

- 35 Las realizaciones de la invención que se han expuesto anteriormente se usan a modo de ejemplo adicionalmente por referencia a especies en las que el polímero es un polímero soluble en agua, en particular poli(etilenglicol) ("PEG"), por ejemplo, metoxi-poli(etilenglicol). Los expertos en la materia observarán que el enfoque en las secciones dadas a continuación es para claridad de la ilustración y los diversos motivos expuestos que usan PEG como un polímero ejemplar se aplican del mismo modo a especies en las que se usa un polímero distinto del PEG.

En la presente invención, se puede usar PEG de cualquier peso molecular, por ejemplo, 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa,

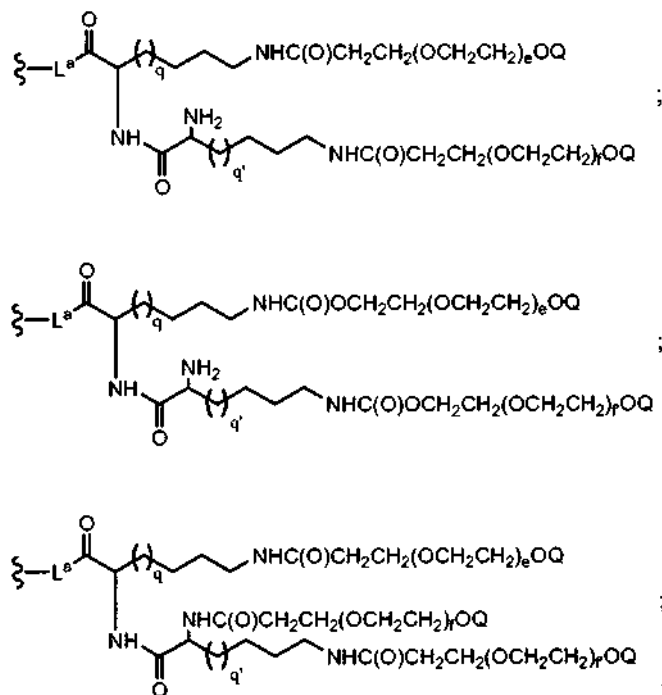
15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 60 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 75 kDa y 80 kDa.

En otras realizaciones ejemplares, el conjugado de polipéptido incluye un resto seleccionado entre el grupo:



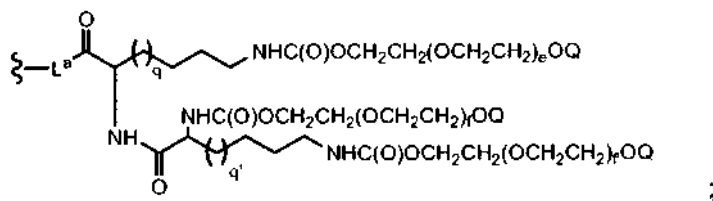
5 En cada una de las fórmulas mencionadas anteriormente, los índices e y f se seleccionan independientemente entre los números enteros de 1 a 2500. En realizaciones adicionales ejemplares, e y f se seleccionan para proporcionar un resto de PEG que tiene aproximadamente 1 kDa, 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 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 y 80 kDa. El símbolo Q representa alquilo sustituido o sin sustituir (por ejemplo, alquilo C_1 - C_6 , por ejemplo, metilo), heteroalquilo sustituido o sin sustituir o H.

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

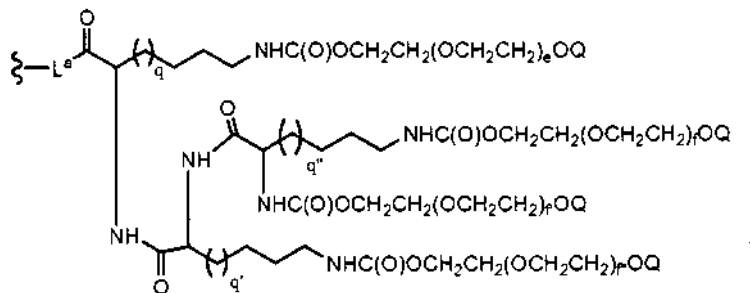


10

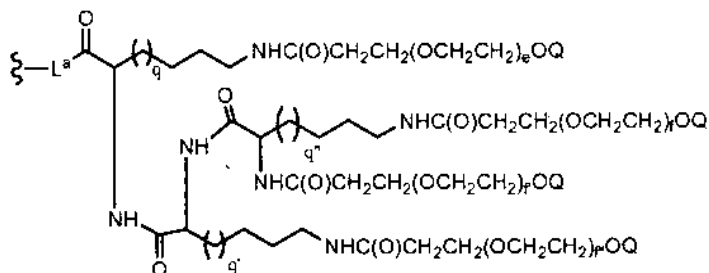
y



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



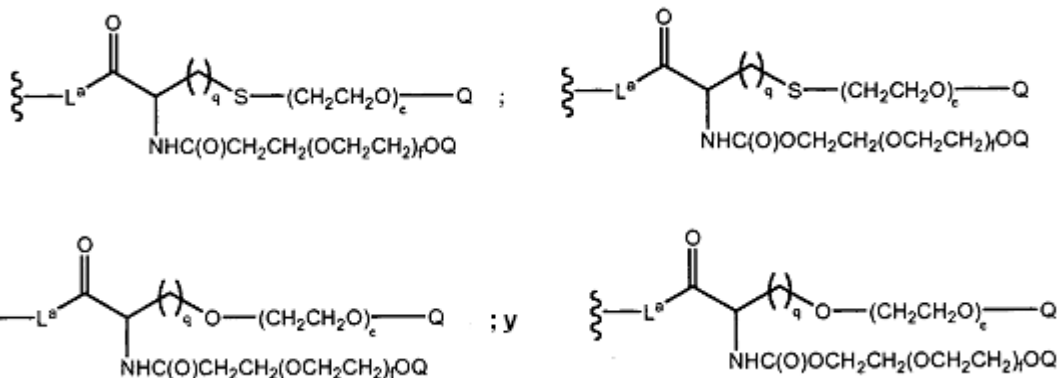
y



5

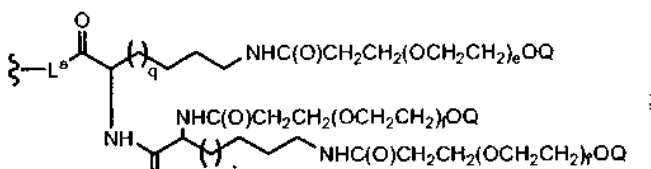
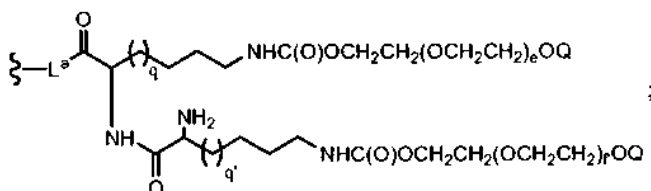
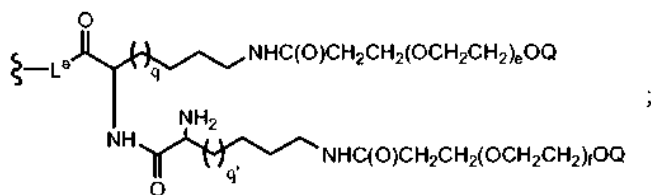
En cada una de las figuras anteriores, los índices e , f , f' y f'' representan números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500. Los índices q , q' y q'' representan números enteros seleccionados independientemente de 1 a 20.

10 En otra realización ejemplar, los conjugados de la invención incluyen una fórmula que es un miembro seleccionado entre:

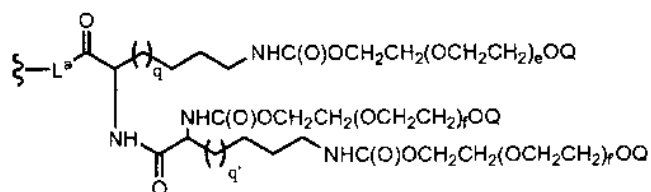


en los que Q es un miembro seleccionado entre H y alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir. Los índices e y f son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500, y el índice q es un número entero seleccionado de 0 a 20.

15 En otra realización ejemplar, los conjugados de la invención incluyen una fórmula que es un miembro seleccionado entre:

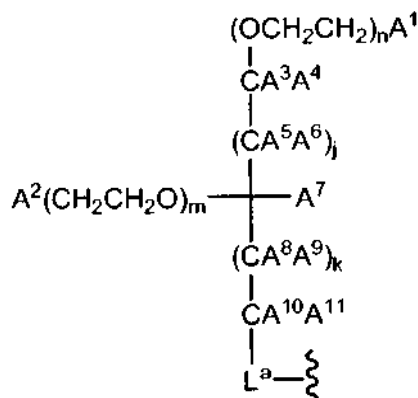


y



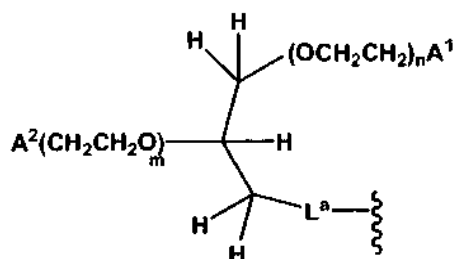
- 5 en las que Q es un miembro seleccionado entre H y alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, preferentemente Me. Los índices e, f and f son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500, y q y q' son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 20.

En otra realización ejemplar, el conjugado de la invención incluye una estructura de acuerdo con la fórmula siguiente:



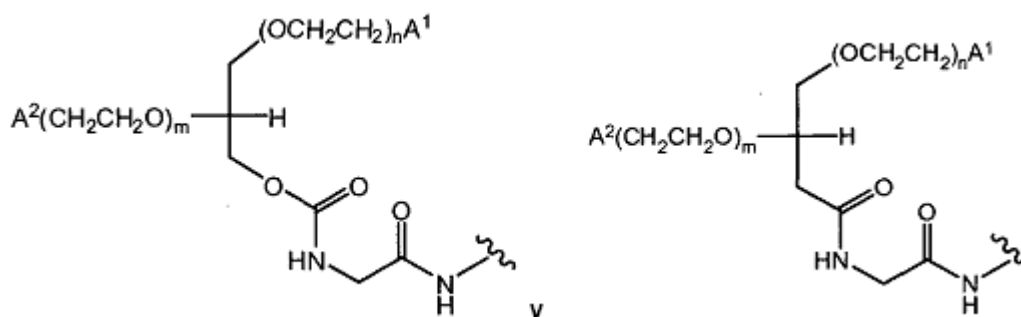
- 10 en la que los índices m y n son números enteros seleccionados independientemente de 0 a 5000. Los índices j y k son números enteros seleccionados independientemente de 0 a 20. A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, A⁸, A⁹, A¹⁰ y A¹¹ son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, -NA¹²A¹³, -OA¹² y -SiA¹²A¹³. A¹² y A¹³ son miembros seleccionados independientemente entre alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir.
- 15

En una realización de acuerdo con la fórmula anterior, el polímero ramificado tiene una estructura de acuerdo con la fórmula siguiente:

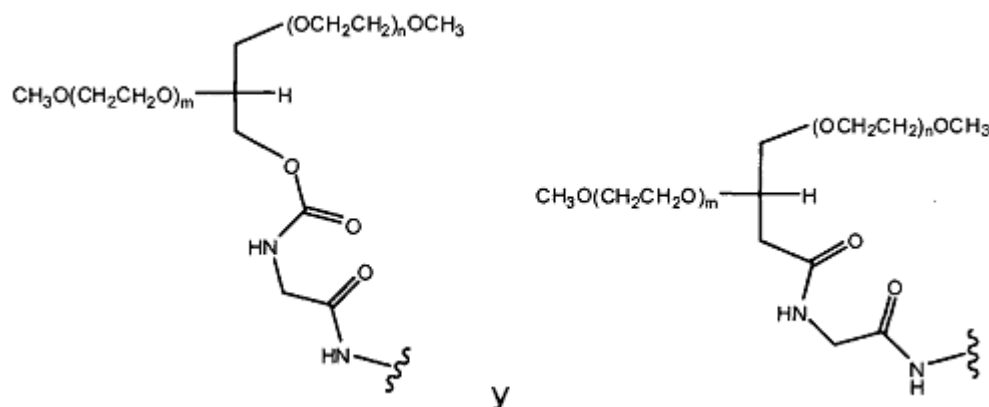


En una realización ejemplar, A¹ y A² son miembros seleccionados independientemente entre -OCH₃ y OH.

- 5 En otra realización ejemplar, el engarce Lᵃ es un miembro seleccionado entre derivados de aminoglicina. Los grupos de modificación de polímero ejemplares de acuerdo con la presente realización tienen una estructura de acuerdo con la fórmula siguiente:



- 10 En un ejemplo, A¹ y A² son miembros seleccionados independientemente entre OCH₃ y OH. Los grupos de modificación de polímero ejemplares de acuerdo con este ejemplo incluyen:

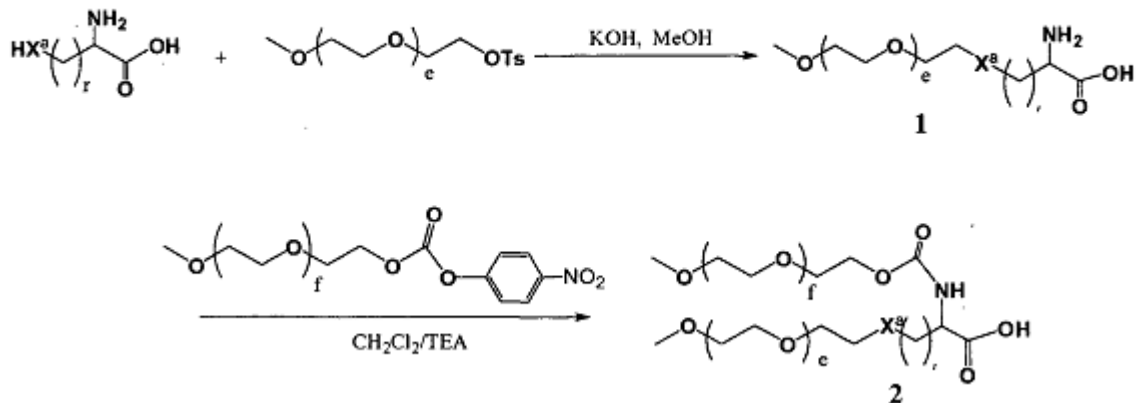


- 15 En cada una de las realizaciones anteriores, en las que el grupo de modificación incluye un centro estereogénico, por ejemplo los que incluyen un engarce de aminoácidos o un engarce a base de glicerol, el centro estereogénico puede ser racémico o definido. En una realización, en la que se define el centro estereogénico, tiene la configuración (S). En otra realización, el centro estereogénico tiene la configuración (R).

- 20 Los expertos en la materia observarán que una o más de las ramas de m-PEG del polímero ramificado se pueden sustituir con un resto de PEG con un extremo diferente, por ejemplo, OH, COOH, NH₂, alquilo C₂-C₁₀, etc. Además, las estructuras mencionadas anteriormente se modifican fácilmente mediante la inserción de engarces de alquilo (o retirando átomos de carbono) entre el átomo de carbono α y el grupo funcional de la cadena lateral. Por lo tanto, los derivados "homo" y homólogos superiores, así como homólogos inferiores están dentro del alcance de los núcleos para los PEG ramificados de uso en la presente invención.

Las especies de PEG ramificados que se exponen el presente documento se preparan fácilmente mediante procedimientos tales como los que se exponen en el Esquema 3, dado a continuación:

Esquema 3: Preparación de una especie de PEG ramificado



en el que X^a es O o S y r es un número entero de 1 a 5. Los índices e y f son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 2500.

Por lo tanto, de acuerdo con el Esquema 3, un aminoácido natural o no natural se pone en contacto con un derivado de m-PEG activado, en este caso el tosilato, que forma 1 por alquilación del heteroátomo X^a de la cadena lateral. El aminoácido de m-PEG mono-funcionalizado se somete a condiciones de N-acilación con un derivado de m-PEG reactivo, ensamblando de ese modo el m-PEG ramificado 2. Como observará un experto en la materia, el grupo saliente de tosilato se puede sustituir con cualquier grupo saliente adecuado, por ejemplo, halógeno, mesilato, triflato, etc. De forma análoga, el carbonato reactivo usado para acilar la amina se puede sustituir con un éster activo, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida, etc., o el ácido se puede activar *in situ* usando un agente de deshidratación tal como dicitohexilcarbodiimida, carbonildiimidazol, etc.

En una realización ejemplar, el grupo de modificación es un resto de PEG, sin embargo, cualquier grupo de modificación, por ejemplo, polímero soluble en agua, polímero insoluble en agua, resto terapéutico, etc., se puede incorporar en un resto de glicosilo a través de un enlace apropiado. El azúcar modificado se forma por medios enzimáticos, medios químicos o una combinación de los mismos, produciendo de ese modo un azúcar modificado. En una realización ejemplar, los azúcares están sustituidos con una amina activa en cualquier posición que permite la unión del resto de modificación, que todavía permite que el azúcar funcione como sustrato para una enzima capaz de acoplar el azúcar modificado al polipéptido de G-CSF. En una realización ejemplar, cuando la galactosamina es el azúcar modificado, el resto de amina se une al átomo de carbono en la posición 6.

Polímeros Insolubles en Agua

En otra realización, análoga a las que se han analizado anteriormente, los azúcares modificados incluyen un polímero insoluble en agua, en lugar de un polímero soluble en agua. Además, los conjugados de la invención pueden incluir uno o más polímeros insolubles en agua. la presente realización de la invención se ilustra mediante el uso del conjugado como un vehículo con el que se administra un polipéptido terapéutico de una forma controlada. En la técnica se conoce sistemas de administración de fármacos poliméricos. Véase, por ejemplo, Dunn y *col.*, Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Los expertos en la materia observarán que sustancialmente cualquier sistema de administración del fármaco conocido se puede aplicar a los conjugados de la presente invención.

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

Los 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. Los miembros particularmente preferentes de las amplias clases de polímeros naturales modificados sintéticamente incluyen, pero no se limitan a, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa,

hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboximetil celulosa, triacetato de celulosa, sal sódica de sulfato de celulosa, y polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos y ácido alginico.

5 Estos y los otros polímeros que se analizan en el presente documento 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 además se pueden sintetizar a partir de monómeros obtenidos en estos proveedores usando técnicas convencionales.

10 Los polímeros biodegradables representativos de uso en los conjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, polilactidas, poliglicólidos y copolímeros de los mismos, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), poli(lactida-co-glicólido), polianhídridos, poliortoésteres, mezclas y copolímeros de los mismos. Son de uso particular composiciones que forman geles, tales como las que incluyen colágeno, pluronics y similares.

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

20 Para fines 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 determinadas regiones o segmentos del copolímero puede ser hidrófilas o incluso solubles en agua, en la molécula de polímero, como un todo, no se disuelve en ninguna medida sustancial en agua.

Para fines de la presente invención, la expresión "molécula que se puede bioreabsorber" incluye una región que es capaz de ser metabolizada o que se puede descomponer y resorber y/o eliminar a través de las vías excretoras normales del organismo. Preferentemente, dichos metabolitos o productos de descomposición son sustancialmente no tóxicos para el organismo.

25 La región que se puede bioreabsorber puede ser hidrófoba o hidrófila, siempre y cuando la composición de copolímero como un todo no se haga soluble en agua. Por lo tanto, la región que se puede bioreabsorber se selecciona en base a la preferencia de que el polímero, como un todo, permanece insoluble en agua. Por consiguiente, las propiedades relativas, es decir, los tipos de grupos funcionales contenidos en, y las proporciones relativas de la región que se puede bioreabsorber, y la región hidrófila se seleccionan para asegurar que las composiciones que se pueden bioreabsorber útiles permanecen insolubles en agua.

30 Los polímeros que se pueden reabsorber ejemplares incluyen, por ejemplo, copolímeros de bloque que se pueden reabsorber producidos de forma sintética de poli(ácido α -hidroxi-carboxílico)/poli(oxialquilen), (véase, Cohn y col., Patente de Estados Unidos N° 4.826.945). Estos copolímeros no están reticulados y son solubles en agua de modo que el organismo puede excretar las composiciones de copolímero de bloque degradadas. Véase, Younes y col., J Biomed. Mater. Res. 21: 1301-1316 (1987); y Cohn y col., J Biomed. Mater. Res. 22: 993-1009 (1988).

35 Los polímeros que se pueden bioreabsorber precedentes en la actualidad incluyen uno o más componentes seleccionados entre poli(ésteres), poli(hidroxi ácidos), 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. Además, más preferentemente, el polímero que se puede bioreabsorber incluye un componente de poli(hidroxi) ácido. De los poli(hidroxi) ácidos, son preferentes el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido policaproico, ácido polibutírico, ácido polivalérico y copolímeros y mezclas de los mismos.

40 Además de formar fragmentos que se absorben *in vivo* ("bioreabsorber"), los revestimientos poliméricos preferentes para uso en los procedimientos de la invención también pueden formar un fragmento que se puede excretar y/o metabolizar.

45 Además, en la presente invención se pueden usar copolímeros de orden superior. Por ejemplo, Casey y col., Patente de Estados Unidos N° 4.438.253, que se expidió el 20 de marzo de 1984, divulga copolímeros de tri-bloque producidos a partir de la transesterificación de poli(ácido glicólico) y un poli(alquilenglicol) terminado en hidroxilo. Dichas composiciones se divulgan para uso como suturas de monofilamento que se pueden reabsorber. La flexibilidad de dichas composiciones se controla mediante la incorporación de un ortocarbonato aromático, tal como ortocarbonato de tetra-p-tolilo en la estructura del copolímero.

50 Además, se pueden usar otros polímeros basados en ácidos láctico y/o glicólico. Por ejemplo, Spinu, Patente de Estados Unidos N° 5.202.413, que se expidió el 13 de abril de 1993, divulga copolímeros de multi-bloque biodegradables que tienen bloques ordenados secuencialmente de polilactida y/o poliglicólido producidos mediante polimerización con apertura del anillo de lactida y/o glicólido en un diol oligomérico o un resto de diamina seguido de extensión de la cadena con un compuesto difuncional, tal como, un diisocianato, cloruro de diacilo o diclorosilano.

Las regiones de revestimientos que se pueden reabsorber útiles en la presente invención se pueden diseñar para que se puedan escindir de forma hidrolítica y/o enzimática. Para fines de la presente invención, "que se puede escindir de forma hidrolítica" se refiere a la susceptibilidad del copolímero, especialmente la región que se puede bioreabsorber, a la hidrólisis en agua o un entorno que contiene agua. De forma análoga, "que se puede escindir de forma enzimática", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la susceptibilidad del copolímero, especialmente la región que se puede bioreabsorber, para escindirse mediante enzimas endógenas o exógenas.

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

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

Se conocen composiciones de hidrogel biocompatibles cuya integridad se puede controlar a través de reticulación y en la actualidad son preferentes para uso en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, Hubbell y *col.*, Patentes de Estados Unidos Nº 5.410.016, que se expidió el 25 de abril de 1995 y Nº 5.529.914, que se expidió el 25 de junio de 1996, divulgan sistemas solubles en agua, que son copolímeros de bloque reticulados que tienen que tienen un segmento de bloque central soluble en agua intercalado entre dos extensiones hidrolíticamente lábiles. Además, dichos copolímeros están protegidos en la parte terminal con grupos funcionales de acrilato fotopolimerizable. Cuando están reticulados, estos sistemas se convierten en hidrogeles. El bloque central soluble en agua de dichos copolímeros puede incluir poli(etilenglicol); mientras que, las extensiones hidrolíticamente lábiles pueden ser un poli(α -hidroxiácido), tal como ácido poliglicólico o ácido poliláctico. Véase, Sawhney y *col.*, *Macromolecules* 26: 581-587 (1993).

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

Además, en otra realización ejemplar, el conjugado de la invención incluye un componente de un liposoma. Los liposomas se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, tal como se describe en Eppstein y *col.*, Patente de Estados Unidos Nº 4.522.811, que se expidió el 11 de junio de 1985. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas se pueden preparar por disolución de lípido o lípidos apropiados (tales como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, araquidol fosfatidil colina, y colesterol) en un disolvente inorgánico que a continuación se evapora, dejando atrás una película delgada de lípido seco en la superficie del recipiente. A continuación, se introduce en el recipiente una solución acuosa del compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable. A continuación, el recipiente se gira a mano para liberar el material lipídico de los lados del recipiente y para dispersar los agregados lipídicos, formando de este modo la suspensión liposomal.

Las micropartículas y los procedimientos de preparación de las micropartículas que se han mencionado anteriormente se ofrecen a modo de ejemplo y no pretenden definir el alcance de las micropartículas de uso en la presente invención. Será evidente para los expertos en la materia que una gran variedad de micropartículas, fabricadas mediante procedimientos diferentes, son de uso en la presente invención.

Los formatos estructurales que se han analizado anteriormente en el contexto de los polímeros solubles en agua, tanto de cadena lineal como ramificada son de aplicación general con respecto a los polímeros insolubles en agua también. Por lo tanto, por ejemplo, los núcleos de ramificación de cisteína, serina, dilisina, y trilisina se pueden funcionalizar con dos restos de polímeros insolubles en agua. Los procedimientos usados para producir estas especies son generalmente muy análogos a los usados para producir los polímeros solubles en agua.

Otros Grupos de Modificación

La presente invención también proporciona conjugados análogos a los que se han descrito anteriormente en los que el polipéptido se conjuga a un resto terapéutico, resto de diagnóstico, resto de dirección, resto de toxina o similar a través de un grupo de unión a glicosilo. Cada uno de los restos mencionados anteriormente puede ser una molécula pequeña, polímero natural (por ejemplo, polipéptido) o un polímero sintético.

Además, en una realización adicional, la invención proporciona conjugados que se localizan selectivamente en un tejido en particular debido a la presencia del agente de dirección como un componente del conjugado. En una realización ejemplar, el agente de dirección es una proteína. Las proteínas ejemplares incluyen transferrina (cerebro,

grupo sanguíneo), glicoproteína HS (hueso, cerebro, grupo sanguíneo), anticuerpos (cerebro, tejido con antígeno específico de anticuerpo, grupo sanguíneo), factores V-XII de coagulación (tejido dañado, coágulos, cáncer, grupo sanguíneo), proteínas del suero, por ejemplo, glicoproteína α -ácida, fetuina, proteína α -fetal (cerebro, grupo sanguíneo), β 2-glicoproteína (hígado, placas de aterosclerosis, cerebro, grupo sanguíneo), G-CSF, GM-CSF, M-CSF, y EPO (estimulación inmune, cánceres, grupo sanguíneo, sobreproducción de glóbulos rojos, neuroprotección), albúmina (aumento de vida media), IL-2 e IFN- α .

En un conjugado dirigido ejemplar, el interferón alfa 2 β (IFN- α 2 β) se conjuga con la transferrina través de un engarce bifuncional que incluye un grupo de unión a glicosilo en cada extremo del resto de PEG (Esquema 1). Por ejemplo, un extremo del engarce de PEG está funcionalizado con un engarce de ácido siálico intacto que se une a la transferrina y el otro está funcionalizado con un engarce de Man con unión en C intacto que se une a IFN- α 2 β .

Biomoléculas

En otra realización, el azúcar modificado lleva una biomolécula. Además, en otras realizaciones, la biomolécula es una proteína, enzima, antígeno, anticuerpo, péptido, ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos individuales o nucleósidos, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos de una y más hebras), lectina, receptor o una combinación de los mismos.

Las biomoléculas preferentes son sustancialmente no fluorescentes, o emiten una cantidad de fluorescencia tan mínima que son inapropiadas para su uso como un marcador fluorescente en un ensayo. Además, en general se prefiere el uso de biomoléculas que no son azúcares. Una excepción a esta preferencia es el uso de un azúcar de otro modo de origen natural que se modifica mediante unión covalente de otra entidad (por ejemplo, PEG, biomolécula, resto terapéutico, resto de diagnóstico, etc). En una realización ejemplar, un resto de azúcar, que es una biomolécula, se conjuga con una rama de engarce y el casete de azúcar-rama de engarce se conjuga posteriormente a un polipéptido a través de un procedimiento de la invención.

Las biomoléculas útiles en la práctica de la presente invención se pueden derivar de cualquier fuente. Las biomoléculas se pueden aislar de fuentes naturales o se pueden producir mediante procedimientos sintéticos. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos naturales o polipéptidos mutados. Las mutaciones se pueden efectuar por mutagénesis química, mutagénesis dirigida al sitio u otros medios de inducción de mutaciones conocidos por los expertos en la materia. Los polipéptidos útiles en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, enzimas, antígenos, anticuerpos y receptores. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; ya sea intactos o fragmentos. Los polipéptidos son opcionalmente los productos de un programa de evolución dirigida.

Los polipéptidos tanto de origen natural como sintéticos y ácidos nucleicos son de uso en conjunto con la presente invención; estas moléculas se pueden unir a un componente de resto de azúcar o un agente de reticulación mediante cualquier grupo reactivo disponible. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden unir a través de un grupo reactivo de amina, carboxilo, sulfhidrilo, o hidroxilo. El grupo reactivo puede residir en un extremo del polipéptido o en un sitio interno en la cadena de polipéptido. Los ácidos nucleicos se pueden unir a través de un grupo reactivo en una base (por ejemplo, amina exocíclica) o un grupo hidroxilo disponible en un resto de azúcar (por ejemplo, 3'-o 5'-hidroxilo). El péptido y las cadenas de ácidos nucleicos se pueden derivatizar adicionalmente a uno o más sitios para permitir la unión de grupos reactivos apropiados en la cadena. Véase, Chrisey y *col.* Nucleic Acids Res. 24: 3031-3039 (1996).

En una realización adicional, la biomolécula se selecciona para dirigir el polipéptido modificado mediante los procedimientos de la invención a un tejido específico, mejorando de ese modo la entrega del polipéptido a ese tejido con respecto a la cantidad de polipéptido no derivatizado que se entrega al tejido. Además, en una realización adicional, la cantidad de polipéptido derivatizado entregado a un tejido específico dentro de un período de tiempo seleccionado se ve reforzada por derivatización en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente, al menos aproximadamente un 40 %, y todavía más preferentemente, al menos aproximadamente un 100 %. En la actualidad, las biomoléculas preferentes para aplicaciones de dirección incluyen anticuerpos, hormonas y ligandos para receptores de la superficie celular.

Además, en otra realización ejemplar adicional, se proporciona como conjugado con biotina. Por lo tanto, por ejemplo, un polipéptido biotinilado de forma selectiva se elabora mediante la unión de un resto de avidina o estreptavidina que lleva uno o más grupos de modificación.

Restos terapéuticos

En otra realización, el azúcar modificado incluye un resto terapéutico. Los expertos en la materia observarán que existe una superposición entre la categoría de restos terapéuticos y biomoléculas; muchas biomoléculas tienen propiedades o potencial terapéutico.

Los restos terapéuticos pueden ser agentes ya aceptados para uso clínico o pueden ser fármacos cuyo uso es experimental, o cuya actividad o mecanismo de acción está en investigación. Los restos terapéuticos pueden tener una acción demostrada en una patología determinada o pueden ser solamente la hipótesis para mostrar la acción deseable en una patología dada. En otra realización, los restos terapéuticos son compuestos, que se están identificando sistemáticamente por su capacidad de interactuar con un tejido de elección. Los restos terapéuticos, que son útiles en

la práctica de la presente invención incluyen fármacos de una amplia gama de clases de fármacos que tienen una diversidad de actividades farmacológicas. Los restos terapéuticos precedentes son sustancialmente no fluorescentes, o emiten una cantidad de fluorescencia tan mínima que son inapropiados para su uso como un marcador fluorescente en un ensayo. Además, en general se prefiere generalmente el uso de restos terapéuticos que no son azúcares. Una excepción a esta preferencia es el uso de un azúcar que se modifica mediante la unión covalente de otra entidad, tal como un PEG, biomolécula, resto terapéutico, resto de diagnóstico y similares. En otra realización ejemplar, un resto terapéutico de azúcar se conjuga a una rama de engarce y el casete de azúcar-rama de engarce se conjuga posteriormente a un polipéptido a través de un procedimiento de la invención.

Los procedimientos de conjugación de agentes terapéuticos y de diagnóstico a otras especies diversas son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; y Dunn y *col.*, Eds. *POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS*, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991.

En una realización ejemplar, el resto terapéutico se une al azúcar modificado a través de un enlace que se escinde en condiciones seleccionadas. Las condiciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un pH seleccionado (por ejemplo, estómago, intestino, vacuola endocítica), la presencia de una enzima activa (por ejemplo, esterasa, reductasa, oxidasa), luz, calor y similares. En la técnica se conocen muchos grupos escindibles. Véase, por ejemplo, Jung y *col.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 761: 152-162 (1983); Joshi y *col.*, *J. Biol. Chem.*, 265: 14518-14525 (1990); Zarling y *col.*, *J. Immunol.*, 124: 913-920 (1980); Bouizar y *col.*, *Eur. J. Biochem.*, 155: 141-147 (1986); Park y *col.*, *J. Biol. Chem.*, 261: 205-210 (1986); Browning y *col.*, *J. Immunol.*, 143: 1859-1867 (1989).

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

Los fármacos antimicrobianos que son preferentes para su incorporación en la presente composición incluyen, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de fármacos de β -lactama, fármacos de quinolona, ciprofloxacina, norfloxacina, tetraciclina, eritromicina, amikacina, triclosán, doxiciclina, capreomicina, clorhexidina, clortetraciclina, oxitetraciclina, clindamicina, etambutol, isotionato de hexamidina, metronidazol, pentamidina, gentamicina, kanamicina, lineomicina, metaciclina, metenamina, minociclina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomicina, tobramicina, miconazol y amantadina.

Otros restos de fármacos de uso en la práctica de la presente invención incluyen fármacos antineoplásicos (por ejemplo, antiandrógenos (por ejemplo, leuprolida o flutamida), agentes citocidas (por ejemplo, adriamicina, doxorubicina, taxol, ciclofosfamida, busulfán, cisplatino, β -2-interferón) antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno), antimetabolitos (por ejemplo, fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina). Además, dentro de esta clase se incluyen agentes basados en radioisótopos tanto para diagnóstico como para terapia, y toxinas conjugadas, tales como ricina, geldanamicina, mitansina, CC-1065, las duocarmicinas, Calicheamicina y estructuras relacionadas y análogos de los mismos.

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

Además, en la presente invención se usan estrógenos (por ejemplo, dietilestilbestrol), glucocorticoides (por ejemplo, triamcinolona, betametasona, etc.) y progestágenos, tales como noretindrona, etinodiol, noretindrona, levonorgestrel; agentes tiroideos (por ejemplo, liofironina o levotiroxina) o agentes antitiroideos (por ejemplo, metimazol); fármacos antihiperprolactinémicos (por ejemplo, cabergolina cabergoline); supresores de hormonales (por ejemplo, danazol o goserelina), oxitócicos (por ejemplo, metilergonovina u oxitocina) y también se pueden usar prostaglandinas, tales como mioprostol, alprostadil o dinoprostona.

Otros grupos de modificación útiles incluyen fármacos inmunomoduladores (por ejemplo, antihistamínicos, estabilizadores de mastocitos, tales como lodoxamida y/o cromolina, esteroides (por ejemplo, triamcinolona, beclometazona, cortisona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, beclometasona, o clobetasol), antagonistas de histamina H₂ (por ejemplo, famotidina, cimetidina, ranitidina), inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, ciclosporina), etc. Además, se usan grupos con actividad antiinflamatoria, tales como sulindac, etodolac, ketoprofeno y ketorolac. Otros fármacos de uso en conjunto con la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia.

Azúcares modificados

Las especies dadoras de glicosilo modificado ("azúcares modificados") se seleccionan preferentemente entre nucleótidos de azúcar modificado, azúcares modificados activados y azúcares modificados que son sacáridos simples que no son ni nucleótidos ni están activados. Cualquier estructura deseada de hidrato de carbono o de no hidrato de carbono se puede añadir a un polipéptido usando los procedimientos de la invención. En general, la estructura será un monosacárido, pero la presente invención no se limita al uso de azúcares monosacáridos modificados; además, son útiles oligosacáridos, polisacáridos y restos miméticos de glicosilo.

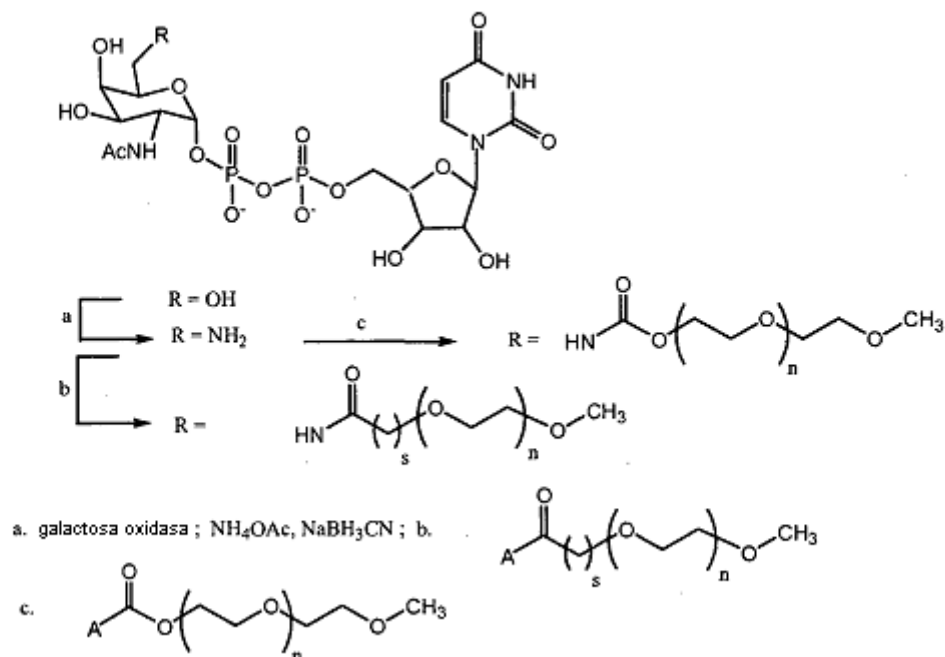
El grupo de modificación se une a un resto de azúcar por medios enzimáticos, medios químicos o una combinación de los mismos, produciendo de este modo un azúcar modificado. Los azúcares se sustituyen en cualquier posición que permite la unión del grupo de modificación, que sin embargo aún permite que el azúcar funcione como un sustrato para la enzima usada para unir el azúcar modificado con el polipéptido. En una realización ejemplar, cuando el ácido siálico es el azúcar, el ácido siálico se sustituye con el grupo de modificación, ya sea en la cadena lateral de piruvilo o en la posición 5 en el resto de amina que normalmente está acetilado en el ácido siálico.

Nucleótidos de Azúcar

En determinadas realizaciones de la presente invención, un nucleótido de azúcar modificado se usa para añadir el azúcar modificado al polipéptido. Ejemplos de nucleótidos de azúcar que se usan en la presente invención en su forma modificada incluyen mono-, di- o trifosfatos de nucleótido o análogos de los mismos. En una realización preferente, el nucleótido de azúcar modificado se selecciona entre un UDP-glicósido, CMP-glicósido, y un GDP-glicósido. Incluso más preferentemente, el nucleótido de azúcar modificado se selecciona entre una UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, GDP-manosa, GDP-fucosa, CMP-ácido siálico, y CMP-NeuAc. Los derivados de N-acetilamina de los nucleótidos de azúcar también son de uso en los procedimientos de la invención.

En un ejemplo, las especies de nucleótido de azúcar se modifican con un polímero soluble en agua. Un nucleótido de azúcar modificado ejemplar lleva un grupo azúcar que se modifica a través de un resto de amina en el azúcar. Los nucleótidos de azúcar modificados, por ejemplo, derivados sacaril-amina de un nucleótido de azúcar, también son de uso en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, una sacaril amina (sin el grupo de modificación) se puede conjugar enzimáticamente a un polipéptido (o a otras especies) y el resto de sacaril amina libre se conjuga posteriormente con un grupo de modificación deseado. Como alternativa, el nucleótido de azúcar modificado puede funcionar como un sustrato para una enzima que transfiere el azúcar modificado a un aceptor de sacarilo en el polipéptido.

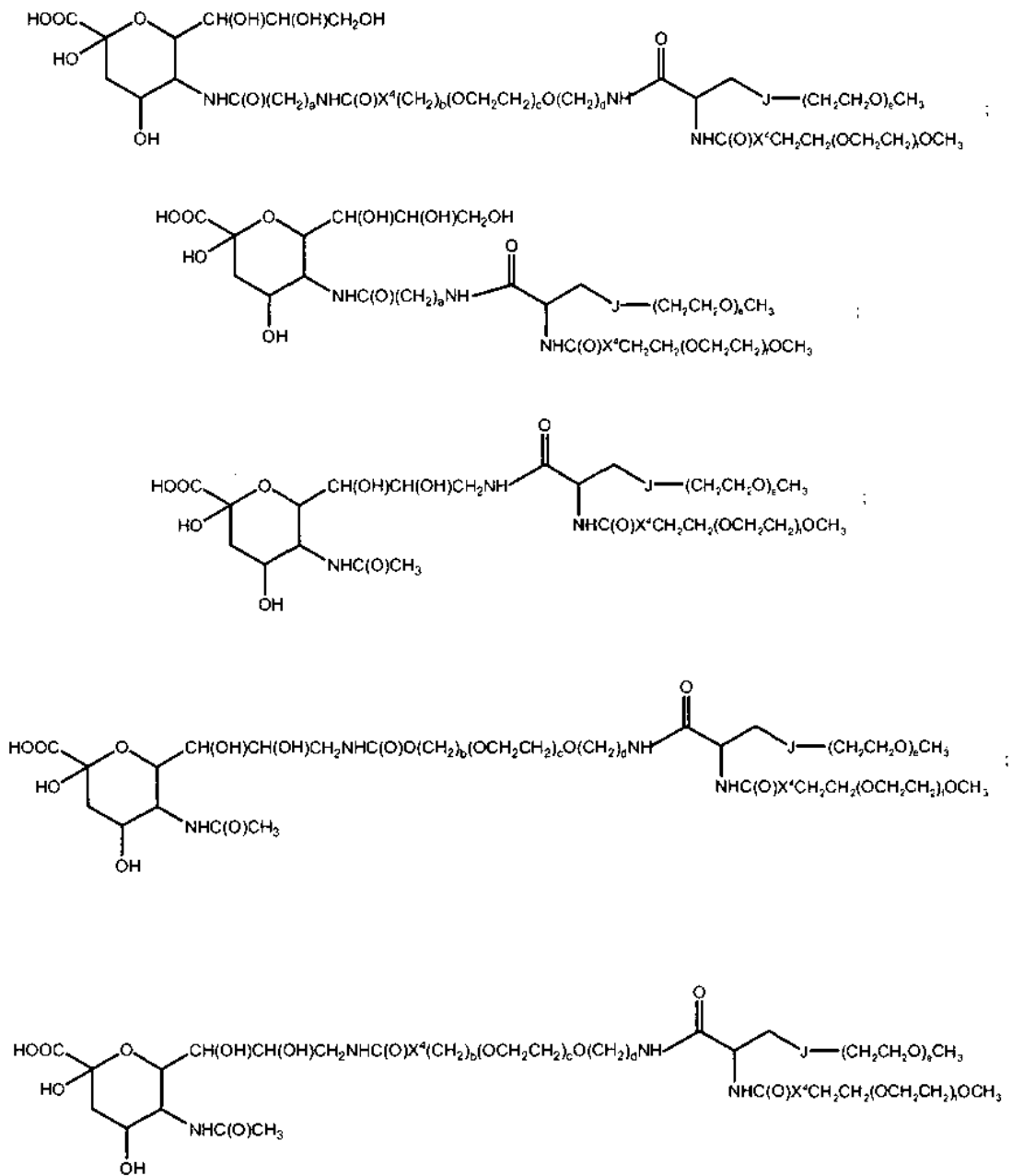
En una realización ejemplar, el azúcar modificado se basa en un resto de 6-amino-N-acetil-glicosilo. Como se muestra en el Esquema 4, dado a continuación para la N-acetilgalactosamina, el nucleótido de azúcar modificado se puede preparar fácilmente usando procedimientos convencionales.

