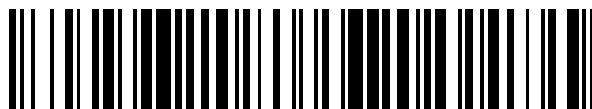


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 342**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48	(2006.01)	A61K 38/43	(2006.01)	C07K 19/00	(2006.01)
C07K 1/00	(2006.01)	C07K 9/00	(2006.01)	C07K 14/79	(2006.01)
C07K 1/13	(2006.01)	C07K 14/475	(2006.01)	C07H 19/10	(2006.01)
A61K 38/14	(2006.01)	C07K 14/59	(2006.01)		
A61K 38/16	(2006.01)	C07K 14/61	(2006.01)		
A61K 38/24	(2006.01)	C07K 14/525	(2006.01)		
A61K 38/26	(2006.01)	C07K 14/56	(2006.01)		
A61K 38/28	(2006.01)	C07K 14/565	(2006.01)		
A61K 38/29	(2006.01)	C12N 9/64	(2006.01)		
A61K 38/30	(2006.01)	C12N 9/22	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2002 E 10012794 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2305312**

54 Título: **Remodelación y glicoconjugación de la hormona estimuladora del folículo (FSH)**

30 Prioridad:

10.10.2001 US 328523 P 19.10.2001 US 344692 P
28.11.2001 US 334233 P 28.11.2001 US 334301 P
07.06.2002 US 387292 P 25.06.2002 US 391777 P
17.07.2002 US 396594 P 16.08.2002 US 404249 P
28.08.2002 US 407527 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DE FREES, SHAWN;
ZOPF, DAVID;
BAYER, ROBERT;
BOWE, CARYN;
HAKES, DAVID y
CHEN, XI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 538 342 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

Remodelación y glicoconjugación de la hormona estimuladora del folículo (FSH)

Antecedentes de la invención

La mayoría de los péptidos de origen natural contienen restos de hidratos de carbono unidos al péptido mediante enlaces específicos para un número seleccionado de aminoácidos a lo largo de la longitud de la cadena peptídica primaria. Por tanto, muchos péptidos de origen natural se denominan "glicopéptidos". La variabilidad del patrón de glicosilación sobre cualquier péptido dado tiene enormes implicaciones para la función de ese péptido. Por ejemplo, la estructura de los glicanos ligados en N sobre un péptido puede afectar a diversas características del péptido, que incluyen la susceptibilidad a proteasas, tráfico intracelular, secreción, selección de tejido como diana, semivida biológica y antigenicidad del péptido en una célula u organismo. La alteración de una o más de estas características afecta enormemente a la eficacia de un péptido en su entorno natural, y también afecta a la eficacia del péptido como agente terapéutico en situaciones en las que el péptido se ha generado para dicho fin.

La estructura del hidrato de carbono unido a la cadena peptídica se conoce como una molécula de "glicano". La estructura de glicano específica presente sobre un péptido afecta la solubilidad y características de agregación del péptido, el plegamiento de la cadena peptídica primaria y, por tanto, su actividad funcional o enzimática, la resistencia del péptido al ataque proteolítico y el control de la proteólisis que conduce a la conversión de formas inactivas del péptido en formas activas. Y, lo que es más importante, residuos de ácido siálico terminales presentes sobre la molécula de glicano afectan a la semivida del péptido en el aparato circulatorio de mamífero. Los péptidos cuyos glicanos no contienen residuos de ácido siálico terminales son rápidamente eliminados de la circulación por el hígado, un evento que invalida cualquier posible beneficio terapéutico del péptido.

Las estructuras de glicano encontradas en los glicopéptidos de origen natural se dividen normalmente en dos clases, glicanos ligados en N y ligados en O.

Los péptidos expresados en células eucariotas están normalmente N-glicosilados sobre residuos de asparagina en sitios en la estructura primaria del péptido que contienen la secuencia asparagina-X-serina/treonina en la que X puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina y ácido aspártico. La porción de hidrato de carbono de tales péptidos se conoce como un glicano ligado en N. Los eventos tempranos de N-glicosilación se producen en el retículo endoplásmico (RE) y son idénticos en mamíferos, plantas, insectos y otros eucariotas superiores. Primero, una cadena de oligosacárido que comprende catorce residuos de azúcar se construye sobre una molécula portadora de lípidos. Como el péptido naciente se traduce y se translocaliza en el RE, la cadena de oligosacárido entera se transfiere al grupo amida del residuo de asparagina en una reacción catalizada por una enzima glicosiltransferasa unida a membrana. El glicano ligado en N se procesa adicionalmente tanto en el RE como en el aparato de Golgi. El procesamiento adicional generalmente implica la eliminación de algunos de los residuos de azúcar y la adición de otros residuos de azúcar en reacciones catalizadas por glicosilasas y glicosiltransferasas específicas para los residuos de azúcar eliminados y añadidos.

Normalmente, las estructuras finales de los glicanos ligados en N dependen del organismo en el que el péptido se produce. Por ejemplo, en general, péptidos producidos en bacterias están completamente sin glucosilar. Péptidos expresados en células de insecto contienen alta manosa, cadenas de oligosacáridos ligados en N de pauci-manosa, entre otros. Los péptidos producidos en cultivo celular de mamífero están normalmente glicosilados de forma diferente dependiendo, por ejemplo, de las especies y condiciones de cultivo celular. Incluso en las mismas especies y bajo las mismas condiciones, algunas veces se encuentra una cierta cantidad de heterogeneidad en la cadena de glicosilo. Además, los péptidos producidos en células vegetales comprenden estructuras de glicano que se diferencian significativamente de aquellas producidas en células animales. El dilema en la materia de la producción de péptidos recombinantes, particularmente cuando los péptidos van a usarse como agentes terapéuticos, es poder generar péptidos que están correctamente glicosilados, es decir, que pueden generar un péptido que tiene una estructura de glicano que se parece, o es idéntica a la presente, sobre la forma que se produce naturalmente del péptido. La mayoría de los péptidos producidos por medios recombinantes comprenden estructuras de glicano que son diferentes de los glicanos de origen natural.

Se ha propuesto una variedad de procedimientos en la materia para personalizar el patrón de glicosilación de un péptido, incluyendo los descritos en los documentos WO 99/22764, WO 98/58964, WO 99/54342 y la patente de EE.UU. nº 5.047.335, entre otros. Esencialmente, muchas de las enzimas requeridas para la glicosilación *in vitro* de péptidos se han clonado y secuenciado. En algunos casos, estas enzimas se han usado *in vitro* para añadir azúcares específicos a una molécula de glicano incompleta sobre un péptido. En otros casos, las células se han manipulado genéticamente para expresar una combinación de enzimas y péptidos deseados de forma que la adición de un resto de azúcar deseado a un péptido expresado se produzca dentro de la célula.

También pueden modificarse péptidos mediante la adición de glicanos ligados en O, también llamados glicanos tipo mucina, debido a su prevalencia en el glicopéptido mucinoso. A diferencia de los N-glicanos que están ligados a residuos de asparagina y se forman por transferencia *en bloc* de oligosacárido a partir de productos intermedios unidos a lípido, los O-glicanos están principalmente ligados a residuos de serina y treonina y se forman por la

adición escalonada de azúcares de azúcares de nucleótido (Tanner y col., Biochim. Biophys. Acta. 906:81-91 (1987); y Hounsell y col., Glycoconj. J. 13:19-26 (1996)). La función del péptido puede afectarse por la estructura de los glicanos ligados en O presentes sobre el mismo. Por ejemplo, la actividad del ligando P-selectina está afectada por la estructura de glicano ligado en O presente sobre la misma. Para una revisión de estructuras de glicano ligado en O véase Schachter y Brockhausen, The Biosynthesis of Branched O-Linked Glycans, 1989, Society for Experimental Biology, pág. 1-26 (Gran Bretaña). Otros patrones de glicosilación se forman ligando glucosilfosfatidilinositol con el grupo carboxilo del extremo carboxilo de la proteína (Takeda y col., Trends Biochem. Sci. 20:367-371 (1995); y Udenfriend y col., Ann. Rev. Biochem. 64:593-591 (1995)).

Aunque actualmente existen diversas técnicas para modificar los glicanos ligados en N de péptidos, en la materia existe la necesidad de un procedimiento generalmente aplicable de producción de péptidos que tienen un patrón de glicosilación deseado, es decir, personalizado. Hay una necesidad particular en la técnica de la glicosilación *in vitro* personalizada de péptidos, pudiendo producirse el péptido resultante a escala industrial. Esta y otras necesidades se satisfacen mediante la presente invención.

La administración de péptidos glicosilados y no glicosilados para generar una respuesta fisiológica particular es muy conocida en las ciencias médicas. Entre los péptidos mejor conocidos utilizados para este fin está la insulina, que se usa para tratar diabetes. También se han usado enzimas por sus beneficios terapéuticos. Un factor importante, que ha limitado el uso de péptidos terapéuticos, es la naturaleza inmunogénica de la mayoría de los péptidos. En un paciente, una respuesta inmunogénica a un péptido administrado puede neutralizar el péptido y/o conducir al desarrollo de una respuesta alérgica en el paciente. Otras deficiencias de los péptidos terapéuticos incluyen potencia inferior a la óptima y rápidas tasas de eliminación. Los problemas inherentes a los péptidos terapéuticos son reconocidos en la materia, y se han investigado diversos procedimientos de eliminación de los problemas. Para proporcionar péptidos terapéuticos solubles, polímeros sintéticos se han unido al esqueleto de péptido.

El poli(etilenglicol) ("PEG") es un polímero a modo de ejemplo que se ha conjugado con péptidos. Se ha demostrado que el uso de PEG para derivatizar péptidos terapéuticos reduce la inmunogenicidad de los péptidos y prolonga el tiempo de eliminación de la circulación. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.179.337 (Davis y col.) se refiere a péptidos no inmunogénicos tales como enzimas y hormonas peptídicas acopladas a polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol. Se usan entre 10 y 100 moles de polímero por mol de péptido y al menos se mantiene el 15% de la actividad fisiológica.

El documento WO 93/15189 (Veronese y col.) se refiere a un procedimiento para mantener la actividad de enzimas proteolíticas modificadas con polietilenglicol ligando la enzima proteolítica a un inhibidor macromolecularizado. Los conjugados están previstos para aplicaciones médicas.

El principal modo de unión de PEG, y sus derivados, a péptidos es un enlace no específico mediante un residuo de aminoácido de péptido. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.088.538 desvela un conjugado de polímero enzimáticamente activo-enzima de una enzima covalentemente unida a PEG. Similarmente, la patente de EE.UU. n° 4.496.689 desvela un complejo covalentemente unido de inhibidor de α -1 proteasa con un polímero, tal como PEG o metoxipoli(etilenglicol) ("mPEG"). Abuchowski y col. (J. Biol. Chem. 252: 3578 (1977)) desvelan la unión covalente de mPEG a un grupo amina de albúmina de suero bovino. La patente de EE.UU. n° 4.414.147 desvela un procedimiento de hacer el interferón menos hidrófobo conjugándolo con un anhídrido de un ácido dicarboxílico, tal como poli(anhídrido succínico de etileno). El documento PCT WO 87/00056 desvela la conjugación de PEG y polioles poli(oxetilados) con proteínas tales con interferón- β , interleucina-2 e inmunotoxinas. El documento EP 154.316 desvela y reivindica linfocinas químicamente modificadas tales como IL-2 que contienen PEG unido directamente a al menos un grupo amino primario de la linfocina. La patente de EE.UU. n° 4.055.635 desvela composiciones farmacéuticas de un complejo soluble en agua de una enzima proteolítica ligada covalentemente a una sustancia polimérica, tal como un polisacárido.

Otro modo de unir PEG a péptidos es mediante la oxidación no específica de residuos de glicosilo sobre un péptido. El azúcar oxidado se utiliza como un sitio para unir un resto de PEG a péptido. Por ejemplo, M'Timkulu (documento WO 94/05332) desvela el uso de una hidracina- o amino-PEG para añadir PEG a una glicoproteína. Los restos de glicosilo se oxidan aleatoriamente a los aldehídos correspondientes, que se acoplan posteriormente al amino-PEG.

En cada uno de los procedimientos descritos anteriormente, el poli(etilenglicol) se añade en un modo no específico aleatorio a residuos reactivos sobre un esqueleto de péptido. Para la producción de péptidos terapéuticos es claramente deseable utilizar una estrategia de derivatización que produzca la formación de un producto específicamente marcado, fácilmente caracterizable, esencialmente homogéneo.

Se usan dos clases principales de enzimas en la síntesis de hidratos de carbono, glicosiltransferasas (por ejemplo, sialiltransferasas, oligosacariltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas) y glicosidasas. Las glicosidasas se clasifican adicionalmente como exoglicosidasas (por ejemplo, β -manosidasa, β -glucosidasa) y endoglicosidasas (por ejemplo, endo-A, endo-M). Cada una de estas clases de enzimas se ha usado satisfactoriamente sintéticamente para preparar hidratos de carbono. Para una revisión general véase Crout y col., Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 98-111 (1998).