Esquema 4: Preparación de un Nucleótido de Azúcar Modificado a Modo de Ejemplo

En el Esquema 4, anterior, el índice n representa un número entero de 0 a 2500, preferentemente de 10 a 1500, y más preferentemente de 10 a 1200. El símbolo "A" representa un grupo de activación, por ejemplo, un halo, un componente de un éster activado (por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida), un componente de un carbonato (por ejemplo, carbonato de p-nitrofenilo) y similares. Los expertos en la materia observarán que se pueden preparar fácilmente otros azúcares de nucleótidos de PEG-amida mediante éste y otros procedimientos análogos.

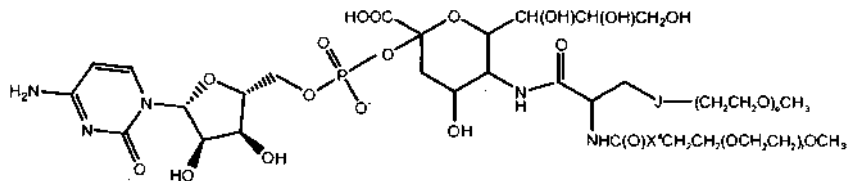
En otras realizaciones ejemplares, el resto de amida se sustituye con un grupo tal como un uretano o una urea.

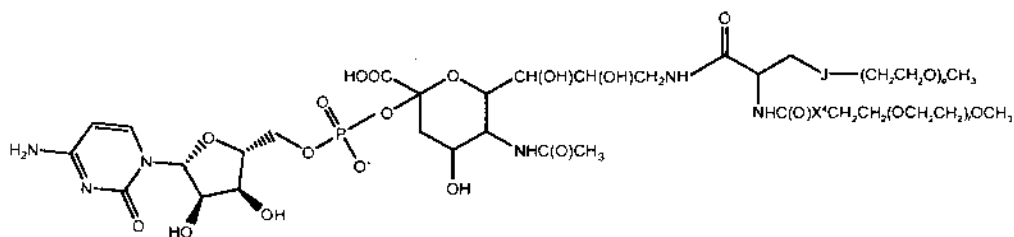
Además, en realizaciones adicionales, R^1 es un PEG ramificado, por ejemplo, uno de las especies que se han expuesto anteriormente. Los compuestos ilustrativos de acuerdo con la presente realización incluyen:



en las que X^4 es un enlace u O, y J es S u O.

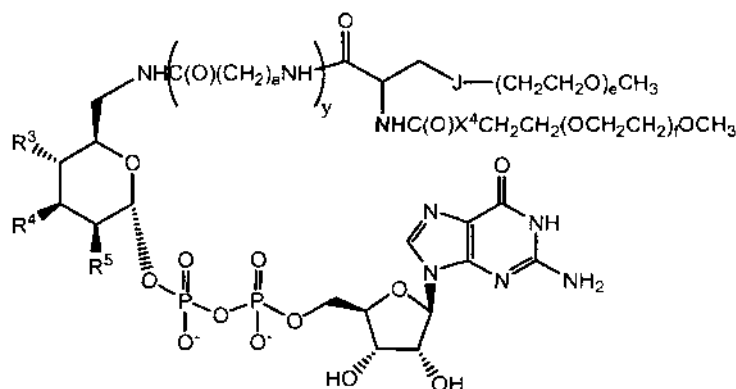
5 o ramificada. Por ejemplo, los compuestos que tienen la fórmula que se muestra a continuación están dentro del ámbito de la presente invención:





en las que X^4 es O o un enlace, y J es S u O.

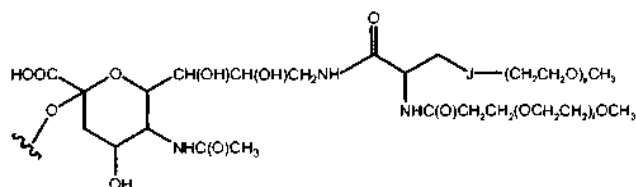
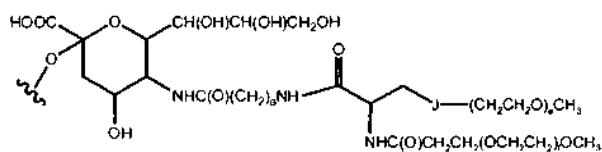
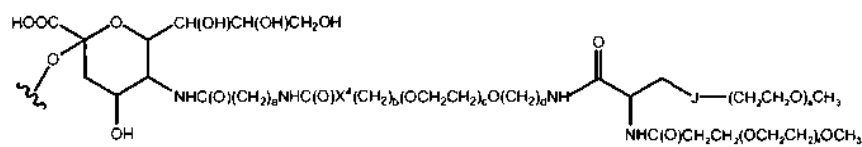
De forma análoga, la invención proporciona conjugados de polipéptidos que se forman usando azúcares de nucleótidos de las especies de azúcar modificadas en las que se modifica el carbono en la posición 6:



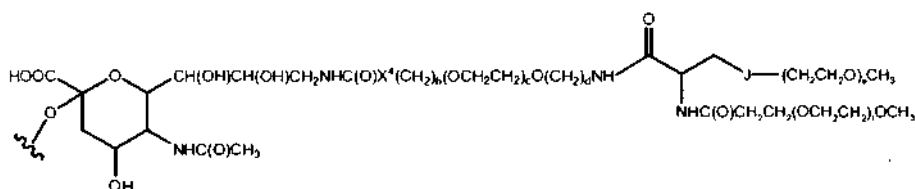
5

en la que X^4 es un enlace u O, J es S u O, e y es 0 o 1.

Además, se proporcionan conjugados de polipéptidos y glicopéptidos que tienen las fórmulas siguientes:



y



10

en las que J es S u O.

Azúcares activados

Los azúcares modificados, activados que son útiles en la presente invención, en general son glucósidos que se han alterado sintéticamente para incluir un grupo saliente. En un ejemplo, el azúcar activado se usa en una reacción enzimática para transferir el azúcar activado en un aceptor en el polipéptido o glicopéptido. En otro ejemplo, el azúcar activado se añade al polipéptido o glicopéptido por medios químicos. "Grupo saliente" (o grupo de activación) se refiere a aquellos restos, que se desplazan fácilmente en reacciones de sustitución nucleófila reguladas por enzimas o como alternativa, se sustituyen en una reacción química usando una pareja de reacción nucleofílica (por ejemplo, un resto glicosilo que lleva un grupo sulfhidrilo). Está dentro de las capacidades de una persona experta la selección de un grupo saliente adecuado para cada tipo de reacción. En la técnica se conocen muchos azúcares activados. Véase, por ejemplo, Vocadlo y *col.*, En CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOLOGY, Vol. 2, Ernst y *col.* Ed., Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Alemania, 2000; Kodama y *col.*, Tetrahedron Lett. 34: 6419 (1993); Loughheed, y *col.*, J. Biol. Chem. 274: 37717 (1999)).

Los ejemplos de grupos salientes incluyen halógeno (por ejemplo, fluoro, cloro, bromo), éster de tosilato, éster de mesilato, éster de triflato y similares. Los grupos salientes preferentes, para su uso en reacciones enzimáticas mediada, son aquéllos que no cargan estéricamente de forma significativa la transferencia enzimática del glicósido al aceptor. En consecuencia, las realizaciones preferentes de derivados de glicósido activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, con fluoruros de glicosilo siendo particularmente preferentes. Entre los fluoruros de glicosilo, fluoruro de α -galactosilo, fluoruro de α -manosilo, fluoruro de α -glucosilo, fluoruro de α -fucosilo, fluoruro de α -xilosilo, fluoruro de α -sialilo, fluoruro de α -N-acetilglucosaminilo, fluoruro de α -N-acetilgalactosaminilo, fluoruro de β -galactosilo, fluoruro de β -manosilo, fluoruro de β -glucosilo, fluoruro de β -fucosilo, fluoruro de β -xilosilo, fluoruro de β -sialilo, fluoruro de β -N-acetilglucosaminilo y fluoruro de β -N-acetilgalactosaminilo son los más preferentes. Para sustituciones nucleófilas no enzimáticas, estos y otros grupos salientes pueden ser útiles. Por ejemplo, el glicósido dador activado puede ser un dinitrofenilo (DNP), o bromo-glicósido.

A modo de ilustración, los fluoruros de glicosilo se pueden preparar a partir del azúcar libre primero por acetilación y a continuación tratando el resto de azúcar con HF/piridina. Esto genera el anómero termodinámicamente más estable del fluoruro de glicosilo (acetilado) protegido (es decir, el fluoruro de α -glicosilo). Si se desea el anómero menos estable (es decir, el fluoruro de β -glicosilo), se puede preparar mediante por conversión del azúcar peracetilado con HBr/HOAc o con HCl para generar el bromuro o cloruro anomérico. Este compuesto intermedio se hace reaccionar con una sal de fluoruro tal como fluoruro de plata para generar el fluoruro de glicosilo. Los fluoruros de glicosilo acetilados se pretende es proteger por reacción con base suave (catalítica) en metanol (por ejemplo, NaOMe/MeOH). Además, en el mercado están disponibles muchos fluoruros de glicosilo.

Otros derivados de glicosilo activados se pueden preparar usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden preparar mesilatos de glicosilo por tratamiento de la forma hemiacetal totalmente bencilada del azúcar con cloruro de mesilo, seguido de hidrogenación catalítica para retirar los grupos bencilo.

En una realización ejemplar adicional, el azúcar modificado es un oligosacárido que tiene una estructura antenaria. En otra realización, uno o más de los extremos de las antenas llevan el resto de modificación. Cuando se une más de un resto de modificación a un oligosacárido que tiene una estructura antenaria, el oligosacárido es útil para "amplificar" el resto de modificación; cada unidad de oligosacárido conjugado con el polipéptido une múltiples copias del grupo de modificación al polipéptido. La estructura general de un conjugado habitual de la invención tal como se ha expuesto en la figura anterior incluye especies polivalentes resultantes de la preparación de un conjugado de la invención que usa una estructura antenaria. En la técnica se conocen muchas estructuras de sacáridos antenarios, y el presente procedimiento se puede poner en práctica con ellos sin limitación.

Preparación de Azúcares Modificados

En general, un enlace covalente entre el resto de azúcar y el grupo de modificación se forma a través del uso de grupos funcionales reactivos, que en general se transforman mediante el procedimiento de unión en un nuevo grupo funcional orgánico o especie no reactiva. Con el fin de formar el enlace, el grupo de modificación y el resto de azúcar llevan grupos funcionales reactivos complementarios. El grupo o grupos funcionales reactivos se pueden situar en cualquier posición en el resto de azúcar.

Los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente los que son bien conocidos en la técnica de la química de bioconjugados. En la actualidad, las clases de reacciones preferentes disponibles con restos de azúcar reactivos son las que evolucionan en condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, pero no se limitan a sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrófilas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples de carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se analizan, por ejemplo, en March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press San

Diego, 1996; y Feeney *y col.*, MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Grupos Funcionales Reactivos

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

- 5 (a) grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos que incluyen, pero no se limitan a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, acil imidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, alquilo, alquenilo, alquinilo y ésteres aromáticos;
- (b) grupos hidroxilo, que se pueden convertir, por ejemplo, en ésteres, éteres, aldehídos, *etc.*
- 10 (c) grupos haloalquilo, en los que el haluro se puede desplazar posteriormente con un grupo nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión, o un ión alcóxido, dando como resultado de ese modo la unión covalente de un nuevo grupo en el grupo funcional del átomo de halógeno;
- (d) grupos dienófilos, que son capaces de participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos maleimido;
- 15 (e) grupos aldehído o cetona, de modo que la derivatización posterior es posible a través de la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquillitio;
- (f) grupos de haluro de sulfonilo para reacción posterior con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas;
- (g) grupos tiol, que, por ejemplo, se pueden convertir en disulfuros o reaccionar con haluros de acilo;
- 20 (h) grupos amina o sulfhidrilo, que, por ejemplo, se pueden acilar, alquilar u oxidar;
- (i) alquenos, que pueden experimentar, 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 se pueden elegir de modo que no participan en, ni interfieran con las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo o grupo de modificación de azúcar reactivo. Como alternativa, un grupo funcional reactivo se puede proteger de la participación en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los expertos en la materia entienden cómo proteger un grupo funcional en particular de modo que no interfiera con un conjunto de condiciones de reacción elegidas. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo, Greene *y col.*, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, Nueva York New York, 1991.

Grupos de Reticulación

- 30 La preparación del azúcar modificado para uso en los procedimientos de la presente invención incluye la unión de un grupo de modificación a un resto de azúcar y la formación de un aducto estable, que es un sustrato para una glicosiltransferasa. El azúcar y el grupo de modificación se pueden acoplar mediante un agente de reticulación de orden cero o superior. Los compuestos bifuncionales ejemplares que se pueden usar para la unión de grupos de modificación a los restos de hidratos de carbono incluyen, pero no se limitan a, poli(etilenglicoles) bifuncionales,
- 35 poliamidas, poliéteres, poliésteres y similares. En la bibliografía se conocen enfoques generales para la unión de hidratos de carbono a otras moléculas. Véase, por ejemplo, Lee *y col.*, Biochemistry 28: 1856 (1989) Bhatia *y col.*, Anal. Biochem. 178: 408 (1989); Janda *y col.*, J. Am. Chem. Soc. 112: 8886 (1990) y Bednarski *y col.*, documento de patente WO 92/18135. En el análisis dado a continuación, los grupos reactivos se tratan como favorables en el resto de azúcar del azúcar modificado emergente. El enfoque del análisis es para claridad de la ilustración. Los expertos en la
- 40 materia observarán que el análisis es relevante también para grupos reactivos en el grupo de modificación.

Se usa una diversidad de reactivos para modificar los componentes del azúcar modificado con de reticulaciones químicas intramoleculares (para revisiones de reactivos de reticulación y procedimientos de reticulación véanse: Wold, F., Meth. Enzymol. 25: 623-651, 1972; Weetall, H. H., y Cooney, D. A., En: ENZYMES AS DRUGS. (Holcenberg, y Roberts, eds.) páginas 395-442, Wiley, Nueva York, 1981; Ji, T. H., Meth. Enzymol. 91: 580-609, 1983; Mattson *y col.*, Mol. Biol. Rep. 17: 167-183, 1993, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia). Los reactivos de reticulación preferente se derivan de diversos reactivos de reticulación homo-bifuncionales, y hetero-bifuncionales, de longitud cero. Los reactivos de reticulación de longitud cero incluyen la conjugación directa de dos grupos químicos intrínsecos sin introducción de material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de un enlace disulfuro pertenecen a esta categoría. Otro ejemplo son reactivos que inducen la condensación de un carboxilo y un grupo amino primario para formar un enlace amida tal como carbodiimidas, etilcloroformiato, reactivo K de Woodward (2-etil-5-fenilisoxazolio-3'-sulfonato), y carbonildiimidazol. Además de estos reactivos químicos, la enzima transglutaminasa (glutamil-péptido γ -glutamilttransferasa; EC 2.3.2.13) se puede usar como reactivo de reticulación de longitud cero. Esta enzima cataliza reacciones de transferencia de acilo en los grupos carboxamida de restos de

glutaminilo unidos a proteínas, en general con un grupo amino primario como sustrato. Los reactivos homo- y hetero-bifuncionales precedentes contienen dos sitios idénticos o dos diferentes, respectivamente, que pueden ser reactivos para amino, sulfhidrilo, guanidino, indol, o grupos no específicos.

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

Los ejemplos de agentes de reticulación no específicos incluyen grupos fotoactivables, completamente inertes en la oscuridad, que se convierten en especies reactivas después de la absorción de un fotón de energía apropiada. En una realización, los grupos fotoactivables se seleccionan a partir de precursores de nitrenos generados después del calentamiento o la fotólisis de azidas. Los nitrenos deficientes en electrones son extremadamente reactivos y pueden reaccionar con una diversidad de enlaces químicos que incluyen N-H, O-H, C-H y C=C. Aunque se pueden usar tres tipos de azidas (derivados de arilo, alquilo, y acilo), las arilazidas están presentes. La reactividad de las arilazidas después de la fotólisis es mejor con enlaces N-H y O-H que con enlaces C-H. Los arilnitrenos deficientes en electrones se expanden rápidamente del anillo para formar deshidroazepinas, que tienden a reaccionar con nucleófilos, en lugar de formar productos de inserción de C-H. La reactividad de las arilazidas puede aumentar por la presencia de sustituyentes aceptores de electrón tales como grupos nitro o hidroxilo en el anillo. Dichos sustituyentes empujan el máximo de absorción de las arilazidas a longitudes de onda mayores. Las arilazidas no sustituidas tienen un máximo de absorción en el intervalo de 260-280 nm, mientras que hidroxi y nitroarilazidas absorben la luz significativa por encima de 305 nm. Por lo tanto, hidroxi y nitroarilazidas son los más preferentes ya que permiten el uso de condiciones de fotólisis menos perjudiciales para el componente de afinidad que las arilazidas sin sustituir.

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

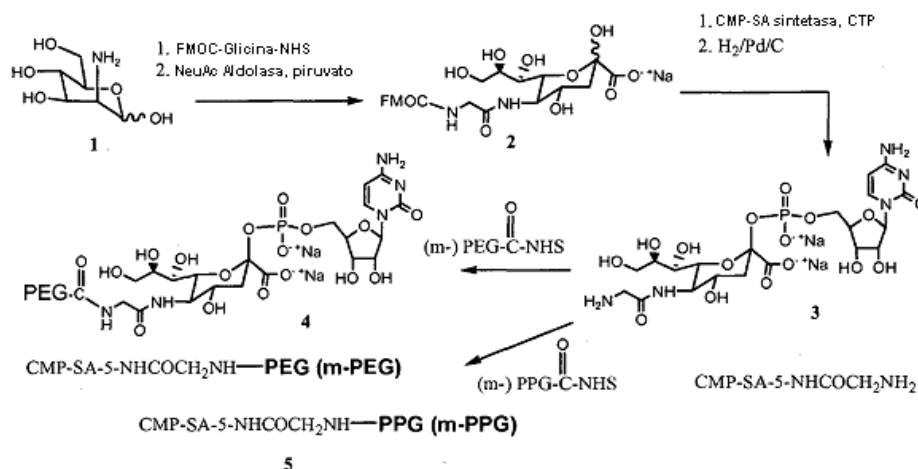
Los ejemplos de restos ejemplares se pueden escindir usando luz, calor o reactivos tales como tioles, hidroxilamina, bases, peryodato y similares. Además, determinados grupos preferentes se escinden *in vivo* en respuesta a su endocitosis (por ejemplo, cis-aconitilo; véase, Shen y col., Biochem. Biophys.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

En el análisis dado a continuación, se expone una serie de ejemplos específicos de azúcares modificados que son útiles en la práctica de la presente invención. En las realizaciones ejemplares, se usa un derivado de ácido siálico como el núcleo de azúcar al que se une el grupo de modificación. El enfoque del análisis sobre los derivados de ácido siálico es solamente para claridad de la ilustración y no se debería interpretar como limitante del ámbito de la invención. Los expertos en la materia observarán que una diversidad de otros restos de azúcar se pueden activar y derivatizar de una manera análoga a la expuesta usando ácido siálico como un ejemplo. Por ejemplo, están disponibles numerosos procedimientos para la modificación de galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y fucosa por nombrar unos pocos sustratos de azúcar, que se modifican fácilmente mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Elhalabi y col., Curr. Med. Chem. 6: 93 (1999) y Schafer y col., J. Org. Chem. 65: 24 (2000).

En una realización ejemplar, el polipéptido que se modifica con un procedimiento de la invención es un glicopéptido que se produce en células procariotas (por ejemplo, *E. coli*), células eucariotas que incluyen levaduras y células de mamífero (por ejemplo, células CHO), o en un animal transgénico y por lo tanto contiene cadenas de oligosacáridos con unión en N y/o en O, que se sialilan de forma incompleta. Las cadenas de oligosacáridos del glicopéptido que carece de un ácido siálico y que contienen un resto de galactosa terminal se pueden glico-PEG-ilar, glico-PPG-ilar o de otro modo modificar con un ácido siálico modificado.

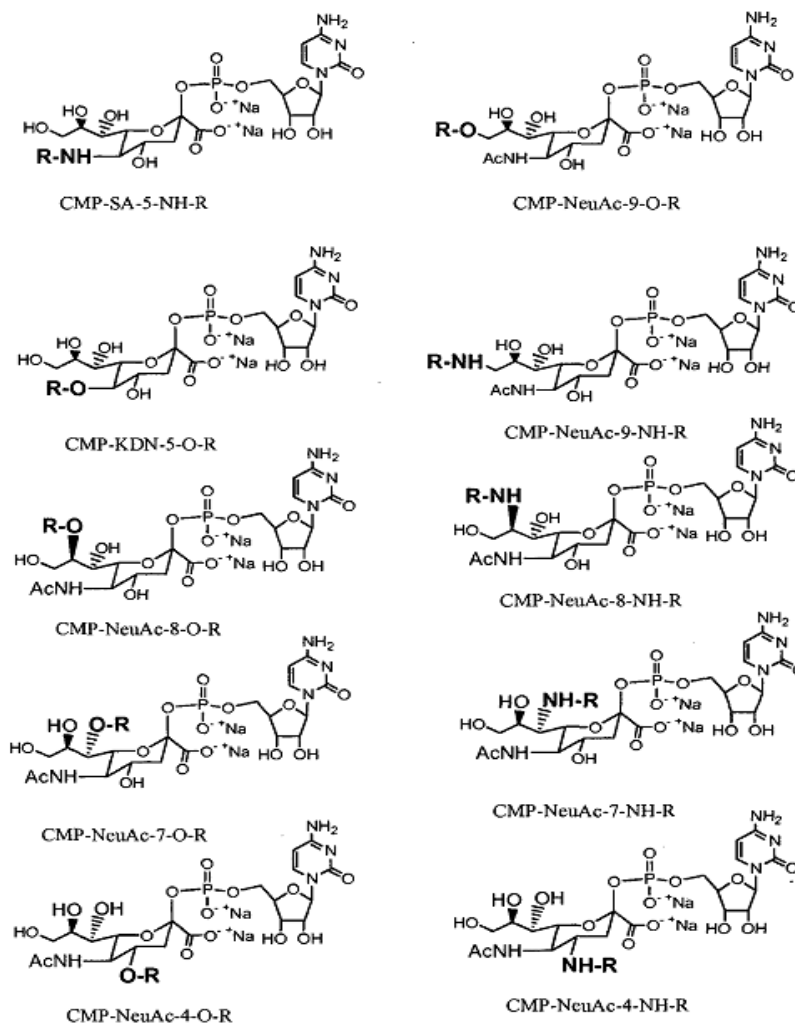
En el Esquema 5, el amino glicósido **1**, se trata con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (por ejemplo, glicina), convirtiendo el resto de amina del azúcar en el aducto de amida del aminoácido protegido correspondiente. El aducto se trata con una aldolasa para formar el α -hidroxi carboxilato **2**. El compuesto **2** se convierte en el derivado de CMP correspondiente mediante la acción de la CMP-SA sintetasa, seguido de hidrogenación catalítica del derivado de CMP para producir el compuesto **3**. La amina introducida a través de la formación del aducto de glicina se usa como un sitio de unión de PEG o PPG por reacción del compuesto **3** con un derivado de (m-) PEG o (m-) PPG activado (por ejemplo, PEG-C(O)NHS, PPG-C(O)NHS), produciendo **4** o **5**, respectivamente.

Esquema 5

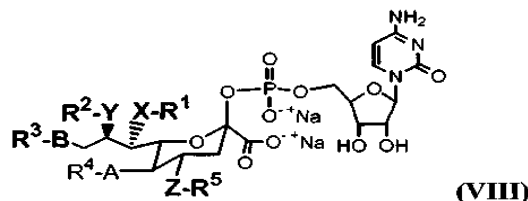


La Tabla 11, dada a continuación expone ejemplos representativos de monofosfatos de azúcar que se derivatizan con un resto de PEG o de PPG. Determinados los compuestos de la Tabla 2 se preparan mediante el procedimiento del Esquema 4. Otros derivados se preparan mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Keppler y *col.*, *Glycobiology* 11: 11R (2001); y Charter y *col.*, *Glycobiology* 10: 1049 (2000)). Otros análogos de PEG y PPG reactivos de amina están disponibles en el mercado, o se pueden preparar mediante procedimientos fácilmente accesibles para los expertos en la materia.

Tabla 11: Ejemplos de monofosfatos de azúcar derivatizados con PEG o PPG



Los fosfatos de azúcar modificado de uso en la práctica de la presente invención se pueden sustituir en otras posiciones así como las que se han expuesto anteriormente. En la actualidad, las sustituciones preferentes de ácido siálico se exponen en la Fórmula (VIII):



(VIII)

- 5 en la que X es un grupo de unión, que se selecciona preferentemente entre -O-, -N(H)-, -S-, CH₂- y -N(R)₂, en el que cada R es un miembro seleccionado independientemente entre R¹-R⁵. Los símbolos Y, Z, A y B cada uno representa un grupo que se selecciona entre el grupo que se ha establecido anteriormente para la identidad de X. X, Y, Z, A y B cada uno se selecciona independientemente y, por lo tanto, pueden ser iguales o diferentes. Los símbolos R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ representan H, un polímero soluble en agua, resto terapéutico, biomolécula u otro resto. Como alternativa, estos símbolos representan un engarce que se une a un polímero soluble en agua, resto terapéutico, biomolécula u otro resto.

Los restos ejemplares unidos a los conjugados que se divulgan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, derivados de PEG (por ejemplo, alquil-PEG, acil-PEG, acil-alquil-PEG, alquil-acil-PEG carbamoil-PEG, aril-PEG), derivados de PPG (por ejemplo, alquil-PPG, acil-PPG, acil-alquil-PPG, alquil-acil-PPG carbamoil-PPG, aril-PPG), restos terapéuticos, restos de diagnóstico, manosa-6-fosfato, heparina, heparano, SLe_x, manosa, manosa-6-fosfato, Sialil Lewis X, FGF, VFGF, proteínas, condroitina, queratano, dermatano, albúmina, integrinas, oligosacáridos antenarios, péptidos y similares. Procedimientos para conjugar los diversos grupos de modificación para un resto de sacárido son fácilmente accesibles para los expertos en la materia (POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY : BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., Plenum Pub. Corp., 1992; POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMICAL AND BIOLOGICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., ACS Symposium Series N° 680, American Chemical Society, 1997; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; y Dunn y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

Una estrategia ejemplar implica incorporar un sulfhidrilo protegido en el azúcar usando el SPDP de reticulación heterobifuncional (3-(2-piridilditio)propionato de n-succinimidilo y a continuación desproteger el sulfhidrilo para la formación de un enlace disulfuro con otro sulfhidrilo en el grupo de modificación.

Si SPDP afecta perjudicialmente a la capacidad del azúcar modificado de actuar como un sustrato de glicosiltransferasa, se usa uno de una variedad de otros agentes de reticulación tales como 2-iminotiolano o S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) para formar un enlace disulfuro. El 2-iminotiolano reacciona con aminas primarias, incorporando instantáneamente un sulfhidrilo sin proteger en la molécula que contiene amina. SATA también reacciona con aminas primarias, pero incorpora un sulfhidrilo protegido, que posteriormente se desacetila usando hidroxilamina para producir un sulfhidrilo libre. En cada caso, el sulfhidrilo incorporado está libre para reaccionar con otros sulfhidrilos o sulfhidrilo protegido, tales como SPDP, formando el enlace disulfuro requerido.

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

Si se encuentra que el enlace disulfuro resulta inapropiado para producir azúcares modificados estables, se pueden usar otros agentes de reticulación que incorporen enlaces más estables entre los componentes. Los agentes de reticulación heterobifuncionales GMBS (N-gama-malimidobutirilo)succinimida y SMCC (succinimidil 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano) reaccionan con aminas primarias, introduciendo de este modo un grupo maleimida en el componente. El grupo maleimida puede reaccionar posteriormente con sulfhidrilos en el otro componente, que se pueden introducir mediante los agentes de reticulación mencionados anteriormente, formando de este modo un enlace tioéter estable entre los componentes. Si el impedimento estérico entre los componentes interfiere con la actividad del componente o con la capacidad del azúcar modificado para actuar como un sustrato de glicosiltransferasa, se pueden usar agentes de reticulación que introduzcan ramas espaciadoras largas entre los componentes y que incluyan derivados de algunos de los agentes de reticulación mencionados anteriormente (es decir, SPDP). Por lo tanto, existe una abundancia de agentes de reticulación apropiados, que son útiles; cada uno de los cuales se selecciona dependiendo de los efectos que tiene sobre la producción de conjugado de polipéptido y de azúcar modificado óptimos.

Se usa una diversidad de reactivos para modificar los componentes del azúcar modificado con reticulaciones químicas intramoleculares (para revisiones de los reactivos de reticulación y los procedimientos de reticulación véase: Wold, F., Meth. Enzymol. 25: 623-651, 1972; Weetall, H. H., y Cooney, D. A., En: ENZYMES AS DRUGS. (Holcenberg, y Roberts, eds.) páginas 395-442, Wiley, Nueva York, 1981; Ji, T. H., Meth. Enzymol. 91: 580-609, 1983; Mattson y col., Mol. Biol. Rep. 17: 167-183, 1993, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia). Los reactivos de reticulación preferentes proceden de diferentes reactivos de reticulación homo-bifuncionales y hetero-bifuncionales de longitud cero. Los reactivos de reticulación de longitud cero incluyen la conjugación directa de dos grupos químicos intrínsecos sin introducción de material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de un enlace disulfuro pertenecen a esta categoría. Otro ejemplo son los reactivos que inducen la condensación de un grupo carboxilo y amino primario para formar un enlace de amida tal como carbodiimidas, etilcloroformiato, reactivo K de Woodward (2-etil-5-fenilisoxazolio-3'-sulfonato) y carbonildiimidazol. Además de estos reactivos químicos, se puede usar la enzima transglutaminasa (glutamyl-péptido y-glutamyltransferasa; EC 2.32.13) como reactivo de reticulación de longitud cero. Esta enzima cataliza las reacciones de transferencia de acilo en los grupos carboxamida de restos de glutaminilo unidos a proteína, normalmente con un grupo amino primario como sustrato. Los reactivos homo- y hetero-bifuncionales preferentes contienen dos sitios idénticos o dos sitios diferentes, respectivamente, que pueden ser reactivos frente a amino, sulfhidrilo, guanidino, indol o grupos no específicos.

Sitios Específicos Preferentes en Reactivos de Reticulación

1. Grupos que Reaccionan con Amino

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Grupos Reactivos con Sulfhidrilo

En otra realización, los sitios son grupos que reaccionan con sulfhidrilo. Los ejemplos no limitantes y útiles de grupos que reaccionan con sulfhidrilo incluyen maleimidas, haluros de alquilo, disulfuros de piridilo y tioftalimidas.

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

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

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

15 Las tioftalimidas reaccionan con los grupos sulfhidrilos libres para formar disulfuros.

3. Resto Reactivo-Carboxilo

En otra realización, las carbodiimidas solubles tanto en agua como en un disolvente orgánico, se usan como reactivos que reaccionan con carboxilo. Estos compuestos reaccionan con los grupos carboxilo libres formando una pseudourea que a continuación se puede acoplar a aminas viables proporcionando un enlace de amina que muestra cómo

20 modificar un grupo carboxilo con una carbodiimida (Yamada y *col.*, Biochemistry 20: 4836-4842, 1981).

Sitios No Específicos Preferentes en los Reactivos de Reticulación

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

25 Los agentes de reticulación no específicos ejemplares incluyen grupos fotoactivables, completamente inertes en la oscuridad, que se convierten en especies reactivas después de la absorción de un fotón de la energía apropiada. En una realización, los grupos fotoactivables se seleccionan entre precursores de nitrenos generados después de calentamiento o fotólisis de azidas. Los nitrenos deficientes en electrones son extremadamente reactivos y pueden reaccionar con una diversidad de enlaces químicos que incluyen N-H, O-H, C-H y C=C. Aunque se pueden usar tres tipos de azidas (derivados de arilo, alquilo, y acilo), las arilazidas están presentes. La reactividad de las arilazidas

30 después de la fotólisis es mejor con enlaces N-H y O-H que con enlaces C-H. Los arilnitrenos deficientes en electrones se expanden rápidamente del anillo para formar deshidroazepinas, que tienden a reaccionar con nucleófilos, en lugar de formar productos de inserción de C-H. La reactividad de las arilazidas puede aumentar por la presencia de sustituyentes aceptores de electrones tales como grupos nitro o hidroxilo en el anillo. Dichos sustituyentes empujan el máximo de absorción de las arilazidas a longitudes de onda mayores. Las arilazidas no sustituidas tienen un máximo

35 de absorción en el intervalo de 260-280 nm, mientras que hidroxi y nitroarilazidas absorben la luz significativa por encima de 305 nm. Por lo tanto, hidroxi y nitroarilazidas son los más preferentes ya que permiten el uso de condiciones de fotólisis menos perjudiciales para el componente de afinidad que las arilazidas sin sustituir.

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

40

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

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

Además, en otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan entre diazopiruvatos. Por ejemplo, el éster de p-nitrofenilo de diazopiruvato de p-nitrofenilo reacciona con aminas alifáticas para dar amidas del ácido diazopirúvico que experimentan fotólisis ultravioleta para formar aldehídos. El componente de afinidad modificado con diazopiruvato

50 fotolizado reaccionará como el formaldehído o el glutaraldehído dando lugar a la formación de reticulaciones.

*Reactivos Homobifuncionales*1. Agentes de Reticulación Homobifuncionales Reactivos Con Aminas Primarias

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

Los ejemplos no limitantes y preferentes de ésteres NHS homobifuncionales incluyen glutarato de disuccinimidilo (DSG), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis-2-(succinimidoxycarbonilo)etilsulfona (BSOCOES), bis-2-(sulfosuccinimidoxycarbonilo)etilsulfona (sulfo-BSOCOES), bis(succinimidilsuccinato) de etilenglicol (EGS), bis(sulfosuccinimidilsuccinato) de etilenglicol (sulfo-EGS), ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (DSP), y ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (sulfo-DSP). Los ejemplos no limitantes y preferentes de imidoésteres homobifuncionales incluyen malonimidato de dimetilo (DMM), succinimidato de dimetilo (DMSC), adipimidato de dimetilo (DMA), pimelimidato de dimetilo (DMP), suberimidato de dimetilo (DMS), 3,3'-oxidipropionimidato de dimetilo (DODP), 3,3'-(metilendioxidipropionimidato de dimetilo (DMDP), 3'-(dimetilenoxi)dipropionimidato de dimetilo (DDDP), 3,3'-(tetrametilendioxo)-dipropionimidato de dimetilo (DTDP), y 3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo (DTBP).

Los ejemplos no limitantes y preferentes de isotiocianatos homobifuncionales incluyen: diisotiocianato de p-fenileno (DITC) y ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico estilbena (DIDS).

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

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

Los ejemplos no limitantes y preferentes de reactivos de aldehído alifático homobifuncionales incluyen glicolal, malondialdehído y glutaraldehído.

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

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

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

2. Agentes de Reticulación Homobifuncionales que Reaccionan con Grupos Sulfhidrilo Libres

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

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

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

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

3. Agentes de Reticulación Homobifuncionales Fotoactivables

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

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

4,4'-ditiobisfenilazida.

Reactivos HeteroBifuncionales

1. Reactivos HeteroBifuncionales que Reaccionan con Amino con un Resto Disulfuro de Piridilo

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

Los ejemplos no limitantes y preferentes de reactivos hetero-bifuncionales con un resto disulfuro de piridilo y un éster NHS que reacciona con amino incluyen 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidio (SPDP), 6-3-(2-piridiltio)propionamidoheptanoato de succinimidilo (LC-SPDP), 6-3-(2-piridiltio)propionamidoheptanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LCSPDP), 4-succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridiltio)tolueno (SMPT) y 6- α -metil- α -(2-piridiltio)toluamidoheptanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT).

2. Reactivos Heterobifuncionales que Reaccionan con Amino con un Resto Maleimida

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

3. Reactivos HeteroBifuncionales que Reaccionan con Amino con un Resto Haluro de Alquilo

La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía. Los ejemplos no limitantes y preferentes de reactivos hetero-bifuncionales con un resto de haluro de alquilo y un éster de NHS que reacciona con amino incluyen (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), (4-yodoacetil)aminobenzoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SIAB), 6-(yodoacetil)aminoheptanoato de succinimidilo (SIAX), 6-(6-((yodoacetil)-amino)heptanoilamino)heptanoato de succinimidilo (SIAXX), 6-(((4-(yodoacetil)-amino)-metil)-ciclohexano-1-carbonil)aminoheptanoato de succinimidilo (SIACX), y 4((yodoacetil)-amino)metilciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SIAC).

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

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

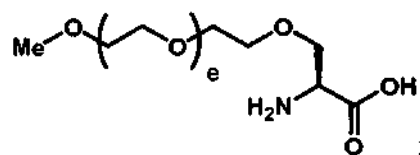
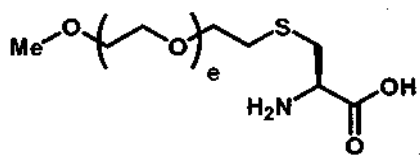
Los expertos en la materia conocen otros agentes de reticulación. Véase, por ejemplo, Pomato y col., Patente de Estados Unidos N° 5.965.106. dentro de las capacidades de un experto en la materia está la elección de un agente de reticulación apropiado para una aplicación en particular.

Grupos de Engarce Escindibles

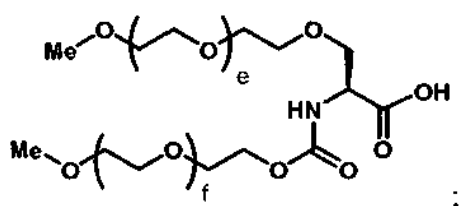
Además, en otra realización, se proporciona el grupo de engarce con un grupo que se puede escindir para liberar el grupo de modificación a partir del resto de azúcar. En la técnica se conocen muchos grupos escindibles. Véase, por ejemplo, Jung y col., Biochem. Biophys. Acta 761: 152-162 (1983); Joshi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

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

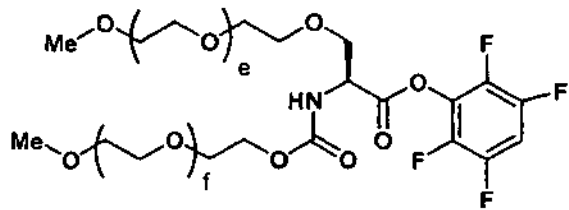
Las realizaciones específicas de acuerdo con la invención incluyen:



y

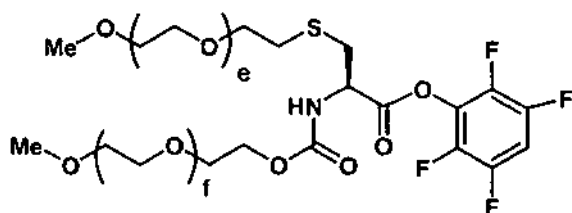


y carbonatos y ésteres activos de estas especies, tales como:



5

y



Conjugados ejemplares de la Invención

En una realización ejemplar, el polipéptido es un interferón de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Los interferones son glicoproteínas antivirales que, en seres humanos, se segregan en los fibroblastos primarios humanos después de la inducción con virus o ARN bicatenario. Los interferones son de interés como agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes antivirales (por ejemplo, hepatitis B y C), agentes antitumorales (por ejemplo, carcinoma hepatocelular) y en el tratamiento de esclerosis múltiple. Para referencias con respecto al interferón- α , véase, Asano, *y col.*, Eur. J. Cancer, 27 (Supl 4): S21-S25 (1991); Nagy, *y col.*, Anticancer Research, 8 (3): 467-470 (1988); Dron, *y col.*, J. Biol. Regul. Homeost. Agents, 3 (1): 13-19 (1989); Habib, *y col.*, Am. Surg., 67 (3): 257-260 (3/2001); y Sugiyama, *y col.*, Eur. J. Biochem., 217: 921-927 (1993). Para referencias que analizan el interferón- β , véase, por ejemplo, Yu, *y col.*, J. Neuroimmunol., 64 (1): 91-100 (1996); Schmidt, J., J. Neurosci. Res., 65 (1): 59-67 (2001); Wender, *y col.*, Folia Neuropathol., 39 (2): 91-93 (2001); Martin, *y col.*, Springer Semin. Immunopathol., 18 (1): 1-24 (1996); Takane, *y col.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 294 (2): 746-752 (2000); Sburlati, *y col.*, Biotechnol. Prog., 14: 189-192 (1998); Dodd, *y col.*, Biochimica et Biophysica Acta, 787: 183-187 (1984); Edelbaum, *y col.*, J. Interferon Res., 12: 449-453 (1992); Conradt, *y col.*, J. Biol. Chem., 262 (30): 14600-14605 (1987); Civas, *y col.*, Eur. J. Biochem., 173: 311-316 (1988); Demolder, *y col.*, J. Biotechnol., 32: 179-189 (1994); Sedmak, *y col.*, J. Interferon Res., 9 (Supl 1): S61-S65 (1989); Kagawa, *y col.*, J. Biol. Chem., 263 (33): 17508-17515 (1988); Hershenson, *y col.*, Patente de Estados Unidos N° 4.894.330; Jayaram, *y col.*, J. Interferon Res., 3 (2): 177-180 (1983); Menge, *y col.*, Develop. Biol. Standard., 66: 391-401 (1987); Vonk, *y*

col., J. Interferon Res., 3 (2): 169-175 (1983); y Adolf, y *col.*, J. Interferon Res., 10: 255-267 (1990).

En un conjugado de interferón ejemplar que no forma parte de la presente invención, el interferón alfa por ejemplo, interferón alfa 2b y 2a, se conjuga con un polímero soluble en agua a través de un engarce de glicosilo intacto.

Además, se divulga un conjugado del factor de estimulación de colonias de granulocitos humanos (G-CSF). G-CSF es una glicoproteína que estimula la proliferación, diferenciación y activación de células precursoras neutropoyéticas en neutrófilos funcionalmente maduros. El G-CSF inyectado se elimina rápidamente del organismo. Véase, por ejemplo, Nohynek, y *col.*, Cancer Chemother. Pharmacol., 39: 259-266 (1997); Lord, y *col.*, Clinical Cancer Research, 7 (7): 2085-2090 (07/2001); Rotondaro, y *col.*, Molecular Biotechnology, 11 (2): 117-128 (1999); y Bönig, y *col.*, Bone Marrow Transplantation, 28: 259-264 (2001).

La presente invención incluye un procedimiento para la modificación de GM-CSF. GM-CSF se conoce bien en la técnica como una citoquina producida por linfocitos T activados, macrófagos, células endoteliales, y fibroblastos del estroma. GM-CSF actúa principalmente en la médula ósea para aumentar la producción de leucocitos inflamatorios, y funciones adicionales como una hormona endocrina para iniciar el suministro de neutrófilos consumidos durante las funciones inflamatorias. El GM-CSF adicional es un factor de activación de macrófagos y promueve la diferenciación de las células de Lagerhans en células científicas. Al igual que G-CSF, GM-CSF también tiene aplicaciones clínicas en la sustitución de la médula ósea después de la quimioterapia

Ácidos Nucleicos

En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido del secun de la invención. El polipéptido del secun incluye dentro de su secuencia de aminoácidos una o más secuencias de glicosilación con unión en O exógena de la invención. En una realización, el ácido nucleico de la invención es parte de un vector de expresión. En otra realización relacionada, la presente invención proporciona una célula que incluye el ácido nucleico de la presente invención. Las células ejemplares incluyen células huésped tales como diversas cepas de *E. coli*, células de insectos y células de mamíferos, tales como células CHO.