Las glicosiltransferasas modifican las estructuras de oligosacáridos sobre péptidos. Las glicosiltransferasas son eficaces para producir productos específicos con buen control estereoquímico y regioquímico. Las glicosiltransferasas se han usado para preparar oligosacáridos y para modificar estructuras de hidratos de carbono ligados en N y en O terminales, particularmente sobre péptidos producidos en células de mamífero. Por ejemplo, los oligosacáridos terminales de glicopéptidos se han sililado y/o fucosilado completamente para proporcionar estructuras de azúcar más coherentes, que mejoran la farmacodinámica de glicopéptidos y una variedad de otras propiedades biológicas. Por ejemplo, se usa β -1,4-galactosiltransferasa para sintetizar lactosamina, una ilustración de la utilidad de glicosiltransferasas en la síntesis de hidratos de carbono (véase, por ejemplo, Wong y col., J. Org. Chem. 47: 5416-5418 (1982)). Además, numerosos procedimientos de síntesis ha hecho uso de α -sialiltransferasas para transferir ácido siálico de ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico a 3-OH o 6-OH de galactosa (véase, por ejemplo, Kevin y col., Chem. Eur. J. 2: 1359-1362 (1996)). Se usan fucosiltransferasas en rutas sintéticas para transferir una unidad de fucosa de guanosina-5'-difosfocucosa a un hidroxilo específico de un aceptor de sacárido. Por ejemplo, Ichikawa preparó sialil-Lewis-X mediante un procedimiento que implicaba la fucosilación de lactosamina sialilada con una fucosiltransferasa clonada (Ichikawa y col., J. Am. Chem. Soc. 114: 9283-9298 (1992)). Para una discusión de recientes avances en la síntesis de glicoconjugados para uso terapéutico véase Koeller y col., Nature Biotechnology 18: 835-841 (2000). Véanse también las patentes de EE.UU. n° 5.876.980; 6.030.815; 5.728.554; 5.922.577; y el documento WO/9831826.

También pueden usarse glicosidasas para preparar sacáridos. Las glicosidasas normalmente catalizan la hidrólisis de un enlace glicosídico. Sin embargo, bajo condiciones apropiadas, pueden usarse para formar este enlace. La mayoría de las glicosidasas usadas para la síntesis de hidratos de carbono son exoglicosidasas; la transferencia de glicosilo se produce en el extremo no reductor del sustrato. La glucosidasa se une a un donante de glicosilo en un producto intermedio de glicosilo-enzima que es tanto interceptado por agua para dar el producto de hidrólisis, como por un aceptor, para generar un nuevo glucósido u oligosacárido. Una ruta a modo de ejemplo que usa una exoglucosidasa es la síntesis del trisacárido central de todos los ligados en N-glicopéptidos, que incluye el enlace de β -manósido, que se forma por la acción de β -manosidasa (Singh y col., Chem. Commun. 993-994 (1996)).

En otra aplicación a modo de ejemplo del uso de una glucosidasa para formar un enlace glicosídico se ha preparado una glucosidasa mutante en la que el aminoácido nucleófilo normal dentro del sitio activo se cambia a un aminoácido no nucleófilo. La enzima mutante no hidroliza enlaces glicosídicos, pero todavía puede formarlos. Una glucosidasa mutante tal se usa para preparar oligosacáridos usando un donante de fluoruro de α -glicosilo y una molécula aceptora de glucósido (Withers y col., patente de EE.UU. n° 5.716.812).

Aunque su uso es menos común que el de las exoglicosidasas, también se utilizan endoglicosidasas para preparar hidratos de carbono. Procedimientos basados en el uso de endoglicosidasas tienen la ventaja de que se transfiere un oligosacárido, en vez de un monosacárido. Los fragmentos de oligosacáridos se han añadido a sustratos usando *endo*- β -N-acetilglucosaminas tales como *endo*-F, *endo*-M (Wang y col., Tetrahedron Lett. 37: 1975-1978); y Haneda y col., Carbohydr. Res. 292: 61-70 (1996)).

Además de su uso en la preparación de hidratos de carbono, las enzimas tratadas anteriormente también se aplican a la síntesis de glicopéptidos. Se ha publicado la síntesis de una glicofoma homogénea de ribonucleasa B (Witte K. y col., J. Am. Chem. Soc. 119: 2114-2118 (1997)). El núcleo de alta manosa de la ribonucleasa B se escindió tratando el glicopéptido con endoglucosidasa H. La escisión se produjo específicamente entre los dos residuos de GlcNAc centrales. Entonces, el tetrasacárido sialil-Lewis X se reconstruyó enzimáticamente sobre el sitio de anclaje de GlcNAc restante sobre la proteína ahora homogénea por el uso secuencial de β -1,4-galactosiltransferasa, α -2,3-sialiltransferasa y α -1,3-fucosiltransferasa V. Sin embargo, mientras que cada etapa enzimáticamente catalizada avanzó con rendimiento excelente, tales procedimientos no se han adaptado a una escala industrial para la generación de glicopéptidos.

Procedimientos que combinan tanto elementos sintéticos químicos como enzimáticos también se conocen en la técnica. Por ejemplo, Yamamoto y colaboradores (Carbohydr. Res. 305: 415-422 (1998)) informaron de la síntesis quimioenzimática del glicopéptido, péptido T glucosilado, usando una endoglucosidasa. El péptido de N-acetilglucosaminilo se sintetizó por medios puramente químicos. El péptido se elaboró posteriormente enzimáticamente con el oligosacárido del péptido transferrina humano. La porción de sacárido se añadió al péptido tratándolo con una *endo*- β -N-acetilglucosaminidasa. El péptido glucosilado resultante fue altamente estable y resistente a la proteólisis cuando se comparó con el péptido T y N-acetilglucosaminil-péptido T.

Se ha explorado el uso de glicosiltransferasas para modificar la estructura de péptidos con grupos indicadores. Por ejemplo, Brossmer y col. (patente de EE.UU. n° 5.405.753) desvelan la formación de un monofosfato de citidina ("MFC") marcado fluorescentemente derivado de ácido siálico y el uso del glucósido fluorescente en un ensayo para actividad de sialiltransferasa y para el marcado fluorescente de superficies celulares, glicoproteínas y péptidos. Gross y col. (Analyt. Biochem. 186: 127 (1990)) describen un ensayo similar. Bean y col. (patente de EE.UU. n° 5.432.059) desvelan un ensayo para alteraciones de la deficiencia de glicosilación utilizando la reglicosilación de una proteína deficientemente glucosilada. La proteína deficiente es reglicosilada con un glucósido de MFC marcado fluorescentemente. Cada uno de los derivados de ácido siálico fluorescentes está sustituido con el resto fluorescente en tanto la posición 9 como en la amina que normalmente está acetilada en ácido siálico. Los procedimientos

usando los derivados de ácido siálico fluorescentes son ensayos para la presencia de glicosiltransferasas o para glicoproteínas no glucosiladas o inapropiadamente glucosiladas. Los ensayos se realizan en pequeñas cantidades de enzima o glicoproteína en una muestra de origen biológico. En la técnica anterior no se ha desvelado o sugerido la derivatización enzimática de un péptido glucosilado o no glucosilado a una escala preparativa o industrial usando un ácido siálico modificado.

También se han dirigido esfuerzos considerables hacia la modificación de superficies celulares alterando residuos de glicosilo presentados por aquellas superficies. Por ejemplo, Fukuda y colaboradores han desarrollado un procedimiento para unir glicósidos de estructura definida sobre superficies celulares. El procedimiento explota la especificidad de sustrato relajado de una fucosiltransferasa que puede transferir fucosa y análogos de fucosa que llevan diversos sustratos de glicosilo (Tsuboi y col., J. Biol. Chem. 271: 27213 (1996)).

También se han usado procedimientos enzimáticos para activar residuos de glicosilo sobre un glicopéptido hacia la posterior elaboración química. Los residuos de glicosilo se activan normalmente usando galactosa oxidasa, que convierte un residuo de galactosa terminal en el aldehído correspondiente. El aldehído se acopla posteriormente a un grupo modificador que contiene amina. Por ejemplo, Casares y col. (Nature Biotech. 19: 142 (2001)) han unido doxorubicina a los residuos de galactosa oxidados de una quimera de MHCII-péptido recombinante.

También se han modificado residuos de glicosilo para contener grupos cetona. Por ejemplo, Mahal y colaboradores (Science 276: 1125 (1997)) han preparado N-levulinolilmanosamina ("ManLev"), que tiene una funcionalidad cetona en la posición normalmente ocupada por el grupo acetilo en el sustrato natural. Se trataron células con ManLev, incorporando así un grupo cetona sobre la superficie celular. Véanse también Saxon y col., Science 287: 2007 (2000); Hang y col., J. Am. Chem. Soc. 123: 1242 (2001); Yarema y col., J. Biol. Chem. 273: 31168 (1998); y Charter y col., Glycobiology 10: 1049 (2000).

Los procedimientos de modificación de superficies celulares no se han aplicado en ausencia de una célula para modificar un péptido glucosilado o no glucosilado. Además, los procedimientos de modificación de la superficie celular no se utilizan para la incorporación enzimática de resto donante de glicosilo modificado previamente formado en un péptido. Además, ninguno de los procedimientos de modificación de la superficie celular son prácticos para producir péptidos modificados con glicosilo a escala industrial.

A pesar de los esfuerzos dirigidos hacia la elaboración enzimática de estructuras de sacárido, todavía sigue existiendo una necesidad de un procedimiento industrialmente práctico para la modificación de péptidos glucosilados y no glucosilados con grupos modificadores tales como polímeros solubles en agua, restos terapéuticos, biomoléculas y similares. Son de particular interés procedimientos en los que el péptido modificado tiene propiedades mejoradas, que potencian su uso como agente terapéutico o de diagnóstico. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

El documento WO87/05330 desvela un procedimiento para modificar proteínas eucariotas y procariotas y tratamientos enzimáticos y/o químicos para producir una proteína modificada portadora de uno o más restos de trisacáridos o tetrasacáridos ligados covalentemente. No se desvelan conjugados entre la FSH y un óxido de polialquileño o un polipéptido.

[0029] GROSS et al., Eur. J. Biochem., 1988, 177, 583-589 "Enzymatic introduction of a fluorescent sialic acid into oligosaccharide chains of glycoproteins" se interesan por la introducción enzimática de ácido siálico fluorescente en restos oligosacáridos de glicoproteínas. El documento no trata de un conjugado de proteína entre la FSH y un óxido de polialquileño o un polipéptido.

GROSS et al., Biochemistry 1989, 28, 7386-7392, "Transfer of Synthetic Sialic Acid Analogues to N- and OLinked Glycoprotein Glycans Using Four Different Mammalian Sialyltransferases", desvelan propiedades cinéticas de la transferencia de diversos análogos sintéticos de ácido siálico 9-sustituido en glicanos de glicoproteínas N u O unidos mediante cuatro sialiltransferasas de mamífero purificadas. El documento no trata la formación de un conjugado entre un péptido y un óxido de polialquileño o polipéptido.

GUO et al., Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997, Vol. 68, 1-20, "Utilization of Glycosyltransferases to Change Oligosaccharide Structures" analizan la síntesis de oligosacáridos catalizada por glicosiltransferasas. El documento no trata la formación de un conjugado entre la FSH y óxidos de polialquileño o polipéptidos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento *in-vitro* sin células de formación de un conjugado entre un péptido de la hormona estimuladora del folículo (FSH) y un polímero soluble en agua, como se indica en las reivindicaciones adjuntas.

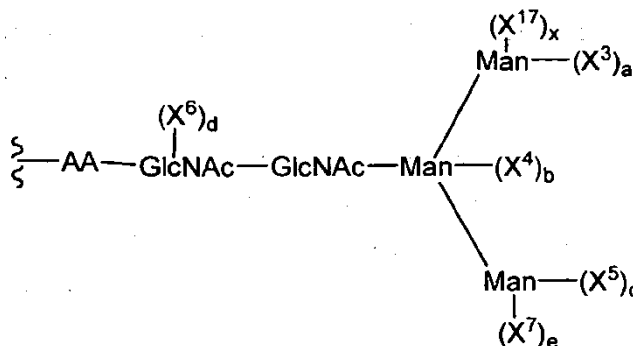
También se refiere a un péptido de FSH y a una composición farmacéutica, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

También se desvela un procedimiento *in vitro*, sin células, de remodelación de un péptido que tiene la fórmula:

X² es un segundo residuo de glucosilo unido covalentemente a X¹, en la que X¹ y X² están seleccionados de residuos de monosacárido y oligosacárido. El procedimiento comprende:

- $$\text{---AA---Z---X}^1\text{---X}^2$$

30 También está incluido en la invención un procedimiento *in vitro* sin células de remodelación de un péptido que tiene la fórmula:



6

(b) poner en contacto el glicano truncado con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al glicano truncado, remodelándose así el péptido.