Composiciones Farmacéuticas

Los conjugados de polipéptidos de la invención tienen una amplia variedad de aplicaciones farmacéuticas. Por ejemplo, la eritropoyetina glicoconjugada (EPO) se puede usar para tratar la anemia general, anemia aplásica, lesión quimioinducida (tal como lesión a la médula ósea), insuficiencia renal crónica, nefritis, y talasemia. La EPO modificada se puede usar adicionalmente para tratar trastornos neurológicos tales como lesión cerebral/espinal, esclerosis múltiple, y enfermedad de Alzheimer.

Además se divulga el interferón- α (IFN- α), que se puede usar para tratar SIDA y hepatitis B o C, infecciones virales causadas por una diversidad de virus tales como virus del papiloma humano (HBV), coronavirus, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes simple (HSV), y virus de la varicela-zóster (VZV), cánceres tales como leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA, melanoma maligno, linfoma no Hodgkins folicular, cromosoma de Filadelfia (Ph)-positivo, leucemia mielógena en fase crónica (CML), cáncer renal, mieloma, leucemia mielógena crónica, cánceres de la cabeza y el cuello, cánceres óseos, así como displasia de cuello uterino y trastornos del sistema nervioso central (SNC) tales como esclerosis múltiple. Además, el IFN- α modificado de acuerdo con los procedimientos de la presente invención es útil para tratar una variedad de otras enfermedades y afecciones tales como el síndrome de Sjogren (un enfermedad autoinmune), enfermedad de Behcet (una enfermedad inflamatoria autoinmune), fibromialgia (trastorno por dolor/fatiga musculoesquelético), úlcera aftosa (aftas), síndrome de fatiga crónica, y fibrosis pulmonar.

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

Además, se divulga el G-CSF modificado de acuerdo con los procedimientos de la presente invención que se puede usar como un adyuvante en quimioterapia para el tratamiento de cánceres, y para prevenir o aliviar afecciones o complicaciones asociadas con determinados procedimientos médicos, por ejemplo, lesión de médula ósea quimio-inducida; leucopenia (generalizada); neutropenia febril quimio-inducida; neutropenia asociada con trasplantes de médula ósea; y neutropenia grave y crónica. El G-CSF modificado también se puede usar para trasplantes; movilización de células sanguíneas periféricas; movilización de células precursoras sanguíneas periféricas para extracción en pacientes que recibirán quimioterapia mieloablativa o mielosupresora; y reducción de la duración de neutropenia, fiebre, uso de antibióticos, hospitalización después de tratamiento de inducción/consolidación para

leucemia mieloide aguda (AML). Otras afecciones o trastornos que se pueden tratar con G-CSF modificado incluyen asma y rinitis alérgica.

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

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que incluye al menos un polipéptido o conjugado de polipéptido de la invención y un diluyente, excipiente, vehículo, aditivo o combinaciones de los mismos farmacéuticamente aceptables. En una realización ejemplar, la composición farmacéutica incluye un conjugado covalentes entre un polímero soluble en agua (por ejemplo, un polímero soluble en agua de origen no natural), y un polipéptido glicosilado o no glicosilado de la invención así como un diluyente farmacéuticamente aceptable. Los polímeros solubles en agua ejemplares incluyen poli(etilenglicol) y metoxi-poli(etilenglicol). Como alternativa, el polipéptido conjuga con grupo de modificación distinto de un derivado de poli(etilenglicol), tal como un resto o una biomolécula terapéuticos. El grupo de modificación se conjuga con el polipéptido a través de un grupo de unión a glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente tanto con el polipéptido como con el grupo de modificación. En otra realización ejemplar, las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para uso en una diversidad de sistemas de administración de fármacos. Las farmacias adecuadas para uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17^a ed. (1985). Para una breve revisión de procedimientos de administración de fármacos, véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier forma de administración apropiada, que incluye por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo comprende preferentemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, se puede usar cualquiera de los vehículos mencionados anteriormente un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, y carbonato de magnesio. Además, se pueden usar matrices biodegradables, tales como microesferas (por ejemplo, polilactato poliglicolato) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.897.268 y N° 5.075.109 se divulgan microesferas biodegradables adecuadas.

Normalmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía subcutánea o por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. Por lo tanto, la invención proporciona composiciones para administración parenteral, que incluyen el compuesto disuelto o suspendido en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similares. Además, las composiciones pueden contener detergentes tales como Tween 20 y Tween 80; estabilizantes tales como manitol, sorbitol, sacarosa, y trehalosa; y conservantes tales como EDTA y meta-cresol. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables cuando se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como agentes para el ajuste del pH y de tamponamiento, agentes para el ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden filtrar de forma estéril. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso como tal, o se pueden liofilizar, siendo combinada la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. En general, el pH de las preparaciones estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9 y lo más preferentemente entre 7 y 8.

En algunas realizaciones, los glicopéptidos de la invención se pueden incorporar en liposomas formados a partir de líquidos que forman vesículas convencionales. Para preparar liposomas existe una diversidad de procedimientos disponibles, tal como se describe, por ejemplo, en Szoka y col., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), Patentes de Estados Unidos N° 4.235.871, N° 4.501.728 y N° 4.837.028. La dirección de liposomas usando una diversidad de agentes de dirección (por ejemplo, los sialil galactósidos de la invención) se conoce bien en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.957.773 y N° 4.603.044).

Se pueden usar procedimientos convencionales para el acoplamiento de agentes de dirección a liposomas. Estos procedimientos en general implican la incorporación componentes lípidos en los liposomas, tales como fosfatidiletanolamina, que se pueda activar para la unión de agentes de dirección, o compuestos lipofílicos derivatizados, tales como los glicopéptidos derivatizados con lípidos de la invención.

Los mecanismos de dirección en general requieren que los agentes de dirección se coloquen en la superficie del liposoma de una manera tal 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 se pueden unir a una molécula de lípido antes

de que se forme el liposoma usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, alquilación o acilación de un grupo hidroxilo presente en el hidrato de carbono con un haluro de alquilo de cadena larga o con un ácido graso, respectivamente). Como alternativa, el liposoma se puede formar de una manera tal que una porción de conector se incorpora primero en la membrana en el momento de la formación de la membrana. La porción de conector debe tener una porción lipófila, que se incrusta firmemente y se ancla en la membrana. Además, debe tener una porción reactiva, que esté químicamente disponible en la superficie acuosa del liposoma. La porción reactiva se selecciona con el fin de que sea químicamente adecuada para formar un enlace químico estable con el agente de dirección o hidrato de carbono, que se añade posteriormente. En algunos casos, es posible unir el agente diana a la molécula de conector directamente, pero en la mayoría de los casos, es más adecuado usar una tercera molécula que actúa como un puente químico, uniendo de este modo la molécula de conector que está en la membrana con el agente diana o hidrato de carbono que se extiende, tridimensionalmente, fuera de la superficie vesical.

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

Sin pretender limitar al ámbito de la invención, en cada una de las realizaciones que se han expuesto anteriormente (por ejemplo, las que se refieren a composiciones, tales como polipéptidos del secuón, conjugados de polipéptidos, bibliotecas de polipéptidos, composiciones farmacéuticas, ácidos nucleicos que codifican polipéptidos y similares), en general serán preferentes las siguientes realizaciones ejemplares.

V. Procedimientos

Identificación de Polipéptidos del Secuón como Sustratos para Glicosiltransferasas

Una estrategia para la identificación de polipéptidos del secuón que se pueden glicosilar con un rendimiento satisfactorio cuando se someten a una reacción de glicosilación, es preparar una biblioteca de polipéptidos del secuón, en la que cada polipéptido del secuón incluye al menos una secuencia de glicosilación con unión en O o con unión en S de la invención, y someter a ensayo cada polipéptido del secuón por su capacidad para funcionar como un sustrato eficaz para una glicosiltransferasa. Se puede generar una biblioteca de polipéptidos del secuón mediante la inclusión de una secuencia de glicosilación con unión en O o con unión en S seleccionada de la invención en diferentes posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido precursor.

Biblioteca de Polipéptidos del Secuón

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos para generar una o más bibliotecas de polipéptidos del secuón, en las que los polipéptidos del secuón corresponden a un polipéptido precursor (por ejemplo, polipéptido de tipo silvestre). En una realización, el polipéptido precursor tiene una secuencia de aminoácidos que incluye m aminoácidos. Cada posición del aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos se representa por $(\text{AA})_n$, en el que n es un miembro seleccionado de 1 a m . Un procedimiento ejemplar para generar una biblioteca de polipéptidos del secuón incluye las etapas de: (i) producir un primer polipéptido del secuón (por ejemplo, de forma recombinante, de forma química o por otros medios) mediante la introducción de una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención en una primera posición del aminoácido $(\text{AA})_n$ dentro del polipéptido precursor; (ii) producir al menos un polipéptido del secuón adicional mediante la introducción de una secuencia de glicosilación con unión en O en una posición del aminoácido adicional. En una realización, la posición del aminoácido adicional es $(\text{AA})_{n+x}$. En otra realización, la posición del aminoácido nacional es $(\text{AA})_{n-x}$. En estas realizaciones, x es un miembro seleccionado de 1 a $(m-n)$. En una realización, el polipéptido del secuón adicional incluye la misma secuencia de glicosilación con unión en O como el primer polipéptido del secuón. En otra realización, el polipéptido del secuón adicional incluye una secuencia de glicosilación con unión en O diferente a la del primer polipéptido del secuón. En una realización ejemplar, la biblioteca de polipéptidos del secuón se genera mediante "exploración del secuón" que se ha descrito anteriormente en el presente documento. Además, en el presente documento se describen polipéptidos precursores ejemplares y secuencias de glicosilación con unión en O útiles en las bibliotecas de la invención.

Identificación de Polipéptidos de Dirección

Puede ser deseable seleccionar, entre los miembros de la biblioteca, a los polipéptidos que se glicosilan y/o glicoPEGilan de forma eficaz cuando se someten a una reacción de glicosilación y/o glicoPEGilación enzimática. Los polipéptidos del secuón, que se encuentra que se glicosilan y/o glicoPEGilan de forma eficaz se denominan "polipéptidos de dirección". En una realización ejemplar, el rendimiento de la reacción de glicosilación o glicoPEGilación enzimática se usa para seleccionar uno o más polipéptidos de dirección. En otra realización ejemplar, el rendimiento de la glicosilación o glicoPEGilación enzimática para un polipéptido de dirección está entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 100 %, preferentemente entre aproximadamente un 30 % y aproximadamente un 100 %, más preferentemente entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 100 % y lo más preferentemente entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 100 %. Los polipéptidos de dirección que se pueden glicosilar de forma eficaz opcionalmente se evalúan adicionalmente sometiendo al polipéptido de dirección glicosilado a otra reacción de glicosilación o glicoPEGilación enzimática.

Por lo tanto, la invención proporciona procedimientos para identificar un polipéptido de dirección. Un procedimiento modo de ejemplo incluye las etapas de: (i) generar una biblioteca de polipéptidos del secuón de la invención; (ii) someter al menos a un miembro de la biblioteca a una reacción de glicosilación enzimática (un opcionalmente una reacción de glicoPEGilación enzimática). En una realización, durante esta reacción, un resto de glicosilo se transfiere de una molécula dadora de glicosilo en al menos una secuencia de glicosilación con unión en O, en la que el resto de glicosilo se derivativa opcionalmente con un grupo de modificación. El procedimiento puede incluir adicionalmente: (iii) medir el rendimiento de la reacción de glicosilación o glicoPEGilación enzimática para al menos un miembro de la biblioteca. La medida se puede realizar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica y los que se describen a continuación en el presente documento. además, el procedimiento puede incluir antes de la etapa (ii): (iv) purificar al menos un miembro de la biblioteca.

El resto de glicosilo transferido de la etapa (ii) puede ser cualquier resto de glicosilo incluyendo mono- y oligosacáridos así como grupos miméticos de glicosilo. En una realización ejemplar, el resto de glicosilo, que se añade al polipéptido del secuón en una reacción de glicosilación inicial, es un resto de Gal. En otra realización ejemplar, el resto de glicosilo es un resto de GalNAc. Las reacciones de glicosilación posteriores se pueden usar para añadir restos de glicosilo adicionales (por ejemplo, Gal) al polipéptido de resultante GalNAc. El grupo de modificación puede ser cualquier grupo de modificación de la invención, incluyendo polímeros solubles en agua tales como mPEG. En una realización, la reacción de glicosilación enzimática de la etapa (ii) se produce en una célula huésped, en la que se expresa el polipéptido. En otra realización, la etapa (ii) y la etapa (ii) se realizan en el mismo recipiente de reacción. El procedimiento puede incluir adicionalmente (v): someter el producto de la etapa (ii) a una reacción de PEGilación. En una realización, la reacción de PEGilación es una reacción de glicoPEGilación enzimática. En otra realización, la reacción de PEGilación es una reacción de PEGilación química. El procedimiento puede incluir adicionalmente: (vi) medir el rendimiento de la reacción de PEGilación. Los procedimientos útiles para medir el rendimiento de la reacción de PEGilación se describen a continuación. el procedimiento puede incluir adicionalmente: (vii) generar un vector de expresión que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido del secuón. El procedimiento puede incluir adicionalmente: (viii): transfectar una célula huésped con el vector de expresión.

En la técnica se conocen procedimientos para generar polipéptidos del secuón (incluyendo cualquier polipéptido de dirección). En el presente documento se describen procedimientos ejemplares. El procedimiento puede incluir: (i) generar un vector de expresión que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que corresponde al polipéptido del secuón. El procedimiento puede incluir adicionalmente: (ii) transfectar una célula huésped con el vector de expresión. El procedimiento puede incluir adicionalmente: (iii) expresar el polipéptido del secuón en una célula huésped. El procedimiento puede incluir adicionalmente: (iv) aislar el polipéptido del secuón. El procedimiento puede incluir adicionalmente: (v) glicosilar de forma enzimática el polipéptido del secuón en la secuencia de glicosilación con unión en O, por ejemplo usando una glicosil transferasa, tal como GalNAc-T2. Un polipéptido del secuón de interés (por ejemplo, un polipéptido de dirección seleccionado) se prevé expresar en una escala industrial (por ejemplo, conduciendo al aislamiento de más de 250 mg, preferentemente más de 500 mg de proteína). El polipéptido del secuón

En una realización ejemplar, cada miembro de una biblioteca de polipéptidos del secuón se somete a una reacción de glicosilación enzimática. Por ejemplo, cada polipéptido del secuón se somete por separado a una reacción de glicosilación y se determina el rendimiento de la reacción de glicosilación para una o más condiciones de reacción seleccionadas.

En una realización ejemplar, uno o más polipéptidos del secuón de la biblioteca se purifica antes de su procesamiento adicional, tal como glicosilación y/o glicoPEGilación.

En otro ejemplo, se pueden combinar grupos de polipéptidos del secuón y la mezcla resultante de polipéptidos del secuón se puede someter a una reacción de glicosilación o de glicoPEGilación. En una realización ejemplar, una mezcla que contiene todos los miembros de la biblioteca se somete a una reacción de glicosilación. En un ejemplo, de acuerdo con la presente realización, el reactivo dador de glicosilo se puede añadir a la mezcla de reacción de glicosilación en una cantidad inferior a la estequiométrica (con respecto a los sitios de glicosilación presentes) creando un entorno en el que los polipéptidos del secuón compiten como sustratos para la enzima. Estos polipéptidos del secuón, que son sustratos para la enzima, se pueden identificar, por ejemplo por medio de análisis de espectros de masas con o sin separación anterior o purificación de la mezcla glicosilada. Este mismo enfoque se puede usar para un grupo de polipéptidos del secuón cada uno de los cuales contiene secuencias de glicosilación con unión en O diferentes de la invención.

El rendimiento de la reacción de glicosilación enzimática, reacción de glicoPEGilación enzimática o reacción de glicoPEGilación química se puede determinar usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. En una realización ejemplar, el procedimiento usado para distinguir entre un polipéptido glicosilado o glicoPEGilado y un polipéptido sin reaccionar (por ejemplo, no glicosilado o glicoPEGilado) se determina usando una técnica que implica espectroscopía de masas (por ejemplo, LC-MS, MALDI-TOF). En otra realización ejemplar, el rendimiento se determina usando una técnica que implica electroforesis en gel. Además, en otra realización ejemplar, el rendimiento se determina usando una técnica que implica resonancia magnética nuclear (RMN). En una realización adicional ejemplar, el rendimiento se determina usando una técnica que implica cromatografía, tal como HPLC o GC. En una realización, se usa una placa de múltiples pocillos (por ejemplo, una placa de 96 pocillos) para realizar un número de

reacciones de glicosilación en paralelo. La placa se puede equipar opcionalmente con un medio de separación o de filtración (por ejemplo, membrana de filtración en gel) en el fondo de cada pocillo. Se puede usar centrifugación para acondicionar previamente cada muestra antes del análisis mediante espectroscopía de masas u otros medios.

Glicosilación dentro de una Célula Huésped

La glicosilación inicial de una secuencia de glicosilación con unión en O mutante, que es parte de un polipéptido del secun de la invención, también se puede producir dentro de una célula huésped, en la que se expresa el polipéptido. Esa tecnología, por ejemplo, se describe en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/842.926 presentada el 6 de septiembre de 2006, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. La propuesta puede ser un microorganismo procariota, tal como cepas de *E. coli* o *Pseudomonas*). En una realización ejemplar, la célula huésped una célula de *E. coli* mutante *trxB* gor supp.

En otra realización ejemplar, la glicosilación intracelular se consigue mediante co-expresión del polipéptido y una enzima que puede usar el polipéptido como un sustrato y puede glicosilar el polipéptido de forma intracelular en la célula huésped y cultivando la luna huésped en condiciones que permiten la transferencia intracelular de un resto de azúcar a la secuencia de glicosilación. Una enzima ejemplar es "azúcar nucleótido activo:proteína glicosiltransferasa polipeptídica" (por ejemplo, una N-acetilgalactosaminil transferasa eucariótica activa soluble). En otra realización ejemplar, el microorganismo en el que se expresa el polipéptido del secun tiene un entorno de oxidación intracelular. El microorganismo se puede modificar genéticamente para que tenga el entorno de oxidación intracelular. La glicosilación intracelular no se limita a la transferencia de un solo resto de glicosilo. Se pueden añadir varios restos de glicosilo secuencialmente mediante co-expresión de las enzimas necesarias y la presencia de los dadores de glicosilo respectivos. Además, este enfoque se puede usar para producir polipéptidos del secun en una escala comercial.

Existen procedimientos disponibles para determinar si un polipéptido del secun está glicosilado de forma eficaz o no dentro de la secuencia de glicosilación con unión en O mutante dentro de la célula huésped. Por ejemplo, el lisado celular (después de una o más etapas de purificación) se analiza por espectroscopía de masas para medir la relación entre polipéptidos del secun glicosilados y no glicosilados. En otro ejemplo, el lisado celular se analiza mediante electroforesis en gel separando los polipéptidos glicosilados de los no glicosilados.

Evaluación Adicional de Polipéptidos de Dirección

En una realización, en la que el procedimiento de identificación sistemática inicial implica glicosilación enzimática usando un resto de glicosilo sin modificar (por ejemplo, transferencia de un resto de GalNAc mediante GalNAc-T2), los polipéptidos de dirección seleccionados se pueden evaluar adicionalmente por su capacidad para ser un sustrato eficaz para modificación adicional, por ejemplo, a través de otra reacción enzimática o una modificación química. En una realización ejemplar, la "identificación sistemática" posterior implica someter un polipéptido de dirección glicosilado a otra reacción de glicosilación (por ejemplo, adición de Gal) y/o PEGilación.

Una reacción de PEGilación puede ser, por ejemplo, una reacción de PEGilación química o una reacción de glicoPEGilación enzimática. Con el fin de identificar un polipéptido de dirección, que se glicoPEGila de forma eficaz, al menos un polipéptido de dirección (opcionalmente glicosilado anteriormente) se somete a una reacción de PEGilación y se determina el rendimiento para esta reacción. En un ejemplo, se determinan los rendimientos de PEGilación para cada polipéptido de dirección. En una realización ejemplar, el rendimiento para la reacción de PEGilación está entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 100 %, preferentemente entre aproximadamente un 30 % y aproximadamente un 100 %, más preferentemente entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 100 % y lo más preferentemente entre aproximadamente un 70 % ir aproximadamente un 100 %. El rendimiento de la PEGilación se puede determinar usando cualquier procedimiento analítico conocido en la técnica, que sea adecuado para el análisis de polipéptidos, tal como espectroscopía de masas (por ejemplo, MALDI-TOF, Q-TOF), electroforesis en gel (por ejemplo, en combinación con medios para cuantificación, tales como densitometría), técnicas de RMN así como procedimientos de cromatografía, tales como HPLC usando materiales de columna útiles para la separación de especies PEGiladas y no PEGiladas del polipéptido analizado. Como se ha descrito anteriormente para la glicosilación, se puede usar una placa de múltiples pocillos (por ejemplo, una placa de 96 pocillos) para realizar un número de reacciones de PEGilación en paralelo. La placa se puede equipar opcionalmente con un medio de separación o de filtración (por ejemplo, membrana de filtración en gel) en el fondo de cada pocillo. Se puede usar centrifugación y reconstitución para acondicionar previamente cada muestra antes del análisis mediante espectroscopía de masas u otros medios.

En otra realización ejemplar, la glicosilación y la glicoPEGilación de un polipéptido del secun se produce en una "reacción de una etapa" tal como se describe a continuación. En un ejemplo, el polipéptido del secun se pone en contacto con una primera enzima (por ejemplo, GalNAc-T2) y una molécula dadora apropiada (por ejemplo, UDP-GalNAc). La mezcla se incuba durante un período de tiempo adecuado antes de añadir una segunda enzima (por ejemplo, Core-1-GalT1) y un segundo dador de glicosilo (por ejemplo, UDP-Gal). De este modo, se puede realizar cualquier número de reacciones de glicosilación/glicoPEGilación. Como alternativa, más de una enzima y más de un dador de glicosilo se pueden poner en contacto con el polipéptido mutante para añadir más de un resto de glicosilo en una etapa de reacción. Por ejemplo, el polipéptido mutante se pone en contacto con 3 enzimas diferentes (por ejemplo, GalNAc-T2, Core-1-GalT1 y ST3Gal1) y tres restos dadores de glicosilo diferentes (por ejemplo, UDP-GalNAc,

UDP-Gal y CMP-SA-PEG) en un sistema tampón adecuado para generar un polipéptido mutante glicoPEGilado, tal como polipéptido-GalNAc-Gal-SA-PEG (véase, Ejemplo 4.6). Los rendimientos globales se pueden determinar usando los procedimientos que se han descrito anteriormente.

Formación de Conjugados de Polipéptidos

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para formar un conjugado covalente entre un grupo de modificación y un polipéptido. Los conjugados de polipéptidos de la invención se forman entre polipéptidos glicosilados o no glicosilados y diversas especies tales como polímeros solubles en agua, restos terapéuticos, biomoléculas, restos de diagnóstico, restos de dirección y similares. El polímero, resto terapéutico o biomolécula se conjuga con el polipéptido a través de un grupo de unión a glicosilo, que se interpone entre, y se une covalentemente tanto con el polipéptido como con el grupo de modificación (por ejemplo, polímero soluble en agua). El resto de azúcar del azúcar modificado se selecciona preferentemente entre azúcares de nucleótido, azúcares activados y azúcares, que ni son nucleótidos ni están activados.

En una realización ejemplar, el conjugado de polipéptido se forma a través de unión enzimática de un resto modificado al polipéptido. El azúcar modificado se añade directamente a una secuencia de glicosilación con unión en O, o ha un resto de glicosilo, que se une directa o indirectamente (por ejemplo, a través de uno o más restos de glicosilo) a una secuencia de glicosilación con unión en O.

Un procedimiento ejemplar para fabricar un conjugado de polipéptido de la invención incluye las etapas de: (i) producir de forma recombinante un polipéptido del secun que incluye una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención, y (ii) glicosilar de forma enzimática el polipéptido del secun a la secuencia de glicosilación con unión en O. En una realización ejemplar, el procedimiento incluye poner en contacto el polipéptido mutante con una mezcla que contiene un dador de glicosilo (por ejemplo, un azúcar modificado) y una enzima, tal como una glicosiltransferasa (por ejemplo, GalNAc-T2 humana) para la que el dador de glicosilo es un sustrato. La reacción se realiza en condiciones apropiadas para que la enzima forme un enlace covalente entre el resto de glicosilo y el polipéptido.

Usando la gran selectividad de las enzimas, tales como las glicosiltransferasas, el presente procedimiento proporciona polipéptidos que llevan grupos de modificación en una o más posiciones específicas. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, un azúcar modificado se une directamente a una secuencia de glicosilación con unión en O dentro de la cadena de polipéptido o, como alternativa, el azúcar modificado se une a un resto de hidratos de carbono de un glicopéptido. Además, dentro del ámbito de la presente invención están los polipéptidos en los que los azúcares modificados se unen tanto a un sitio glicosilado como directamente a un resto de aminoácidos de la cadena principal del polipéptido.

En contraste con las estrategias conocidas de elaboración química y enzimática de péptidos, los procedimientos de la invención, hacen posible ensamblar polipéptidos y glicopéptidos que tienen un patrón de derivatización sustancialmente homogéneo. Las enzimas usadas en la invención son generalmente selectivas para un resto de aminoácido en particular o combinación de restos de aminoácidos del polipéptido. Los procedimientos de la invención también proporcionan medios prácticos para producción a gran escala de polipéptidos y glicopéptidos modificados.

En una realización ejemplar, el polipéptido está O-glicosilado y funcionalizado con un polímero soluble en agua de la siguiente manera: El polipéptido se produce con una secuencia de glicosilación con unión en O disponible. Se añade GalNAc a un resto de serina o treonina dentro de la secuencia de glicosilación y el péptido de GalNAc resultante se sialila con un cassette de ácido siálico-grupo de modificación usando ST6Gal-1. Como alternativa, el péptido de GalNAc se galactosila usando Core-1-GalT-1 y el producto se sialila con un casete de ácido siálico-grupo de modificación usando ST3Gal-1. Un conjugado ejemplar de acuerdo con este procedimiento tiene las siguientes uniones: Thr- α -1-GalNAc- β -1,3-Gal- α 2,3-Sia*, en el que Sia* es el casete de ácido siálico-grupo de modificación.

Las etapas de glicosilación se pueden realizar separadamente, o combinadas en una reacción de una "sola etapa" usando múltiples enzimas y dadores de sacarilo. Por ejemplo, en la reacción con tres enzimas que se ha expuesto anteriormente, la GalNAc tranferasa, GalT y SiaT así como las respectivas moléculas dadoras de glicosilo se pueden combinar en un solo recipiente. Como alternativa, la reacción de GalNAc se puede realizar primero y tanto GalT y SiaT como los dadores de sacarilo apropiados se pueden añadir posteriormente. Otro ejemplo implica la adición de cada enzima y fundador de glicosilo apropiado realizando la reacción secuencialmente en un motivo de una "sola etapa". Además, las combinaciones de los procedimientos que se han expuesto anteriormente son útiles para preparar los compuestos de la invención.

En los conjugados de la invención, el casete de Sia-grupo de modificación se puede unir al Gal en una unión α -2,6, o α -2,3.

La presente invención también proporciona medios para añadir (o retirar) uno o más restos de glicosilo seleccionados a un polipéptido, después de la conjugación de un azúcar modificado con al menos uno de los restos de glicosilo del polipéptido seleccionados. La presente realización es útil, por ejemplo, cuando se desea conjugar el azúcar modificado a un resto de glicosilo seleccionado que no está presente en un polipéptido o que no está presente en una cantidad deseada. Por lo tanto, antes de acoplar un azúcar modificado a un polipéptido, el resto de glicosilo seleccionado se conjuga con el polipéptido mediante acoplamiento enzimático o químico. En otra realización, el patrón de glicosilación

de un glicopéptido se altera antes de la conjugación del azúcar modificado mediante la retirada del resto de hidrato de carbono del glicopéptido. Véase, por ejemplo el documento del patente WO 98/31826.

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

La adición química de restos de glicosilo se realiza mediante cualquier procedimiento reconocido en la técnica. La adición enzimática de restos de azúcar se consigue preferentemente usando una modificación de los procedimientos que se exponen en el presente documento, sustituyendo unidades de glicosilo nativo para los azúcares modificados usados en la invención. Otros procedimientos para añadir restos de azúcar se divulgan en las Patentes de Estados Unidos N° 5.876.980; N° 6.030.815; N° 5.728.554 y N° 5.922.577. los procedimientos ejemplares de uso en la presente invención se describen en el documento de patente WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM., páginas 259-306 (1981).

Conjugados de Polipéptidos que Incluyen Dos o Más Polipéptidos

Además, se proporcionan conjugados que incluyen dos o más polipéptidos unidos entre sí a través de una rama de engarce, es decir, conjugados polifuncionales; estando al menos un polipéptido O-glicosilado o incluyendo una secuencia de glicosilación con unión en O mutante. Los conjugados polifuncionales de la invención pueden incluir dos o más copias del mismo polipéptido o una colección de diversos polipéptidos con estructuras y/o propiedades diferentes. En los conjugados ejemplares de acuerdo con la presente realización, el engarce entre los dos polipéptidos se une a al menos uno de los polipéptidos a través de un resto de glicosilo con unión en O, tal como un grupo de unión a glicosilo intacto de glicosilo con unión en O.

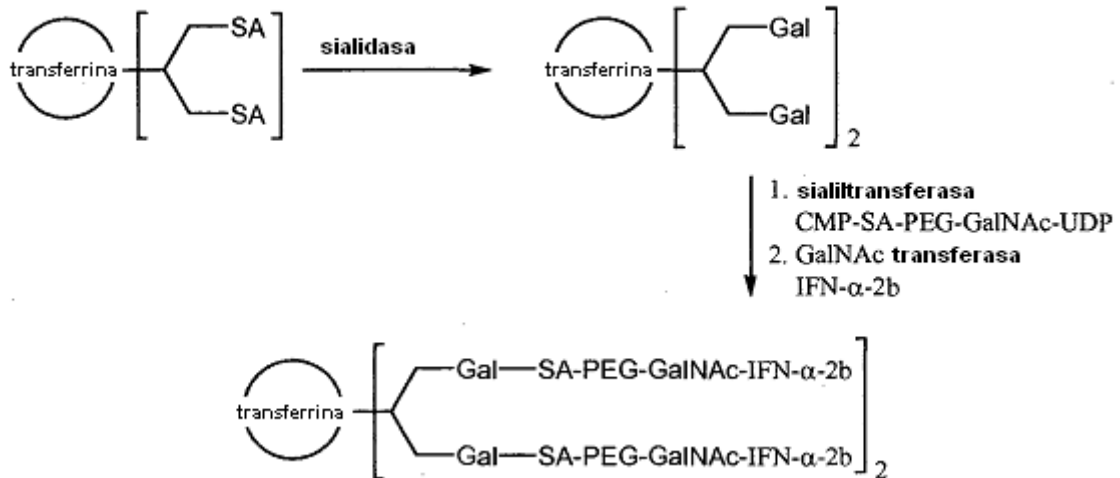
En una realización, la invención proporciona un procedimiento para unir dos o más polipéptidos a través de un grupo de unión. El grupo de unión es de cualquier estructura útil y se puede seleccionar entre estructuras de cadena lineal y ramificada. Preferentemente, cada extremo del engarce, que se une a un polipéptido, incluye un azúcar modificado (es decir, un grupo de unión a glicosilo intacto emergente).

En un procedimiento de la invención ejemplar, dos polipéptidos se unen entre sí a través de un resto de engarce que incluye un engarce de PEG. El constructo se ajusta a la estructura general que sea expuesto anteriormente en el esquema. Como se describe en el presente documento, el constructo de la invención incluye dos grupos de unión a glicosilo intactos (es decir, $s + t = 1$). El enfoque en un engarce de PEG que incluye dos grupos glicosidos para fines de claridad y no se debería interpretar como limitante de la identidad de las ramas del engarce de uso en la presente 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. La primera y la segunda unidades de glicosilo son preferentemente sustratos para diferentes transferasas, que permiten la unión ortogonal del primer y segundo polipéptidos a la primera y segunda unidades de glicosilo, respectivamente. En la práctica, el engarce de (glicosilo)¹-PEG-(glicosilo)² se pone en contacto con el primer polipéptido y una primera transferasa para la que la primera unidad de glicosilo es un sustrato, formando de este modo (péptido)¹-(glicosilo)¹-PEG-(glicosilo)². A continuación, la transferasa y/o polipéptido sin reaccionar se retiran opcionalmente de la mezcla de reacción. El segundo polipéptido y una segunda transferasa para la que la segunda unidad de glicosilo es un sustrato se añaden al conjugado de (péptido)¹-(glicosilo)¹-PEG-(glicosilo por)², formando (péptido)¹-(glicosilo)¹-PEG-(glicosilo)²-(péptido)²; al menos uno de los restos de glicosilo tiene unión en O directa o indirectamente. Los expertos en la materia observarán que el procedimiento que se ha resumido anteriormente también es aplicable para la formación de conjugados entre más de dos polipéptidos, por ejemplo, mediante el uso de un PEG ramificado, dendrímero, poli(aminoácido), polisacáridos o similar.

En una realización ejemplar que no forma parte de la invención, el interferón alfa 2β (IFN-α 2β) se conjuga a transferrina a través del engarce bifuncional que incluye un grupo de unión a glicosilo intacto en cada extremo del resto de PEG (Esquema 6). El conjugado de IFN tiene una vida media *in vivo* que es mayor que la de IFN solo debido al mayor tamaño molecular del conjugado. Además, la conjugación de IFN a transferrina sirve para dirigir selectivamente el conjugado al cerebro. Por ejemplo, un extremo del engarce de PEG se funcionaliza con un CMP ácido siálico y el otro se refuncionaliza con una UDP GalNAc. El engarce se combina con IFN en presencia de una GalNAc transferasa, dando como resultado la unión de la GalNAc de la rama del engarce a un resto de serina y/o treonina en el IFN.

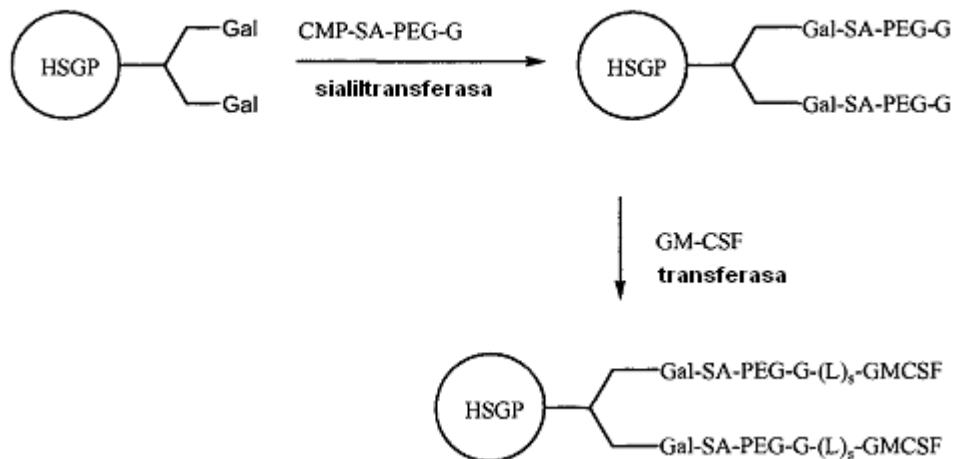
Esquema 6:



Los procesos descritos anteriormente se pueden realizar a través de tantos ciclos como se desee, y no se limitan a la formación de un conjugado entre los polipéptidos con un solo engarce. Además, los expertos en la materia observarán que las reacciones que funcionalizan los grupos de unión a glicosilo intactos en los extremos del engarce de PEG (otro) con el polipéptido se pueden producir simultáneamente en el mismo recipiente de reacción, o se pueden realizar de una forma en etapas. Cuando las reacciones se realizan de una forma en etapas, el conjugado producido en cada etapa se purifica opcionalmente a partir de uno o más componentes de la reacción (por ejemplo, enzimas, péptidos).

Otra realización ejemplar adicional se expone en el Esquema 7. El Esquema 7 muestra un procedimiento para preparar un conjugado que dirige una proteína seleccionada, por ejemplo, GM-CSF, a hueso y aumenta la vida media en circulación de la proteína seleccionada.

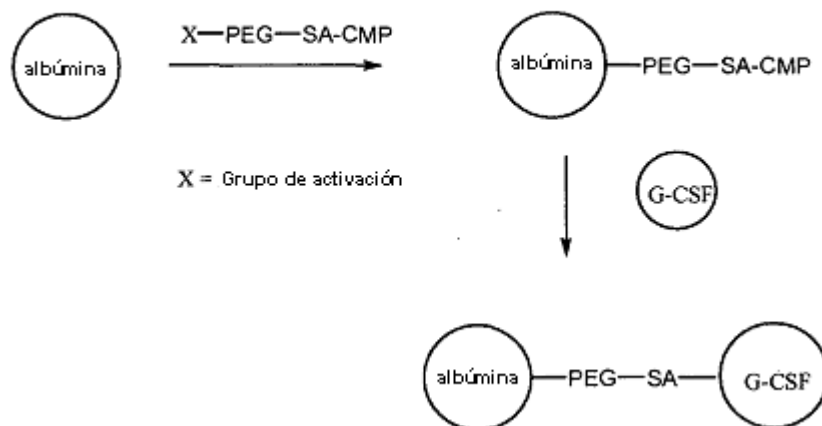
Esquema 7:



en el que G es un resto de glicosilo en un resto de azúcar activado (por ejemplo, nucleótido de azúcar), que se convierte en un grupo de engarce de glicosilo intacto en el conjugado. Cuando s es mayor que 0, L es un grupo de unión a sacarilo tal, GalNAc, o GalNAc-Gal.

En otra realización ejemplar en la que se usa un derivado de PEG reactivo, la invención proporciona un procedimiento para prolongar la vida media en la circulación en sangre de un polipéptido seleccionados, en esencia dirigiendo el polipéptido al grupo sanguíneo, por conjugación del polipéptido con un polímero sintético o natural de un tamaño suficiente para retrasar la filtración de la proteína por los glomérulos (por ejemplo, albúmina). Esta realización de la invención se ilustra en el Esquema 8, en el que el polipéptido de G-CSF ejemplar se conjuga con albúmina a través de un engarce de PEG usando una combinación de modificaciones químicas y enzimáticas.

Esquema 8: Uso de un análogo de PEG activado para formar un conjugado de polipéptido



Como se muestra en el Esquema 8, un resto (por ejemplo, cadena lateral de aminoácido) de albúmina se modifica con un derivado de PEG reactivo, tal como X-PEG-(CMP-ácido siálico), en el que X es un grupo de activación (por ejemplo, éster activo, isotiocianato, etc). El derivado de PEG y G-CSF se combinan y se ponen en contacto con una transferasa para la que CMP-ácido siálico su sustrato. En una realización ilustrativa adicional, una ϵ -amina de lisina se hace reaccionar con el éster de N-hidroxisuccinimida del engarce de PEG para formar el conjugado de albúmina. El CMP-ácido siálico del engarce se conjuga enzimáticamente con un resto apropiado en GCSF, por ejemplo, Gal, o GalNAc formando de ese modo el conjugado. Los expertos en la materia observarán que el procedimiento que se ha descrito anteriormente no se limita a los patrones de la reacción que se exponen. Además, el procedimiento se puede poner en práctica para formar conjugados que incluyen más de dos restos de proteína usando, por ejemplo, un engarce ramificado que tiene más de dos extremos.

Conjugación Enzimática de Azúcares Modificados con Polipéptidos

Los azúcares modificados se conjugan con un polipéptido glicosilado o no glicosilado usando una enzima apropiada para mediar la conjugación. Preferentemente, concentraciones del azúcar(es), enzima(s) y polipéptido(s) dadores modificados se seleccionan de modo que la glicosilación evoluciona hasta que se consume el aceptor. Las consideraciones que se analizan a continuación, aunque se exponen en el contexto de una sialiltransferasa, en general se pueden aplicar a otras reacciones de glicosiltransferasas.

Se conoce un número de procedimientos de uso de glicosiltransferasas para sintetizar estructuras deseadas de oligosacáridos y en general se pueden aplicar en la presente invención. Procedimientos ejemplares se describen, por ejemplo, en el documento de Patente WO 96/32491 y por Ito y col., Pure Appl. Chem. 65: 753 (1993), así como en las Patentes de Estados Unidos N° 5.352.670; N° 5.374.541 y N° 5.545.553.

La presente invención se pone en práctica usando una sola glicosiltransferasa o una combinación de glicosiltransferasas. Por ejemplo, se puede usar una combinación de una sialiltransferasa y una galactosiltransferasa. En esas realizaciones que usan más de una enzima, las enzimas y sustratos se combinan preferentemente en una mezcla de reacción inicial, o las enzimas y reactivos para una segunda reacción enzimática se añaden a al medio de reacción una vez que la primera reacción enzimática está completa o casi completa. Mediante la realización de dos reacciones enzimáticas secuencialmente en un solo recipiente, los rendimientos globales mejoran con respecto a procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Se reduce Además, la limpieza y la eliminación de disolventes productos secundarios extra.

Los restos de glicosilo con unión en O de los conjugados de la invención en general se originan con un resto de GalNAc que se une al polipéptido. Cualquier miembro de la familia de las GalNAc transferasas (por ejemplo, los que se describen en el presente documento en la Tabla 13) se puede usar para unir un resto de GalNAc al polipéptido (véase por ejemplo, Hassan H, Bennett EP, Mandel U, Hollingsworth MA, y Clausen H (2000); y Control of Mucin-Type O-Glycosylation: O-Glycan Occupancy is Directed by Substrate Specificities of Polypeptide GalNAc-Transferases; Eds. Ernst, Hart, y Sinay; Wiley-VCH capítulo "Carbohidratos in Chemistry and Biology - a Comprehension Handbook", 273-292). El resto de GalNAc por sí mismo puede ser el grupo de unión a glicosilo y se puede derivatizar con a grupo de modificación. Como alternativa, el resto de sacarilo se prepara usando una o más enzimas y uno o más sustratos dadores de glicosilo apropiados. A continuación, el azúcar modificado se puede añadir al resto de glicosilo ampliado.

La enzima cataliza la reacción, en general mediante una etapa de síntesis que es análoga a la reacción inversa de la etapa de hidrólisis con endoglicanasa. En estas realizaciones, la molécula dadora de glicosilo (por ejemplo, una estructura de oligo- o monosacárido deseada) contiene un grupo saliente y la reacción evoluciona con la adición de la molécula dadora a un resto de GlcNAc en la proteína. Por ejemplo, el grupo saliente puede ser un halógeno, tal como

flúor. En otras realizaciones, el grupo saliente es una Asn, o un resto de Asn-péptido. En otras realizaciones adicionales, el resto de GlcNAc en la molécula dadora de glicosilo está modificado. Por ejemplo, el resto de GlcNAc puede comprender un resto de 1,2 oxazolina.

5 En otra realización, cada una de las enzimas usadas para producir un conjugado de la invención está presentes en una cantidad catalítica. La cantidad catalítica de una enzima en particular varía de acuerdo con la concentración de ese sustrato de la enzima, así como con condiciones de la reacción tales como temperatura, tiempo y valor de pH. Los expertos en la materia conocen bien medios para determinar la cantidad catalítica para una enzima dada en concentraciones de sustrato y condiciones de reacción seleccionadas previamente.

10 La temperatura a la que se realiza un procedimiento anterior puede variar desde justo por encima de congelación a la temperatura en la que se desnaturaliza la enzima más sensible. Los intervalos de temperatura preferentes son de aproximadamente de 0 °C a aproximadamente 55 °C, y más preferentemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 32 °C. En otra realización ejemplar, uno o más componentes del presente procedimientos se llevan a una temperatura elevada usando una enzima termófila.

15 La mezcla de reacción se mantiene durante un período de tiempo suficiente para que el aceptor se glicosile, formando de ese modo el conjugado deseado. A menudo se puede detectar algo de conjugado después de unas pocas horas, obteniéndose normalmente cantidades recuperables en 24 horas o un periodo de tiempo inferior. Los expertos en la materia entienden que la velocidad de reacción depende de un número de factores variables (por ejemplo, concentración de enzima, concentración de dadores, concentración del aceptor, temperatura, volumen de disolvente), que se optimizan para un sistema seleccionado.

20 La presente invención también proporciona la producción a escala industrial de polipéptidos modificados. Como se usa en el presente documento, una escala industrial produce generalmente al menos aproximadamente 250 mg, preferentemente al menos aproximadamente 500 mg, y más preferentemente al menos aproximadamente 1 gramo de conjugado purificado, acabado, preferentemente después de un solo ciclo de reacción, es decir, el conjugado no es un combinación de los productos de reacción de ciclos de síntesis consecutivamente iterados, idénticos.

25 En el análisis dado a continuación, la invención se ejemplifica mediante la conjugación de restos de ácido siálico modificados con un polipéptido glicosilado. El ácido siálico modificado ejemplar se marca con (m-) PEG. El enfoque del siguiente análisis sobre el uso de PEG-ácido siálico modificado y polipéptidos glicosilados es para claridad de ilustración y no pretende implicar que la invención se limite a la conjugación de estos dos compañeros. Un experto entiende que el análisis se puede aplicar en general a las adiciones de restos de glicosilo modificados distintos de ácido siálico. Además, el análisis se puede aplicar igualmente a la modificación de una unidad de glicosilo con agentes distintos de PEG incluyendo otros polímeros, restos terapéuticos y biomoléculas solubles en agua.

30 Se puede usar un enfoque enzimático para la introducción selectiva de un grupo de modificación (por ejemplo, mPEG o mPPG) en un polipéptido o glicopéptido. En una realización, el procedimiento usa azúcares modificados, que incluyen el grupo de modificación en combinación con una glicosiltransferasa o glicosintasa apropiada. Al seleccionar la glicosiltransferasa que conseguirá la unión de hidratos de carbono deseada y al usar el azúcar modificado como sustrato dador, el grupo de modificación se puede introducir directamente en la cadena principal del polipéptido, en restos de azúcar existentes de un glicopéptido o en restos de azúcar que se han añadido a un polipéptido. En otra realización, el procedimiento usa azúcares modificados, que llevan un grupo funcional reactivo enmascarado, que se puede usar para la unión del grupo de modificación después de la transferencia del azúcar modificado en el polipéptido o glicopéptido.

35 En un ejemplo, la glicosiltransferasa es una sialiltransferasa, que se usa para añadir un resto de sialilo modificado a un glucopéptido. El aceptor glicosídico para el resto de sialilo se puede añadir a una secuencia de glicosilación con unión en O, por ejemplo, durante la expresión del polipéptido o se puede añadir química o enzimáticamente después de la expresión del polipéptido, usando la glicosidasa(s), glicosiltransferasa(s) apropiadas o combinaciones de las mismas. Los restos aceptores adecuados, incluyen, por ejemplo, aceptores de galactosilo tales como GalNAc, Galβ1,4GlcNAc, Galβ1,4GalNAc, Galβ1,3GalNAc, lacto-N-tetraosa, Galβ1,3GlcNAc, Galβ1,3Ara, Galβ1,6GlcNAc, Galβ1,4Glc (lactosa), y otros aceptores conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Paulson y *col.*, J. Biol. Chem. 253: 5617-5624 (1978)).

40 En una realización ejemplar, un resto de GalNAc se añade a una secuencia de glicosilación con unión en O mediante la acción de una GalNAc transferasa. Hassan H, Bennett EP, Mandel U, Hollingsworth MA, y Clausen H (2000), Control of Mucin-Type O-Glycosylation: O-Glycan Occupancy is Directed by Substrate Specificities of Polypeptide GalNAc-Transferases (Eds. Ernst, Hart, y Sinay), Wiley-VCH capítulo "Carbohidrates in Chemistry and Biology - a Comprehension Handbook", páginas 273-292. El procedimiento incluye la incubación del polipéptido a modificar con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de una galactosiltransferasa y un dador de galactosilo adecuado. Se permite que la reacción evolucione sustancialmente hasta su finalización o, como alternativa, la reacción termina cuando se añade una cantidad seleccionada previamente de resto de galactosa. Otros procedimientos de ensamblaje de un aceptor de sacárido seleccionado serán evidentes para los expertos en la materia.

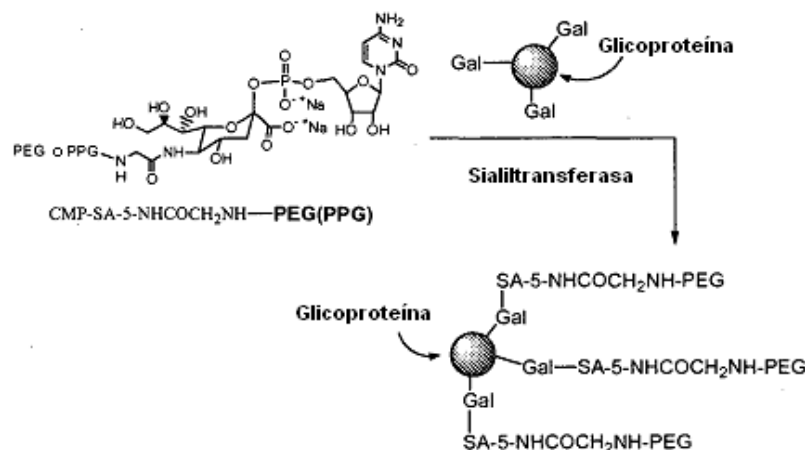
En el análisis dado a continuación, el procedimiento de la invención se ejemplifica mediante el uso de azúcares

modificados que tienen un polímero soluble en agua unido a los mismos. El enfoque del análisis es para claridad de la ilustración. Los expertos observarán que el análisis es igualmente relevante para aquellas realizaciones en las que el azúcar modificado lleva un resto terapéutico, una biomolécula o similares.

- 5 En otra realización ejemplar, un polímero soluble en agua se añade a un resto de GalNAc a través de un de resto de galactosilo modificado (Gal). Como alternativa, se puede añadir un Gal sin modificar al resto de GalNAc terminal.

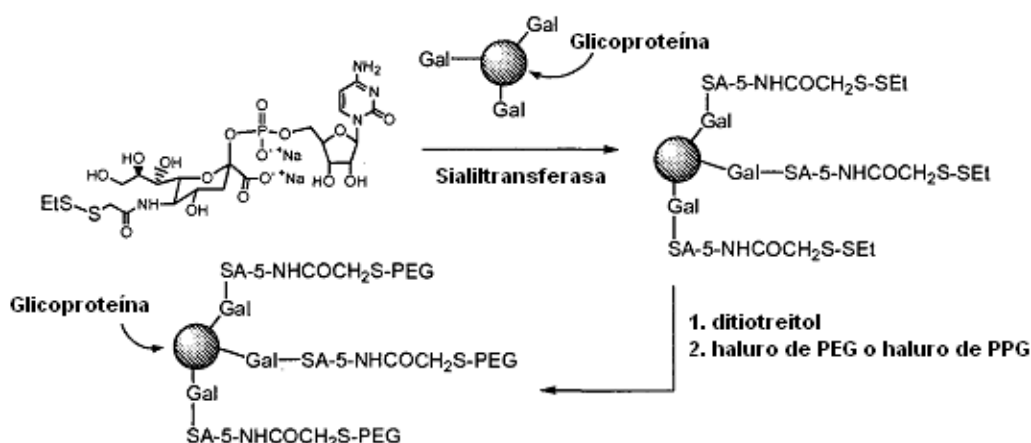
Además, en un ejemplo adicional, un polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG) se añade sobre un resto de Gal terminal usando un resto de ácido siálico modificado y una sialiltransferasa apropiada. Esta realización se ilustra en el Esquema 9, dado a continuación.

Esquema 9: Adición de un Resto de Sialilo Modificado a una Glicoproteína



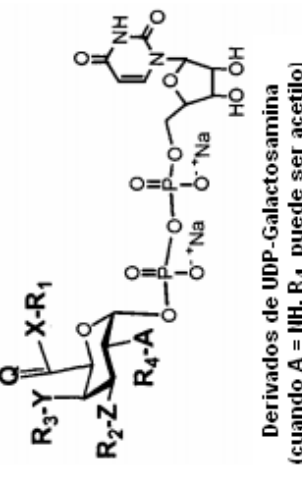
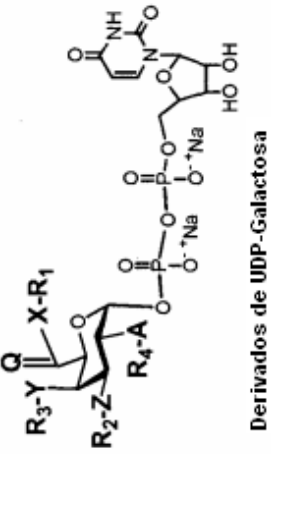
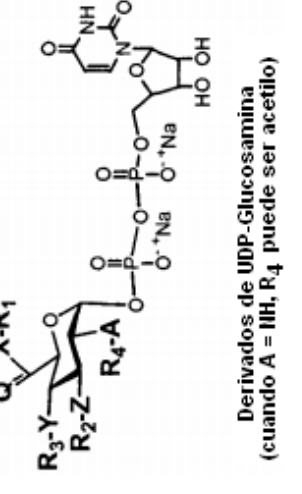
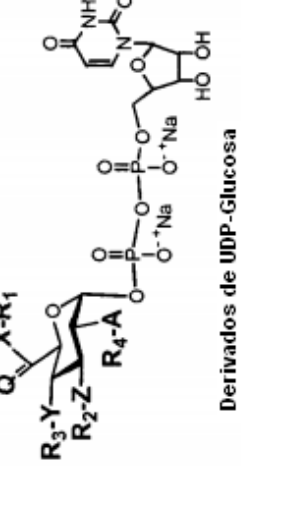
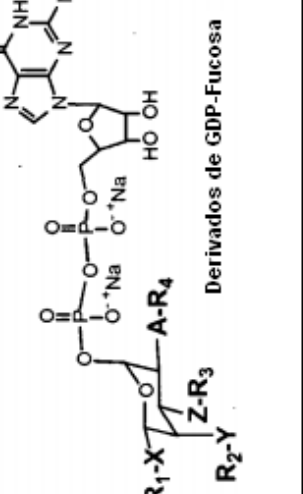
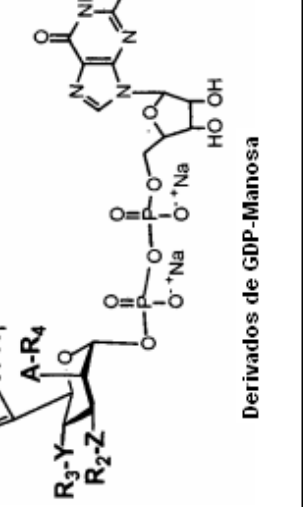
- 10 Y en otro enfoque adicional, un grupo funcional reactivo enmascarado está presente en el ácido siálico. El grupo reactivo enmascarado no se ve preferentemente afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al polipéptido. Después de la unión covalente del ácido siálico modificado al polipéptido, el enmascaramiento se retira y el polipéptido se conjuga con el grupo de modificación, tal como polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG o PPG) por reacción de del grupo reactivo sin enmascarar en el resto de azúcar modificado con un
- 15 grupo de modificación reactivo. Esta estrategia se ilustra en el Esquema 10, dado a continuación.

Esquema 10: Modificación de un Glicopéptido usando un Resto de Sialilo que Lleva un Grupo Funcional Reactivo



Se puede usar cualquier azúcar modificado en combinación con una glicosiltransferasa apropiada, dependiendo de los azúcares terminales de las cadenas laterales de oligosacárido del glicopéptido (Tabla 12).

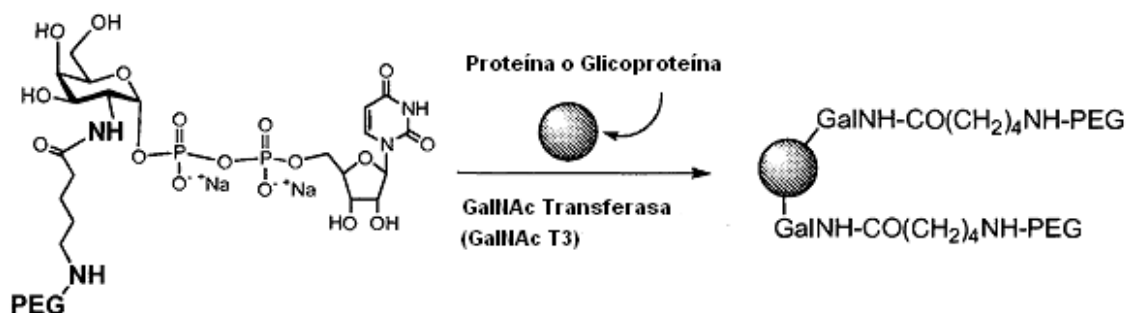
Tabla 12: Azúcares Modificados A Modo de Ejemplo

 Derivados de UDP-Galactosamina (cuando A = IH, R₄ puede ser acetilo)	 Derivados de UDP-Galactosa
 Derivados de UDP-Glucosamina (cuando A = IH, R₄ puede ser acetilo)	 Derivados de UDP-Glucosa
 Derivados de GDP-Fucosa	 Derivados de GDP-Manosa

X = O, IH, S, CH₂, II-(R₁-5)
 Y = X; Z = X; A = X; B = X.
 Q = H₂, O, S, IH, II-R.
 R₁, R₂, R₃, R₄ = H, Engarce-M, M, condroitina, queratano, dermatano, albúmina, integrinas, péptidos, etc.
 M = Ligando de interés

En una realización alternativa, el azúcar modificado se añade directamente a la cadena principal de péptido usando una glicosiltransferasa conocida por transferir restos de azúcar a la secuencia de glicosilación con unión en O en la cadena principal de polipéptido. Esta realización ejemplar se expone en el Esquema 11, dado a continuación. Las glicosiltransferasas ejemplares útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, GalNAc transferasas (GalNAc T1 a GalNAc T20), GlcNAc transferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, xilosiltransferasas, manosiltransferasas y similares. El uso de este enfoque permite la adición directa de azúcares modificados en polipéptidos que carecen de cualquier hidratos de carbono o, como alternativa, en glicopéptidos existentes.

Esquema 11: Transferencia de un Azúcar Modificado A Modo de Ejemplo en un Polipéptido sin Glicosilación Anterior



En cada una de las realizaciones ejemplares que se han expuesto anteriormente, se puede usar una o más etapas de modificación química o enzimática después de la conjugación del azúcar modificado con el polipéptido. En una realización ejemplar, una enzima (por ejemplo, fucosiltransferasa) se usa para añadir una unidad de glicosilo (por ejemplo, fucosa) en el azúcar modificado terminal unido al polipéptido. En otro ejemplo, se usa una reacción enzimática para "proteger" (por ejemplo, sialilar) sitios en los que el azúcar modificado no se puede conjugar. Como alternativa, se usa una reacción química para alterar la estructura del azúcar modificado conjugado. Por ejemplo, el azúcar modificado o conjugado se hace reaccionar con agentes que estabilizan o desestabilizan su unión con el componente de polipéptido al que se une el azúcar modificado. En otro ejemplo, un componente del azúcar modificado se desprotege después de su conjugación con el polipéptido. Un experto observará que existe una variedad de procedimientos enzimáticos y químicos que son útiles en los procedimientos de la invención en cualquier etapa después de que el azúcar modificado se haya conjugado con el polipéptido. La elaboración adicional del conjugado de azúcar-péptido está dentro del ámbito de la invención.

En otra realización ejemplar, el glicopéptido se conjuga con una gente de dirección, por ejemplo, transferrina (para administrar el polipéptido a través de la barrera sangre-cerebro, y a los endosomas), carnitina (para administrar el polipéptido a las células musculares; véase, por ejemplo, LeBorgne y col., Biochem. Pharmacol. 59: 1357-63 (2000)), y fosfonatos, por ejemplo, bisfosfonato (para dirigir el polipéptido al hueso y otros tejidos calcícos; véase, por ejemplo, Modem Drug Discovery, agosto de 2002, página 10). Otros agentes útiles para la dirección son evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, glucosa, glutamina e IGF también son útiles para dirigirse al músculo.

El resto de dirección y el polipéptido terapéutico se conjugan mediante cualquier procedimiento que se analiza en el presente documento o de otro modo se conoce en la técnica. Los expertos observarán que los polipéptidos además de los que se han expuesto anteriormente también se pueden derivatizar tal como se expone en el presente documento. En el Apéndice adjunto a la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 60/328.523, en tramitación, del solicitante, presentada el 10 de octubre de 2001 se exponen polipéptidos ejemplares.

En una realización ejemplar, el agente de dirección y el polipéptido terapéutico se acoplan a través de un resto de engarce. En la presente realización, al menos uno del polipéptido terapéutico o de la gente de dirección se acopla al resto de engarce a través de un grupo de unión a glicosilo intacto de acuerdo con un procedimiento de la invención. En una realización ejemplar, el resto de engarce incluye un poli(éter) tal como poli(etilenglicol). En otra realización ejemplar, el resto de engarce incluye al menos un enlace que se degrada *in vivo*, liberando el polipéptido terapéutico del agente de dirección, después de la administración del conjugado al tejido diana o región del organismo.

Además, en otra realización ejemplar, la distribución *in vivo* del resto terapéutico se altera mediante la alteración de una glicoforma en el resto terapéutico sin conjugar el polipéptido terapéutico a un resto de dirección. Por ejemplo, el polipéptido terapéutico se puede desviar de la absorción por el sistema reticuloendotelial mediante protección de un resto de galactosa terminal de un grupo glicosilo con ácido siálico (o un derivado del mismo).

Enzimas

Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas catalizan la adición de azúcares activados (NDP-azúcares dadores), de una forma gradual, a una proteína, glicopéptido, lípido o glicolípido o al extremo no reductor de un oligosacárido en crecimiento. Los glicopéptidos con unión en N se sintetizan a través de una transferasa y un dador de oligosacárido unido a lípidos Dol-PP-NAG₂Glc₃Man₉ en una transferencia de bloque seguido por la adaptación del núcleo. En este caso, la naturaleza del sacárido "núcleo" es algo diferente de las uniones posteriores. En la técnica se conoce un gran número de glicosiltransferasas

La glicosiltransferasa a usar en la presente invención puede ser cualquiera siempre que se pueda usar el azúcar modificado como un dador de azúcar. Ejemplos de dichas enzimas incluyen glicosiltransferasa de la ruta de Leloir, tales como galactosil-transferasa, N-acetilglucosaminiltransferasa, N-acetilgalactosaminiltransferasa, fucosiltransferasa, sialiltransferasa, manosiltransferasa, xilosiltransferasa, glucuroniltransferasa y similares.

Para síntesis enzimáticas de sacáridos que implican reacciones de glicosiltransferasa, la glicosiltransferasa se puede clonar o aislar de cualquier fuente. Se conocen muchas glicosiltransferasas clonadas, al igual que sus secuencias de polinucleótidos. Las secuencias de aminoácidos de la glicosiltransferasa y secuencias de nucleótidos que codifican las glicosiltransferasas de las cuales se pueden deducir las secuencias de aminoácidos también se encuentran en diversas bases de datos disponibles al público, que incluyen GenBank, Swiss-Prot, EMBL, y otras.

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

Las glicosiltransferasas que codifican ADN se pueden obtener por síntesis química, mediante identificación sistemática de transcritos inversos de ARNm a partir de células o de cultivos de líneas celulares apropiados, mediante identificación sistemática de bibliotecas genómicas a partir de células apropiadas, o mediante combinaciones de estos procedimientos. La identificación sistemática de ARNm o ADN genómico se puede realizar con sondas de oligonucleótidos generadas a partir de la secuencia genética de las glicosiltransferasas. Las sondas se pueden marcar con un grupo detectable tal como un grupo fluorescente, un átomo radiactivo o un grupo quimioluminiscente de acuerdo con procedimientos conocidos y usados en ensayos de hibridación convencionales. Como alternativa, las secuencias de genes de las glicosiltransferasas se pueden obtener mediante el uso del procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los cebadores de oligonucleótidos de PCR que se producen a partir de la secuencia genética de las glicosiltransferasas. (Véase, Patente de Estados Unidos N° 4.683.195 de Mullis y col. y Patente de Estados Unidos N° 4.683.202 de Mullis).

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

En una realización ejemplar, la invención usa una enzima procariótica. Dichas glicosiltransferasas incluyen enzimas implicadas en la síntesis de lipooligosacáridos (LOS), que son producidos por muchas bacterias gram negativas (Preston y col., Critical Reviews in Microbiology 23 (3): 139-180 (1996)). Dichas enzimas incluyen, pero no se limitan a, las proteínas de los operones *rfa* de especies tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, que incluyen una β 1,6 galactosiltransferasa y una β 1,3 galactosiltransferasa (véase, por ejemplo, Acceso de EMBL N° M80599 y N° M86935 (*E. coli*); Acceso de EMBL N° S56361 (*S. typhimurium*)), una glucosiltransferasa (Acceso de Swiss-Prot N° P25740 (*E. coli*)), una β 1,2-glucosiltransferasa (*rfaJ*) (Acceso de Swiss-Prot N° P27129 (*E. coli*)) y Acceso de Swiss-Prot N° P19817 (*S. typhimurium*)), y una β 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (*rfaK*) (Acceso de EMBL N° U00039 (*E. coli*)). Otras glicosiltransferasas para las que se conocen las secuencias de aminoácidos incluyen las que están codificadas por operones tales como *rfaB*, que se han caracterizado en organismos, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium leprosum*, y el operón *rhl* de *Pseudomonas aeruginosa*.

Para uso en la presente invención también son adecuadas las glicosiltransferasas que están implicadas en la

producción de estructuras que contienen lacto-N-neotetraosa, D-galactosil- β -1,4-N-acetil-D-glucosaminil- β -1,3-D-galactosil- β -1,4-D-glucosa, y la secuencia del trisacárido del grupo sanguíneo P^k, D-galactosil- α -1,4-D-galactosil- β -1,4-D-glucosa, que se han identificado en los LOS de los patógenos de la mucosa *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Scholten y col., J. Med. Microbiol. 41: 236-243 (1994)). Los genes de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* que codifican las glicosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de estas estructuras se han identificado a partir de los inmunitipos L3 y L1 de *N. meningitidis* (Jennings y col., Mol. Microbiol. 18: 729-740 (1995)) y el mutante F62 de *N. gonorrhoeae* (Gotshlich, J. Exp. Med. 180: 2181-2190 (1994)). En *N. meningitidis*, un sitio que consiste en tres genes, *lgtA*, *lgtB* e *lgtE*, codifica las enzimas glicosiltransferasa necesarias para la adición de los tres últimos de los azúcares de la cadena de lacto-N-neotetraosa (Wakarchuk y col., J. Biol. Chem. 271: 19166-73 (1996)). Recientemente se demostró la actividad enzimática del producto genético de *lgtB* e *lgtA*, lo que proporciona la primera evidencia directa de su función de glicosiltransferasa propuesta (Wakarchuk y col., J. Biol. Chem. 271(45): 28271-276 (1996)). En *N. gonorrhoeae*, hay dos genes adicionales, *lgtD* que añade β -D-GalNAc en la posición 3 de la galactosa terminal de la estructura de lacto-N-neotetraosa e *lgtC* que añade una α -D-Gal terminal al elemento de lactosa de un LOS truncado, creando de este modo la estructura de antígeno del grupo sanguíneo P^k (Gotshlich (1994), mencionado anteriormente). En *N. meningitidis*, un inmunitipo L1 separado también expresa el antígeno de grupo sanguíneo P^k y se ha demostrado que lleva a un gen *lgtC* (Jennings y col., (1995), mencionado anteriormente). Las glicosiltransferasas de *Neisseria* y los genes asociados también se describen en el documento de patente USPN 5.545.553 (Gotschlich). También se han caracterizado los genes para α 1,2-fucosiltransferasa y α 1,3-fucosiltransferasa de *Helicobacter pylori* (Martin y col., J. Biol. Chem. 272: 21349-21356 (1997)). En la presente invención también se usan las glicosiltransferasas de *Campylobacter jejuni* (véase, por ejemplo, http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf_42.html).

(a) GalNAc Transferasas

La primera etapa de la glicosilación con unión en O se puede catalizar con uno o más miembros de una gran familia de UDP-GalNAc: las N-acetilgalactosaminiltransferasas polipeptídicas (GalNAc-transferasas), que normalmente transfieren GalNAc a sitios aceptores de serina y de treonina (Hassan y col., J. Biol. Chem. 275: 38197-38205 (2000)). Hasta la fecha, se han identificado y caracterizado doce miembros de la familia de GalNAc-transferasa de mamíferos (Schwientek y col., J. Biol. Chem. 277: 22623-22638 (2002)), y se han predicho varios miembros adicionales supuestos de esta familia genética a partir del análisis de bases de datos del genoma. Las isoformas de la GalNAc-transferasa tienen diferentes propiedades cinéticas y muestran patrones de expresión diferenciales temporal y espacialmente, lo que sugiere que tienen funciones biológicas distintas (Hassan y col., J. Biol. Chem. 275: 38197-38205 (2000)). El análisis de secuencias de GalNAc-transferasas ha conducido a la hipótesis de que estas enzimas contienen dos subunidades distintas: una unidad catalítica central, y una unidad C-terminal con similitud en la secuencia con la de la lectina ricina vegetal, denominada "dominio de lectina" (Hagen y col., J. Biol. Chem. 274: 6797-6803 (1999); Hazes, Protein Eng. 10: 1353-1356 (1997); Breton y col., Curr. Opin. Struct. Biol. 9: 563-571 (1999)). Experimentos previos que implican mutagénesis específica del sitio de restos conservados seleccionados confirmaron que mutaciones en el dominio catalítico eliminaban la actividad catalítica, por el contrario, las mutaciones en el "dominio de lectina" no tenían efectos significativos en la actividad catalítica de la isoforma de GalNAc-transferasa, GalNAc-T1 (Tenno y col., J. Biol. Chem. 277(49): 47088-96 (2002)). Por lo tanto, se pensó que el "dominio de lectina" C-terminal no era funcional y no desempeñaba papeles para las funciones enzimáticas de las GalNAc-transferasas (Hagen y col., J. Biol. Chem. 274: 6797-6803 (1999)).

Las GalNAc-transferasas polipeptídicas, que no han presentado especificidades evidentes de GalNAc-glicopéptido, también parece que se modulan mediante sus dominios de lectina supuestos (documento de patente PCT WO 01/85215 A2). Recientemente, se encontró que mutaciones en el supuesto dominio de lectina de GalNAc-T1, del mismo modo que las que se han analizado anteriormente en GalNAc-T4 (Hassan y col., J. Biol. Chem. 275: 38197-38205 (2000)), modificaban la actividad de la enzima de una forma similar a GalNAc-T4. Por lo tanto, aunque la GalNAc-T1 de tipo silvestre añadía múltiples restos de GalNAc consecutivos a un sustrato de polipéptido con múltiples sitios aceptores, la GalNAc-T1 mutada no conseguía añadir más de un resto de GalNAc al mismo sustrato (Tenno y col., J. Biol. Chem. 277(49): 47088-96 (2002)). Más recientemente, se han determinado estructuras de GalNAc-T1 de murino cristalinas de rayos X (Fritz y col., PNAS 2004, 101(43): 15307-15312) así como GalNAc-T2 humana (Fritz y col., J. Biol. Chem. 2006, 281(13):8613-8619). La estructura de GalNAc-T2 humana reveló una flexibilidad inesperada entre los dominios catalítico y de lectina y sugirió un nuevo mecanismo usado por GalNAc-T2 para capturar sustratos glicosilados. El análisis cinético de GalNAc-T2 que carece del dominio de lectina confirmó la importancia de este dominio en la actuación en sustratos glicopeptídicos. Sin embargo, la actividad de las enzimas con respecto a sustratos no glicosilados no se ve afectada de forma significativa por la retirada del dominio de lectina. Por lo tanto, las enzimas de GalNAc-T2 truncadas humanas que carecen del dominio de lectina o esas enzimas que tienen un dominio de lectina truncado pueden ser útiles para la glicosilación de sustratos polipeptídicos cuando no se desea la glicosilación adicional del polipéptido monoglicosilado resultante.

La evidencia reciente demuestra que algunas GalNAc-transferasas presentan actividades únicas con glicopéptidos parcialmente GalNAc-glicosilados. Las acciones catalíticas es de al menos tres isoformas de GalNAc-transferasa, GalNAc-T4, -T7, y -T10, actúan selectivamente en los glicopéptidos que corresponden a dominios de repetición en tándem de mucina en los que solamente las secuencias de glicosilación potencial agrupadas se han glicosilado con GalNAc con otras GalNAc-transferasas (Bennett y col., FEBS Letters 460: 226-230 (1999); Ten Hagen y col., J. Biol. Chem. 276: 17395-17404 (2001); Bennett y col., J. Biol. Chem. 273: 30472-30481 (1998); Ten Hagen y col., J. Biol.

Chem. 274: 27867-27874 (1999)). GalNAc-T4 y -T7 reconocen diferentes polipéptidos glicosilados con GalNAc y catalizan la transferencia de GalNAc a sitios de sustrato aceptor además de los que se han usado anteriormente. Se predice que una de las funciones de dichas actividades de GalNAc-transferasa representa una etapa de control de la densidad de ocupación de O-glicano en glicoproteínas con alta densidad de glicosilación con unión en O.

Un ejemplo de esto es la glicosilación de la morfina asociada a cáncer MUC1. La MUC1 contiene una región glicosiladas con unión en O de repetición en tándem de 20 restos (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA) con sin consecuencias de glicosilación con unión en O potenciales. GalNAc-T1, -T2, y -T3 pueden iniciar la glicosilación de la repetición en tándem de MUC1 y se pueden incorporar solamente en tres sitios (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, se subrayan los sitios de unión a GalNAc). La GalNAc-T4 es única en que es la única isoforma de GalNAc-transferasa identificada hasta el momento que puede completar la unión de glicano con unión en O a los cinco sitios aceptores en la secuencia de repetición en tándem de 20 aminoácidos en la mucina asociada con el cáncer de mama. MUC1, GalNAc-T4 transfiere GalNAc a al menos dos sitios no usados por otras isoformas de GalNAc-transferasa en el glipopéptido GalNAc-TAP24 (TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP, los sitios de unión a GalNAc-T4 únicos están en negrita) (Bennett y col., J. Biol. Chem. 273: 30472-30481 (1998). Parece que una actividad tal como la que presenta GalNAc-T4 es necesaria para la producción de la glicofoma de MUC1 expresada por células cancerígenas cuando todos los sitios potenciales están glicosilados (Muller y col., J. Biol. Chem. 274: 18165-18172 (1999)). La MUC1 normal de glándulas mamarias de lactante tiene aproximadamente 2,6 glicanos con unión en O por repetición (Muller y col., J. Biol. Chem. 272: 24780-24793 (1997) y la MUC1 derivada de la línea celular de cáncer T47D tiene 4,8 glicanos con unión en O por repetición (Muller y col., J. Biol. Chem. 274: 18165-18172 (1999)). La forma de MUC1 asociada al cáncer está asociada por lo tanto con mayor densidad de ocupación de glicano con unión en O y esto se consigue mediante una actividad de GalNAc-transferasa idéntica o similar a la de GalNAc-T4. Se describe otra enzima, GalNAc-T11, por ejemplo, en T. Schwientek y col., J. Biol. Chem. 2002, 277 (25): 22623-22638.

La producción de proteínas tales como la enzima GalNAc T_{1-xx} a partir de genes clonados por ingeniería genética es bien conocida. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.761.371. Un procedimiento implica la recogida de muestras suficientes, a continuación la secuencia de aminoácidos de la enzima se determina mediante secuenciación N-terminal. A continuación, esta información se usa para aislar un clon de ADNc que codifica una transferasa de longitud completa (unida a membrana) que después de la expresión en la línea celular Sf9 de insecto dio como resultado la síntesis de una enzima totalmente activa. La especificidad aceptora de la enzima se determina a continuación usando un análisis semicuantitativo de los aminoácidos que rodean las secuencias de glicosilación conocidas en 16 proteínas diferentes, seguido de estudios de glicosilación *in vitro* de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que determinados restos de aminoácidos están sobrerrepresentados en segmentos de péptidos glicosilados y que los restos en posiciones específicas que rodean restos glicosilados de serina y treonina pueden tener una influencia más notable en la eficacia aceptora que otros restos de aminoácidos.

Dado que se ha demostrado que se pueden usar mutaciones de GalNAc transferasas para producir patrones de glicosilación que son distintos de los producidos por las enzimas de tipo silvestre, está dentro del ámbito de la presente invención usar una o más GalNAc transferasas mutantes o truncadas en la preparación de los polipéptidos glicosilados con unión en O de la invención. Los dominios catalíticos y los mutantes de truncamiento de proteínas GalNAc-T2 se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 60/576.530 presentada el 3 de junio de 2004; y en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 60/598584, presenta la 3 de agosto de 2004; y ambas se incorporan en el presente documento por referencia para todos los fines. Además, los dominios catalíticos se pueden identificar por alineamiento con glicosiltransferasas conocidas. Las enzimas GalNAc-T2 truncadas, tales como GalNAc-T2 humana ($\Delta 51$). GalNAc-T2 humana ($\Delta 51 \Delta 445$) y procedimientos para obtener esas enzimas también se describen en el documento de patente WO 06/102652 (documento de patente PCT/US06/011065, presentado el 24 de marzo de 2006) y documento de patente PCT/US05/00302, presentado el 6 de enero de 2005, que se incorporan en el presente documento por referencia para todos los fines. Las secuencias de GalNAc-T 1, GalNAc-T2, GalNAc-T3 y GalNAc-T11 ejemplares se resumen en la Tabla 13, dada a continuación.

Tabla 13: Secuencias de GalNAc-T1, GalNAc-T2, GalNAc-T3 y GalNAc-T11 a Modo de Ejemplo

1. UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 Humana (GalNAc-T2)

MRRRSRMLLCFAFLWVLGIAYYMYSGGGSALAGGAGGGAGRKEDWNEIDPIKKKDLHHSNGEEKAQ
SMETLPPGKVRWPDFNQEAYVGGTMVRSGQDPYARNKFNQVESDKLRMDRAIPDTRHDQCQRKQW
RVDLPATSVVITFHNEARSALLRTVVSVLKKSPPHLIKEIILVDDYSNDPEDGALLGKIEKVRVLRNDRR
EGLMRSRVRGADAAQAKVLTFLDSECEHNEHWLEPLLVAEDRTRVVSPIIDVINMDNFQYVVGASA
DLKGGFDWNLVFKWDYMTPEQRRSRQGNPVAPIKTPMIAAGGLFVMDKIFYFEELGKYDMMMDVWGG
ENLEISFRVWQCGGSLEIIPCSRVRGHVFRKQHPYTFPGGSGTVFARNTRRAAEVWMDEYKNFYAAVP
SARNVPYGNISRLRLRKLKLSCKPFWYLENVYPELRVDPHQDIAFGALQQGTNCLDTLGHFADGVVG
VYECHNAGGNQEWALTKEKSVKHMDLCLTVVDRAPGSLIKLQGCRENDSRQKWEQIEGNSKLRHVG
SNLCLDSRTAKSGGLSVEVCGPALSQQWKFTLNQQ

(Continuación)

2. *UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 humana truncada (GalNAc-T2 Δ51)*

KKKDLHHSNGEEKAQSMETLPPGKVRWPDFNQEAYVGGTMVRSGQDPYARNKFNQVESDKLRMDR
AIPDTRHDQCQRKQWRVDLPATSVVITFHNEARSALLRTVVSVLKKSPPHLIKEIILVDDYSNDPEDGAL
LGKIEKVRVLRNDRREGLMRSRVRGADAAQAKVLTFLDSHCECNEHWLEPLLERSVAEDRTRVVSPIID
VINMDNFQYVGASADLKGGFDWNLVFKWDYMTPEQRRSRQGNPVAPIKTPMIAGGLFVMDKIFYFEE
LGKYDMMMDVWGGENLEISFRVWQCGGSLEIIPCSRVRGHVFRKQHPYTFPGGSGTVFARNTRRAAEV
WMDEYKNFYAAVPSARNVPYGNISRLRLRKLKLSCKPFKWYLENVYPELRVPDHDQDIAFGALQQGT
NCLDTLGHFADGVVGVYECHNAGGNQEWALTKEKSVKHMDLCLTVVDRAPGSLIKLQGCRENDSRQ
KWEQIEGNSKLRHVGSNLCLDSRTAKSGGLSVEVCGPALSQQWKFTLNLQQ

3. *UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 humana truncada (GalNAc-T2 Δ1-51 Δ445-571)*

KKKDLHHSNGEEKAQSMETLPPGKVRWPDFNQEAYVGGTMVRSGQDPYARNKFNQVESDKLRMDR
AIPDTRHDQCQRKQWRVDLPATSVVITFHNEARSALLRTVVSVLKKSPPHLIKEIILVDDYSNDPEDGAL
LGKIEKVRVLRNDRREGLMRSRVRGADAAQAKVLTFLDSHCECNEHWLEPLLERSVAEDRTRVVSPIID
VINMDNFQYVGASADLKGGFDWNLVFKWDYMTPEQRRSRQGNPVAPIKTPMIAGGLFVMDKIFYFEE
LGKYDMMMDVWGGENLEISFRVWQCGGSLEIIPCSRVRGHVFRKQHPYTFPGGSGTVFARNTRRAAEV
WMDEYKNFYAAVPSARNVPYGNISRLRLRKLKLSCKPFKWYLENVYPELRVPDHDQD

4. *UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 humana truncada (GalNAc-T2 Δ51) (forma alternativa)*

MSKKKDLHHSNGEEKAQSMETLPPGKVRWPDFNQEAYVGGTMVRSGQDPYARNKFNQVESDKLRM
DRAIPDTRHDQCQRKQWRVDLPATSVVITFHNEARSALLRTVVSVLKKSPPHLIKEIILVDDYSNDPED
GALLGKIEKVRVLRNDRREGLMRSRVRGADAAQAKVLTFLDSHCECNEHWLEPLLERSVAEDRTRVVS
PIIDVINMDNFQYVGASADLKGGFDWNLVFKWDYMTPEQRRSRQGNPVAPIKTPMIAGGLFVMDKIFY
FEELGKYDMMMDVWGGENLEISFRVWQCGGSLEIIPCSRVRGHVFRKQHPYTFPGGSGTVFARNTRRA
AEVWMDEYKNFYAAVPSARNVPYGNISRLRLRKLKLSCKPFKWYLENVYPELRVPDHDQDIAFGALQ
QGTNCLDTLGHFADGVVGVYECHNAGGNQEWALTKEKSVKHMDLCLTVVDRAPGSLIKLQGCREND
SRQKWEQIEGNSKLRHVGSNLCLDSRTAKSGGLSVEVCGPALSQQWKFTLNLQQ

5. *UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 humana truncada (GalNAc-T2 Δ1-51 Δ445-571) forma alternativa*

MSKKKDLHHSNGEEKAQSMETLPPGKVRWPDFNQEAYVGGTMVRSGQDPYARNKFNQVESDKLRM
DRAIPDTRHDQCQRKQWRVDLPATSVVITFHNEARSALLRTVVSVLKKSPPHLIKEIILVDDYSNDPED
GALLGKIEKVRVLRNDRREGLMRSRVRGADAAQAKVLTFLDSHCECNEHWLEPLLERSVAEDRTRVVS
PIIDVINMDNFQYVGASADLKGGFDWNLVFKWDYMTPEQRRSRQGNPVAPIKTPMIAGGLFVMDKIFY
FEELGKYDMMMDVWGGENLEISFRVWQCGGSLEIIPCSRVRGHVFRKQHPYTFPGGSGTVFARNTRRA
AEVWMDEYKNFYAAVPSARNVPYGNISRLRLRKLKLSCKPFKWYLENVYPELRVPDHDQD

6. *UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 humana truncada (GalNAc-T2 Δ53)*

KDLHHSNGEEKAQSMETLPPGKVRWPDFNQEAYVGGTMVRSGQDPYARNKFNQVESDKLRMDRAIP
DTRHDQCQRKQWRVDLPATSVVITFHNEARSALLRTVVSVLKKSPPHLIKEIILVDDYSNDPEDGALLG
KIEKVRVLRNDRREGLMRSRVRGADAAQAKVLTFLDSHCECNEHWLEPLLERSVAEDRTRVVSPIIDVI
NMDNFQYVGASADLKGGFDWNLVFKWDYMTPEQRRSRQGNPVAPIKTPMIAGGLFVMDKIFYFEELG
KYDMMMDVWGGENLEISFRVWQCGGSLEIIPCSRVRGHVFRKQHPYTFPGGSGTVFARNTRRAAEVW

MDEYKNFYAAVPSARNVPYGNISRLRLRKKLSCKPFKWYLENVYPELRVPDHQDIAFGALQQGTN
CLDTLGHFADGVVGVYECHNAGGNQEWALTKEKSVKHMDLCLTVVDRAPGSLIKLQGCRENDSRQK
WEQIEGNSKLRHVGSNLCLDSRTAKSGGLSVEVCGPALSQQWKFTLNLQQ

(Continuación)

7. *UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 humana truncada (GalNAc-T2 Δ1-53 Δ445-571)*

KDLHHSNGEKAQSMETLPPGKVRWPDFNQEAYVGGTMVRSGQDPYARNKFNQVESDKLRMDRAIP
DTRHDQCQRKQWRVLDLPATSVVITFHNEARSALLRTTVSVLKKSPPHLIKEIILVDDYSNDPEDGALLG
KIEKVRVLRNDRREGLMRSRVRGADAAQAKVLTFLDSHCECNEHWLEPLLERVAEDRTRVVSPIIDVI
NMDNFQYVGASADLKGGFDWNLVFKWDYMTPEQRRSRQGNPVAPIKTPMIAGGLFVMDKIFYFEELG
KYDMMMDVWGGENLEISFRVWQCGGSLEIIPCSRVGHVFRKQHPYTFPGGSGTVFARNTRRAAEVW
MDEYKNFYAAVPSARNVPYGNISRLRLRKKLSCKPFKWYLENVYPELRVPDHQD

8. *UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 humana truncada (GalNAc-T2 Δ53) forma alternativa*

MSKDLHHSNGEKAQSMETLPPGKVRWPDFNQEAYVGGTMVRSGQDPYARNKFNQVESDKLRMDR
AIPDTRHDQCQRKQWRVLDLPATSVVITFHNEARSALLRTTVSVLKKSPPHLIKEIILVDDYSNDPEDGAL
LGKIEKVRVLRNDRREGLMRSRVRGADAAQAKVLTFLDSHCECNEHWLEPLLERVAEDRTRVVSPIID
VINMDNFQYVGASADLKGGFDWNLVFKWDYMTPEQRRSRQGNPVAPIKTPMIAGGLFVMDKIFYFEE
LGKYDMMMDVWGGENLEISFRVWQCGGSLEIIPCSRVGHVFRKQHPYTFPGGSGTVFARNTRRAAEV
WMDEYKNFYAAVPSARNVPYGNISRLRLRKKLSCKPFKWYLENVYPELRVPDHQDIAFGALQQGT
NCLDTLGHFADGVVGVYECHNAGGNQEWALTKEKSVKHMDLCLTVVDRAPGSLIKLQGCRENDSRQ
KWEQIEGNSKLRHVGSNLCLDSRTAKSGGLSVEVCGPALSQQWKFTLNLQQ

9. *UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 humana truncada (GalNAc-T2 Δ1-53 Δ445-571) forma alternativa*