En un aspecto, la eliminación de la etapa (a) produce un glicano truncado en el que a, b, c, e y x son cada uno 0.

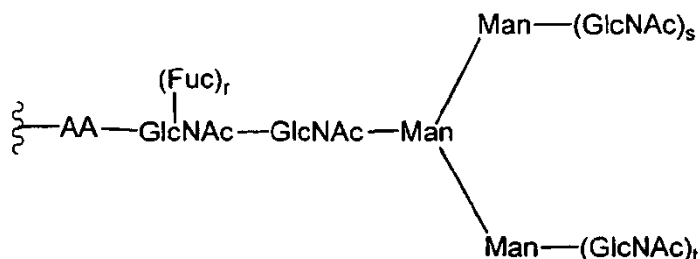
- 5 En otro aspecto, X^3 , X^5 y X^7 están seleccionados del grupo constituido por (manosa)_z y (manosa)_z-(X^8)_y en la que X^8 es un resto glicosilo seleccionado de mono- y oligo-sacáridos; y es un número entero seleccionado de 0 y 1; y z es un número entero entre 1 y 20, en la que si z es 3 o mayor, (manosa)_z está seleccionada de estructuras lineales y ramificadas.

En otro aspecto más, X^4 está seleccionado del grupo constituido por GlcNAc y xilosa. En otro aspecto, en el que X^3 , X^5 y X^7 son (manosa)_u, en la que u está seleccionado de los números enteros entre 1 y 20, y si u es 3 o mayor, (manosa)_u está seleccionada de estructuras lineales y ramificadas.

- 15 Al menos uno de los donantes de glicosilo comprende un grupo modificador, y el grupo modificador es un polímero soluble en agua. Preferentemente, el polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol). Incluso más preferentemente, el poli(etilenglicol) tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.

Además, el péptido es la hormona estimuladora del folículo.

También se desvela un procedimiento *in vitro* sin células de remodelación de un péptido que comprende un glicano que tiene la fórmula:



- 20 en la que

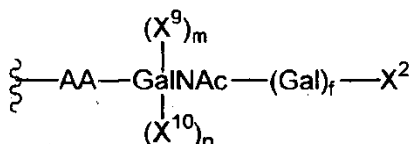
r, s y t son números enteros independientemente seleccionados de 0 y 1. El procedimiento comprende:

- 25 (a) poner en contacto el péptido con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al glicano, remodelándose así el péptido.

- 30 En una realización preferida, al menos uno de los donantes de glicosilo comprende un grupo modificador, y el grupo modificador puede ser un miembro seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua, un resto terapéutico, un marcador detectable, un grupo ligador reactivo y un resto dirigido. Preferentemente, el grupo modificador es un polímero soluble en agua y más preferentemente, el polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol). Incluso más preferentemente, el poli(etilenglicol) tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.

- 35 Además, el péptido puede seleccionarse del grupo constituido por factor estimulante de colonias de granulocitos, interferón-alfa, interferón-beta, factor VIIa, factor IX, hormona estimuladora del folículo, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón-gamma, inhibidor de alfa-1-proteasa, beta-glucosidasa, proteína del activador tisular del plasminógeno, interleucina-2, factor VIII, receptor del factor de necrosis tumoral quimérico, uroquinasa, anticuerpo quimérico anti-glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo quimérico anti-HER2, anticuerpo quimérico anti-virus respiratorio sincital, anticuerpo quimérico anti-CD20, ADNasa, anticuerpo quimérico anti-factor de necrosis tumoral, insulina humana, sAg de la hepatitis B y hormona de crecimiento humana.

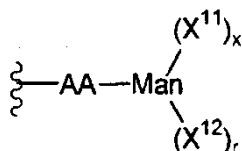
En otro aspecto más, el péptido tiene la fórmula:



- 40 en la que

X^9 y X^{10} son residuos de monosacárido u oligosacárido independientemente seleccionados; y m, n y f son números enteros seleccionados de 0 y 1.

En otro aspecto, el péptido tiene la fórmula:



5

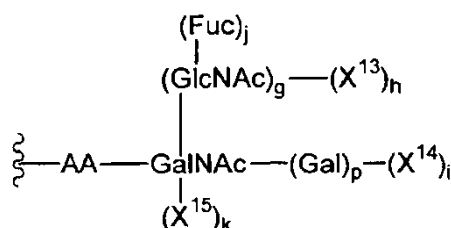
en la que

X^{11} y X^{12} son restos glicosilo independientemente seleccionados; y r y x son números enteros independientemente seleccionados de 0 y 1.

En una realización preferida, X^{11} y X^{12} son (manosa)_q en la que

10 q está seleccionado de los números enteros entre 1 y 20, y si q es tres o mayor, (manosa)_q está seleccionada de estructuras lineales y ramificadas.

En otro aspecto, el péptido tiene la fórmula:



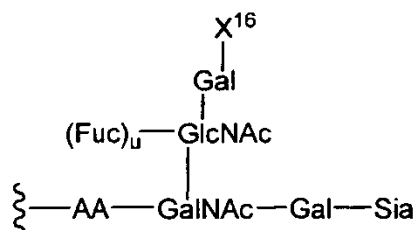
en la que

15 X^{13} , X^{14} y X^{15} son residuos de glicosilo independientemente seleccionados; y g, h, i, j, k y p están seleccionados independientemente de los números enteros 0 y 1, con la condición de que al menos uno de g, h, i, j, k y p sea 1.

En una realización de este aspecto, X^{14} y X^{15} son miembros independientemente seleccionados de GlcNAc y Sia; e i y k están seleccionados independientemente de los números enteros 0 y 1, con la condición de que al menos uno de i y k sea 1, y si k es 1, g, h y j son 0.

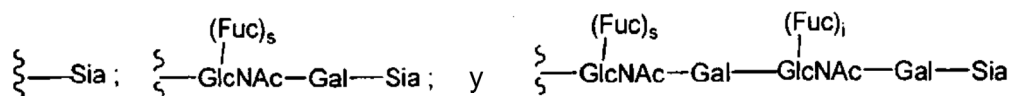
20

En otro aspecto de la invención, el péptido tiene la fórmula:



en la que

X^{16} es un miembro seleccionado de:



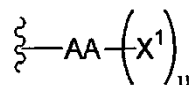
25

en la que

s, u e i están seleccionados independientemente de los números enteros 0 y 1.

En una realización la eliminación utiliza una glucosidasa.