MSKDLHHSNGEKAQSMETLPPGKVRWPDFNQEAYVGGTMVRSGQDPYARNKFNQVESDKLRMDR
AIPDTRHDQCQRKQWRVLDLPATSVVITFHNEARSALLRTTVSVLKKSPPHLIKEIILVDDYSNDPEDGAL
LGKIEKVRVLRNDRREGLMRSRVRGADAAQAKVLTFLDSHCECNEHWLEPLLERVAEDRTRVVSPIID
VINMDNFQYVGASADLKGGFDWNLVFKWDYMTPEQRRSRQGNPVAPIKTPMIAGGLFVMDKIFYFEE
LGKYDMMMDVWGGENLEISFRVWQCGGSLEIIPCSRVGHVFRKQHPYTFPGGSGTVFARNTRRAAEV
WMDEYKNFYAAVPSARNVPYGNISRLRLRKKLSCKPFKWYLENVYPELRVPDHQD

10. *UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 1 humana truncada (GalNAc-T1 Δ40)*

GLPAGDVLEPVQKPHEGPGEMGKPVVIPKEDQEKMKEMFKINQFNLMASEMIALNRSPLDVRLEGCKT
KVYPDNLPPTSVVIVFHNEAWSTLLRTVHVSINRSRPHMIEEIVLVDDASERDFLRPLESYVKKLKV
VHVIRMEQRSGILIRARLKGAASVKGQVITFLDAHCECTVGWLEPLLARIKHDRRTVVCPIIDVISDDTFE
YMAGSDMTYGGFNWKLNFRWYPVPQREMDRRKGDRTLPVRTPTMAGGLFSIDRDYFQEIGTYDAGM
DIWGGENLEISFRIWQCGGTLEIVTCSHVGHVFRKATPYTFPGGTGQIINKNNRRLAEVWMDEFKNFFY
IISPGVTKVDYGDISSRVGLRHLKQCKPFSWYLENIYPDSQIPRHYFSLGEIRNVETNQCLDNMARKENE
KVGIFNCHGMGGNQVFSYTANKEIRTDDLCLDVSKLNGPVTMLKCHHLKGNQLWEYDPVKLTQLHV
NSNQCLDKATEEDSQVPSIRDCNGSRSQQWLLRNVTLPFIF

(Continuación)

11. UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 1 humana truncada (GalNAc-T1 $\Delta 40$) forma alternativa

MGLPAGDVLPEPVQKPHEGPGEMGKPVVIPKEDQEKMKEMFKINQFNLMASEMIALNRSPLDVRLEGCKTKVYPDNLPPTTSVVIVFHNEAWSTLLRTVHSVINSRPHMIEEIVLVDDASERDFLKRPLESYVKKLKVPHVIRMEQRSGLRARLKGAAVSKGQVITFLDAHCECTVGWLEPLLARIKHDRRTVVCPIDVISDDTFEYMAGSMDMTYGGFNWKLNFRWYPVPQREMDRRKGDRTLVPVRTPTMAGGLFSIDRDYFQEIGTYDAGMDIWGGENLEISFRIWQCGGTLEIVTCSHVGHVFRKATPYTFPGGTGQIINKNNRRLAEVWMDEFKNFFYIISPGVTKVVDYGDISSRVGLRHKLQCKPFSWYLENIYPSQIPRHYFSLGEIRNVETNQCLDNMARKENEKVGIFNCHGMGGNQVFSYTANKEIRTDDLCLDVSKLNGPVTMLKCHHLKGNQLWEYDPVKLTLQHVNSNQCLDKATEEDSQVPSIRDCNGSRSQQWLLRNVTLP EIF

12. UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 humana (GalNAc-T3)

MAHLKRLVKLHIKRHYHKKFWKLGAIVFFIIVLVLMQREVSQYSKEESRMERNMKNKNKMLDLMLEAVNNIKDAMPKMQIGAPVRQNI DAGERPCLQGYTAAELKPVLD RPPQDSNAPGASGKAFKTTNLSVEEQKEKERGEAKHCFNAFASDRISLHRDLGPDTRPPECIEQKFKRCPLPTTSVIIVFHNEAWSTLLRTVHSVLYSSPAILLKEIILVDDASVDEYLHDKLDEYVKQFSIVKIVRQERKGLITARLLGATVATAETLTFLDAHCECFYGWLEPLLARIAENYTA VVSPDIASIDLNTFEFNKPSPYGSNHN RGNFDWSLSFGWESLPDHEKQRRKDETYPIKTPTFAGGLFSISKEYFEYIGSYDEEMEIWGGENIEMSFRVWQCGGQLEIMPCSVVGHVFRSKSPHSFPKGTQVIARNQVRLAEVWMDEYKEIFYRRNTDAKIVKQKAFGDLSKRFEIKHRLRCKNFTWYLNNIYPEVYVPDLNPVISGYIKSVGQPLCLDVGENNQGGKPLIMYTCHGLGGNQYFEYSAQHEIRHNIQKELCLHAAQGLVQLKACTYKGHKTVVTGEQIWEIQDQLLYNPFLKMCL SANGEHPSLVSCNPSDPLQKWILSQND

13. UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 de *Drosophila* (GalNAc-T3)

MGLRFQQLKKLWLLYLFLFFAFFMFAISINLYVASIQGGDAEMRHPKPPPKRRSLWPHKNIVAHYIGKGDIFGNMTADDYNINLFQPINGEGADGRPVVPPRDRFRMQRFFRLNSFNLLASDRIPNLRTLKDYRTP ECRDKKYASGLPSTSVIIVFHNEAWSVLLRTTTSVINRSRPHLLKEIILVDDASDRSYLKRQLESYVKVLA VPTRIFRMKKRSGLV PARLLGAENARGDVL TFLDAHCECSR GWLEPLLSRIKESRKVVICPVIDIISDDNFSYTKTFENHWGAFNWQLSFRWFSSDRKRQTAGNSSKDSTDPIATPGMAGGLFAIDRKYFYEMGSYDSNMRVWGGENVEMSFRIWQCGGRVEISPCSHVGHVFRSSTPYTFPGGMSEVLTDNLARAATVWMDDWQYFIMLYTSGTLGAKDKVNVTERVALRERLQCKPFSWYLENIWPEHFFPAPDRFFGKIWL DGETECAQAYSKHMKNLPGRALSREWKR AFEIDS KAEELMALIDLERDKCLRPLKEDVPRSSLSAVTVGDCTSHAQSMDFVITPKGQIMTNDNVCLTYRQQLGVKMLKNRNATTSNVMLAQCASDSSQLWTYDMDTQ QISHRDTKLCLTLKAATNSRLQKVEKVVLMECDFKDITQKWGFIPLPWRM

(Continuación)

14. UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 de Ratón (GalNAc-T3)

MAHLKRLVKLHIKRHYHRKFWKLGAVIFFFLVVLILMQREVSVQYSKEESKMERNLKNKNKMLDFML
EAVNNIKDAMPKMQIGAPIKENIDVRERPCLOGYTAAELKPVFDRPPQDSNAPGASGKPFKITHLSPE
EQKEKERGETKHCFAFASDRISLHRDLGPDTRPPECIEQKFRCPPPTTSVIIIVFHNEAWSTLLRTVHS
VLYSSPAILLKEIILVDDASVDDYLHEKLEEIYKQFSIVKIVRQQRKGLITARLLGA AVATAETLTFLDA
HCECFYGWLEPLLARIAENYTA VVSPDIASIDLNTFEFNKPSPYGNNHNRGNFDWSLSFGWESLPDHEK
QRRKDETYPIKTPTFAGGLFSISKKYFEHIGSYDEEMEIWGGENIEMSFVRVWQCGGQLEIMPCSVVGHV
FRSKSPHTFPKGTQVIARNQVRLAEVWMDEYKEIFYRRNTDAAKIVKQKSFGDLSCRFEIKRLQCKNF
TWYLNNTIYPEAYVPDLNPVISGYIKSVGQPLCLDVGENNQGGKPLILYTCHGLGGNQYFEYSAQREIRH
NIQKELCLHATQGVVQLKACVYKGHRTIAPGEQIWEIRKDQLLYNPLFKMCLSSNGEHPNLVPCDATD
LLQKWIFSQND

15. UDP-N-acetilgalactosaminiltransferasa 11 humana (GalNAc-T11)

MGSVTVRYFCYGCFLTSATWTVLLFVYFNSEVTQPLKNVPVKGSGPHGSPKKFYPRFTRGPSRVLEP
QFKANKIDDVIDSRVEDPEEGHLKFSSSELGMIFNERDQELRDLGYQKHAFNMLISDRLGYHRDVPDTR
NAACKEKFYPPDLPAASVVICFYNEAFSALLRTVHSVIDRTPAHLLEIILVDDSDFDLKGELDEYVQ
KYLPGKIKVIRNTKREGLIRGRMIGAAHATGEVLVFLDSHCEVNVMWLQPLLAIREDRHTVVCVIDI
ISADTLAYSSSPVVRGGFNWGLHFKWDLVPLSELGRAEGATAPIKSPTMAGGLFAMNRQYFHELQGY
DSGMDIWGGENLEISFRIWMCGGKLFIPCSRVGHIKRRPYGSPEGQDTMTHNSRLAHVWLDEYKE
QYFSLRPDLKTKSYGNISERVELRKKLGCKSFKWYLDNVYPQMISGSHAKPQQPIFVNRGPKRPKVLQ
RGRLYHLQTNKCLVAQGRPSQKGGVLVVKACDYSDPNQIWIYNEEHVLSLLCLDMSETRSSDPPR
LMKCHGSGGSQQWTFGKNNRLYQVSVGQCLRAVDPLGQKGSVAMAICDGSSSQQWHLEG

(b) Fucosiltransferasas

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

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

(c) Galactosiltransferasas

En otro grupo de realizaciones, la glicosiltransferasa es una galactosiltransferasa. Las galactosiltransferasas ejemplares incluyen α (1,3) galactosiltransferasas (E.C. N° 2.4.1.151, véase, por ejemplo, Dabkowski y col., Transplant Proc. 25: 2921 (1993) e Yamamoto y col. Nature 345: 229-233 (1990)), bovina (GenBankJ04989, Joizasse y col., J. Biol. Chem. 264: 14290-14297 (1989)), murina (GenBank m26925; Larsen y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86: 8227-8231 (1989)), porcina (GenBank L36152; Strahan y col., Immunogenetics 41: 101-105 (1995)). Otra α 1,3 galactosiltransferasa adecuada es la que está implicada en la síntesis del antígeno del grupo sanguíneo B (E.C. N° 2.4.1.37, Yamamoto y col., J. Biol. Chem. 265: 1146-1151 (1990) (human)). En la práctica de la invención también son

adecuadas las formas solubles de la $\alpha 1,3$ -galactosiltransferasa tal como la informada en Cho, S.K. y Cummings, R.D. (1997) J. Biol. Chem., 272, 13622-13628.

En otra realización, la galactosiltransferasa es una $\beta(1,3)$ -galactosiltransferasa, tal como Core-1-GalT1. Se ha descrito la Core-1- $\beta 1,3$ -galactosiltransferasa humana (véase, por ejemplo, Ju y col., J. Biol. Chem. 2002, 277 (1): 178-186). Enzimas de *Drosophila melanogaster* se describen en Correia y col., PNAS 2003, 100 (11): 6404-6409 y en Muller y col., FEBS J. 2005, 272 (17): 4295-4305. Core-1- $\beta 3$ galactosiltransferasas adicionales, incluyendo versiones truncadas de las mismas, se divulgan en el documento de patente WO/0144478 y en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/842.926 presentada al 6 de septiembre de 2006. En una realización ejemplar, la $\beta(1,3)$ -galactosiltransferasa es un miembro seleccionado entre enzimas que se describen en PubMed con el Número de Acceso AAF52724 (transcripto de CG9520-PC) y versiones modificadas de la misma, tal como las variaciones, que se optimizan con codones para la expresión en bacterias. La secuencia de una enzima ejemplar, soluble Core-1-GalT1 (Core-1-GalT1 A31) se muestra a continuación:

Secuencia de core-1-GalT1 A31

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

(d) Sialiltransferasas

Las sialiltransferasas son otro tipo de glicosiltransferasas que son útiles en las células recombinantes y mezclas de reacción de la invención. Las células que producen sialiltransferasas recombinantes también producirán CMP-ácido siálico, que es un dador de ácido siálico para sialiltransferasas. Los ejemplos de sialiltransferasas que son adecuadas para uso en la presente invención incluyen ST3Gal III (por ejemplo, ST3Gal III de rata o humano), ST3Gal IV, ST3Gal I, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II, y ST6GalNAc III (la nomenclatura de la sialiltransferasa usada en el presente documento es tal como se describe en Tsuji y col., Glycobiology 6: v-xiv (1996)). Una $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa ejemplar denominada $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico a la Gal no reductora terminal de un disacárido o glicósido Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ Glc. Véase, Van den Eijnden y col., J. Biol. Chem. 256: 3159 (1981), Weinstein y col., J. Biol. Chem. 257: 13845 (1982) and Wen y col., J. Biol. Chem. 267: 21011 (1992). Otra $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa (EC 2.4.99.4) ejemplar transfiere ácido siálico a la

GFCLAELFVYSTPERSEFMPYDGHHRGVDNDAHSHDMMEMSGPEQDVGGHEHVHENSTIAERLYSE
VRVLCWIMTNPSNHQKKARHVKRTWGKRCNKLIFMSSAKDDELDAVALPVGEGRNNLWGKTKEAY
KYIYEHHINDADWFLKADDDTYTIVENMRYMLYPYSPETPVYFGCKFKPYVKQGYMSGGAGYVLSRE
AVRRFVVEALPNPKLCKSDNSGAEDVEIGKCLQNVNVLGDSRDSNGRGRFFPFVPEHHLIPSHTDKKF
WYWQYIFYKTDEGLDCCSDNAISFHYVSPNQMYVLDYLIYHLRPYGIINTPDALPNKLAVGELMPEIKE
QATESTSDGVSKRSAETKTQ

Gal no reductora terminal del disacárido o glicósido. Véase, Rearick y col., J. Biol. Chem. 254: 4444 (1979) y Gillespie y col., J. Biol. Chem. 267: 21004 (1992). Enzimas adicionales ejemplares incluyen Gal- $\beta 1,4$ -GlcNAc $\alpha 2,6$ sialiltransferasa (Véase, Kurosawa y col. Eur. J. Biochem. 219: 375-381 (1994)).

Preferentemente, para la glicosilación de hidratos de carbono de glicopéptidos, la sialiltransferasa podrá transferir ácido siálico a la secuencia de Gal $\beta 1,4$ GlcNAc-, la penúltima secuencia más común que subyace al ácido siálico terminal en las estructuras de hidratos de carbono totalmente sialiladas (véase, la Tabla 2, dada a continuación).

Tabla 14: Sialiltransferasas que usan la secuencia de Gal $\beta 1,4$ GlcNAc como un sustrato aceptor

Sialiltransferasa	Fuente	Secuencia(s) formadas	Ref.
ST6Gal I	Mamífero	NeuAca $\alpha 2,6$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc-	1
ST3Gal III	Mamífero	NeuAca $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc- NeuAca $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,3$ GlcNAc-	1
ST3Gal IV	Mamífero	NeuAca $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc- NeuAca $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,3$ GlcNAc-	1
ST6Gal II	Mamífero	NeuAca $\alpha 2,6$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc	

(continuación)

Sialiltransferasa	Fuente	Secuencia(s) formadas	Ref.
ST6Gal II	fotobacteria	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitides</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	3
1) Goochee y col., Bio/Technology 9: 1347-1355 (1991) 2) Yamamoto y col., J. Biochem. 120: 104-110 (1996) 3) Gilbert y col., J. Biol. Chem. 271: 28271-28276 (1996)			

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

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

Las sialiltransferasas diferentes de las que se enumeran en la Tabla 2, también son útiles en un procedimiento a gran escala económico y eficaz para la sialilación de glicopéptidos comercialmente importantes. Como un ensayo sencillo para encontrar la utilidad de estas otras enzimas, diversas cantidades de cada enzima (1-100 mU/mg de proteína) se hacen reaccionar con asialo- α ₁ AGP (a 1-10 mg/ml) para comparar la capacidad de la sialiltransferasa de interés para sialilar glicopéptidos con respecto a cualquiera de las ST6Gal I, ST3Gal III bovinas o ambas sialiltransferasas. Como alternativa, otros glicopéptidos o glucopéptidos, u oligosacáridos unidos con unión en N liberados enzimáticamente de la cadena principal polipeptídica se pueden usar en lugar de asialo- α ₁ AGP para esta evaluación. Las sialiltransferasas con la capacidad de sialilar los oligosacáridos con unión en N de glicopéptidos de forma más eficaz que ST6Gal I son útiles en un procedimiento práctico a gran escala para la sialilación del péptido (tal como se ilustra para ST3Gal III en la presente divulgación). Otras sialiltransferasas ejemplares se muestran en la Figura 10.

Proteínas de Fusión

En otras realizaciones ejemplares, los procedimientos de la invención usan proteínas de fusión que tienen más de una actividad enzimática que está implicada en la síntesis de un conjugado de glicopéptido deseado. Los polipéptidos de fusión pueden estar formados, por ejemplo, por un dominio catalíticamente activo de una glicosiltransferasa que está unido a un dominio catalíticamente activo de una enzima auxiliar. El dominio catalítico de la enzima auxiliar, por ejemplo, puede catalizar una etapa en la formación de un azúcar de nucleótidos que es un dador para la glicosiltransferasa, o catalizar una reacción implicada en un ciclo de glicosiltransferasa. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica una glicosiltransferasa se pueden unir, en marco, a un polinucleótido que codifica una enzima implicada en la síntesis de azúcar de nucleótidos. A continuación, la proteína de fusión resultante puede catalizar no solo la síntesis del azúcar de nucleótido, sino también la transferencia del resto de azúcar a la molécula aceptora. La proteína de fusión puede ser dos o más enzimas del ciclo unidas en una secuencia de nucleótidos expresable. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye los dominios catalíticamente activos de dos o más glicosiltransferasas. Véase, por ejemplo, 5.641.668. Los glicopéptidos modificados de la presente invención se pueden diseñar y preparar fácilmente usando diversas proteínas de fusión adecuadas (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de PCT PCT/CA98/01180, que se publicó como documento de patente WO 99/31224 el 24 de junio de 1999).

Enzimas Inmovilizadas

Además de enzimas unidas a células, la presente invención también proporciona el uso de enzimas que están inmovilizadas sobre un soporte sólido y/o soluble. En una realización ejemplar, se proporciona una glicosiltransferasa que está conjugada con un PEG a través de un engarce de glicosilo intacto de acuerdo con los procedimientos de la invención. El conjugado de PEG-engarce-enzima está unido opcionalmente a un soporte sólido. El uso de enzimas soportadas en soporte sólido en los procedimientos de la invención simplifica el tratamiento de la mezcla de reacción y la purificación del producto de reacción, y también permite la recuperación fácil de la enzima. El conjugado de glicosiltransferasa se usa en los procedimientos de la invención. Otras combinaciones de enzimas y soportes serán evidentes para los expertos en la materia.

Purificación de Conjugados de Polipéptidos

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

Si la glicoproteína modificada se produce intracelularmente, como una primera etapa, los desechos de partículas, incluyendo células y desechos de células, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Opcionalmente, la proteína se puede concentrar con un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, seguido de separación de la variante de polipéptido de otras impurezas mediante una o más etapas de cromatografía, tales como cromatografía de inmunoafinidad, (por ejemplo, en dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía de hidróxido apatito y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Las fases estacionarias ejemplares incluyen Azul-Sefarosa, CM Azul-Sefarosa, MONO-Q, MONO-S, lentil lectina-Sefarosa, WGA-Sefarosa, Con A-Sefarosa, Éter Toyopearl, Butil Toyopearl, Fenil Toyopearl, SP-Sefarosa, o proteína A Sefarosa.

Otras técnicas cromatográficas incluyen cromatografía SDS-PAGE, cromatografía sobre sílice, cromatografía de fase inversa (por ejemplo, gel de sílice con grupos alifáticos anexos), filtración sobre gel usando, por ejemplo, tamiz molecular Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía sobre columnas que unen selectivamente el polipéptido, y precipitación con etanol o con sulfato de amonio.

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

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

Dentro de otra realización, los sobrenadantes de los sistemas que producen el glicopéptido modificado de la invención se concentran primero empleando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender un ligando para el polipéptido, una lectina o molécula de anticuerpo unido a un soporte adecuado. Como alternativa, se puede usar una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos DEAE colgantes. Las matrices adecuadas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa, u otros tipos usados habitualmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, se puede usar una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Los grupos sulfopropilo son particularmente preferentes.

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

El glicopéptido modificado de la invención que resulta de una fermentación a gran escala se puede purificar mediante procedimientos análogos a los que se describen en Urdal y *col.*, J. Chromatog. 296: 171 (1984). Esta referencia describe dos etapas de RP-HPLC, secuenciales para la purificación de IL-2 recombinante humana en una columna de HPLC preparativa. Como alternativa, se pueden usar técnicas tales como cromatografía de afinidad para purificar la glicoproteína modificada.

Adquisición de Secuencias de Codificación de Polipéptidos

Tecnología Recombinante General

La creación de polipéptidos mutantes, que incorporan una secuencia de glicosilación con unión en O de la invención se puede lograr alterando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido precursor correspondiente, por mutación o por síntesis química completa del polipéptido. La secuencia de aminoácidos del polipéptido se altera preferentemente a través de cambios a nivel del ADN, particularmente mediante la mutación de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido en bases seleccionadas previamente para generar codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La mutación o mutaciones del ADN se realizan preferentemente procedimientos conocidos en la técnica.

La presente invención se basa en técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Textos básicos que divulgan los procedimientos generales de uso en la presente invención incluyen Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y Ausubel y *col.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (1994).

Los tamaños del ácido nucleico se dan en kilobases (kb) o pares de bases (pb). Estas son las estimaciones derivadas electroforesis en gel de agarosa o de acrilamida, a partir de ácidos nucleicos secuenciados, o a partir de secuencias de ADN publicadas. Para las proteínas, los tamaños se dan en kilodaltons (kDa) o números de restos de aminoácidos. Los tamaños de las proteínas se estiman a partir de electroforesis en gel, a partir de proteínas secuenciadas, a partir de secuencias de aminoácidos derivados, o a partir de secuencias de proteínas publicadas.

Los oligonucleótidos que no están disponibles en el mercado se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo, de acuerdo con el procedimientos del triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por primera vez en Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862 (1981), usando un sintetizador automatizado, tal como se describe en Van Devanter y *col.*, *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168 (1984). Los genes completos también se pueden sintetizar químicamente. La purificación de oligonucleótidos se realiza usando cualquier estrategia reconocida en la técnica, por ejemplo, electroforesis en gel de acrilamida nativa o HPLC de intercambio aniónico tal como se describe en Pearson y Reanier, *J. Chrom.* 255: 137-149 (1983).

La secuencia de los genes clonados del polipéptido de tipo silvestre, polinucleótidos que codifican polipéptidos mutantes, y oligonucleótidos sintéticos se puede verificar después de la clonación usando, por ejemplo, el procedimiento de determinación de cadenas para secuenciación de moldes bicatenarios de Wallace y *col.*, *Gene* 16: 21-26 (1981).

En una realización ejemplar, la secuencia de glicosilación se añade mediante la transposición de polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican un péptido candidato se pueden modular con protocolos de transposición de ADN. La transposición de ADN es un proceso de recombinación recursiva y mutación, realizado por fragmentación aleatoria de una mezcla de genes relacionados, seguido por el reensamblaje de los fragmentos mediante un proceso tipo reacción en cadena de polimerasa. Véase, por ejemplo, Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751 (1994); Stemmer, *Nature* 370: 389-391 (1994); y Patentes de Estados Unidos Nº 5.605.793, Nº 5.837.458, Nº 5.830.721 y Nº 5.811.238.

Clonación y Subclonación de una Secuencia de Codificación de Péptidos de Tipo Silvestre

Se han determinado numerosas secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos de tipo salvaje y están disponibles en un proveedor comercial, por ejemplo, hormona de crecimiento humano, por ejemplo, GenBank Nºs de acceso NM 000515, NM 002059, NM 022556, NM 022557, NM 022558, NM 022559, NM 022560, NM 022561, y NM 022562.

El rápido progreso en los estudios del genoma humano ha hecho posible un enfoque de clonación en el que se puede buscar un ser una base de datos de secuencia de ADN humano para cualquier segmento del gen que tenga un determinado porcentaje de homología de secuencia con una secuencia de nucleótidos conocida, tal como una que codifica un polipéptido identificado previamente. Posteriormente, se puede obtener cualquier secuencia de ADN identificada de este modo por de síntesis química y/o una técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como procedimiento de extensión de solapamiento. Para una secuencia corta, la síntesis *de novo* completa puede ser suficiente; aunque puede ser necesario un aislamiento adicional de la secuencia de codificación de longitud completa de un ADNc humano o una biblioteca genómica usando una sonda sintética para obtener un gen más grande.

Como alternativa, se puede aislar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido a partir de una biblioteca de ADNc humano o ADN genómico usando técnicas de clonación convencionales tales como reacción en cadena de polimerasa (PCR), en la que a menudo los cebadores basados en la homología pueden tener su origen en una secuencia de ácidos nucleicos conocida que codifica un polipéptido. Las técnicas usadas más habitualmente para este fin se describen en textos convencionales, por ejemplo, Sambrook y Russell, mencionados anteriormente.

Las bibliotecas de ADNc adecuadas para obtener una secuencia de codificación para un polipéptido de tipo silvestre pueden estar disponibles en el mercado o se pueden construir. Se conocen bien los procedimientos generales para aislar ARNm, fabricar ADNc por transcripción inversa, unir ADNc en un vector recombinante, transfectar en un huésped recombinante para su propagación, identificación sistemática, y clonación (véase, por ejemplo, Gubler y Hoffman, *Gene*, 25: 263-269 (1983); Ausubel y *col.*, mencionados anteriormente). Después de obtener un segmento amplificado de secuencia de nucleótidos mediante PCR, el segmento se puede usar adicionalmente como una sonda para aislar la secuencia de nucleótidos de longitud completa que codifica al polipéptido de tipo silvestre a partir de la

biblioteca de ADNc. Una descripción general de procedimientos apropiados se puede encontrar en Sambrook y Russell, mencionados anteriormente.

Se puede seguir un procedimiento similar para obtener una secuencia de longitud completa que codifica un polipéptido de tipo silvestre, por ejemplo, uno cualquiera de los números de Acceso de GenBank mencionados anteriormente, a partir de una biblioteca genómica humana. Las bibliotecas genómicas humanas están disponibles en el mercado o se pueden construir de acuerdo con diversos procedimientos reconocidos en la técnica. En general, para la construcción de una biblioteca genómica, el ADN se extrae primero de un tejido en el que se puede encontrar con probabilidad un polipéptido. A continuación, el ADN se corta mecánicamente o se digiere enzimáticamente para producir fragmentos de aproximadamente 12-20 kb de longitud. Los fragmentos se separan posteriormente por centrifugación en gradiente a partir de fragmentos de polinucleótidos de tamaños no deseados y se insertan en vectores bacteriófagos λ . Estos vectores y fagos se empaquetan *in vitro*. Los fagos recombinantes se analizan por hibridación en placa tal como se describe en Benton y Davis, Science, 196: 180-182 (1977). La hibridación de colonias se realiza tal como se ha descrito en Grunstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 3961-3965 (1975).

En base a la secuencia de homología, se pueden diseñar oligonucleótidos degenerados como conjuntos de cebadores y se puede realizar PCR en condiciones adecuadas (véase, por ejemplo, White y col., PCR Protocols: Current Methods and Applications, 1993; Griffin y Griffin, PCR Technology, CRC Press Inc. 1994) para amplificar un segmento de la secuencia de nucleótidos de un ADNc o biblioteca genómica. Usando el segmento amplificado como una sonda, se obtiene el ácido nucleico de longitud completa que codifica un polipéptido de tipo silvestre.

Tras la adquisición de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de tipo silvestre, la secuencia de codificación se puede subclonar en un vector, por ejemplo, un vector de expresión, de modo que se puede producir un polipéptido de tipo silvestre recombinante a partir del constructo resultante. Posteriormente, se pueden realizar modificaciones adicionales a la secuencia de codificación del polipéptido de tipo silvestre, por ejemplo, sustituciones de nucleótidos, para alterar las características de la molécula.

Introducción de Mutaciones en una Secuencia de Polipéptidos

A partir de una codificación de secuencia de polinucleótidos, se puede determinar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de tipo silvestre. Posteriormente, se puede modificar esta secuencia de aminoácidos para alterar el patrón de glicosilación de la proteína, mediante la introducción de la secuencia consecuencias de glicosilación adicionales en diversos lugares de la secuencia de aminoácidos.

En la técnica se conocen bien varios tipos de secuencias de glicosilación de proteínas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en eucariotas, la glicosilación con unión en N se produce en la asparagina de la secuencia consenso Asn-X_{aa}-Ser/Thr, en la que X_{aa} es cualquier aminoácido excepto prolina (Kornfeld y col., Ann Rev Biochem 54: 631-664 (1985); Kukuruzinska y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2145-2149 (1987); Herscovics y col., FASEB J 7: 540-550 (1993); y Orlean, Saccharomyces Vol. 3 (1996)). La glicosilación con unión en O se producen restos de serina o treonina (Tanner y col., Biochim. Biophys. Acta. 906: 81-91 (1987); y Hounsell y col., Glycoconj. J. 13: 19-26 (1996)). Se forman otros patrones de glicosilación uniendo glicosilfosfatidilinositol al grupo carboxilo carboxil-terminal de la proteína (Takeda y col., Trends Biochem. Sci. 20: 367-371 (1995); y Udenfriend y col., Ann. Rev. Biochem. 64: 593-591 (1995). En base a este conocimiento, se pueden introducir de este modo mutaciones adecuadas en una secuencia de polipéptido de tipo silvestre para formar nuevas secuencias de glicosilación.

Aunque la modificación directa de un resto de aminoácido dentro de una secuencia de polipéptido puede ser adecuada para introducir una secuencia de glicosilación nueva con unión en N o con unión en O, más frecuentemente, la introducción de una nueva secuencia de glicosilación ese consigue mediante la mutación de la secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido. Esto se puede conseguir usando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido, alguno de los cuales se analizan a continuación.

En la técnica se establece y se describe una diversidad de protocolos de generación de mutación. Véase, por ejemplo, Zhang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4504-4509 (1997); y Stemmer, Nature, 370: 389-391 (1994). Los procedimientos se pueden usar por separado o en combinación para producir variantes de un conjunto de ácidos nucleicos, y por lo tanto variantes de polipéptidos codificados. En el mercado están disponibles kits para mutagénesis, construcción de bibliotecas, y otros procedimientos para generar diversidad.

Los procedimientos mutacionales para generar diversidad incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigidas al sitio (Botstein y Shortle, Science, 229: 1193-1201 (1985)), mutagénesis usando moldes que contienen uracilo (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 488-492 (1985)), mutagénesis dirigidas a oligonucleótidos (Zoller y Smith, Nucl. Acids Res., 10: 6487-6500 (1982)), mutagénesis de ADN modificado por fosforotioato (Taylor y col., Nucl. Acids Res., 13: 8749-8764 y 8765-8787 (1985)), y mutagénesis usando ADN dúplex con huecos (Kramer y col., Nucl. Acids Res., 12: 9441-9456 (1984)).

Otros procedimientos para generar mutaciones incluyen la reparación de la falta de coincidencia puntual (Kramer y col., Cell, 38: 879-887 (1984)), mutagénesis usando cepas huésped deficientes en reparación (Carter y col., Nucl. Acids Res., 13: 4431-4443 (1985)), mutagénesis de supresión (Eghedarzadeh y Henikoff, Nucl. Acids Res., 14: 5115 (1986)), restricción-selección y restricción-purificación (Wells y col., Phil. Trans. R. Soc. Lond. A, 317: 415-423 (1986)),

mutagénesis por síntesis total de genes (Nambiar *y col.*, Science, 223: 1299-1301 (1984)), reparación de la ruptura bicatenaria (Mandecki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 7177-7181 (1986)), mutagénesis mediante procedimientos de terminación de cadena de polinucleótidos (Patente de Estados Unidos Nº 5.965.408), y PCR propensa al error (Leung *y col.*, Biotechniques, 1: 11-15 (1989)).

5 *Modificación de Ácidos Nucleicos para el Uso Preferente del Codón en un Organismo Huésped*

La secuencia de polinucleótidos que codifica una variante de polipéptido se puede alterada adicionalmente para que coincida con el uso del codón preferente de un huésped en particular. Por ejemplo, el uso del codón preferente de una cepa de células bacterianas se puede usar para obtener un polinucleótido que codifica una variante de polipéptido de la invención e incluye los codones favorecidos por esta cepa. La frecuencia de uso del codón preferente exhibida por una célula huésped se puede calcular promediando la frecuencia de uso del codón preferente en un gran número de genes expresados por la célula huésped (por ejemplo, el servicio de cálculo está disponible en el sitio web del Instituto de Investigación de ADN Kazusa, Japón). Este análisis se limita preferentemente a genes que se expresan altamente por la célula huésped. La Patente de Estados Unidos Nº 5.824.864, por ejemplo, proporciona la frecuencia de uso de codones por genes altamente expresados exhibidos por plantas dicotiledóneas y plantas monocotiledóneas.

En la finalización de la modificación, las secuencias de codificación variables de polipéptidos se verifican por secuenciación y a continuación se subclonan en un vector de expresión adecuado para la producción recombinante de la misma manera que los polipéptidos de tipo silvestre.

Expresión de Polipéptidos Mutantes

Siguiendo la verificación de secuencias, se puede producir la variante polipeptídica de la presente invención usando técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante, que depende de las secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido que se divulga en el presente documento.

Sistemas de Expresión

Para obtener la expresión de alto nivel de un ácido nucleico que codifica un polipéptido mutante de la presente invención, en general se subclona un polinucleótido que codifica el polipéptido mutante en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción/traducción y un sitio de unión a de ribosomas para el comienzo de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell, mencionados anteriormente, y Ausubel *y col.*, mencionados anteriormente. Sistemas de expresión bacteriana para expresar el polipéptido de tipo silvestre o mutante están disponibles en, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Salmonella*, y *Caulobacter*. Los kits para dichos sistemas de expresión están disponibles en el mercado. Los sistemas de expresión eucariota para células de mamífero, levadura, y células de insecto se conocen bien en la técnica y también están disponibles en el mercado. En una realización, el vector de expresión eucariota es un vector adenoviral, un vector adeno-asociado, o un vector retroviral.

El promotor usado para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación en particular. El promotor se coloca opcionalmente a aproximadamente la misma distancia desde el sitio de inicio de la transcripción heteróloga como lo es desde el sitio de inicio de la transcripción en su entorno natural. Sin embargo, tal como se sabe en la técnica, se puede admitir alguna variación en esta distancia sin pérdida de la función del promotor.

Además del promotor, el vector de expresión incluye en general una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales necesarios para la expresión del polipéptido mutante en células huésped. Por lo tanto, un casete de expresión habitual contiene un promotor unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido mutante y señales necesarias para la poliadenilación eficaz de la transcripción, sitios de unión al ribosoma, y terminación de la traducción. En general, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido está unida a una secuencia de péptido señal escindible para promover la secreción del polipéptido por la célula transformada. Dichos péptidos señal incluyen, entre otros, los péptidos señal de activador del plasminógeno tisular, insulina, y factor de crecimiento neuronal, y la esterasa de la hormona juvenil de *Heliothis virescens*. Los elementos adicionales del casete pueden incluir potenciadores y, si el ADN genómico se usa como el gen estructural, intrones con sitios dadores y aceptores de empalme funcional.

Además de una secuencia promotora, el casete de expresión también debería contener una región de terminación de la transcripción corriente abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. La región de terminación se puede obtener a partir del mismo gen que la secuencia promotora o se puede obtener a partir de diferentes genes.

El vector de expresión en particular usado para transportar la información genética en la célula no es particularmente crítico. Se puede usar cualquier de los vectores convencionales usados para la expresión en células eucariotas o procariotas. Los vectores de expresión bacteriana convencionales incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23d, y sistemas de expresión de fusión tales como GST y LacZ. Además, se pueden añadir marcas de epítipo a las proteínas recombinantes para proporcionar procedimientos convenientes de aislamiento, por ejemplo, c-myc.

En general, se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas en vectores de

expresión eucariota, por ejemplo, vectores de SV40, vectores del virus del papiloma, y vectores derivados del virus Epstein-Barr. Otros vectores eucariotas ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMT010/A⁺, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas en la dirección del promotor temprano de SV40, promotor tardío de SV40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor de mama de murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores que se han mostrado eficaces para la expresión en células eucariotas.

En algunas realizaciones ejemplares, el vector de expresión se elige entre pCWin1, pCWin2, pCWin2/MBP, pCWin2-MBP-SBD (pMS₃₉), and pCWin2-MBP-MCS-SBD (pMXS₃₉) tal como se divulga en la solicitud de Patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente presentada el 9 de abril de 2004 que se incorpora en el presente documento por referencia.

Algunos sistemas de expresión tienen marcadores que proporcionan la amplificación genética tales como timidina quinasa, higromicina B fosfotransferasa, y dihidrofolato reductasa. Como alternativa, también son adecuados los sistemas de expresión de alto rendimiento que no implican amplificación genética, tal como un vector de baculovirus en células de insecto, con una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido mutante en la dirección del promotor de polihedrina u otros promotores de baculovirus fuertes.

Los elementos que se incluyen en general en vectores de expresión también incluyen un replicón que funciona en *E. coli*, un gen que codifica la resistencia a antibióticos para permitir la selección de bacterias que albergan plásmidos recombinantes, y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido para permitir la inserción de secuencias eucarióticas. La resistencia del antibiótico elegido en particular no es crítica, es adecuado cualquiera de los muchos genes de resistencia conocidos en la técnica son adecuados. Las secuencias procariotas se eligen opcionalmente de manera que no interfieran con la replicación del ADN en células eucariotas, si fuera necesario.

Cuando se desea la expresión periplásmica de una proteína recombinante (por ejemplo, un mutante hgh de la presente invención), el vector de expresión comprende adicionalmente una secuencia que codifica una señal de secreción, tal como señal de secreción OppA de *E. coli* (Proteína de Unión a Oligopéptidos Periplásmicos) o una versión modificada de la misma, que se conecta directamente a la posición 5' de la secuencia de codificación de la proteína a expresar. Esta secuencia señal dirige la proteína recombinante producida en el citoplasma a través de la membrana celular en el espacio periplásmico. El vector de expresión puede comprender además una secuencia de codificación para la señal peptidasa 1, que es capaz de escindir enzimáticamente la secuencia de señal cuando la proteína recombinante está entrando en el espacio periplásmico. Una descripción más detallada de la producción periplásmica de una proteína recombinante se puede encontrar, por ejemplo, en Gray y col., Gene 39: 247-254 (1985), Patentes de Estados Unidos N° 6.160.089 y N° 6.436.674.

Como se ha analizado anteriormente, un experto en la materia reconocerá que se pueden hacer diversas sustitución es conservativas a cualquier polipéptido de tipo silvestre o mutante o a su secuencia de codificación árabe que se mantiene aún la e actividad biológica del polipéptido. Además, también se pueden hacer modificaciones en una secuencia de codificación de polinucleótidos para adaptar el uso preferente del codón en un huésped de expresión en particular sin alterar la secuencia de aminoácidos resultante.

Procedimientos de transfección

Se usan procedimientos de transfección convencionales para producir líneas celulares de bacteria, mamífero, levadura o insectos que expresan grandes cantidades del polipéptido mutante, que a continuación se purifican usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Colley y col., J. Biol. Chem. 264: 17619-17622 (1989); Guide to Protein Purification, en Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). La transformación de células eucariotas y procariotas se realiza de acuerdo con técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Morrison, J. Bact. 132: 349-351 (1977); Clark-Curtiss y Curtiss, Methods in Enzymology 101: 347-362 (Wu y col., eds, 1983)).

Se puede usar cualquiera de los procedimientos bien conocidos para la introducción de secuencias de nucleótidos extraños en células huésped. Éstos incluyen el uso de transfección con fosfato cálcico, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores de plasma, vectores virales y cualquiera de los otros procedimientos bien conocidos para introducir ADN genómicos clonado DNA, ADNc, ADN sintético, u otro material genético extraño en una célula huésped (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, mencionado anteriormente). Solamente es necesario que el procedimiento de ingeniería genética usado en particular sea capaz de introducir de forma satisfactoria al menos un gen en la célula huésped capaz de expresar el polipéptido mutante.

Detección de Expresión de Polipéptidos Mutantes en Células Huésped

Después de introducir el vector de expresión en células huésped apropiadas, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión de polipéptido mutante. A continuación, las células se identifican sistemáticamente para la expresión del polipéptido recombinante, que posteriormente se recupera cultivo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); Patente de Estados Unidos N° 4.673.641; Ausubel y col., mencionado anteriormente; y Sambrook y Russell, mencionado anteriormente).

Los expertos en la materia conocen bien varios procedimientos generales de identificación sistemática de la expresión genética. En primer lugar, la expresión genética se puede detectar a nivel del ácido nucleico. Normalmente se usa una diversidad de procedimientos específicos de medida de ADN y ARN usando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (por ejemplo, Sambrook y Russell, mencionado anteriormente). Algunos procedimientos implican una separación electroforética (por ejemplo, transferencia de Southern para detectar ADN y transferencia de para detectar ARN), pero la detección del ADN o del ARN también se puede realizar sin electroforesis (tal como mediante transferencia puntual). Además, se puede detectar la presencia de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido mutante en células transfectadas mediante PCR o RT-PCR usando cebadores específicos de secuencias.

En segundo lugar, la expresión genética se puede detectar al nivel del polipéptido. Los expertos en la materia usan de forma rutinaria diversos ensayos inmunológicos para medir el nivel de un producto genético, usando particularmente anticuerpos policlonales o monoclonales que reaccionan específicamente con un polipéptido mutante de la presente invención (por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies*, A Laboratory Manual, Capítulo 14, Cold Spring Harbor, 1988; Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975)). Dichas técnicas requieren la preparación del anticuerpo mediante la selección de anticuerpos con una especificidad elevada frente al polipéptido mutante o una porción antigénica del mismo. Los procedimientos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales están bien establecidos y sus descripciones se pueden encontrar en la bibliografía, véase, por ejemplo, Harlow y Lane, mencionado anteriormente; Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511-519 (1976). En una sección posterior se proporcionan de descripciones más detalladas para preparar anticuerpos frente al polipéptido mutante de la presente invención y realizar ensayos inmunológicos que detectan el polipéptido mutante.

*Purificación de Polipéptidos **Mutantes** Producidos de Forma Recombinante*

Una vez que se confirma la expresión de un polipéptido mutante recombinante en células huésped transfectadas, las células huésped se cultivan a continuación en una escala apropiada con el fin de purificar el polipéptido recombinante.

1. Purificación a partir de Bacterias

Cuando los polipéptidos mutantes de la presente invención se producen de forma recombinante mediante bacterias transformadas en grandes cantidades, en general después de inducción del promotor, aunque la expresión puede ser constitutiva, las proteínas pueden formar agregados insolubles. Existen varios protocolos que son adecuados para la purificación de cuerpos de inclusión de proteínas. Por ejemplo, la purificación de proteínas agregadas (en lo sucesivo en el presente documento denominadas cuerpos de inclusión) en general implica la extracción, separación y/o purificación de cuerpos de inclusión por alteración de células bacterianas, por ejemplo, por incubación en un tampón de aproximadamente 100-150 µg/ml de lisozima y Nonidet P40 al 0,1 %, un detergente no iónico. La suspensión celular se puede triturar usando un triturador Polytron (Brinkman Instruments, Westbury, NY). Como alternativa, las células se pueden sonicar en hielo. Procedimientos alternativos para lisar bacterias se describen en Ausubel y *col.* y Sambrook y Russell, ambos mencionados anteriormente, y serán evidentes para los expertos en la materia.

En general, la suspensión celular se centrifuga y el sedimento que contiene los cuerpos de inclusión se vuelve a suspender en tampón que no disuelve pero que lava los grupos de inclusión, por ejemplo, Tris-HCl 20 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM y Triton-X 100 al 2 %, un detergente no iónico. Puede ser necesario repetir la etapa de lavado para retirar tantos residuos celulares como sea posible. El sedimento restante de los cuerpos de inclusión se puede volver a suspender en un tampón apropiado (por ejemplo, fosfato sódico 20 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM). Otros tampones apropiados serán evidentes para los expertos en la materia.

Después de la etapa de lavado, los cuerpos de inclusión se solubilizan mediante la adición de un disolvente que es tanto un aceptor de hidrógeno fuerte como un dador de hidrógeno fuerte (o una combinación de disolventes cada uno de los cuales tienen estas propiedades). Las proteínas que formaron los cuerpos de inclusión se pueden renaturalizar a continuación por dilución o diálisis con un tampón compatible. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, urea (de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M), formamida (al menos aproximadamente un 80 %, base de volumen/volumen), y clorhidrato de guanidina (de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M). Algunos disolventes que son capaces de solubilizar proteínas que forman agregados, tales como SDS (dodecil sulfato sódico) y ácido fórmico al 70 %, pueden ser inapropiados para su uso en este procedimiento debido a la posibilidad de una desnaturalización irreversible de las proteínas, acompañado por una falta de inmunogenicidad y/o actividad. Aunque el clorhidrato de guanidina y agentes similares son agentes de desnaturalización, esta desnaturalización no es irreversible y la renaturalización se puede producir después de la retirada (por diálisis, por ejemplo) o dilución del agente de desnaturalización, lo que permite la re-formación de la proteína inmunológica y/o biológicamente activa de interés. Después de la solubilización, la proteína se puede separar de otras proteínas bacterianas mediante técnicas convencionales de separación. Para una descripción adicional de polipéptidos recombinantes de purificación a partir de cuerpos de inclusión de bacterias, véase, por ejemplo, Patra y *col.*, *Protein Expression and Purification* 18: 182-190 (2000).

Como alternativa, es posible purificar polipéptidos recombinantes, por ejemplo, un polipéptido mutante, a partir de periplasma bacteriano. Cuando la proteína recombinante se exporta en el periplasma de la bacteria, la fracción periplásmica de la bacteria se puede aislar mediante choque osmótico en frío además de otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel y *col.*, mencionado anteriormente). Para aislar

proteínas recombinantes del periplasma, las células bacterianas se centrifugan para formar un sedimento. El sedimento se vuelve suspender en un tampón que contiene sacarosa al 20 %. Para lisar las células, las bacterias se centrifugan y el sedimento se vuelve a suspender en MgSO_4 5 mM enfriado con hielo y se mantiene en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión celular se centrifuga y el sobrenadante se decanta y se guarda. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante se pueden separar a partir de las proteínas huésped mediante técnicas de separación convencional bien conocidas por los expertos en la materia.

2. Técnicas de Separación Convencional para Purificación

Cuando un polipéptido recombinante, por ejemplo, el polipéptido mutante de la presente invención, se expresa en células huésped en una forma soluble, su purificación puede seguir procedimientos convencionales de purificación de proteínas, por ejemplo los que se describen en el presente documento, a continuación a la purificación se prevé realizar usando procedimientos que se divulgan en cualquier parte, por ejemplo, en la Publicación de PCT N° WO2006/105426.

Fraccionamiento de la Solubilidad

A menudo, como una etapa inicial, si la mezcla de proteínas es compleja, un fraccionamiento inicial de sales puede separar muchas de las proteínas de las células huésped no deseadas (o proteínas derivadas de los medios de cultivo celular) a partir de la proteína recombinante de interés, por ejemplo, un polipéptido mutante de la presente invención. La sal preferente es el sulfato de amonio. El sulfato de amonio precipita proteínas reduciendo de forma eficaz la cantidad de agua en la mezcla de proteínas. A continuación, las proteínas precipitan en base a su solubilidad. Cuanto más hidrófoba es una proteína, es más probable que precipite a concentraciones de sulfato de amonio menores. Un protocolo habitual es añadir sulfato de amonio saturado a una solución de proteínas de modo que la concentración resultante de sulfato de amonio está entre un 20-30 %. Esto para precipitar a las proteínas más hidrófobas. El precipitado se descarta (a menos que la proteína de interés se hidrófoba) y se añade sulfato de amonio al sobrenadante hasta una concentración conocida por que hace precipitar la proteína de interés. El precipitado se solubiliza a continuación en tampón y el exceso de sal se retira si fuera necesario, a través de diálisis o diafiltración. Otros procedimientos que dependen de la solubilidad de las proteínas, tales como precipitación en etanol frío, son bien conocidos por los expertos en la materia y se pueden usar para fraccionar mezclas complejas de proteínas.

Ultrafiltración

En base a un peso molecular calculado, se puede aislar una proteína de mayor y de menor tamaño usando ultrafiltración a través de membranas de diferentes tamaños de poro (por ejemplo, membranas de Amicon o Millipore). Como una primera etapa, la mezcla de proteínas se ultrafiltra a través de una membrana con un tamaño de poro que tiene un punto de corte del peso molecular menor que el peso molecular de una proteína de interés, por ejemplo, un polipéptido mutante. A continuación, el retenido de la ultrafiltración se ultrafiltra a través de una membrana con un punto de corte molecular del peso molecular mayor que el peso molecular de la proteína de interés. La proteína recombinante pasará a través de la membrana en el filtrado. A continuación, el filtrado se puede cromatografiar tal como se describe a continuación.

Cromatografía en Columna

Las proteínas de interés (tal como el polipéptido mutante de la presente invención) también se pueden separar de otras proteínas en base a su tamaño, carga de superficie neta, hidrofobia, o afinidad por ligandos. Además, se pueden conjugar anticuerpos generados frente a polipéptidos a matrices de columna y el polipéptido se puede inmunopurificar. Todos estos procedimientos son bien conocidos en la técnica.

Será evidente para un experto en la materia que se pueden realizar técnicas de cromatografía en cualquier escala y usando equipo a partir de muchos fabricantes diferentes (por ejemplo, Pharmacia Biotech).

Inmunoensayos para Detección de Expresión de Polipéptidos Mutantes

Para confirmar la producción de un polipéptido mutante recombinante, los ensayos inmunológicos pueden ser útiles para detectar la expresión del polipéptido en una muestra. Además, los ensayos inmunológicos son útiles para cuantificar el nivel de expresión de la hormona recombinante. Los anticuerpos frente a un polipéptido mutante son necesarios para realizar estos ensayos inmunológicos.

Producción de Anticuerpos frente Polipéptidos Mutantes

Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con un inmunógeno de interés son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Coligan, Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY, 1991; Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NY, 1989; Stites y col. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias citadas en ese documento; Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed.) Academic Press, Nueva York, NY, 1986; y Kohler y Milstein Nature 256: 495-497, 1975). Dichas técnicas incluyen preparación de anticuerpos mediante selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o

vectores similares (véase, Huse y *col.*, Science 246: 1275-1281, 1989; y Ward y *col.*, Nature 341: 544-546, 1989).

Con el fin de producir anticuerpos que contienen antiseros con una especificidad deseada, el polipéptido de interés (por ejemplo, un polipéptido mutante de la presente invención) o un fragmento de antígeno del mismo se puede usar para inmunizar animales adecuados, por ejemplo, ratones, conejos, o primates. Un adyuvante convencional, tal como adyuvante de Freund, se puede usar de acuerdo con un protocolo de inmunización convencional. Como alternativa, un péptido antigénico sintético derivado del polipéptido en particular se puede conjugar con una proteína vehículo y posteriormente usar como un inmunógeno.

La respuesta inmune del animal a la preparación de inmunógeno se controla tomando extracciones de sangre de ensayo determinando la titulación de reactividad del antígeno de interés. Cuando se obtienen títulos de anticuerpos al antígeno apropiadamente elevados, se extrae sangre del animal y se preparan antiseros. Posteriormente, se puede realizar fraccionamiento adicional de los antiseros para enriquecer anticuerpos específicamente reactivos al antígeno y purificación de los anticuerpos, véase, Harlow y Lane, mencionado anteriormente, y las descripciones generales que se han proporcionado anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen usando diversas técnicas familiares para los expertos a la materia. En general, se immortalizan células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, normalmente mediante fusión con una célula de mieloma (véase, Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976). Los procedimientos de immortalización alternativos incluyen, por ejemplo, transformación con Virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus, u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Las colonias que surgen de células inmortalizadas individuales se identifican sistemáticamente para la producción de anticuerpos de la especificidad y la afinidad deseadas para el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células puede aumentar mediante diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado.

Además, también se pueden producir de forma recombinante anticuerpos monoclonales después de la identificación de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo con una especificidad deseada o un fragmento de unión de dicho anticuerpo mediante identificación sistemática de una biblioteca de ADNc de linfocitos B humanos de acuerdo con el protocolo general resumido en Huse y *col.*, mencionado anteriormente. Los principios y los procedimientos generales de producción de polipéptidos recombinantes que se han analizado anteriormente son aplicables para la producción de anticuerpos mediante procedimientos recombinantes.

Cuando se desee, los anticuerpos capaces de reconocer específicamente un polipéptido mutante de la presente invención se pueden someter a ensayo para su reactividad cruzada frente al polipéptido de tipo silvestre y de este modo se puede distinguir de los anticuerpos frente a la proteína de tipo silvestre. Por ejemplo, los antiseros obtenidos a partir de un animal inmunizado con un polipéptido mutante se pueden desarrollar a través de una columna en la que se inmoviliza un polipéptido de tipo silvestre. La porción de los antiseros que pasa a través de la columna reconoce solamente al polipéptido mutante y no al polipéptido de tipo silvestre. De forma análoga, los anticuerpos monoclonales frente a un polipéptido mutante también se pueden identificar sistemáticamente por su exclusividad en el reconocimiento solamente del mutante pero no del polipéptido de tipo silvestre.

Los anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen específicamente solamente al polipéptido mutante de la presente invención pero no al polipéptido de tipo silvestre son útiles para aislar la proteína mutante a partir de la proteína de tipo silvestre, por ejemplo, por incubación de una muestra con un anticuerpo policlonal o monoclonal específico de péptidos mutante inmovilizado en un soporte sólido.

Inmunoensayos para Detectar la Expresión de Polipéptidos Recombinantes

Una vez que los anticuerpos específicos para un polipéptido mutante de la presente invención están disponibles, la cantidad del polipéptido en una muestra, por ejemplo, un lisado celular, se puede medir mediante una diversidad de procedimientos de inmunoensayo que proporcionan resultados cualitativos y cuantitativos para un experto en la materia. Para una revisión de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo en general véase, por ejemplo, Stites, mencionado anteriormente; Patentes de Estados Unidos N° 4.366.241; N° 4.376.110; N° 4.517.288; y N° 4.837.168.

Marcado en Inmunoensayos

Los inmunoensayos a menudo usan un agente de marcado para unirse específicamente y para marcar el complejo de unión formado por el anticuerpo y la proteína diana. El agente de marcado puede ser en sí mismo uno de los restos que comprenden el complejo de anticuerpo/proteína diana, o puede ser un tercer resto, tal como otro anticuerpo, que se une específicamente al complejo de anticuerpo/proteína diana. Una marca se puede detectar por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, immunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares), radiomarcas (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, y otras usadas en un ELISA), y marcas colorimétricas tales como perlas de oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

En algunos casos, el agente de marcado es un segundo anticuerpo que lleva una marca detectable. Como alternativa,

el segundo anticuerpo puede carecer de una marca, pero a su vez, se puede unir a un tercer anticuerpo marcado específico para anticuerpos de las especies a las que corresponde el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo se puede modificar con un resto detectable, tal como biotina, al que se puede unir específicamente una tercera molécula marcada, tal como estreptavidina marcada con enzima.

- 5 Otras proteínas capaces de unirse específicamente a regiones constantes de inmunoglobulina, tales como proteína A o proteína G, también se pueden usar como los agentes de marcado. Estas proteínas son constituyentes normales de las paredes celulares de las bacterias estreptococos. Presentan una reactividad no inmunogénica fuerte con regiones constantes de inmunoglobulina a partir de una diversidad de especies (véase, en general, Kronval, y *col.* J. Immunol., 111: 1401-1406 (1973); y Akerstrom, y *col.*, J. Immunol., 135: 2589-2542 (1985)).

10 *Formatos de Inmunoensayo*

Los inmunoensayos para detectar una proteína diana de interés (por ejemplo, una hormona de crecimiento humano mutante) a partir de muestras pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que se mide directamente la cantidad de proteína diana capturada. En un ensayo de "sándwich" preferente, por ejemplo, el anticuerpo específico para la proteína diana se puede unir directamente a un sustrato sólido en el que se inmoviliza el anticuerpo. A continuación, éste captura la proteína diana en muestras de ensayo. El complejo de anticuerpo/proteína diana inmovilizado de este modo se une a continuación a un agente de marcado, tal como un segundo o tercer anticuerpo que lleva una marca tal como se ha descrito anteriormente.

- 20 En ensayos competitivos, la cantidad de proteína diana en una muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de una proteína diana añadida (exógena) desplazada (o con la que compite) a partir del anticuerpo específico para la proteína diana mediante la proteína diana presente en la muestra. En un ejemplo habitual que dicho ensayo, el anticuerpo se inmoviliza y la proteína diana exógena se marca. Dado que la cantidad de la proteína diana exógena unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de la proteína diana presente en la muestra, el nivel de proteína diana en la muestra se puede determinar de este modo en base a la cantidad de proteína diana exógena unida al anticuerpo e inmovilizada este modo.

- 25 En algunos casos, se usa análisis de transferencia de western (inmunotransferencia) para detectar y cuantificar la presencia de un polipéptido mutante en las muestras. La técnica comprende generalmente separar proteínas de la muestra por electroforesis en gel en base al peso molecular, transfiriendo las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon, o un filtro de nailon derivatizado) e incubando las muestras con los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína diana. Estos anticuerpos se pueden marcar directamente o como alternativa se pueden detectar posteriormente usando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos anti-ratón oveja marcados) que se unen específicamente a los anticuerpos frente a un polipéptido mutante.

- 30 Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos con liposomas (LIA), que usa liposomas diseñados para unir moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados. Los agentes químicos liberados se detectan a continuación de acuerdo con técnicas convencionales (véase, Monroe y *col.*, Amer. Clin. Prod. Rev., 5: 34-41 (1986)).

Procedimientos de Tratamiento

- Además de los conjugados que se han analizado anteriormente, la presente invención proporciona procedimientos para prevenir, curar o mejorar una patología mediante la administración de un conjugado de polipéptido de la invención a un sujeto con el riesgo de desarrollar la enfermedad o a un sujeto que tiene la enfermedad. Además, la invención proporciona procedimientos para dirigir conjugados de la invención a un tejido o región en particular del organismo.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar las composiciones y procedimientos de la presente invención, pero no para limitar la invención que se reivindica.

Realizaciones Preferentes de la Invención:

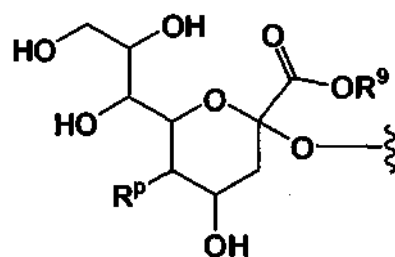
- 45 En una realización, la invención proporciona un conjugado covalente entre un polipéptido del secuón glicosilado o no glicosilado y un grupo de modificación polimérico, correspondiendo dicho polipéptido del secuón a un polipéptido precursor y comprendiendo una secuencia de glicosilación con unión en O exógena, estando conjugado dicho grupo de modificación polimérico a dicho polipéptido del secuón en dicha secuencia de glicosilación con unión en O a través de un grupo de unión a glicosilo, en el que dicho grupo de unión a glicosilo se interpone entre y se une covalentemente tanto a dicho polipéptido del secuón como a dicho grupo de modificación polimérico, con la condición de que dicho polipéptido precursor no sea un miembro seleccionado entre hormona de crecimiento humano (hGH), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón-*alfa* (INF-*alfa*), péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

- 55 El conjugado covalente de la realización anterior, en el que dicho grupo de modificación polimérico es un miembro seleccionado entre lineal y ramificado y comprende uno o más restos de polímero, en el que cada resto de polímero se selecciona independientemente.

El conjugado covalente de cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho resto de polímero es un miembro seleccionado entre poli(etilenglicol) y metoxi-poli(etilenglicol) (m-PEG).

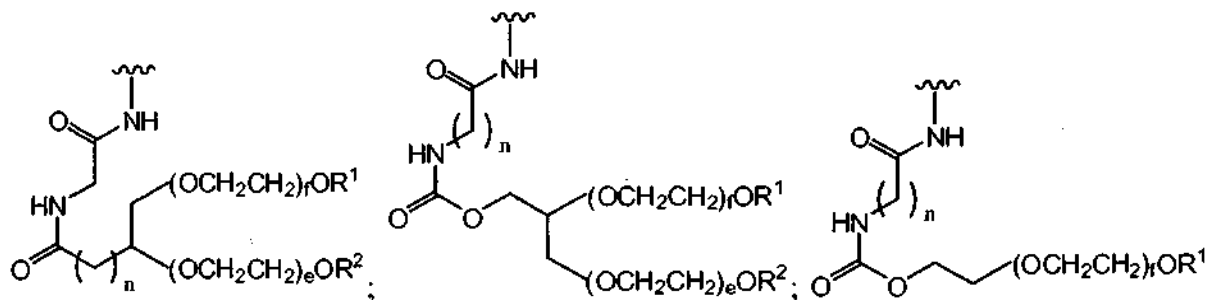
5 El conjugado covalente de cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho grupo de unión a glicosilo es un grupo de unión a glicosilo intacto.

El conjugado covalente de cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende un resto de acuerdo con la Fórmula (III):



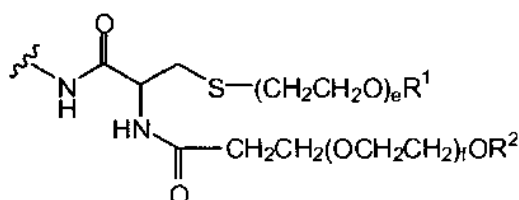
(III)

en el que R^9 es H, una carga negativa o un contraión salino; y R^p es un miembro seleccionado entre:



10

y



en los que n es un número entero seleccionado de 1 a 20 y f y e son números enteros seleccionados independientemente entre 1-2500.

15 El conjugado covalente de cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido precursor es un miembro seleccionado entre proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15), neurotrofina-3 (NT-3), proteasa del factor von Willebrand (vWF), eritropoyetina (EPO), α_1 -antitripsina (inhibidor de la proteasa α_1), glucocerebrosidasa, activador de plasminógenos de tipo celular (TPA), leptina, hirudina, uroquinasa, Dnasa humana, insulina, proteína de superficie de la hepatitis B (HbsAg), toxina-IL-2 de difteria química, gonadotropina coriónica humana (hCG), peroxidasa tiroidea (TPO), alfa-galactosidasa, alfa-L-iduronidasa, beta-glucosidasa, alfa-galactosidasa A, α -glucosidasa ácida (maltasa ácida), anti-trombina III (AT III), hormona de estimulación de folículos (FSH), péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2), Factor VII, Factor VIII, Factor VII con el dominio B suprimido, Factor IX, Factor X, Factor XIII, prokinetisina, extendina-4, CD4, receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), α -CD20, ligando-1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), complemento, transferrina, molécula de adhesión celular dependiente de la glicosilación (GlyCAM), molécula de adhesión de células neurales (N-CAM), proteína de fusión de la región Fc de IgG del receptor de TNF, anticuerpo monoclonal anti-HER2, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para TNF- α , anticuerpo monoclonal para glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo monoclonal para CD20, anticuerpo monoclonal para VEGF-A, anticuerpo monoclonal para PSGL-1, anticuerpo monoclonal para CD4, anticuerpo monoclonal para α -CD3, anticuerpo monoclonal para EGF, anticuerpo monoclonal para antígeno carcinoembrionario (CEA) y anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-2.

20

25

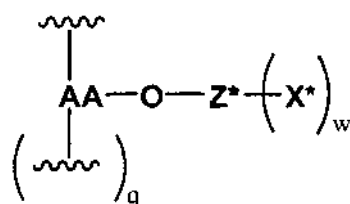
30

El conjugado covalente de cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre: (X)_mPTP, (X)_mPTEI(P)_n, (X)_mPTQA(P)_n, (X)_mPTINT(P)_n, (X)_mPTTVS(P)_n, (X)_mPTTVL(P)_n, (X)_mPTQGAM(P)_n, (X)_mTET(P)_n, (X)_mPTVL(P)_n, (X)_mPTLS(P)_n, (X)_mPTDA(P)_n, (X)_mPTEN(P)_n, (X)_mPTQD(P)_n, (X)_mPTAS(P)_n, (X)_mPTQGA(P)_n, (X)_mPTSAV(P)_n, (X)_mPTTLYV(P)_n, (X)_mPSSG(P)_n y (X)_mPSDG(P)_n, en el que m y n son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1; P es prolina; y X es un miembro seleccionado independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga.

El conjugado covalente de cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre: PTP, PTEI, PTEIP, PTQA, PTQAP, PTINT, PTINTP, PTTVS, PTTVL, PTQGAM, PTQGAMP y TETP.

Una composición farmacéutica que comprende un conjugado covalente de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un conjugado de polipéptido que comprende un polipéptido del secunón, correspondiendo dicho polipéptido del secunón a un polipéptido precursor y que tiene una secuencia de glicosilación con unión en O exógena, comprendiendo dicho conjugado de polipéptido un resto de acuerdo con la Fórmula (V):



(V)

en la que w es un número entero seleccionado entre 0 y 1; q es un número entero seleccionado entre 0 y 1; AA-O- es un resto derivado de un aminoácido que tiene una cadena lateral sustituida con un grupo hidroxilo, colocado dicho aminoácido dentro de dicha secuencia de glicosilación con unión en O; Z* es un miembro seleccionado entre un resto de glicosilo y un grupo de unión a glicosilo; y X* es un miembro seleccionado entre un grupo de modificación polimérico y un grupo de unión a glicosilo unido covalentemente a un grupo de modificación polimérico, con la condición de que dicho polipéptido precursor no sea un miembro seleccionado entre hormona de crecimiento humano (hGH), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón-*alfa* (INF-*alfa*), péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

El conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho aminoácido es serina (S) o treonina (T).

El conjugado de polipéptido de cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre: (X)_mPTP, (X)_mPTEI(P)_n, (X)_mPTQA(P)_n, (X)_mPTINT(P)_n, (X)_mPTTVS(P)_n, (X)_mPTTVL(P)_n, (X)_mPTQGAM(P)_n, (X)_mTET(P)_n, (X)_mPTVL(P)_n, (X)_mPTLS(P)_n, (X)_mPTDA(P)_n, (X)_mPTEN(P)_n, (X)_mPTQD(P)_n, (X)_mPTAS(P)_n, (X)_mPTQGA(P)_n, (X)_mPTSAV(P)_n, (X)_mPTTLYV(P)_n, (X)_mPSSG(P)_n y (X)_mPSDG(P)_n, en el que m y n son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1; P es prolina; y X es un miembro seleccionado independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga.

El conjugado de polipéptido de cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre: PTP, PTEI, PTEIP, PTQA, PTQAP, PTINT, PTINTP, PTTVS, PTTVL, PTQGAM, PTQGAMP y TETP.

El conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que Z* es un miembro seleccionado entre GalNAc, GalNAc-Gal, GalNAc-Gal-Sia y GalNAc-Sia.

El conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho grupo de modificación polimérico es un miembro seleccionado entre lineal y ramificado y comprende uno o más restos de polímero, en el que cada uno de dicho resto de polímero se selecciona independientemente.

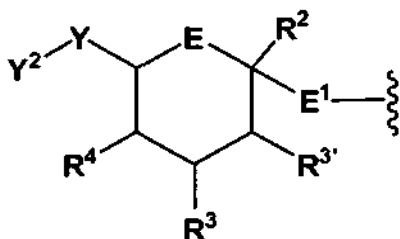
El conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho resto de polímero es un miembro seleccionado entre poli(etilenglicol) y derivados del mismo.

El conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que w es 1.

El conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que X^* comprende un resto, que es un miembro seleccionado entre un resto de sialilo (Sia), un resto de galactosilo (Gal), un resto de GalNAc y un resto de Gal-Sia.

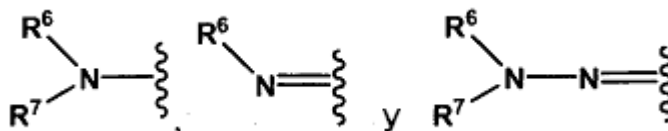
El conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido precursor es un miembro seleccionado entre proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15), neurotrofina-3 (NT-3), proteasa del factor von Willebrand (vWF), eritropoyetina (EPO), α_1 -antitripsina (inhibidor de la proteasa α_1), glucocerebrosidasa, activador de plasminógenos de tipo celular (TPA), leptina, hirudina, uroquinasa, Dnasa humana, insulina, proteína de superficie de la hepatitis B (HbsAg), toxina-IL-2 de difteria química, gonadotropina coriónica humana (hCG), peroxidasa tiroidea (TPO), alfa-galactosidasa, alfa-L-iduronidasa, beta-glucosidasa, alfa-galactosidasa A, α -glucosidasa ácida (maltasa ácida), anti-trombina III (AT III), hormona de estimulación de folículos, péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2), Factor VII, Factor VIII, Factor VII con el dominio B suprimido, Factor IX, Factor X, Factor XIII, prokinetisina, extendina-4, CD4, receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), α -CD20, ligando-1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), complemento, transferrina, molécula de adhesión celular dependiente de la glicosilación (GlyCAM), molécula de adhesión de células neurales (N-CAM), proteína de fusión de la región Fc de IgG del receptor de TNF, anticuerpo monoclonal anti-HER2, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para TNF- α , anticuerpo monoclonal para glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo monoclonal para CD20, anticuerpo monoclonal para VEGF-A, anticuerpo monoclonal para PSGL-1, anticuerpo monoclonal para CD4, anticuerpo monoclonal para α -CD3, anticuerpo monoclonal para EGF, anticuerpo monoclonal para antígeno carcinoembrionario (CEA) y anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-2.

El conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que X^* comprende un resto de acuerdo con la Fórmula (VI):



(VI)

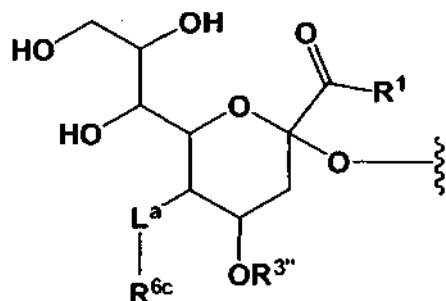
en la que E es un miembro seleccionado entre O, S, NR^{27} y CHR^{28} , en los que R^{27} y R^{28} son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir y heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir; E^1 es un miembro seleccionado entre O y S; R^2 es un miembro seleccionado entre H, $-R^1$, $-CH_2R^1$, y $-C(X^1)R^1$, en los que R^1 es un miembro seleccionado entre OR^9 , SR^9 , $NR^{10}R^{11}$, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir, en los que R^9 es un miembro seleccionado entre H, una carga negativa, un ión metálico, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y acilo; R^{10} y R^{11} son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y acilo; X^1 es un miembro seleccionado entre alquenoil sustituido o sin sustituir, O, S y NR^8 , en el que R^8 es un miembro seleccionado entre H, OH, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir; Y es un miembro seleccionado entre CH_2 , $CH(OH)CH_2$, $CH(OH)CH(OH)CH_2$, CH , $CH(OH)CH$, $CH(OH)CH(OH)CH$, $CH(OH)$, $CH(OH)CH(OH)$, y $CH(OH)CH(OH)CH(OH)$; Y^2 es un miembro seleccionado entre H, OR^6 , R^6 , alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir,



en los que R^6 y R^7 son miembros seleccionados independientemente entre H, $La-R^{6b}$, $C(O)R^{6b}$, $C(O)-L^a-R^{6b}$, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir, en los que R^{6b} es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y un grupo de modificación; R^3 , R^3' y R^4 son miembros seleccionados independientemente entre H, OR^{3n} , SR^{3n} , alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, $-L^a-R^{6c}$, $-C(O)-L^a-R^{6c}$, $-NH-L^a-R^{6c}$, $=N-L^a-R^{6c}$ y $-NHC(O)-L^a-R^{6c}$, en el que R^{3n} es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir; y R^{6c} es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, $NR^{13}R^{14}$ y un grupo de

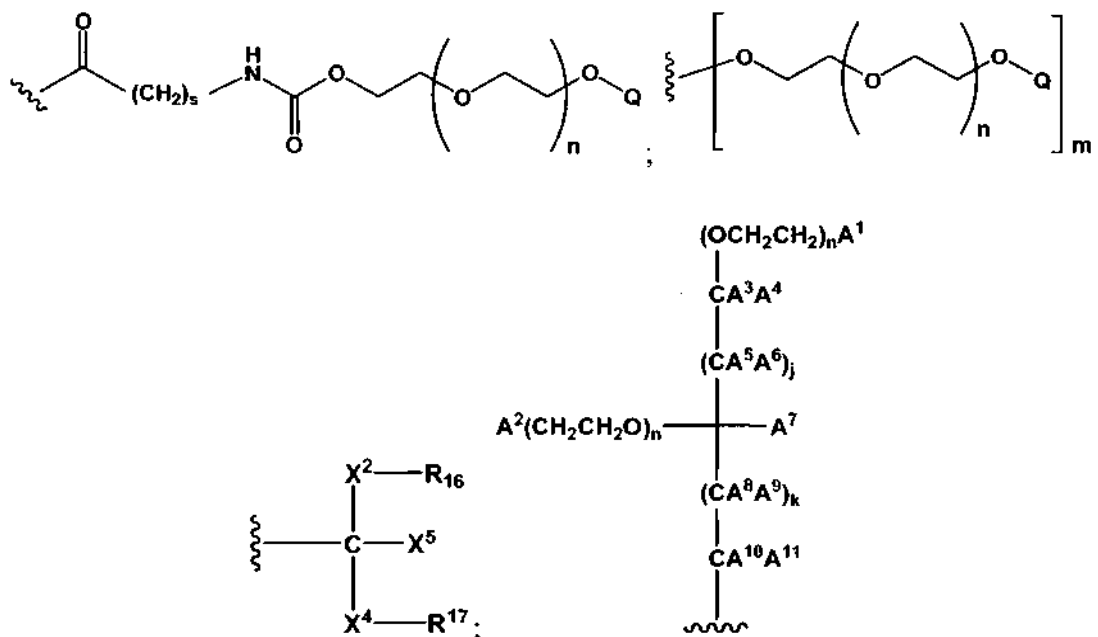
modificación, en el que R^{13} y R^{14} son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir; y cada L^a es un miembro seleccionado independientemente entre un enlace y un grupo de engarce.

- 5 El conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que X^* comprende un resto de acuerdo con la Fórmula (VII):



(VII).

El conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que al menos uno de R^{6b} y R^{6c} es un miembro seleccionado entre:



- 10 en las que s , j y k son números enteros seleccionados independientemente de 0 a 20; cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 2500; m es un número entero de 1-5; Q es un miembro seleccionado entre H y alquilo C_1 - C_6 ; R^{16} y R^{17} son restos de polímero seleccionados independientemente; X^2 y X^4 son fragmentos de unión seleccionados independientemente que unen restos de polímero R^{16} y R^{17} a C; X^5 es un grupo no reactivo distintos de un resto de polímero; y 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
- 15 entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, $-NA^{12}A^{13}$, $-OA^{12}$ y $-SiA^{12}A^{13}$, en los que A^{12} y A^{13} son miembros seleccionados independientemente entre alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

- 20 Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones expuestas anteriormente en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un polipéptido del secuón que corresponde a un polipéptido precursor, en el que dicho polipéptido del secuón comprende una secuencia de glicosilación con unión en O exógena seleccionada entre SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2:

- 25 $(X)_m PO^* U(B)_p (Z)_r (J)_s (O)_t (P)_n$ (SEC ID N°: 1); y
 $(X)_m (B^1)_p TUB(Z)_r (J)_s (P)_n$ (SEC ID N°: 2);

en las que m, n, p, r, s y t son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1; P es prolina; O* es un miembro seleccionado entre serina (S) y treonina (T); U es un miembro seleccionado entre prolina (P), ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga; X, B y B¹ son miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga; y Z, J y O son miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S), tirosina (Y), metionina (M) y aminoácidos sin carga, con la condición de que dicho polipéptido precursor no sea un miembro seleccionado entre hormona de crecimiento humano (hGH), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón-*alfa* (INF-*alfa*), péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

El polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre: (X)_mPTP, (X)_mPTEI(P)_n, (X)_mPTQA(P)_n, (X)_mPTINT(P)_n, (X)_mPTTVS(P)_n, (X)_mPTTVL(P)_n, (X)_mPTQGAM(P)_n, (X)_mTET(P)_n, (X)_mPTVL(P)_n, (X)_mPTLS(P)_n, (X)_mPTDA(P)_n, (X)_mPTEN(P)_n, (X)_mPTQD(P)_n, (X)_mPTAS(P)_n, (X)_mPTQGA(P)_n, (X)_mPTSAV(P)_n, (X)_mPTTLYV(P)_n, (X)_mPSSG(P)_n y (X)_mPSDG(P)_n, en las que m y n son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1; P es prolina; y X es un miembro seleccionado independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga.

El polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre: PTP, PTEI, PTEIP, PTQA, PTQAP, PTINT, PTINTP, PTTVS, PTTVL, PTQGAM, PTQGAMP y TETP.

El polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un sustrato para una GalNAc-transferasa.

El polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que al menos 3 aminoácidos se encuentra en entre dicho O* y un resto de lisina (K) o arginina (R).

El polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido precursor es un polipéptido terapéutico.

El polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido precursor es un miembro seleccionado entre proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15), neurotrofina-3 (NT-3), proteasa del factor von Willebrand (vWF), eritropoyetina (EPO), α₁-antitripsina (inhibidor de la proteasa α-1), glucocerebrosidasa, activador de plasminógenos de tipo celular (TPA), leptina, hirudina, uroquinasa, Dnasa humana, insulina, proteína de superficie de la hepatitis B (HbsAg), toxina-IL-2 de difteria quimérica, gonadotropina coriónica humana (hCG), peroxidasa tiroidea (TPO), alfa-galactosidasa, alfa-L-iduronidasa, beta-glucosidasa, alfa-galactosidasa A, α-glucosidasa ácida (maltasa ácida), anti-trombina III (AT III), hormona de estimulación de folículos, péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2), Factor VII, Factor VIII, Factor VII con el dominio B suprimido, Factor IX, Factor X, Factor XIII, proquetina, extendina-4, CD4, receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), α-CD20, ligando-1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), complemento, transferrina, molécula de adhesión celular dependiente de la glicosilación (GlyCAM), molécula de adhesión de células neurales (N-CAM), proteína de fusión de la región Fc de IgG del receptor de TNF, anticuerpo monoclonal anti-HER2, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para TNF-α, anticuerpo monoclonal para glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo monoclonal para CD20, anticuerpo monoclonal para VEGF-A, anticuerpo monoclonal para PSGL-1, anticuerpo monoclonal para CD4, anticuerpo monoclonal para α-CD3, anticuerpo monoclonal para EGF, anticuerpo monoclonal para antígeno carcinoembrionario (CEA) y anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-2.

Un ácido nucleico aislado que codifica dicho polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento.

Un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento.

Una célula que comprende dicho ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento.

Un polipéptido del secuón que corresponde a un polipéptido precursor, en el que dicho polipéptido del secuón comprende una secuencia de glicosilación con unión en O exógena seleccionada entre: XPO*P, XPO*EI(P)_n, (X)_mPO*EI, XPO*QA(P)_n, XPO*TVS, (X)_mPO*TVSP, XPO*QGA, (X)_mPO*QGAP, XPO*QGAM(P)_n, XTEO*P, (X)_mPO*VL, XPO*VL(P)_n, XPO*TVL, (X)_mPO*TVLP, (X)_mPO*TLVVP, XPO*TLVYV(P)_n, (X)_mPO*LS(P)_n, (X)_mPO*DA(P)_n, (X)_mPO*EN(P)_n, (X)_mPO*QD(P)_n, (X)_mPO*AS(P)_n, XPO*SAV, (X)_mPO*SAVP, (X)_mPO*SG(P)_n, XTEO*P y (X)_mPO*DG(P)_n, en las que m y n son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1; O* es un

miembro seleccionado entre serina (S) y treonina (T); X es un miembro seleccionado entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga; cada S (serina) está sustituida opcional e independientemente con T (treonina); y cada T (treonina) está sustituida opcional e independientemente con S (serina).

- 5 El polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O es un sustrato para GalNAc-transferasa.

- 10 El polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que al menos 3 aminoácidos se encuentra en entre dicho O* y un resto de lisina (K) o un resto de arginina (R).

El polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido precursor es un polipéptido terapéutico.

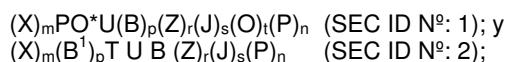
- 15 El polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido precursor es un miembro seleccionado entre proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15), neurotrofina-3 (NT-3), proteasa del factor von Willebrand (vWF), eritropoyetina (EPO), factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón beta, interferón gamma, α_1 -antitripsina (inhibidor de la proteasa α_1), glucocerebrosidasa, activador de plasminógenos de tipo celular (TPA), interleuquina-2 (IL-2), leptina, hirudina, uroquinasa, Dnasa humana, insulina, proteína de superficie de la hepatitis B (HbsAg), toxina-IL-2 de difteria quimérica, gonadotropina coriónica humana (hCG), peroxidasa tiroidea (TPO), alfa-galactosidasa, alfa-L-iduronidasa, beta-glucosidasa, alfa-galactosidasa A, α -glucosidasa ácida (maltasa ácida), anti-trombina III (AT III), hormona de estimulación de folículos (FSH), péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2). Factor VII, Factor VIII, Factor VII con el dominio B suprimido, Factor IX, Factor X, Factor XIII, proquetina, extendina-4, CD4, receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), α -CD20, ligando-1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), complemento, transferrina, molécula de adhesión celular dependiente de la glicosilación (GlyCAM), molécula de adhesión de células neurales (N-CAM), proteína de fusión de la región Fc de IgG del receptor de TNF, anticuerpo monoclonal anti-HER2, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para TNF- α , anticuerpo monoclonal para glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo monoclonal para CD20, anticuerpo monoclonal para VEGF-A, anticuerpo monoclonal para PSGL-1, anticuerpo monoclonal para CD4, anticuerpo monoclonal para α -CD3, anticuerpo monoclonal para EGF, anticuerpo monoclonal para antígeno carcinoembrionario (CEA) y anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-2.
- 30

Un ácido nucleico aislado que codifica dicho polipéptido del secuón de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento.

- 35 Un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento.

Una célula que comprende dicho ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento.

- 40 Una biblioteca de polipéptidos del secuón que comprende una pluralidad de miembros diferentes, en los que cada miembro de dicha biblioteca corresponde a un polipéptido precursor común y en los que cada miembro de dicha biblioteca comprende una secuencia de glicosilación con unión en O exógena, en la que cada una de dicha secuencia de glicosilación con unión en O eso miembros seleccionados independientemente entre SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2:



- 45 en las que m, n, p, r, s y t son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1; P es prolina; O* es un miembro seleccionado entre serina (S) y treonina (T); U es un miembro seleccionado entre prolina (P), ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga; X, B y B¹ son miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga; y Z, J y O son miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S), tirosina (Y), metionina (M) y aminoácidos sin carga.
- 50

- La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en la que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre: (X)_mPTP, (X)_mPTEI(P)_n, (X)_mPTQA(P)_n, (X)_mPTINT(P)_n, (X)_mPTTVS(P)_n, (X)_mPTTVL(P)_n, (X)_mPTQGAM(P)_n, (X)_mTET(P)_n, (X)_mPTVL(P)_n, (X)_mPTLS(P)_n, (X)_mPTDA(P)_n, (X)_mPTEN(P)_n, (X)_mPTQD(P)_n, (X)_mPTAS(P)_n, (X)_mPTQGA(P)_n, (X)_mPTSAV(P)_n, (X)_mPTTLYV(P)_n, (X)_mPSSG(P)_n y (X)_mPSDG(P)_n, en las que m y n son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1; P es prolina; y X es un miembro seleccionado independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina
- 55

(S) y aminoácidos sin carga.

La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre: PTP, PTEI, PTEIP, PTQA, PTQAP, PTI NT, PTINTP, PTTVS, PTTVL, PTQGAM, PTQGAMP y TETP.

- 5 La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en las que cada miembro de dicha biblioteca comprende la misma secuencia de glicosilación con unión en O en una posición del aminoácido diferente dentro de dicho polipéptido precursor.

10 La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en las que cada miembro de dicha biblioteca comprende una secuencia de glicosilación con unión en O diferente en la misma posición del aminoácido dentro de dicho polipéptido precursor.

15 La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en la que dicho polipéptido precursor tiene m aminoácidos, correspondiendo cada aminoácido a una posición del aminoácido, comprendiendo dicha biblioteca: (a) un primer polipéptido del secuón que tiene dicha secuencia de glicosilación con unión en O en una primera posición del aminoácido (AA)_n, en el que n es un miembro seleccionado de 1 a m; y (b) al menos un polipéptido del secuón adicional, teniendo cada polipéptido del secuón adicional dicha secuencia de glicosilación con unión en O en una posición del aminoácido adicional, que es un miembro seleccionado entre (AA)_{n+x} y (AA)_{n-x}, en los que x es un miembro seleccionado de 1 a (m-n).

20 La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende un segundo polipéptido del secuón que tiene dicha secuencia de glicosilación con unión en O en una segunda posición del aminoácido seleccionada entre (AA)_{n+p} y (AA)_{n-p}, en los que p se selecciona de 1 a 10.

La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en la que cada una de dicha posición del aminoácido adicional es adyacente a una posición del aminoácido seleccionado previamente.

- 25 La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O es un sustrato para una GalNAc-transferasa.

La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en la que dicha GalNAc-transferasa es un miembro seleccionado entre GalNAc-T2 con el dominio de lectina suprimido y GalNAc-T2 con el dominio de lectina truncado.

- 30 La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido precursor es un polipéptido terapéutico.

35 La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido precursor es un miembro seleccionado entre proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15), neurotrofina-3 (NT-3), proteasa del factor von Willebrand (vWF), eritropoyetina (EPO), factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón beta, interferón gamma, α_1 -antitripsina (inhibidor de la proteasa α_1), glucocerebrosidasa, activador de plasminógenos de tipo celular (TPA), interleuquina-2 (IL-2), leptina, hirudina, uroquinasa, Dnasa humana, insulina, proteína de superficie de la hepatitis B (HbsAg), toxina-IL-2 de difteria quimérica, gonadotropina coriónica humana (hCG), peroxidasa tiroidea (TPO), alfa-galactosidasa, alfa-L-iduronidasa, beta-glucosidasa, alfa-galactosidasa A, α -glucosidasa ácida (maltasa ácida), anti-trombina III (AT III), hormona de estimulación de folículos (FSH), péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2), Factor VII, Factor VIII, Factor VII con el dominio B suprimido, Factor IX, Factor X, Factor XIII, proquinetisina, extendina-4, CD4, receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), α -CD20, ligando-1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), complemento, transferrina, molécula de adhesión celular dependiente de la glicosilación (GlyCAM), molécula de adhesión de células neurales (N-CAM),
45 proteína de fusión de la región Fc de IgG del receptor de TNF, anticuerpo monoclonal anti-HER2, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para TNF- α , anticuerpo monoclonal para glicoproteína Mb/Mla, anticuerpo monoclonal para CD20, anticuerpo monoclonal para VEGF-A, anticuerpo monoclonal para PSGL-1, anticuerpo monoclonal para CD4, anticuerpo monoclonal para α -CD3, anticuerpo monoclonal para EGF, anticuerpo monoclonal
50 para antígeno carcinoembrionario (CEA) y anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-2.