También se desvela un procedimiento *in vitro* sin células de remodelación de un péptido que tiene la fórmula:



en la que

AA es un residuo de aminoácido terminal o interno del péptido;

X¹ es un residuo de glicosilo unido covalentemente a AA, seleccionado de residuos de monosacarilo y oligosacarilo; y u es un número entero seleccionado de 0 y 1. El procedimiento comprende: poner en contacto el péptido con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al glicano truncado, en el que el donante de glicosilo comprende un grupo modificador, remodelándose así el péptido.

En una realización preferida, al menos uno de los donantes de glicosilo comprende un grupo modificador, y el grupo modificador puede ser un miembro seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua, un resto terapéutico, un marcador detectable, un grupo ligador reactivo y un resto dirigido. Preferentemente, el grupo modificador es un polímero soluble en agua y más preferentemente, el polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol). Incluso más preferentemente, el poli(etilenglicol) tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.

Además, el péptido puede seleccionarse del grupo constituido por factor estimulante de colonias de granulocitos, interferón-alfa, interferón-beta, factor VIIa, factor IX, hormona estimuladora del folículo, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón-gamma, inhibidor de alfa-1-proteasa, beta-glucosidasa, proteína del activador tisular del plasminógeno, interleucina-2, factor VIII, receptor del factor de necrosis tumoral quimérico, uroquinasa, anticuerpo quimérico anti-glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo quimérico anti-HER2, anticuerpo quimérico anti-virus respiratorio sincitial, anticuerpo quimérico anti-CD20, ADNasa, anticuerpo quimérico anti-factor de necrosis tumoral, insulina humana, sAg de la hepatitis B y hormona de crecimiento humana.

También se desvela un conjugado covalente entre un péptido y un grupo modificador que altera una propiedad del péptido, en el que el grupo modificador está unido covalentemente al péptido en un residuo de glicosilo o de aminoácido preseleccionado del péptido mediante un grupo de unión de glicosilo intacto.

En un aspecto, el grupo modificador es un miembro seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua, un resto terapéutico, un marcador detectable, un grupo ligador reactivo y un resto dirigido.

En otro aspecto, el grupo modificador y un precursor de grupo de unión a glicosilo intacto se unen como una unidad unida covalentemente al péptido mediante la acción de una enzima, convirtiendo la enzima el precursor en el grupo de unión a glicosilo intacto, formando así el conjugado.

El conjugado covalente comprende:

un primer grupo modificador unido covalentemente a un primer residuo del péptido mediante un primer grupo de unión a glicosilo intacto, y
un segundo grupo de unión a glicosilo unido a un segundo residuo del péptido mediante un segundo grupo de unión a glicosilo intacto.

En una realización, el primer residuo y el segundo residuo son estructuralmente idénticos. En otra realización, el primer residuo y el segundo residuo tienen estructuras diferentes. En una realización adicional, el primer residuo y el segundo residuo son residuos de glicosilo. En otra realización, el primer residuo y el segundo residuo son residuos de aminoácidos.

En otra realización más, el péptido se remodela antes de formar el conjugado. Preferentemente, el péptido se remodela para introducir un resto aceptor para el grupo de unión a glicosilo intacto.

En otra realización, el grupo modificador es un polímero soluble en agua, que puede comprender poli(etilenglicol), que, en otra realización, puede tener una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.

En otra realización más, el péptido está seleccionado del grupo constituido por factor estimulante de colonias de granulocitos, interferón-alfa, interferón-beta, factor VIIa, factor IX, hormona estimuladora del folículo, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón-gamma, inhibidor de alfa-1-proteasa, beta-glucosidasa, proteína del activador tisular del plasminógeno, interleucina-2, factor VIII, receptor del factor de necrosis tumoral quimérico, uroquinasa, anticuerpo quimérico anti-glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo quimérico anti-HER2, anticuerpo quimérico anti-virus respiratorio sincitial, anticuerpo quimérico anti-CD20, ADNasa, anticuerpo quimérico anti-factor de necrosis tumoral, insulina humana, sAg de la hepatitis B y hormona de crecimiento humana.

En otra realización, la unidad de enlace de glicosilo intacta es un miembro seleccionado del grupo constituido por un residuo de ácido siálico, un residuo de Gal, un residuo de GlcNAc y un residuo de GalNAc.

También se proporciona un procedimiento de formación de un conjugado covalente entre un polímero y un péptido glucosilado o no glucosilado, en el que el polímero está conjugado con el péptido mediante un grupo de unión a glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente a tanto el péptido como el polímero. El procedimiento comprende poner en contacto el péptido con una mezcla que comprende un azúcar de nucleótido unido covalentemente al polímero y una glicosiltransferasa para la que el azúcar de nucleótido es un sustrato en condiciones suficientes para formar el conjugado.

En una realización preferida, el polímero es un polímero soluble en agua. En otra realización preferida, el grupo de unión a glicosilo está unido covalentemente a un residuo de glicosilo unido covalentemente al péptido, y en otra realización, el grupo de unión a glicosilo está unido covalentemente a un residuo de aminoácido del péptido.

En otra realización más, el polímero comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en un óxido de polialquileño y un polipéptido. En una realización de la invención el óxido de polialquileño puede ser poli(etilenglicol). En otra realización, el poli(etilenglicol) tiene un grado de polimerización de aproximadamente 1 a aproximadamente 20.000, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.000, o también preferentemente, el polietilenglicol tiene un grado de polimerización de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000.

En otra realización, la glicosiltransferasa está seleccionada del grupo constituido por sialiltransferasa, galactosiltransferasa, glicosiltransferasa, GalNAc transferasa, GlcNAc transferasa, fucosiltransferasa y manosiltransferasa. En una realización, la glicosiltransferasa se produce recombinantemente, y en otra realización, la glicosiltransferasa es una enzima procariota recombinante, o una enzima eucariota recombinante.

En otra realización más, el azúcar de nucleótido está seleccionado del grupo constituido por UDP-glucósido, MFC-glucósido y GDP-glucósido y está seleccionado preferentemente del grupo constituido por UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, UDP-N-acetilgalactosamina, UDP-N-acetilglucosamina, GDP-manosa, GDP-fucosa, MFC-ácido siálico, MFC-NeuAc.

En otra realización, el péptido es un agente terapéutico.

En otra realización más, el péptido glucosilado se desglucosila parcialmente antes de la puesta en contacto.

En otra realización, el grupo de unión a glicosilo intacto es un residuo de ácido siálico.

Además, el procedimiento puede realizarse en un entorno sin células.

Y, en otra realización, el conjugado covalente puede aislarse, y preferentemente, el conjugado covalente se aísla por filtración en membrana.