Un procedimiento que comprende: expresar un polipéptido del secuón en una célula huésped, correspondiendo dicho polipéptido del secuón a un polipéptido precursor y que comprende una secuencia de glicosilación con unión en O exógena seleccionada entre SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2:

- 55 $(X)_m PO^*U(B)_p(Z)_r(J)_s(O)_t(P)_n$ (SEC ID N°: 1); y
 $(X)_m(B^1)_p TUB(Z)_r(J)_s(P)_n$ (SEC ID N°: 2);

5 en las que m, n, p, r, s y t son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1; P es prolina; O* es un miembro seleccionado entre serina (S) y treonina (T); U es un miembro seleccionado entre prolina (P), ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga; X, B y B¹ son miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga; y Z, J y O son miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S), tirosina (Y), metionina (M) y aminoácidos sin carga, con la condición de que dicho polipéptido precursor no sea un miembro seleccionado entre hormona de crecimiento humano (hGH), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón-*alfa* (INF-*alfa*), péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

10 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende adicionalmente aislar dicho polipéptido del secuón.

15 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende adicionalmente glicosilar enzimáticamente dicho polipéptido del secuón en dicha secuencia de glicosilación con unión en O.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha glicosilación enzimática se consigue usando una glicosiltransferasa.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha glicosiltransferasa es GalNAc-T2.

20 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha GalNAc-T2 es un miembro seleccionado entre GalNAc-T2 con el dominio de lectina suprimido y GalNAc-T2 con el dominio de lectina truncado.

25 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende adicionalmente generar un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido del secuón.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende adicionalmente transfectar dicha célula huésped con dicho vector de expresión.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido precursor es un polipéptido terapéutico.

30 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido precursor es un miembro seleccionado entre proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15), neurotrofina-3 (NT-3), proteasa del factor von Willebrand (vWF), eritropoyetina (EPO), α_1 -antitripsina (inhibidor de la proteasa α_1), glucocerebrosidasa, activador de plasminógenos de tipo celular (TPA), leptina, hirudina, uroquinasa, Dnasa humana, insulina, proteína de superficie de la hepatitis B (HbsAg), toxina-IL-2 de difteria quimérica, gonadotropina coriónica humana (hCG), peroxidasa tiroidea (TPO), alfa-galactosidasa, alfa-L-iduronidasa, beta-glucosidasa, alfa-galactosidasa A, α -glucosidasa ácida (maltasa ácida), anti-trombina III (AT III), hormona de estimulación de foliculos (FSH), péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2), Factor VII, Factor VIII, Factor VII con el dominio B suprimido, Factor IX, Factor X, Factor XIII, proquinetisina, extendina-4, CD4, receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), α -CD20, ligando-1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), complemento, transferrina, molécula de adhesión celular dependiente de la glicosilación (GlyCAM), molécula de adhesión de células neurales (N-CAM), proteína de fusión de la región Fc de IgG del receptor de TNF, anticuerpo monoclonal anti-HER2, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para TNF- α , anticuerpo monoclonal para glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo monoclonal para CD20, anticuerpo monoclonal para VEGF-A, anticuerpo monoclonal para PSGL-1, anticuerpo monoclonal para CD4, anticuerpo monoclonal para α -CD3, anticuerpo monoclonal para EGF, anticuerpo monoclonal para antígeno carcinoembrionario (CEA) y anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-2.

50 Un procedimiento para fabricar un conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende las etapas de: (i) producir de forma recombinante dicho polipéptido del secuón; y (ii) glicosilar enzimáticamente dicho polipéptido del secuón en dicha secuencia de glicosilación con unión en O.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha glicosilación enzimática de la etapa (ii) se consigue usando una GalNAc transferasa.

55 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha GalNAc transferasa es GalNAc-T2 humana.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha GalNAc-T2 es un miembro seleccionado entre GalNAc-T2 con el dominio de lectina suprimido y GalNAc-T2 con el dominio de lectina truncado.

- 5 Un procedimiento para fabricar una biblioteca de polipéptidos del secúon de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, comprendiendo dicho procedimiento: (i) producir de forma recombinante un primer polipéptido del secúon mediante la introducción de dicha secuencia de glicosilación con unión en O en una primera posición del aminoácido (AA)_n; y (ii) producir de forma recombinante al menos un polipéptido del secúon adicional mediante la introducción de dicha secuencia de glicosilación con unión en O en una posición del aminoácido adicional seleccionada entre (AA)_{n+x} y (AA)_{n-x}, en los que x es un miembro
10 seleccionado de 1 a (m-n). Un procedimiento para identificar un polipéptido de dirección, comprendiendo dicho procedimiento: (i) generar una biblioteca de polipéptidos del secúon de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento; y (ii) someter al menos un miembro de dicha biblioteca a una reacción de glicosilación enzimática, transfiriendo un resto de glicosilo a partir de una molécula dadora de glicosilo en al menos una de dicha secuencia de glicosilación con unión en O, en la que dicho resto de glicosilo se
15 derivatiza opcionalmente con un grupo de modificación, identificando de ese modo dicho polipéptido de dirección.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende adicionalmente medir el rendimiento para dicha reacción de glicosilación enzimática para al menos un miembro de dicha biblioteca.

- 20 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha medida se consigue con un miembro seleccionado entre espectroscopía de masas, electroforesis en gel, resonancia magnética nuclear (RMN) y HPLC.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho rendimiento para dicho polipéptido de dirección está entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 100 %.

- 25 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende adicionalmente, antes de la etapa (ii), purificar al menos un miembro de dicha biblioteca.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho resto de glicosilo de la etapa (ii) comprende un miembro seleccionado entre un resto de galactosa y un resto de GalNAc.

- 30 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha reacción de glicosilación enzimática de la etapa (ii) se produce dentro de una célula huésped, en la que se expresa dicho al menos un miembro de dicha biblioteca.

- 35 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende adicionalmente: (iii) someter el producto de la etapa (ii) a una reacción de PEGilación, en la que dicha reacción de PEGilación es un miembro seleccionado entre una reacción de PEGilación química y una reacción de glicoPEGilación enzimática.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que la etapa (ii) y la etapa (iii) se realizan en un solo recipiente de reacción.

- 40 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende adicionalmente medir el rendimiento de dicha reacción de PEGilación.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicha medida se consigue con un miembro seleccionado entre espectroscopía de masas, electroforesis en gel, resonancia magnética nuclear (RMN) y HPLC.

- 45 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho rendimiento de dicha reacción de PEGilación para dicho polipéptido de dirección está entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 100 %.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido de dirección después de dicha reacción de PEGilación tiene una actividad terapéutica sustancialmente igual que la actividad terapéutica de dicho polipéptido precursor.

- 50 El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, en el que dicho polipéptido de dirección después de dicha reacción de PEGilación tiene una actividad terapéutica distinta de la actividad terapéutica de dicho polipéptido precursor.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende adicionalmente generar un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos

nucleicos que codifica dicho polipéptido del secuón.

El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones que se han expuesto anteriormente en el presente documento, que comprende adicionalmente transfectar dicha célula huésped con dicho vector de expresión.

Sin pretender limitar al ámbito de la invención, en la que cada una de las realizaciones que se han expuesto anteriormente (por ejemplo, las que se refieren a procedimientos para fabricar polipéptidos del secuón, procedimientos para fabricar bibliotecas y procedimientos para identificar polipéptidos del secuón), en general son preferentes las siguientes realizaciones ejemplares: En una realización ejemplar, en la que el polipéptido precursor es el péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1), la secuencia de glicosilación con unión en O no se selecciona preferentemente entre PTQ, PTT, PTQA, PTQG, PTQGA, PTQGAMP, PTQGAM, PTINT, PTQAY, PTTLY, PTGSLP, PTTSEP, PTAVIP, PTSSEP, PTTLYP, PTVLP, TETP, PSDGP y PTEVP. En otra realización ejemplar, en la que el polipéptido precursor es GLP-1 de tipo silvestre, la secuencia de glicosilación con unión en O no se selecciona preferentemente entre PTQ, PTT, PTQA, PTQG, PTQGA, PTQGAMP, PTQGAM, PTINT, PTQAY, PTTLY, PTGSLP, PTTSEP, PTAVIP, PTSSEP, PTTLYP, PTVLP, TETP, PSDGP y PTEVP. En otra realización ejemplar, en la que el polipéptido precursor es GLP-1 de tipo silvestre, la secuencia de glicosilación con unión en O no se selecciona preferentemente entre PTQ, PTT, PTQA, PTQG, PTQGA, PTQGAMP, PTQGAM, PTINT, PTQAY, PTTLY, PTGSLP, PTTSEP, PTAVIP, PTSSEP, PTTLYP, PTVLP, TETP, PSDGP y PTEVP, a menos que la secuencia de glicosilación con unión en O no se diseñe alrededor de un resto de prolina que está presente en el polipéptido G-CSF de tipo silvestre.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente a modo de ilustración y no pretenden limitar el ámbito de la invención. Los expertos en la materia reconocerán rápidamente una diversidad de parámetros no críticos que se podrían cambiar o modificar para producir sustancialmente los mismos resultados. Aunque el procedimiento se ejemplifica por referencia a BMP-7 humano y NT-3 humano, los expertos en la materia observarán que se pueden incorporar sitios de glicosilación en las secuencias peptídicas de otras proteínas que incluyen otras proteínas morfogenéticas óseas y neurotrofinas, por ejemplo BMP-2, de la forma que se expone a continuación.

Ejemplo 1: Incorporación de sitios de glicosilación en proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7)

1.1. información de la secuencia **BMP-7**

A continuación se muestra una secuencia de BMP-7 ejemplar (S.1).

Proteína morfogenética Ósea Humana 7 (SEC ID N°: **)

M¹STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLN
AISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

La metionina N-terminal puede estar presente o ausente en cualquier mutante de BMP-7. En este ejemplo, la numeración de los restos de aminoácidos se basa en la secuencia sin modificar inicial en la que el resto que está más a la izquierda, metionina (M), se numera como posición 1. Para resaltar cómo la secuencia mutante difiere con respecto a la secuencia sin modificar, la numeración de aminoácidos sin modificar tal como aparecen en las secuencias mutantes a continuación se mantiene sin cambios después de la modificación. Puede estar presente en más de una de las modificaciones de la secuencia descritas en un mutante de BMP-7 de la presente invención.

Las regiones preferentes para introducción de mutaciones para crear un sitio o sitios de glicosilación no presente en el polipéptido de tipo silvestre son las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos 1-6, 10-21, 27-36, 55-65, 73-80, 75-85 y 117-125. Se puede usar la exploración del secuón usando cualquiera de las secuencias de glicosilación con unión en O mutantes de la invención, por ejemplo PTP o PTINT, para insertar un nuevo sitio o sitios de glicosilación en el polipéptido precursor de BMP-7.

Este ejemplo describe mutaciones de secuencias de aminoácidos que introducen secuencias de glicosilación con unión en O, por ejemplo, restos de serina o treonina, en la secuencia de la Proteína 7 Morfogenética Ósea de tipo silvestre. Se generó un número de polipéptidos de BMP-7 mutante por introducción de secuencias de glicosilación con unión en O en 7 regiones diferentes de la secuencia peptídica, incluyendo el extremo amino. La exploración del secuón se realizó a través de las dos regiones de bucle entre los aminoácidos 72-86 y 96-103 usando las secuencias de glicosilación con unión en O, PTP y PTINT, respectivamente. Se prepararon cuerpos de inclusión para todos los mutantes de BMP-7.

1.2. Mutaciones de M¹STGSK

En estos mutantes amino-terminales de BMP-7, la secuencia M¹STGSK de tipo silvestre (SEC ID N°: **) se substituyó

tanto con inserciones de aminoácidos como con sustituciones de aminoácidos. Las mutaciones preferentes incluyen:

M ¹ FPSTGSK	(SEC ID N ^o : **), C.1
M ¹ FPTTGSK	(SEC ID N ^o : **), C.2
M ¹ FPSTGSA	(SEC ID N ^o : **), C.3
M ¹ FPTINTK	(SEC ID N ^o : **), C.4
M ¹ FPTINTA	(SEC ID N ^o : **), C.5

En este ejemplo, se incluyó fenilalanina (F) en la secuencia de glicosilación con unión en O con el fin de mejorar los rendimientos de la expresión de *E. coli* para los mutantes N-terminales.

1.3. Mutaciones de Q⁹NRSKTP¹⁶KNQEA

- 5 En estos mutantes de BMP-7, el Q⁹NRSKTP¹⁶KNQEA de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) se sustituyó con restos o inserciones de aminoácidos que crean sitio(s) de glicosilación en la proximidad de la prolina 16. Los ejemplos precedentes incluyen:

Q ⁹ NGTETP ¹⁶ KNQEA	(SEC ID N ^o : **), C.6
Q ⁹ NRSKTP ¹⁶ TNQEA	(SEC ID N ^o : **), C.7
Q ⁹ NRSKTP ¹⁶ TINTA	(SEC ID N ^o : **), C.8
Q ⁹ NRSATP ¹⁶ TINTA	(SEC ID N ^o : **), C.9
Q ⁹ NRSATP ¹⁶ TTVSA	(SEC ID N ^o : **), C.10

1.4. Mutaciones de VAEN³⁰SSDQR

- 10 En estos mutantes, la secuencia VAEN³⁰SSDQR de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) se sustituyó con restos de aminoácidos que crean sitio(s) de glicosilación. Los ejemplos preferentes incluyen:

VAEP ³⁰ SSDQR	(SEC ID N ^o : **), C. 11
VAEP ³⁰ TSADQR	(SEC ID N ^o : **), C. 12
VATP ³⁰ TSADQR	(SEC ID N ^o : **), C. 13

1.5. Mutaciones de DWIAP⁶⁰EGYAA

En estos mutantes de BMP-7, la secuencia DWIAP⁶⁰EGYAA de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) se sustituyó con restos de aminoácidos que crean sitio(s) de glicosilación. Los ejemplos preferentes incluyen:

DWIIAP ⁶⁰ TGYAA	(SEC ID N ^o : **), C. 14
DWIIAP ⁶⁰ TINTA	(SEC ID N ^o : **), C. 15
DWIIAP ⁶⁰ TTVSA	(SEC ID N ^o : **), C. 16

1.6. Mutaciones de AFP⁷⁵LNSYM

En estos mutantes, la secuencia AFP⁷⁵LNSYM de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) se sustituyó con restos de aminoácidos que crean sitio(s) de glicosilación. Los ejemplos preferentes incluyen:

AFP ⁷⁵ TNSYM	(SEC ID N ^o : **), C. 17
AFP ⁷⁵ TINTM	(SEC ID N ^o : **), C. 18
AFP ⁷⁵ TTVSM	(SEC ID N ^o : **), C. 19
ASP ⁷⁵ TINTM	(SEC ID N ^o : **), C. 20

1.7. Mutaciones de P⁷⁵LNSYMNATNH

En estos mutantes de BMP-7, la secuencia P⁷⁵LNSYMNATNH de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) se sustituyó con restos de aminoácidos que crean sitio(s) de glicosilación. Los ejemplos preferentes incluyen:

P ^{/b} TQAP MNATNH	(SEC ID N ^o : **), C. 21
P ^{/b} TINTP NATNH	(SEC ID N ^o : **), C. 22
P ^{/b} TTVSP NATNH	(SEC ID N ^o : **), C. 23
P ^{/b} TEIP MNATNH	(SEC ID N ^o : **), C. 24
P ^{/b} LNSYPT ATNH	(SEC ID N ^o : **), C. 25
P ^{/b} LNSSPT INTH	(SEC ID N ^o : **), C. 26
P ^{/b} LNSPTINT NH	(SEC ID N ^o : **), C. 27
P ^{/b} LNSPTTVS NH	(SEC ID N ^o : **), C. 28

1.8. Mutaciones de YFDD¹²⁰SSNVI

En estos mutantes de BMP-7, la secuencia de tipo silvestre YFDD¹²⁰SSNVI (SEC ID N^o: **) se sustituyó con restos de aminoácidos que crean sitio(s) de glicosilación. Los ejemplos preferentes incluyen:

YFDP ¹²⁰ SSNVI	(SEC ID N ^o : **), C. 29
YFDP ¹²⁰ TTVSI	(SEC ID N ^o : **), C. 30
YFSP ¹²⁰ TTVSI	(SEC ID N ^o : **), C. 31

5 1.9. Exploración del Secuón dentro de BMP-7

En estos mutantes, dos regiones diferentes de la secuencia de BMP-7 se mutaron usando secuencias de glicosilación con unión en O de la invención. A continuación, las mutaciones en cada región se consideran por separado. Las mutaciones ejemplares incluyen:

Exploración del Secuón dentro de C⁷²AFPLNSYMNATHA usando PTP y PTINT:

- 10 En estos mutantes de BMP-7, aminoácidos de la secuencia C⁷²AFPLNSYMNATHA de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) se sustituyeron con PTP o PTINT, y la mutación se exploró a través de toda la región de creación de secuencia o secuencias de glicosilación dentro de cada mutante. Los ejemplos incluyen:

Exploración del Secuón ejemplar usando PTP:

C ^{/2} PTP NSYMNATHA	(SEC ID N ^o : **), C. 32
C ^{/2} AFPTP SYMNATHA	(SEC ID N ^o : **), C. 33
C ^{/2} AFPPTP YMNATHA	(SEC ID N ^o : **), C. 34
C ^{/2} AFPLPTP MNATHA	(SEC ID N ^o : **), C. 35
C ^{/2} AFPLNPTP NATHA	(SEC ID N ^o : **), C. 36
C ^{/2} AFPLNSPTP ATHA	(SEC ID N ^o : **), C. 37
C ^{/2} AFPLNSYPTP THA	(SEC ID N ^o : **), C. 38
C ^{/2} AFPLNSYMP TPHA	(SEC ID N ^o : **), C. 39
C ^{/2} AFPLNSYMNPTP A	(SEC ID N ^o : **), C. 40
C ^{/2} AFPLNSYMNAPT P	(SEC ID N ^o : **), C. 41

- 15 *Exploración del Secuón ejemplar usando PTINT:*

C ^{/2} APTINT YMNATHA	(SEC ID N ^o : **), C. 42
C ^{/2} AFPTINT MNATHA	(SEC ID N ^o : **), C. 43
C ^{/2} AFPPTINT NATHA	(SEC ID N ^o : **), C. 44
C ^{/2} AFPLPTINT ATHA	(SEC ID N ^o : **), C. 45
C ^{/2} AFPLNPTINT THA	(SEC ID N ^o : **), C. 46
C ^{/2} AFPLNSPTINT HA	(SEC ID N ^o : **), C. 47

C^{1/2}AFPLNSYPTINTA (SEC ID N^o: **), C. 48
 C^{1/2}AFPLNSYMPINT (SEC ID N^o: **), C. 49

Exploración del Secuón dentro de N⁹⁶PETVPKPCC usando PTP y PTINT:

En estos mutantes, la secuencia de tipo silvestre N⁹⁶PETVPKPCC (SEC ID N^o: **) se sustituyó con PTP or PTINT, y la mutación se exploró a través de toda la región que crea el sitio o sitios de glicosilación dentro de cada mutante. Los ejemplos preferentes incluyen:

Exploración del Secuón ejemplar usando PTP:

P⁹⁶TPTVPKPCC (SEC ID N^o: **), C. 50
 N⁹⁶PTPVPKPCC (SEC ID N^o: **), C. 51
 N⁹⁶PTPPKPCC (SEC ID N^o: **), C. 52
 N⁹⁶PEPTPKPCC (SEC ID N^o: **), C. 53
 N⁹⁶PETPTPPCC (SEC ID N^o: **), C. 54
 N⁹⁶PETVPTPCC (SEC ID N^o: **), C. 55

Exploración del Secuón ejemplar usando PTINT:

P⁹⁶TINTPKPCC (SEC ID N^o: **), C. 56
 N⁹⁶PTINTKPCC (SEC ID N^o: **), C. 57
 N⁹⁶PTINTPCC (SEC ID N^o: **), C. 58
 N⁹⁶PEPTINTCC (SEC ID N^o: **), C. 59

10 **1.10. Purificación de Mutantes de BMP-7**

Todos los mutantes C.1 a C.59 de BMP-7 se trataron de acuerdo con las siguientes etapas: (a) Fermentación, (b) lisis celular, (c) aislamiento de cuerpo de inclusión (IB) (por ejemplo, por centrifugación), (d) solubilización de IB, (e) purificación de IB (por ejemplo, S-sefarsa), y (f) replegamiento de IB.

Ejemplo 2: Incorporación de secuencias de glicosilación en neutrotrofina-3 (NT-3)

15 **2.1. Información de la secuencia de NT-3**

Una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre ejemplar (S.2) de NT-3 humano se muestra a continuación.

Neutrotrofina-3 Humana (SEC ID N^o: **):

MYAEHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYETR
 CKEARPVKNGCRGIDDKHWSQCKTSQTYVRALTSENNKLVGWRWIRIDTSCVCAL
 SRKIGRT

20 Este ejemplo describe mutaciones de secuencias de aminoácidos que introducen secuencias de glicosilación con unión en O en la secuencia S.2 de NT-3 de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) o cualquier versión modificada (por ejemplo, mutada previamente) de la misma. Se creó un número de mutantes introduciendo sitios de glicosilación con unión en O en 3 regiones de bucle así como el extremo amino.

25 La metionina N-terminal (M) puede estar presente o ausente en cualquier mutante de NT-3. En este ejemplo, la numeración de los restos de aminoácidos se basa en la secuencia inicial sin modificar en la que el resto N-terminal, metionina (M), se numera como posición 1. Para resaltar cómo difiere la secuencia mutante con respecto a la secuencia sin modificar, la numeración de los aminoácidos sin modificar tal como aparecen en las secuencias mutantes a continuación permanece sin cambiar después de la modificación. En un mutante de NT-3 de la presente invención pueden estar presentes más de una de las modificaciones de las secuencias descritas.

Las regiones preferentes para la introducción de mutaciones para crear una secuencia de glicosilación de la invención dentro del polipéptido de NT-3 son las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos 1-9, 22-30, 45-54 y 91-99 de la secuencia de aminoácidos (S.2) de NT-3 de tipo silvestre.

2.2. Mutación de M¹YAEHKSHR

- 5 En estos mutantes amino-terminales, la secuencia M¹YAEHKLSHR de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) se sustituye tanto con inserciones de aminoácidos como con sustituciones de aminoácidos. Las mutaciones ejemplares incluyen:

M¹FPTEIPLSR (SEC ID N^o: **), A.1

M¹FPTEIPSHR (SEC ID N^o: **), A.2

2.3. Mutación de VTDK²⁵SSAID

- 10 En estos mutantes, la secuencia VTDK²⁵SSAID de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) se sustituye con restos de aminoácidos que crean secuencia(s) de glicosilación. Los ejemplos preferentes incluyen:

VTDP²⁵TINTD (SEC ID N^o: **), A.3

VTDP²⁵TTVSD (SEC ID N^o: **), A.4

VTDP²⁴TTVSID (SEC ID N^o: **), A.5

2.4. Mutación de GNSP⁴⁸VKQYFY

En estos mutantes, la secuencia GNSP⁴⁸VKQYFY de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) se sustituye con restos de aminoácidos que crean secuencia(s) de glicosilación. Los ejemplos preferentes incluyen:

GNSP⁴⁸TTVSFY (SEC ID N^o: **), A.6

GNSP⁴⁸TINTFY (SEC ID N^o: **), A.7

GNAP⁴⁸TINTFY (SEC ID N^o: **), A.8

15

2.5. Mutación de TSE⁹³NNKLVG

En estos mutantes, la secuencia TSE⁹³NNKLVG de tipo silvestre (SEC ID N^o: **) se sustituye con restos de aminoácidos que crean secuencia(s) de glicosilación. Los ejemplos preferentes incluyen:

TSP⁹³TINTVG (SEC ID N^o: **), A. 9

TAP⁹³TINTVG (SEC ID N^o: **), A. 10

TSP⁹³TTVSVG (SEC ID N^o: **), A. 11

TAP⁹³TTVSVG (SEC ID N^o: **), A. 12

TSP⁹³TQGAVG (SEC ID N^o: **), A. 13

TAP⁹³TQGAVG (SEC ID N^o: **), A. 14

TSE⁹³PTINTG (SEC ID N^o: **), A. 15

TSE⁹³PTTVSG (SEC ID N^o: **), A. 16

20 2.6. Expresión y purificación de mutantes de NT-3 humano

Expresión

Se sometió a ensayo una diversidad de mutantes de NT-3 por su capacidad de expresión en W3110 de *E. coli*. a 37 °C. Resultado: Se expresaron todos los mutantes A.1 a A.16 sometidos a ensayo (SEC ID N^o: **). Después de la lisis celular, se aislaron cuerpos de inclusión por centrifugación.

25 Solubilización y sulfitolización de cuerpos de inclusión de hNT-3

El sedimento de IB lavado se solubilizó con 100 mg/ml en un tampón que contenía Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, sulfito sódico 100 mM, tetratiónato sódico 10 mM, y urea 7,5 M. La solubilización se realizó por

agitación a temperatura ambiente durante ~20 min. La suspensión se agitó adicionalmente a 4 °C durante un periodo adicional de 2 h. Se añadió PEI (polietilenimina) hasta una concentración final de un 0,15 % y se agitó a 4 °C durante ~1 h seguido de incubación durante otra hora. La mezcla se centrifugó durante 30 min a 5000 rpm/4 °C usando una centrífuga Sorvall RC-3B. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm, se diluyó al menos 10 veces con tampón de equilibrio SP-Sepharose Fast Flow (SPFF) (acetato sódico 50 mM, urea 5 M, pH 5) y a continuación se cargó en una columna de SPFF. La columna se lavó con el tampón de equilibrio. La proteína se eluyó con MOPS 50 mM, urea 5 M, Glicina 10 mM, pH 7,0.

Replegamiento y purificación de mutantes de hNT-3

El tampón de replegamiento estaba formado por Tris 0,1 M, urea 2 M, NaCl 0,1 M, PEG300 al 15 %, glicina 10 mM, etanolamina 25 mM, pH 9,1. Se combinaron las fracciones del pico principal a partir de SPFF y se diluyó en el tampón de replegamiento a una concentración de 0,1 mg/ml. El replegamiento comenzó mediante la adición de L-Cisteína hasta aproximadamente 5 mM y se incubó durante 5 días a 4 °C con agitación suave.

El pH de la combinación relegada se ajustó a pH 7, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se cargó en una columna de cromatografía de intercambio catiónico Macrorep High S equilibrada con fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. La proteína se eluyó en el mismo tampón con un gradiente lineal de concentraciones crecientes de NaCl (0-1,5 M) y cloruro de tetrametilamonio (TMAC, 0-0,25M). Se recogió la proteína en el pico principal y se usó para estudios de glicosilación y GlicoPEGilación.

2.7. GlicoPEGilación de mutantes de hNT-3

Identificación sistemática de mutantes de hNT-3 para glicosilación y glicoPEGilación

Todas las proteínas mutantes de hNT-3 se purificaron usando cromatografía High S y a continuación se intercambiaron en un tampón de reacción que contenía Tris HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 20 mM, polisorbato 80 al 0,001 % y NaN₃ al 0,02 %. La adición de GalNAc a las proteínas se realizó a 32 °C durante una noche en 50 µl de reacción formada por ~1 mg/ml de hNT-3, 50 mU de GalNAc-T2/mg hNT-3, UDP-GalNAc 0,7 mM, y MnCl₂ 0,7 mM. La incorporación de GalNAc se controló por MALDI. Una diversidad de mutantes dentro de A.1-A.16 (SEC ID N^{es} **) se glicosiló de forma eficaz mediante la adición de GalNAc. Para estos mutantes, se encontró que la velocidad de glicosilación era superior a un 50 %.

Cuando finalizó, la mezcla de reacción dividió en dos alícuotas iguales. Se usó una alícuota para la PEGilación directa catalizada por ST6GalNAcI. Se añadió solución de reserva de SA-CMP-PEG con PEG de diferentes tamaños (20 K, 30 K y 40 K ramificado (NOF)) hasta una relación molar final de aproximadamente 3:1 con respecto a hNT-3. Se añadió ST6GalNAcI hasta una concentración final de al menos 20 mU/mg de hNT-3. La reacción se realizó a 32 °C y la PEGilación se sometió a ensayo por SDS-PAGE.

La segunda alícuota se mezcló con la mezcla de enzimas formadas por solución de reserva de UDP-Gal (42 mM), Core-1-GalTI (1,4 U/ml), y tampón de reacción que se ha descrito anteriormente. La galactosilación se realizó a 32 °C durante una noche y la incorporación del grupo galactosilo se controló por MALDI. Cuando la galactosilación se completó, se añadió solución de reserva de SA-CMP-PEG con PEG de diferentes tamaños (20 K, 30 K y 40 K ramificado (NOF)) hasta una relación molar final de aproximadamente 3:1 con respecto a hNT-3. Se añadió ST3Gall hasta una concentración final de al menos 20 mU/mg de hNT-3. La reacción se realizó a 32 °C y la PEGilación se sometió a ensayo por SDS-PAGE.

2.8. GlicoPEGilación preparativa y purificación de mutantes de hNT-3 modificados

La GlicoPEGilación preparativa de mutantes de hNT-3 seleccionados se consiguió en 3 etapas: (a) Adición de GalNAc catalizado por GalNAc-T2; (b) Incorporación de un grupo galactosilo catalizado por Core-1-GalT1; (c) Adición de SA-PEG de 20 KDa catalizado por ST3Gall.

A la solución de proteínas de hNT-3 que contenía aproximadamente 236 µg de proteína, se añadieron UDP-GalNAc (50 mM), MnCl₂ (100 mM), y GalNAc-T2 (2,1 U/ ml). La reacción se realizó a 32 °C durante ~20 horas y continuó 3 horas más después de suplemento con UDP-GalNAc (50 mM) y GalNAc-T2 (2,1 U/ml) para llevar la reacción a su finalización. A continuación se añadieron UDP-Gal (42 mM) y Core-1-GalT1 (1,4 U/ml) a la mezcla de reacción. La reacción se realizó a 32 °C durante una noche. El análisis de MALDI demostró una galactosilación de aproximadamente un 100 %. A continuación, se añadieron ST3Gall (0,65 U/ml) y SA-CMP-PEG de 20 K (0,1 mg/µl). se permitió que la incubación continuara durante una noche.

La mezcla de reacción se diluyó con agua hasta ~10 ml y se cargó en una columna Source 15S (~2 ml de CV), que se equilibró previamente con fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. La proteína se eluyó a 0,5 ml/min durante 80 min usando un gradiente lineal de fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, NaCl 1,5 M, TMAC 0,25 M. Las fracciones que contenían hNT-3 PEGylado se combinaron, se concentró y se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna SUPERDEX200.

2.9. Resumen de los Resultados

Los resultados de expresión, glicosilación *in vitro* y glicoPEGilación *in vitro* de mutantes de NT-3 humano seleccionados se resumen en la Tabla 16, dada a continuación.

Tabla 16: Glicosilación y glicoPEGilación *in vitro* de mutantes NT-3 humanos replegados

Mutante No.	Secuencia	Glicosilación	Glico-PEGilación	
A.1	M ¹ EPTEIPLSR	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K, 30 K, 40 K ramificado*)	SEC ID N°: **
A.2	M ¹ FPTEIPSHR	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K, 30 K, 40 K ramificado*)	SEC ID N°: **
A.3	VTDP ²⁵ TINTD	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K)	SEC ID N°: **
A.4	VTDP ²⁵ TTVSD	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K)	SEC ID N°: **
A.5	VTDP ²⁴ TVSID	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K)	SEC ID N°: **
A.6	GNSP ⁴⁸ TTVSFY	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K)	SEC ID N°: **
A.7	GNSP ⁴⁸ TINTFY	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K)	SEC ID N°: **
A.8	GNAP ⁴⁸ TINTFY	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K)	SEC ID N°: **
A.9	TSP ⁹³ TINTVG	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K)	SEC ID N°: **
A.10	TAP ⁹³ TINTVG	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K)	SEC ID N°: **
A.11	TSP ⁹³ TTVSVG	GalNAc	GalNAc-Gal-SA-PEG (20 K)	SEC ID N°: **
* 40 K-NOF-PEG				

5

Ejemplo 3: Expresión de BMP-7 Humano y NT-3 Humano Usando Diversos Vectores y Células Huésped de *E. coli*

La secuencia S.1 nativa de BMP-7 (SEC ID N°: **) y los mutantes C.1 a C.31 de BMP-7 que se han descrito anteriormente (SEC ID N°: **) (Ejemplo 1) así como la secuencia S.2 nativa de NT-3 (SEC ID N°: **) y los mutantes A.1-A.16 de NT-3 que se han descrito anteriormente (SEC ID N°: **) (Ejemplo 2) se pueden expresar usando una diversidad de vectores en diferentes células huésped de *E. coli*. Los resultados experimentales para las secuencias nativas se resumen en la Tabla 17, dada a continuación. Además, todos los mutantes C.1 a C.31 de BMP-7 (SEC ID N°: **) se expresaron en W3110 de *E. coli* a 37 °C como cuerpos de inclusión.

Tabla 17: Expresión de BMP-7 humano nativo (S.1) (SEC ID N°: **) y NT-3 nativo (S.2) (SEC ID N°: **) en *E. coli*

Proteína	Vector	Célula Huésped de <i>E. coli</i>	Temperatura de Inducción
BMP-7	pET24a	trxb,gor,supp-2 DE3	20 °C
BMP-7	pET24a	NovaBlue(DE3)	37 °C
BMP-7	pET24a	NovaBlue(DE3)	20 °C
BMP-7	pcWin2	W3110	37 °C
NT-3	pET24a	trxb,gor,supp-2 DE3	20 °C
NT-3	pcWin2	trxb,gor,supp-2	20 °C
NT-3	pcWin2	W3110	37 °C

15

BMP-7 y NT-3 o BMP-7 y NT-3 mutados se pueden glicosilar o glicoconjugar (véase el documento de patente WO 03/31464). Preferentemente, un BMP-7 o NT-3 mutado está glicoPEGilado, en los que un resto de polietilenglicol (PEG) se conjuga al polipéptido BMP-7 o NT-3 mutado a través de una unión de glicosilo (véase el documento de patente WO 03/31464). Se espera que la GlicoPEGilación de la proteína dé como resultado propiedades biofísicas mejoradas que pueden incluir, pero no se limitan a, mayor vida media, valores mayores de área bajo la curva (AUC), eliminación reducida, e inmunogenicidad reducida.

Ejemplo 4 no forma parte de la presente invención: Introducción de Secuencias de Glicosilación con unión en O en FGF-21

4.1. Información de la Secuencia

A continuación se muestra una secuencia de aminoácidos (S.3) para FGF-21 ejemplar.

Factor 21 de Crecimiento de Fibroblastos (FGF-21) (SEC ID N°: **)

MHP³IP⁵DSSP⁹LLQFGGQVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDDGTGVGGAADQSP⁵⁰ESLL
QLKALKP⁶¹GVIQILGVKTSRFLCQRP⁷⁹DGALYGSLHFD⁹¹EACSFRELLLEDGYNVY
QSEAHGLP¹¹⁶LHLP¹²⁰GNKSP¹²⁵HRDP¹²⁹AP131RGP¹³⁴ARFLP¹³⁹LP¹⁴¹GLP¹⁴⁴P¹⁴⁵ALP¹⁴⁸E
P¹⁵⁰P¹⁵¹GILAP¹⁵⁶QP¹⁵⁸P¹⁵⁹DVGSSDP¹⁶⁶LSMVGP¹⁷²SQGRSP¹⁷⁸SYAS

Se preparó y examinó un total de 48 mutantes de O-glicosilación. Las secuencias de glicosilación con unión en O mutantes se introdujeron en el polipéptido precursor mediante construcción de mutaciones alrededor de los restos de prolina existentes. Se pudieron glicosilar y glicoPEGilar mutaciones en 9 restos de prolina diferentes (GalNAc-Gal) con cys-PEG ramificado 40 K.

4.2. Mutagénesis y Clonación

Se sintetizó un ADNc que codificaba la forma madura de longitud completa de la proteína FGF21 humana en base a la secuencia publicada (N° de Acceso de NCBI NM 019113). El gen se amplificó por PCR usando 2 conjuntos de oligonucleótidos que incorporarían las mutaciones deseadas y los sitios de restricción para la construcción de los vectores de expresión. Los genes sintéticos se subclonaron usando 5' NdeI y 3' XhoI de flanqueo en las cadenas principales de vectores de expresión. Los vectores usados fueron pCWin2 con una secuencia de dirección modificada o pCWM3. Se realizaron PCR, clonación, y transformaciones bacterianas usando técnicas convencionales (por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, FM, y *col.*, John Wiley e Hijos, Inc. 1998).

4.3. Expresión de FGF-21

En una primera etapa, FGF-21 de tipo silvestre se expresó en células mutantes trxB gor supp de *E. coli* y se sometió a ensayo para la actividad biológica. Se encontró que el polipéptido purificado era biológicamente activo en un ensayo de absorción de glucosa que usa adipocitos primarios humanos. Todos los polipéptidos mutantes se expresaron a continuación usando el mismo procedimiento. Se usaron cultivos células mutantes trxB gor supp de *E. coli* a pequeña escala durante toda la noche para inocular 50-150 ml de LB sin animal calentado previamente que contenía 50 µg/ml de kanamicina. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación, y se controló a DO₆₀₀. Cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,6, los cultivos se transfirieron a una incubadora con agitación a 18 °C durante 30 minutos. A continuación, las células transformadas se indujeron con IPTG a 18 °C. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,1 mM, y la incubación con agitación continuó durante 16-20 horas a 18 °C. Las células se cosecharon por centrifugación a 4 °C, 7000 x g durante 15 minutos. Se encontró que los niveles de expresión estaban entre un 15 y un 20 % de lisado de proteínas tal como se determina por densitometría de geles de electroforesis explorados.

4.4. Purificación de FGF-21

Se lisaron sedimentos de Células Congeladas a partir de 200 mls representativos de una cepa mutante trxB gor supp que expresa FGF-21 en 40 ml de BisTris 50 mM a pH 7,0 pasando dos veces a través de un microfluidizador. El material insoluble sedimento o por centrifugación durante 15 minutos a 13.000 rpm usando un rotor Sorvall SS34. Todos los mutantes de FGF-21 se purificaron usando dos etapas cromatográficas. El material soluble final se pasó a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se adsorbió en una Columna QFF de 1 ml a 1 ml/min. La columna se unió a un AKTA y se diluyó usando un gradiente de 20 CV a NaCl 500 mM en el BisTris 50 mM a pH 7,0. Se separaron las fracciones a través de la parte inicial del gradiente por SDS-PAGE y se tiñeron con coomassie para determinar qué fracciones se combinaban. A continuación, las fracciones combinadas se separaron en una columna SEC (Superdex 75 16/60) desarrollando a 0,5 ml/min usando tampón TBS.

4.5. Glicosilación de FGF-21

Se sometieron a ensayo polipéptidos mutantes de FGF-21 purificado para su capacidad para funcionar como un sustrato para la enzima GalNAc-T2. Se usó MALDI para controlar las reacciones. Las condiciones de reacción ejemplares fueron como sigue a continuación: se incubaron 10 mcg de cada proteína de FGF-21 mutante en BisTris 20 mM pH 6,7, NaCl 50 mM, MnCl₂ 10 mM con 40 mU de hGalNAcT2/mg de proteína y 10 equivalentes molares de UDP-GalNAc durante 6 h a 30 °C. los resultados se resumen en la Tabla 18, dada a continuación.

Se añadió acetona hasta 3 veces el volumen de la mezcla de reacción y se centrifugó a una velocidad máxima en una microcentrífuga para precipitar la proteína. La Acetona se retiró y se permitió que el sedimento se secase al aire antes de volverlo a suspender con agua. Se mezclaron 0,5 ul con 0,5 ul de 10 mg/ml de ácido Sinapínico. A continuación, las mezclas se analizaron por MALDI.

Los mutantes B.1-B.4, B.18, B.20, B.22, B.28, B.29, B.31-8,36, B.41 y B.42 se pudieron glicosilar totalmente con GalNAc usando GalNAc-T2. Los mutantes B.19, B.23, B.37-B.40 y B.43-B.44 se glicosilaron parcialmente. Varios mutantes, tales como B.18, B.20, B.29 y B.31-B.36 se glicosilaron pero se añadieron restos de GalNAc adicionales a un porcentaje determinado de esos mutantes. El alcance de la glicosilación se estimó obteniendo una relación del pico del producto (AUC) al pico del reactivo usando un espectro de MALDI.

4. 6. GlicoPEGilación de FGF-21

Generalmente, cuando el polipéptido se glicosilaba con GalNAc, la adición posterior de Gal y SA-PEG era eficaz. En particular, se evaluaron los mutantes B.1-B.4, B.22, B.28, B.41 y B.42 de FGF-21 para la adición de Gal y PEG de 40 KDa al polipéptido glicosilado (GalNAc). Las condiciones de reacción ejemplares se resumen a continuación:

Reacción 1 : Adición de GalNAc

Se incubaron 10 mcg de polipéptido FGF-21 (1 mg/ml) en BisTris 20 mM a pH 6,7, NaCl 50 mM, MnCl₂ 10 mM que contenían 10 equivalentes molares (0,4 mM) de UDP-GalNAc que MBP-hGalNAcT2 (40 mU/mg) durante 6 horas a 30 °C.

Reacción 2: Adición de GalNAc, Gal y PEG de 40 kDa

10 mcg de polipéptido FGF-21 (1 mg/ml) se incubaron en BisTris 20 mM a pH 6,7, NaCl 50 mM, MnCl₂ 10 mM que contenían 10 equivalentes molares (0,4 mM) de UDP-GalNAc, 10 equivalentes molares de UDP-Gal (0,4 mM), 2 equivalentes molares de CMP-SA-40 K PEG (0,08 mM) (cys-PEG de 40 KDa), MBP-hGalNAcT2 (40 mU/mg), MBP-dCore-1-GalT1 (40 mU/mg) y ST3Gal1 (50 mU/mg) durante 16 horas a 30 °C. Las reacciones se analizaron usando SDS-PAGE (véase la FIGURA 3)

4.7. Resumen de Resultados

En la Tabla 18 se resumen los resultados para la expresión de mutantes de FGF-21 en células trxB gor supp de *E. coli* mutante, reacciones de glicosilación y de glicoPEGilación; dadas a continuación. Los mutantes seleccionados se evaluarán en un ensayo de absorción de glucosa basado en células usando adipocitos primarios humanos.