También se proporciona un procedimiento de formación de un conjugado covalente entre un primer péptido glucosilado o no glucosilado, y un segundo péptido glucosilado o no glucosilado, unido conjuntamente por un resto de ligador, en el que el resto de ligador está conjugado con el primer péptido mediante un primer grupo de unión a glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente tanto al primer péptido como al resto de ligador, y el resto de ligador está conjugado con el segundo péptido mediante un segundo grupo de unión a glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente tanto al segundo péptido como al resto de ligador. El procedimiento comprende:

(a) poner en contacto el primer péptido con un derivado del precursor de resto de ligador que comprende un precursor del primer grupo de unión a glicosilo intacto y un precursor del segundo grupo de unión a glicosilo intacto;

(b) poner en contacto la mezcla de (a) con una glicosiltransferasa para la que el precursor del primer grupo de unión a glicosilo es un sustrato, en condiciones suficientes para convertir el precursor del primer grupo de unión a glicosilo intacto en el primer grupo de unión a glicosilo intacto, formando así un primer conjugado entre el precursor de resto de ligador y el primer péptido;

(c) poner en contacto el primer conjugado con el segundo péptido y una glicosiltransferasa para la que el precursor del segundo grupo de unión a glicosilo intacto es un sustrato, en condiciones suficientes para convertir el precursor del segundo grupo de unión a glicosilo intacto en el segundo grupo de unión a glicosilo, formando así el conjugado entre el resto de ligador y el primer péptido glucosilado o no glucosilado, y el segundo péptido glucosilado o no glucosilado.

En un aspecto, el resto de ligador comprende un polímero soluble en agua, y en una realización, el polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol).

También se proporciona un procedimiento de formación de un conjugado covalente entre un primer péptido glucosilado o no glucosilado, y un segundo péptido glucosilado o no glucosilado unido conjuntamente por un resto de ligador, en el que

el resto de ligador está conjugado covalentemente con el primer péptido, y el resto de ligador está conjugado con el segundo péptido mediante un grupo de unión a glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente tanto al segundo péptido como al resto de ligador. El procedimiento comprende:

- 5 (a) poner en contacto el primer péptido con un derivado activado del resto de ligador que comprende:
un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria a un residuo sobre el primer péptido, y un precursor del grupo de unión a glicosilo intacto, en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el grupo funcional reactivo y el residuo, formando así un primer conjugado; y
(b) poner en contacto el primer conjugado con el segundo péptido y una glicosiltransferasa para la que el precursor del grupo de unión a glicosilo intacto es un sustrato, en condiciones suficientes para convertir el precursor del grupo de unión a glicosilo intacto en el grupo de unión a glicosilo intacto, formando así el conjugado entre el primer péptido glucosilado o no glucosilado, y el segundo péptido glucosilado o no glucosilado unido conjuntamente por el resto de ligador.

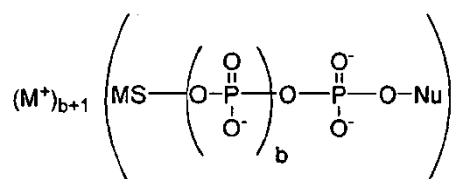
En una realización, el resto de ligador comprende un polímero soluble en agua, que puede ser poli(etilenglicol).

- 15 También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un polímero y un péptido glucosilado o no glucosilado, en la que el polímero está conjugado con el péptido mediante un grupo de unión a glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente tanto al péptido como al polímero.

- 20 También se desvela una composición para formar un conjugado entre un péptido y un azúcar modificado, comprendiendo la composición: una mezcla de un azúcar modificado, una glicosiltransferasa y un sustrato aceptor de péptido, en la que el azúcar modificado tiene unido covalentemente al mismo un miembro seleccionado de un polímero, un resto terapéutico y una biomolécula.

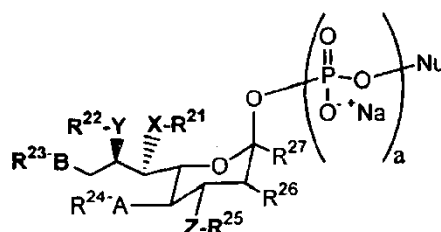
La invención también incluye péptidos remodelados usando los procedimientos de la invención y composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos remodelados.

La invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



- 25 en la que
MS es un azúcar modificado que comprende un azúcar unido covalentemente a un grupo modificador; Nu es un nucleósido; y b es un número entero de 0 a 2.

- 30 En un aspecto se incluye un compuesto que tiene la fórmula:



- en la que
X, Y, Z, A y B son miembros independientemente seleccionados de S, O y NH;
R²¹, R²², R²³, R²⁴ y R²⁵ miembros independientemente seleccionados de H y un polímero;
35 R²⁶ es un miembro seleccionado de H, OH y un polímero;
R²⁷ es un miembro seleccionado de COO⁻ y Na⁺;
Nu es un nucleósido; y
a es un número entero de 1 a 3.

También se desvela un procedimiento *in vitro* sin células de remodelación de un péptido que tiene la fórmula:



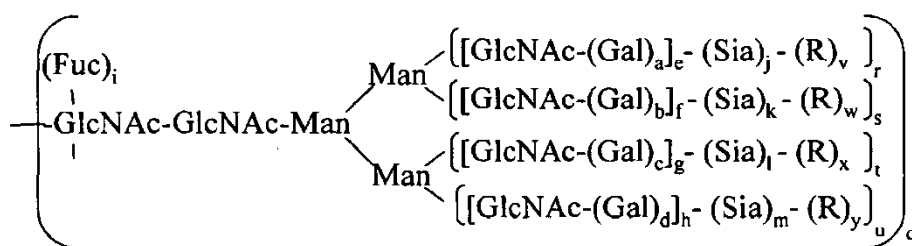
en la que

AA es un residuo de aminoácido terminal o interno del péptido. El procedimiento comprende:

poner en contacto el péptido con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al residuo de aminoácido, en la que el donante de glicosilo comprende un grupo modificador, remodelándose así el péptido.

En cada una de las realizaciones que se tratan más adelante, los esquemas de remodelación específicos y los péptidos se identifican únicamente para enfatizar realizaciones preferidas de la invención.