Tabla 18: Evaluación de Mutantes de FGF-21

Mutante Nº	Secuencia del Secuón	Adición de GalNAc	GlicoPEGilación*	
B.1	P ⁵ TSSP	100 %	GalNAc-Gal-SA-PEG (40 K)	SEC ID Nº: **
B.2	P ⁵ TQAP	100 %	GalNAc-Gal-SA-PEG (40 K)	SEC ID Nº: **
B.3	P ³ TPDSS	100 %	GalNAc-Gal-SA-PEG (40 K)	SEC ID Nº: **
B.4	M ¹ FPTP	100 %	GalNAc-Gal-SA-PEG (40 K)	SEC ID Nº: **
B.5	P ⁵⁰ TSLL	0 %	NE	SEC ID Nº: **
B.6	P ⁵⁰ TINT	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.7	P ⁵⁰ TVGS	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.8	P ⁵⁰ TQAG	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.9	AP ⁶¹ TV	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.10	AP ⁶¹ TSVG	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.11	AP ⁶¹ TINT	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.12	SP ⁶¹ TINT	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.13	SP ⁷⁹ T	0 %	NE	SEC ID Nº: **
B.14	AP ⁷⁹ TQ	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.15	AP ⁷⁹ TINT	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.16	P ¹¹⁶ TQAP	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.17	TP ¹¹⁶ TEI	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.18	P ¹²⁰ TINT	100 %	NE	SEC ID Nº: **
B.19	P ¹²⁰ TSVG	10 %	NE	SEC ID Nº: **
B.20	P ¹²⁰ TET	100 %	NE	SEC ID Nº: **
B.21	P ¹²⁵ TQA	40 %	NE	SEC ID Nº: **
B.22	P ¹²⁵ TEI	100 %	GalNAc-Gal-SA-PEG (40 K)	SEC ID Nº: **
B.23	P ¹²⁹ T	10 %	NE	SEC ID Nº: **
B.24	ADP ¹²⁹ TP ¹³¹ A	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.25	PRG ¹³⁴ TINT	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.26	PRGP ¹³⁴ TSVG	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.27	PAGP ¹³⁴ TINT	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.28	P ¹³⁹ TPG	100 %	GalNAc-Gal-SA-PEG (40 K)	SEC ID Nº: **
B.29	P ¹⁴⁸ TPPG	100 %	NE	SEC ID Nº: **
B.30	P ¹⁵¹ TINAP	NE	NE	SEC ID Nº: **
B.31	P ¹⁵¹ TINTP	100 %	NE	SEC ID Nº: **
B.32	P ¹⁵¹ TTV	100 %	NE	SEC ID Nº: **
B.33	P ¹⁵¹ TTVS	100 %	NE	SEC ID Nº: **
B.34	P ¹⁵⁶ TPPD	100 %	NE	SEC ID Nº: **

(continuación)

Mutante Nº	Secuencia del Secuón	Adición de GalNAc	GlicoPEGilación*	
B.35	P ¹⁵⁹ TVGSS	100 %	NE	SEC ID Nº: **
B.36	P ¹⁵⁹ TINT	100 %	NE	SEC ID Nº: **
B.37	TETP ¹⁶⁶	70 %	NE	SEC ID Nº: **
B.38	P ¹⁶⁶ TSMV	10 %	NE	SEC ID Nº: **
B.39	P ¹⁶⁶ TSVG	50 %	NE	SEC ID Nº: **
B.40	P ¹⁶⁶ TQGAM	90 %	NE	SEC ID Nº: **
B.41	P ¹¹² TQGAS	100 %	GalNAc-Gal-SA-PEG (40 K)	SEC ID Nº: **
B.42	P ¹⁷² TQGAM	100 %	GalNAc-Gal-SA-PEG (40 K)	SEC ID Nº: **
B.43	P ¹⁷⁸ TQ	10 %	NE	SEC ID Nº: **
B.44	P ¹⁷⁸ TINT	10 %	NE	SEC ID Nº: **
NE = no sometido a ensayo; PEG (40 K) = cys-PEG de 40 KDa				

Ejemplo 5: Glicosilación de Engarce C-terminal

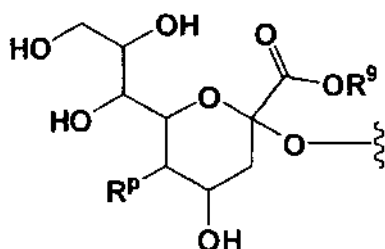
5 El péptido H₂N-Met-Val-Thr-Pro-Thr-Pro-Thr-CO₂ (40 µg) se incubó con GalNAc T2 derivado de Sf9 (200 mUnit), UDP-GalNAc (1 mM final), MnCl₂ (10 mM final) y Tris a pH 7,0 (50 mM final) en 200 µl. Después de 18 h de incubación a 37 °C, la reacción se almacenó a 4 °C. A continuación, la muestra se analizó por LC/MS/MS para determinar el número de restos de GalNAc incorporados en el péptido.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado covalente entre un polipéptido del secuón glicosilado o no glicosilado y un grupo de modificación polimérico, correspondiendo dicho polipéptido del secuón a un polipéptido precursor y comprendiendo una secuencia de glicosilación con unión en O exógena, estando dicho grupo de modificación polimérico conjugado a dicho polipéptido del secuón en dicha secuencia de glicosilación con unión en O a través de un grupo de unión a glicosilo, en el que dicho grupo de unión a glicosilo está interpuesto entre y unido covalentemente tanto a dicho polipéptido del secuón como a dicho grupo de modificación polimérico, con la condición de que dicho polipéptido precursor no sea un miembro seleccionado entre hormona de crecimiento humano (hGH), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón-*alfa* (INF-*alfa*), péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre: (X)_mPTP, (X)_mPTEI(P)_n, (X)_mPTQA(P)_n, (X)_mPTINT(P)_n, (X)_mPTTVS(P)_n, (X)_mPTTVL(P)_n, (X)_mPTQGAM(P)_n, (X)_mTET(P)_n, (X)_mPTVL(P)_n, (X)_mPTLS(P)_n, (X)_mPTDA(P)_n, (X)_mPTEN(P)_n, (X)_mPTQD(P)_n, (X)_mPTAS(P)_n, (X)_mPTQGA(P)_n, (X)_mPTSAV(P)_n, (X)_mPTTLYV(P)_n, (X)_mPSSG(P)_n y (X)_mPSDG(P)_n, m y n son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1;
- 15 P es prolina; y
X es un miembro seleccionado independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga.

2. El conjugado covalente de la reivindicación 1, en el que dicho grupo de modificación polimérico es un miembro seleccionado entre lineal y ramificado y comprende uno o más restos de polímero, en el que cada resto de polímero es seleccionado independientemente, en el que opcionalmente dicho resto de polímero es un miembro seleccionado entre poli(etilenglicol) y metoxi-poli(etilenglicol) (m-PEG).

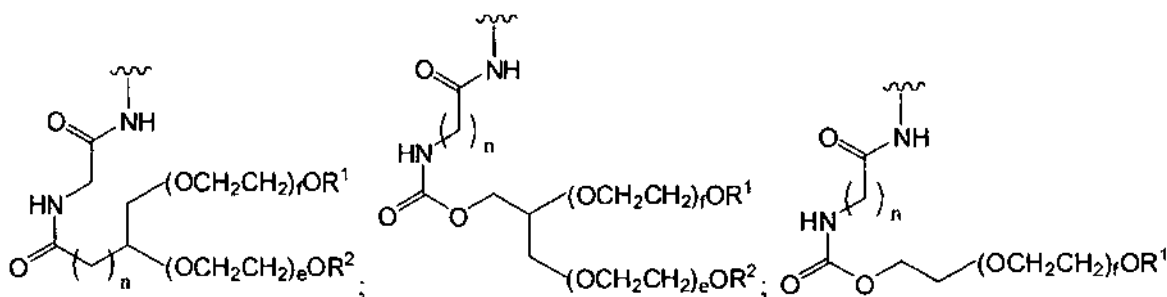
3. El conjugado covalente de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho grupo de unión a glicosilo es un grupo de unión a glicosilo intacto, en el que opcionalmente el conjugado covalente comprende un resto de acuerdo con la Fórmula (III):



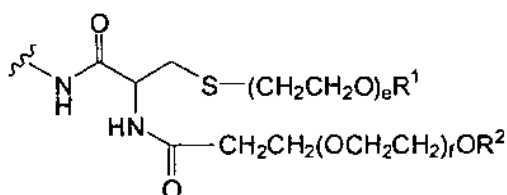
(III)

en la que

R⁹ es H, una carga negativa o un contraión salino; y
R^P es un miembro seleccionado entre:

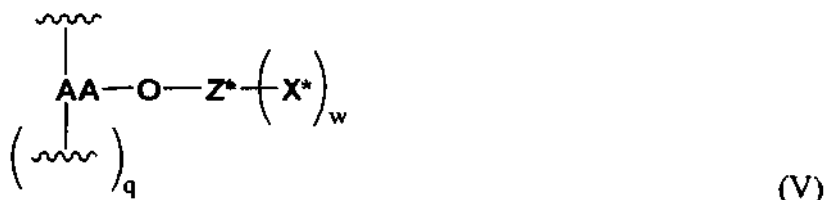


y



en las que n es un número entero seleccionado de 1 a 20 y f y e son números enteros seleccionados independientemente entre 1-2500.

4. Un conjugado de polipéptido que comprende un polipéptido del secuón, correspondiendo dicho polipéptido del secuón a un polipéptido precursor y teniendo una secuencia de glicosilación con unión en O exógena, comprendiendo dicho conjugado de polipéptido un resto de acuerdo con la Fórmula (V):



en la que

w es un número entero seleccionado entre 0 y 1;

q es un número entero seleccionado entre 0 y 1;

AA-O- es un resto derivado de un aminoácido que tiene una cadena lateral sustituida con un grupo hidroxilo, estando colocado dicho aminoácido dentro de dicha secuencia de glicosilación con unión en O, en el que opcionalmente dicho aminoácido es serina (S) o treonina (T);

Z* es un miembro seleccionado entre un resto de glicosilo y un grupo de unión a glicosilo, en el que opcionalmente Z* es un miembro seleccionado entre GalNAc, GalNAc-Gal, GalNAc-Gal-Sia y GalNAc-Sia; y

X* es un miembro seleccionado entre un grupo de modificación polimérico y un grupo de unión a glicosilo unido covalentemente a un grupo de modificación polimérico,

con la condición de que dicho polipéptido precursor no sea un miembro seleccionado entre hormona de crecimiento humano (hGH), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón-*alfa* (INF-*alfa*), péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre:

(X)_mPTP, (X)_mPTEI(P)_n, (X)_mPTQA(P)_n, (X)_mPTINT(P)_n, (X)_mPTTVS(P)_n, (X)_mPTTVL(P)_n, (X)_mPTQGAM(P)_n, (X)_mTET(P)_n, (X)_mPTVL(P)_n, (X)_mPTLS(P)_n, (X)_mPTDA(P)_n, (X)_mPTEN(P)_n, (X)_mPTQD(P)_n, (X)_mPTAS(P)_n, (X)_mP-TQGA(P)_n, (X)_mPTSAV(P)_n, (X)_mPTTLYV(P)_n, (X)_mPSSG(P)_n y (X)_mPSDG(P)_n

m y n son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1;

P es prolina; y

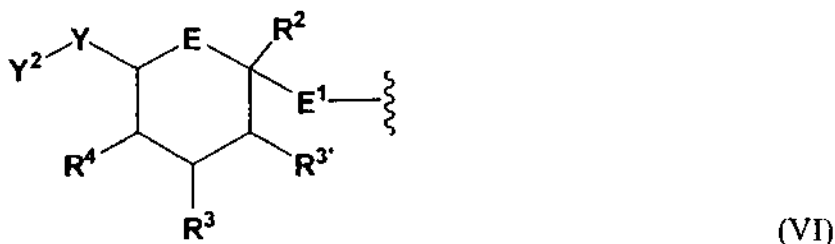
X es un miembro seleccionado independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga.

5. El conjugado de polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho grupo de modificación polimérico es un miembro seleccionado entre lineal y ramificado y comprende uno o más restos de polímero, en el que cada uno de dichos restos de polímero es seleccionado independientemente, en el que opcionalmente dicho resto polimérico es un miembro seleccionado entre poli(etilenglicol) y derivados del mismo.

6. El conjugado de polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que w es 1, opcionalmente o bien:

en el que X* comprende un resto, que es un miembro seleccionado entre un resto de sialilo (Sia), un resto de galactosilo (Gal), un resto de GalNAc y un resto de Gal-Sia, o

en el que X* comprende un resto de acuerdo con la Fórmula (VI):



en la que

E es un miembro seleccionado entre O, S, NR²⁷ y CHR²⁸,

en el que

R²⁷ y R²⁸ son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo

sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir y heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir;

E^1 es un miembro seleccionado entre O y S;

R^2 es un miembro seleccionado entre H, $-R^1$, $-\text{CH}_2R^1$, y $-\text{C}(X^1)R^1$, en los que R^1 es un miembro seleccionado entre OR^9 , SR^9 , $\text{NR}^{10}R^{11}$, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir en el que

R^9 es un miembro seleccionado entre H, una carga negativa, un ión metálico, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y acilo;

R^{10} y R^{11} son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y acilo;

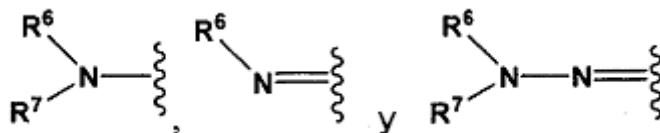
X^1 es un miembro seleccionado entre alquenilo sustituido o sin sustituir, O, S y NR^8

en el que

R^8 es un miembro seleccionado entre H, OH, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir;

Y es un miembro seleccionado entre CH_2 , $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$, CH , $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}$; $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}$, $\text{CH}(\text{OH})$, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})$, y $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})$;

Y^2 es un miembro seleccionado entre H, OR^6 , R^6 , alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir,



en las que

R^6 y R^7 son miembros seleccionados independientemente entre H, L^a-R^{6b} , $\text{C}(\text{O})R^{6b}$, $\text{C}(\text{O})-L^a-R^{6b}$, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir, en los que R^{6b} es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir y un grupo de modificación;

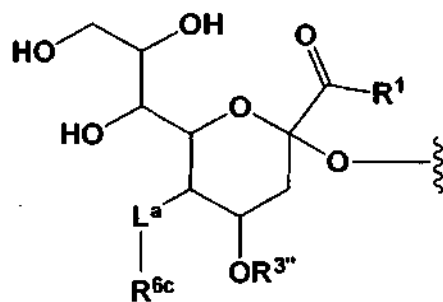
R^3 , R^3 y R^4 son miembros seleccionados independientemente entre H, OR^{3n} , SR^{3n} , alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, $-L^a-R^{6c}$, $-\text{C}(\text{O})-L^a-R^{6c}$, $-\text{NH}-L^a-R^{6c}$, $=\text{N}-L^a-R^{6c}$ y $-\text{NHC}(\text{O})-L^a-R^{6c}$

en los que

R^{3n} es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir; y

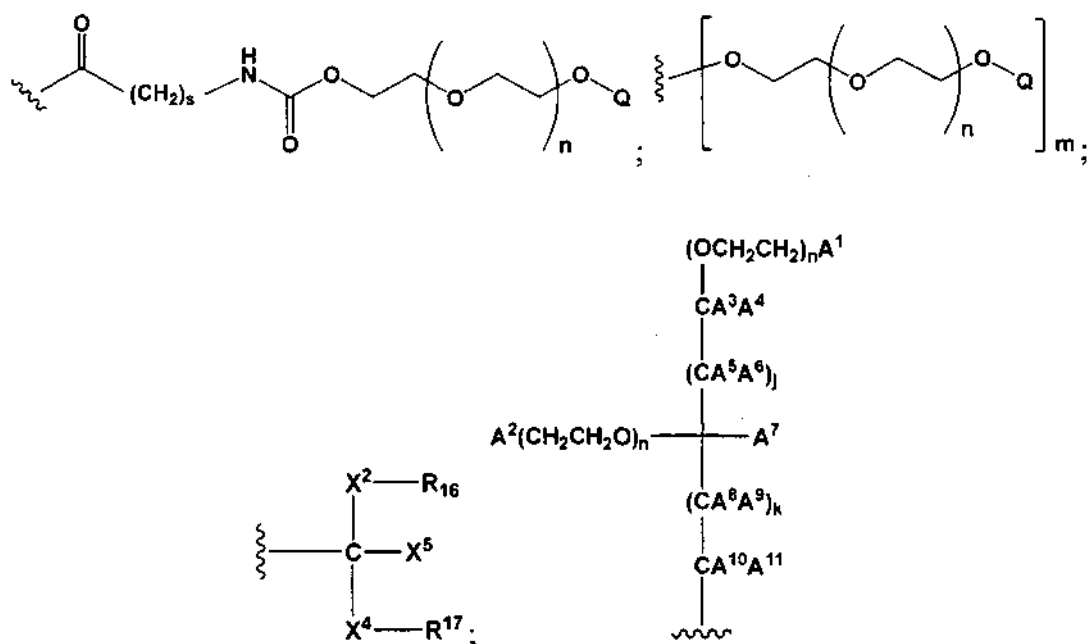
R^{6c} es un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, $\text{NR}^{13}R^{14}$ y un grupo de modificación, en el que R^{13} y R^{14} son miembros seleccionados independientemente entre H, alquilo sustituido o sin sustituir y heteroalquilo sustituido o sin sustituir; y

cada L^a es un miembro seleccionado independientemente entre un enlace y un grupo de engarce, y si X^* comprende un resto de acuerdo con la fórmula (VI), en la que además opcionalmente X^* comprende un resto de acuerdo con la Fórmula (VII):



(VII)

o en la que al menos uno de R^{6b} y R^{6c} es un miembro seleccionado entre:



en los que

s, j y k son números enteros seleccionados independientemente de 0 a 20;
cada n es un número entero seleccionado independientemente de 0 a 2500;

m es un número entero de 1-5;

Q es un miembro seleccionado entre H y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$;

R^{16} y R^{17} son restos de polímero seleccionados independientemente;

X^2 y X^4 son fragmentos de unión seleccionados independientemente que unen restos de polímero R^{16} y R^{17} a C;

X^5 es un grupo no reactivo distinto de un resto de polímero; y

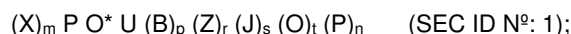
$\text{A}^1, \text{A}^2, \text{A}^3, \text{A}^4, \text{A}^5, \text{A}^6, \text{A}^7, \text{A}^8, \text{A}^9, \text{A}^{10}$ y A^{11} son miembros seleccionados independientemente

entre H, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, $-\text{NA}^{12}\text{A}^{13}$, $-\text{OA}^{12}$ y $-\text{SiA}^{12}\text{A}^{13}$

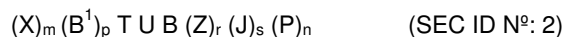
en los que

A^{12} y A^{13} son miembros seleccionados independientemente entre alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, and heteroarilo sustituido o sin sustituir.

7. Un polipéptido del secunón que corresponde a un polipéptido precursor, en el que dicho polipéptido del secunón comprende una secuencia de glicosilación con unión en O exógena seleccionada entre SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2:



y



en las que

m, n, p, r, s y t son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1;

P es prolina;

O^* es un miembro seleccionado entre serina (S) y treonina (T);

U es un miembro seleccionado entre prolina (P), ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga;

X, B y B^1 son miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga; y

Z, J y O son miembros seleccionados independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S), tirosina (Y), metionina (M) y aminoácidos sin carga, con la condición de que dicho polipéptido precursor no sea un miembro seleccionado entre hormona de crecimiento humano (hGH), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón- α (INF- α), péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un

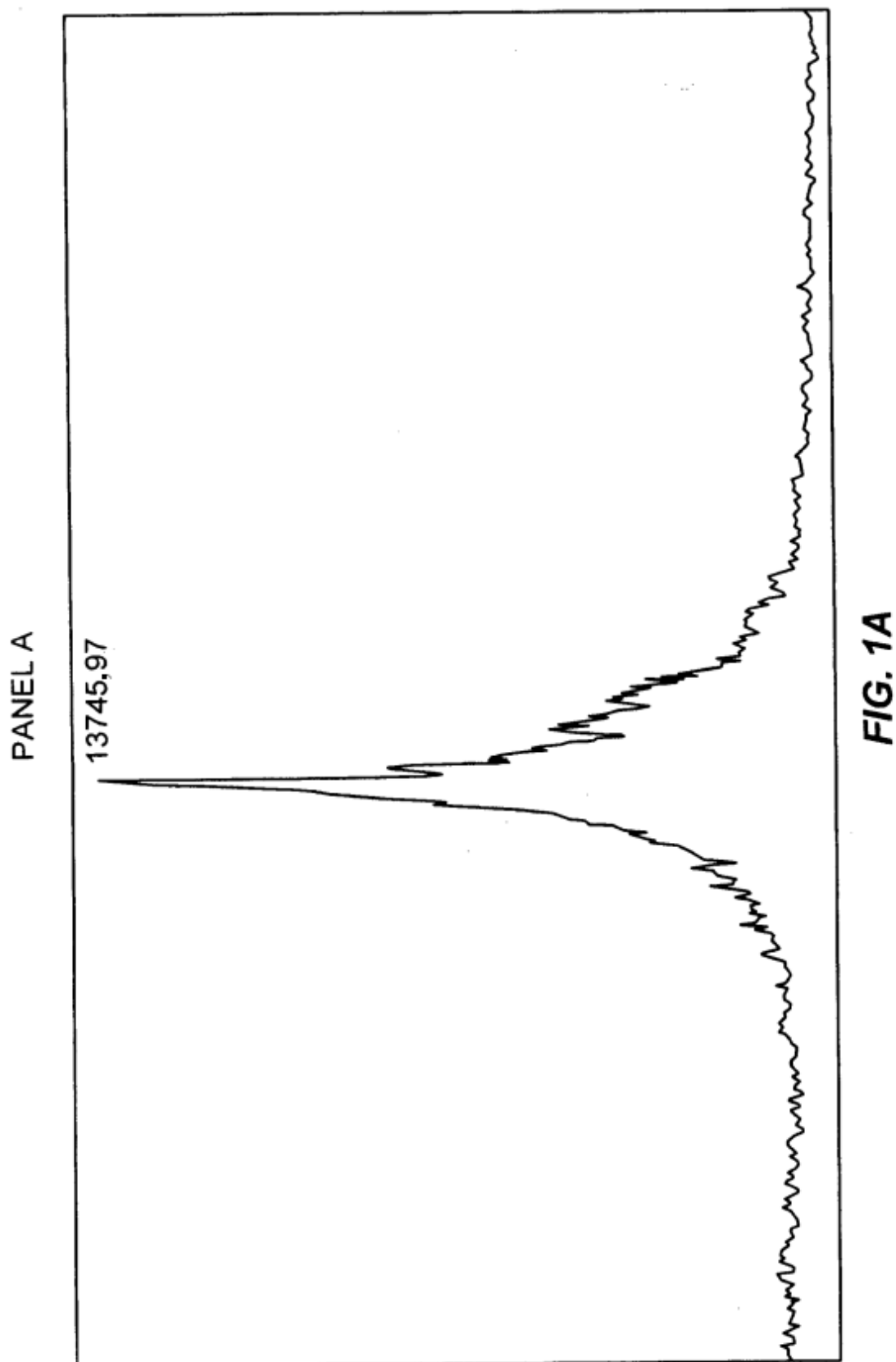
miembro seleccionado entre: $(\text{X})_m \text{PTP}$, $(\text{X})_m \text{PTEI}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTQA}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTINT}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTTVS}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTTVL}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTQGAM}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{TET}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTVL}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTLS}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTDA}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTEN}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTQD}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTAS}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTQGA}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTSAV}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PTTLYV}(\text{P})_n$, $(\text{X})_m \text{PSSG}(\text{P})_n$ y $(\text{X})_m \text{PSDG}(\text{P})_n$,

m y n son números enteros seleccionados independientemente entre 0 y 1;

P es prolina; y

X es un miembro seleccionado independientemente entre ácido glutámico (E), glutamina (Q), ácido aspártico (D), asparagina (N), treonina (T), serina (S) y aminoácidos sin carga.

- 5 8. El conjugado covalente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, conjugado de polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 o polipéptido del secuón de la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de glicosilación con unión en O exógena es un miembro seleccionado entre: PTP, PTEI, PTEIP, PTQA, PTQAP, PTINT, PTINTP, PTTVS, PTTVL, PTQGAM, PTQGAMP y TETP.
- 10 9. El conjugado covalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 8, conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 y 8 o polipéptido del secuón de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que dicho polipéptido precursor es un miembro seleccionado entre proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15), neurotrofina-3 (NT-3), proteasa del factor von Willebrand (vWF), eritropoyetina (EPO), α_1 -antitripsina (inhibidor de la proteasa α_1), glucocerebrosidasa, activador de plasminógenos de tipo celular (TPA), leptina, hirudina, uroquinasa, DNasa humana, insulina, proteína de superficie de la hepatitis B (HbsAg), toxina-IL-2 de dimería quimérica, gonadotropina coriónica humana (hCG), peroxidasa tiroidea (TPO), alfa-galactosidasa, alfa-L-iduronidasa, beta-glucosidasa, alfa-galactosidasa A, α -glucosidasa ácida (maltasa ácida), anti-trombina III (AT III), hormona de estimulación de folículos, péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2), Factor VII, Factor VIII, Factor VII con el dominio B suprimido, Factor IX, Factor X, Factor XIII, proquinetisina, extendina-4, CD4, receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), α -CD20, ligando-1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), complemento, transferrina, molécula de adhesión celular dependiente de la glicosilación (GlyCAM), molécula de adhesión de células neurales (N-CAM), proteína de fusión de la región Fc de IgG del receptor de TNF, anticuerpo monoclonal anti-HER2, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus sincitial respiratorio, anticuerpo monoclonal para TNF- α , anticuerpo monoclonal para glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo monoclonal para CD20, anticuerpo monoclonal para VEGF-A, anticuerpo monoclonal para PSGL-1, anticuerpo monoclonal para CD4, anticuerpo monoclonal para α -CD3, anticuerpo monoclonal para EGF, anticuerpo monoclonal para antígeno carcinoembrionario (CEA) y anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-2.
- 15 10. Un ácido nucleico aislado que codifica dicho polipéptido del secuón de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 o un vector de expresión o célula que comprende dicho ácido nucleico.
- 20 11. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado covalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8 y 9 o un conjugado de polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 y 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 30



PANEL B

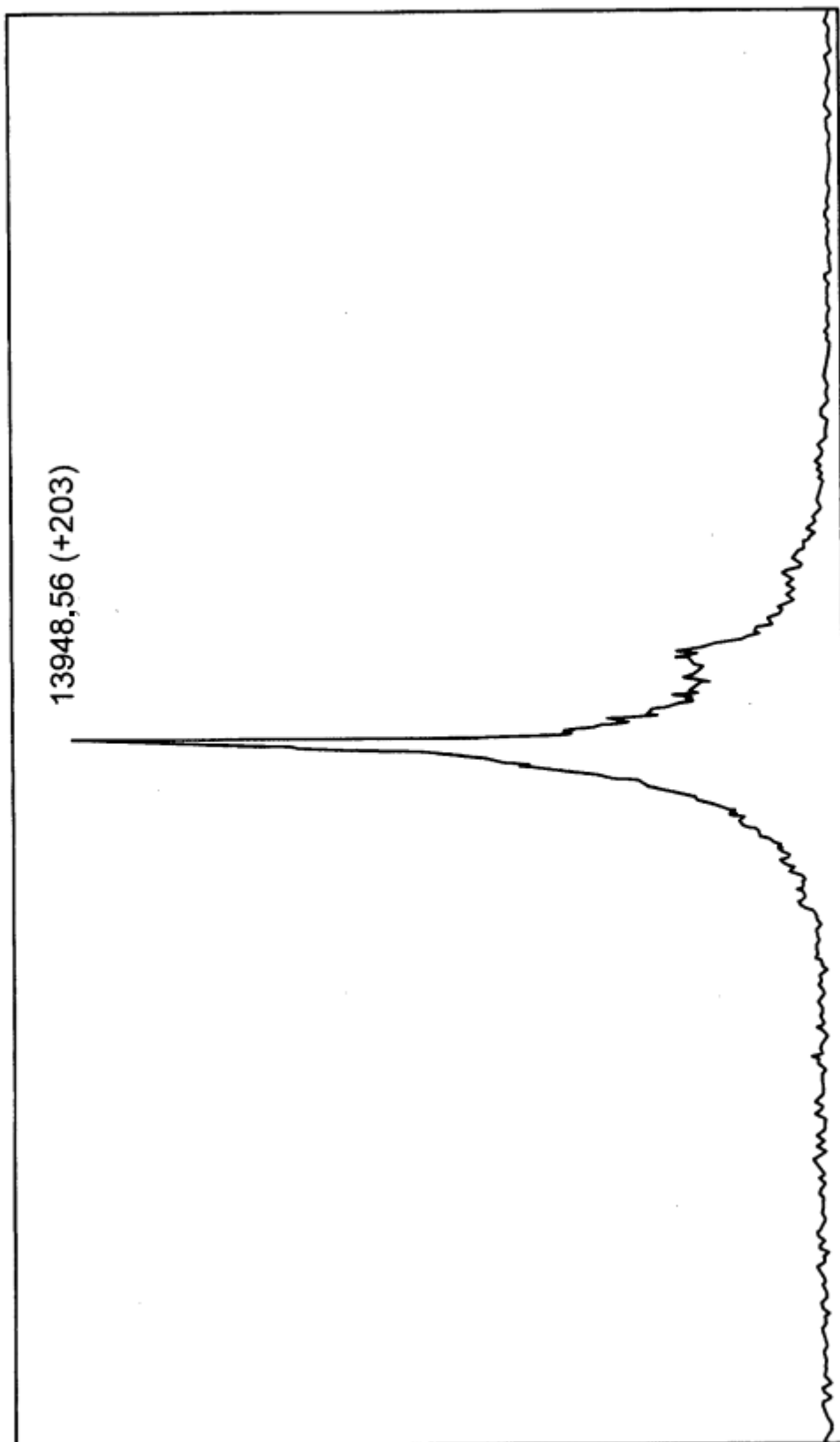


FIG. 1B

PANEL A

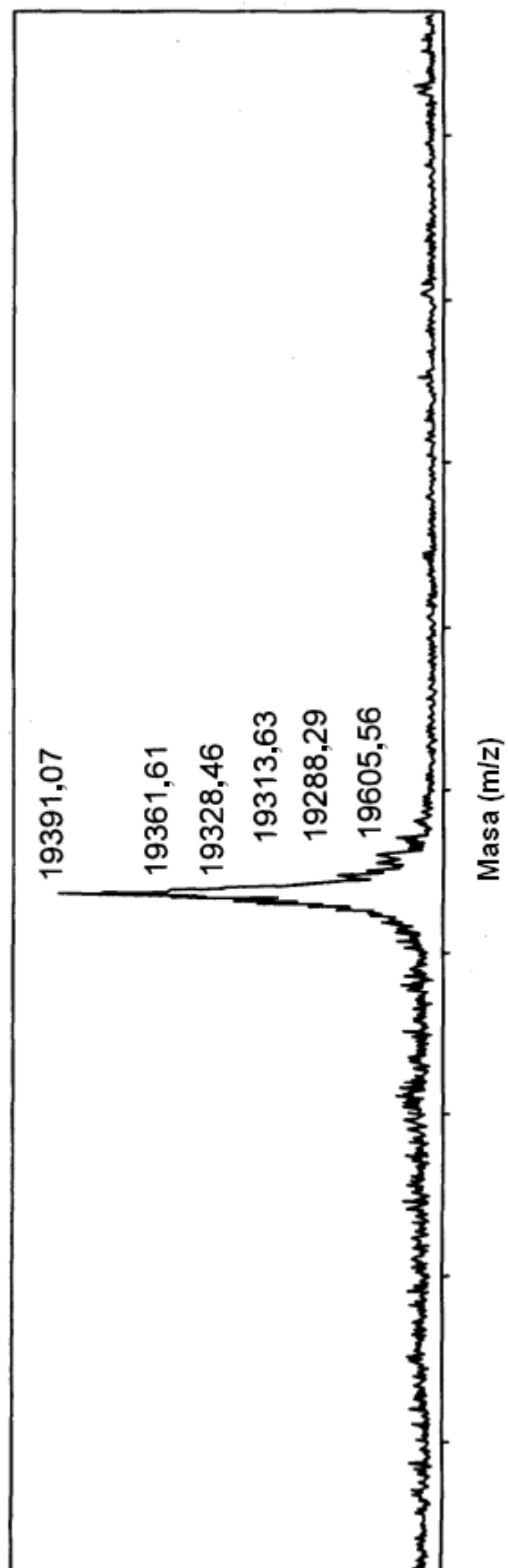


FIG. 2A

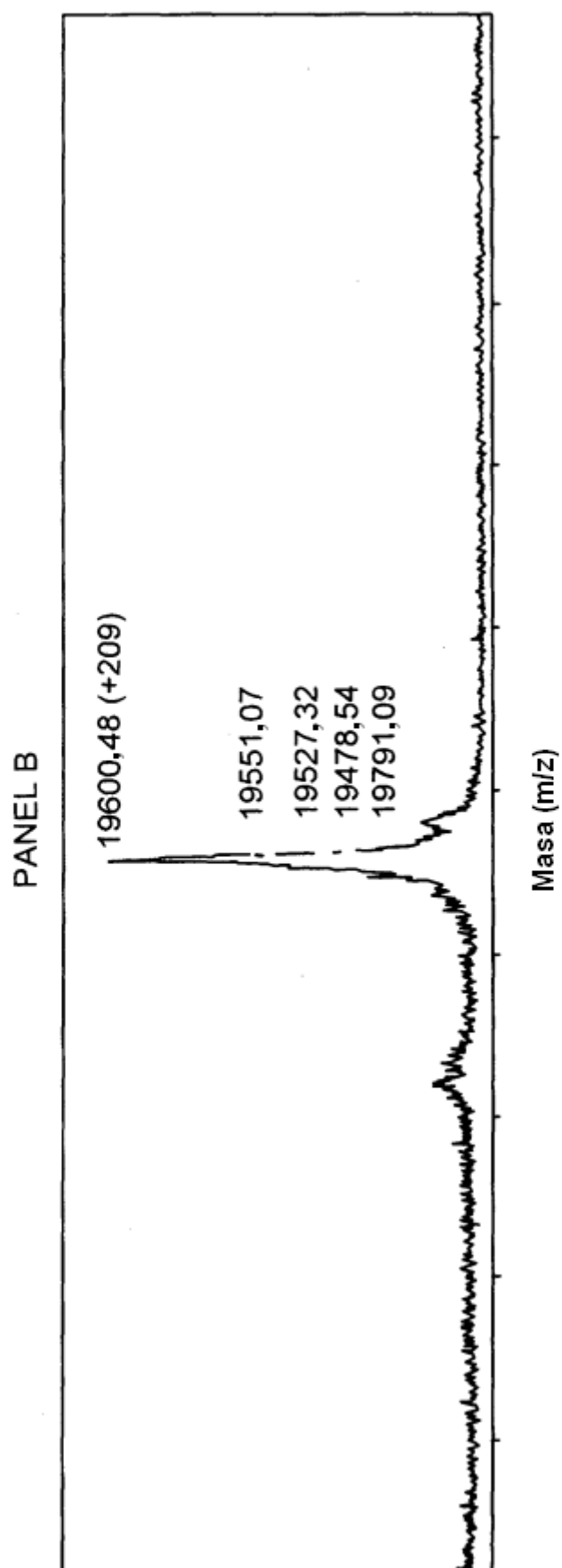


FIG. 2B

FIGURA 3

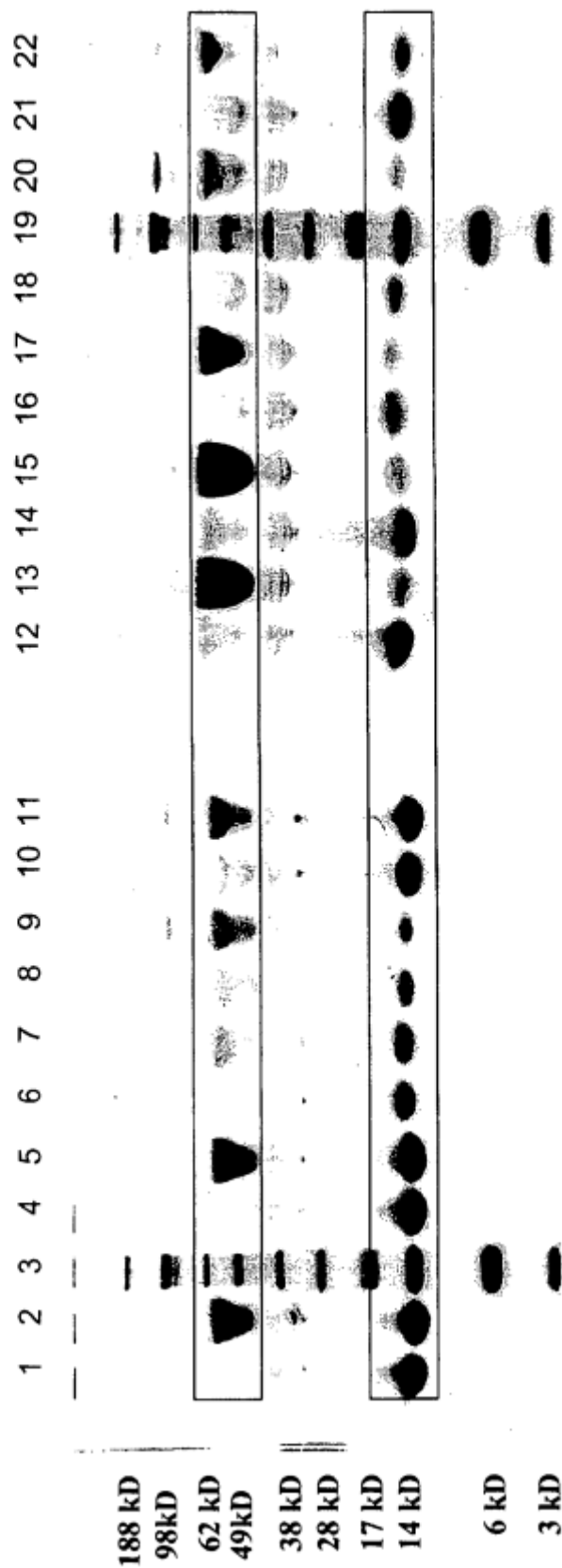


FIGURA 4

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSPFNTSVVYKCTL
 FVEFTVHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQT
 SQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLA
 KEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS
 VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEA
 YVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEE
 EDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVG
 DTLIIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKG VKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCL
 TRYSSYFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQGRNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPA
 GVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTL
 TLPFSGETVFMSPENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNA
 IEPRFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDWPFAHRTMPKIQNVSSDDLMLLRQSPTPHGLSLSD
 LQEAKYETFSDDPSGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHS GDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDF
 KVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENND SKL
 LESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPAALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHID
 GPSLLIENSPSVWQNILEDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQQKKEGP
 IPPDAQNPDMSSFFKMLFLPESARWIQRT HGKNSLNSGQGSPKQLVSLGPEKSV EQNFLSEKNKV VVG
 KGEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKN
 FMKNLFLSTRQNVEGSYEGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEK
 YACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEK
 EKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKD SGVQESS
 HFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTS GKVELLPKVHI
 YQKDLFPTETSN GSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWD
 NHYGTQIPKEEWSQEK SPEKTAFFKKDTILSLNACESNHAI AINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCS
 QNPPVLKRHQREITRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL
 WDYGMS SSPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT
 FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDV
 DLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDP
 TFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNL
 YPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW
 APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHG IKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYR
 GNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNFNPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISD
 AQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTS
 MYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKV KVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRME
 VLGCEAQDLY (SEC ID N°: **)

FIGURA 5

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA
 KPRPPWMGLLGPTIQAENVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK
 EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL
 AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG
 LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFL
 FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFI
 QIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFM
 AYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKG
 VKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKES
 VDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYV
 FDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM MEN
 PGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDY YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF SQNPP
 VLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVE
 RLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSV PQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAE
 VEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEP RKNFVKPNETKTYFWKVQH HMAPTK
 DEFDC KAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSW
 YFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSN
 ENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMST
 LFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVD
 LLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKH
 NIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFAT
 WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKV TGVTQGVKSLLTSMYVKEFLI
 SSSQDGHQWTLFFQNGKVKV FQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVL
 GCEAQDLY

(SEC ID N°: **)

Poli- péptido Precursor	C- terminal	N- terminal	Interno	Inserción Total	Sustitución 1 AA	Sustitución 2 AA	Sustitución 3 AA	Sustitución 4 AA	Sustitución 5 AA	Sustitución 6 AA	Sustitución 7 AA
BMP-7	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP				
BMP-7	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI			
BMP-7	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP		
BMP-7	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA			
BMP-7	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP		
BMP-7	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT		
BMP-7	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	
BMP-7	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS		
BMP-7	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL		
BMP-7	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	
BMP-7	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP
BMP-7	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP			
BMP-15	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP				
BMP-15	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI			
BMP-15	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP		
BMP-15	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA			
BMP-15	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP		
BMP-15	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT		
BMP-15	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	
BMP-15	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS		
BMP-15	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL		

FIGURA 6A

Poli- péptido Precursor	C- terminal	N- terminal	Interno	Inserción Total	Sustitución 1 AA	Sustitución 2 AA	Sustitución 3 AA	Sustitución 4 AA	Sustitución 5 AA	Sustitución 6 AA	Sustitución 7 AA
BMP-15	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	
BMP-15	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP
BMP-15	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP			
NT3	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP				
NT3	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI			
NT3	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP		
NT3	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA			
NT3	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP		
NT3	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT		
NT3	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	
NT3	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS		
NT3	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL		
NT3	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	
NT3	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP
NT3	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP			
FGF-7	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP				
FGF-7	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI			
FGF-7	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP		
FGF-7	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA			
FGF-7	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP		
FGF-7	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT		
FGF-7	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	

FIGURA 6B

Poli- péptido Precursor	C- terminal	N- terminal	Interno	Inserción Total	Sustitución 1 AA	Sustitución 2 AA	Sustitución 3 AA	Sustitución 4 AA	Sustitución 5 AA	Sustitución 6 AA	Sustitución 7 AA
FGF-7	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS		
FGF-7	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL		
FGF-7	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	
FGF-7	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP
FGF-7	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP			
FGF-21	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP				
FGF-21	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI			
FGF-21	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP		
FGF-21	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA			
FGF-21	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP		
FGF-21	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT		
FGF-21	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	
FGF-21	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS		
FGF-21	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL		
FGF-21	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	
FGF-21	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP
FGF-21	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP			
vWF Proteasa	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP					
vWF Proteasa	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI			
vWF	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP		

FIGURA 6C

Poli-peptido Precursor	C-terminal	N-terminal	Interno	Inserción Total	Sustitución 1 AA	Sustitución 2 AA	Sustitución 3 AA	Sustitución 4 AA	Sustitución 5 AA	Sustitución 6 AA	Sustitución 7 AA
Proteasa											
vWF Proteasa	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA			
vWF Proteasa	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP		
vWF Proteasa	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT		
vWF Proteasa	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	
vWF Proteasa	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS		
vWF Proteasa	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL		
vWF Proteasa	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	
vWF Proteasa	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP
vWF Proteasa	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP			
Factor VII	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP				
Factor VII	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI			
Factor VII	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP		
Factor VII	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA			
Factor VII	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP		

FIGURA 6D

Poli-peptido Precursor	C-terminal	N-terminal	Interno	Inserción Total	Sustitución 1 AA	Sustitución 2 AA	Sustitución 3 AA	Sustitución 4 AA	Sustitución 5 AA	Sustitución 6 AA	Sustitución 7 AA
Factor VII	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT		
Factor VII	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	
Factor VII	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS		
Factor VII	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL		
Factor VII	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	
Factor VII	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP
Factor VII	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP			
Factor VIII	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP				
Factor VIII	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI			
Factor VIII	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP		
Factor VIII	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA			
Factor VIII	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP		
Factor VIII	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT		
Factor VIII	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	
Factor VIII	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS		
Factor VIII	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL		
Factor VIII	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	
Factor VIII	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP
Factor VIII	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP			
Factor IX	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP	PTP				
Factor IX	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI	PTEI			
Factor IX	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP	PTEIP		

FIGURA 6E

Poli- péptido Precursor	C- terminal	N- terminal	Interno	Inserción Total	Sustitución 1 AA	Sustitución 2 AA	Sustitución 3 AA	Sustitución 4 AA	Sustitución 5 AA	Sustitución 6 AA	Sustitución 7 AA
Factor IX	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA	PTQA			
Factor IX	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP	PTQAP		
Factor IX	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT	PTINT		
Factor IX	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP	PTINTP		
Factor IX	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS	PTTVS		
Factor IX	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL	PTTVL		
Factor IX	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	PTQGAM	
Factor IX	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP	PTQGAMP
Factor IX	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP	TETP			

FIGURA 6F