La invención proporciona un procedimiento de formación de un conjugado entre un péptido de la hormona estimuladora del folículo (FSH) y un polímero soluble en agua de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, en el que el polímero soluble en agua está unido covalentemente al péptido de FSH mediante un grupo de unión a glicosilo intacto, comprendiendo el péptido de FSH un residuo de glicosilo que tiene la fórmula:



en la que

a, b, c, d, i, q, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1;
e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros entre 0 y 6;
j, k, l y m son miembros independientemente seleccionados de los números enteros entre 0 y 100;
v, w, x e y son 0; y
R es un grupo modificador, una manosa o una oligomanosa. El procedimiento comprende:

(a) poner en contacto el péptido de FSH con una glicosiltransferasa y un donante de glicosilo modificado, que comprende un resto glicosilo que es un sustrato para la glicosiltransferasa unido covalentemente al grupo modificador, en condiciones apropiadas para la formación del grupo de unión a glicosilo intacto.

En una realización, el procedimiento comprende:

(b) antes de la etapa (a), poner en contacto el péptido de FSH con una sialidasa en condiciones apropiadas para eliminar ácido siálico del péptido de FSH.

En otra realización, el procedimiento comprende:

(c) poner en contacto el producto de la etapa (a) con una sialiltransferasa y un donante de ácido siálico en condiciones apropiadas para transferir ácido siálico al producto.

En otra realización más, el procedimiento comprende:

(d) antes de la etapa (a), poner en contacto el péptido de FSH con una galactosidasa en condiciones apropiadas para eliminar galactosa del péptido de FSH.

En una realización adicional, el procedimiento comprende:

(e) antes de la etapa (a), poner en contacto el péptido de FSH con una combinación de una glucosidasa y una sialidasa.

En otra realización más, el procedimiento comprende:

(f) antes de la etapa (a), poner en contacto el péptido de FSH con una galactosiltransferasa y un donante de galactosa en condiciones apropiadas para transferir la galactosa al péptido de FSH.

En otra realización, el procedimiento comprende:

(g) poner en contacto el producto de la etapa (a) con un resto que reacciona con el polímero soluble en agua, formando así un conjugado entre el grupo de unión a glicosilo intacto y el resto.

En una realización adicional, el procedimiento comprende:

(h) antes de la etapa (b), poner en contacto el péptido de FSH con una endoglucanasa en condiciones apropiadas para escindir un resto glicosilo del péptido de FSH.

En otra realización, el procedimiento comprende:

- 5 (i) antes de la etapa (a), poner en contacto el péptido de FSH con N-acetilglucosamina transferasa y un donante de GlcNAc en condiciones apropiadas para transferir GlcNAc al péptido de FSH.

En otra realización más, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en óxidos de polialquileo y polipéptidos.

- 10 En realizaciones adicionales preferidas y con referencia a la fórmula del péptido de FSH descrita anteriormente, a, b, c, d, i, j, k, l, m, q, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; e, f, g y h son 1; y v, w, x e y son 0. Alternativamente, a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, q, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; v, w, x e y son 0. Alternativamente, a, b, c, d, f, h, j, k, l, m, s, u, v, w, x e y son 0; y e, g, i, q, r y t son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1. Alternativamente, a, b, c, d, e, f, g, h, j, k, l y m son 0; i, q, r, s, t, u, v, w, x e y están seleccionados independientemente de 0 y 1; p es 1; R (ramificado o lineal) es un miembro seleccionado de manosa y oligomano. Alternativamente, a, b, c, d, e, f, g, h, j, k, l, m, r, s, t, u, v, w e y son 0; i es 0 ó 1; y q es 1.
- 15

También está incluido un conjugado de péptido de FSH formado por el procedimiento anteriormente descrito.

Breve descripción de los dibujos

- 20 Con el fin de que ilustrar la invención, en los dibujos se representan ciertas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a las disposiciones y medios precisos de las realizaciones representadas en los dibujos.

La Figura 1, que comprende Figura 1A a Figura 1Z y Figura 1AA a Figura 1CC, es una lista de péptidos útiles en los procedimientos de la divulgación.

- 25 La Figura 2 es un esquema que representa un glicano de núcleo de trimanosilo (lado izquierdo) y el procedimiento enzimático para la generación de un glicano que tiene una GlcNAc bisectriz (lado derecho).

- La Figura 3 es un esquema que representa una estructura de núcleo de trimanosilo elemental y cadenas complejas en diversos grados de terminación. Se muestra la generación enzimática *in vitro* de una estructura de núcleo de trimanosilo elemental de una estructura de glicano de hidrato de carbono compleja que no contiene un residuo de GlcNAc bisectriz, ya que es la generación de una estructura de glicano a partir de la misma que contiene una GlcNAc bisectriz. Símbolos: cuadrados: GlcNAc; círculos claros: Man; círculos oscuros: Gal; triángulos: NeuAc.
- 30

La Figura 4 es un esquema para la generación enzimática de una estructura de glicano sialilada (lado derecho) que empieza con un glicano que tiene un núcleo de trimanosilo y una GlcNAc bisectriz (lado izquierdo).

- 35 La Figura 5 es un esquema de una estructura de glicano que contiene alta manosa típica (lado izquierdo) y el proceso enzimático para la reducción de esta estructura a una estructura de núcleo de trimanosilo elemental.

La Figura 6 es un diagrama de una estructura de glicano ligado en N que contiene fucosa y xilosa normalmente producida en células vegetales.

- La Figura 7 es un diagrama de una estructura de glicano ligado en N que contiene fucosa normalmente producida en células de insecto.
- 40

La Figura 8 es un esquema que representa una variedad de rutas para el recorte de una estructura de alta manosa y la síntesis de cadenas de azúcar complejas de la misma. Símbolos: cuadrados: GlcNAc; círculos: Man; diamantes: fucosa; pentágono: xilosa.

- La Figura 9 es un esquema que representa estrategias *in vitro* para la síntesis de estructuras complejas a partir de una estructura de núcleo de trimanosilo elemental. Símbolos: cuadrados oscuros: GlcNAc; círculos claros: Man; círculos oscuros: Gal; triángulos oscuros: NeuAc; GnT: N-acetilglucosaminiltransferasa; GalT: galactosiltransferasa; ST: sialiltransferasa.
- 45

La Figura 10 es un esquema que representa diversas estructuras complejas que pueden sintetizarse a partir de una estructura de núcleo de trimanosilo elemental. Símbolos: cuadrados oscuros: GlcNAc; círculos claros: Man; círculos oscuros: Gal; triángulos oscuros: NeuAc; diamantes: fucosa; FT y FucT: fucosiltransferasa; GalT: galactosiltransferasa; ST: sialiltransferasa; Le: antígeno de Lewis; SLe: antígeno de Lewis sialilado.

50

La Figura 11 es un esquema a modo de ejemplo para preparar glicopéptidos ligados en O que se originan con serina o treonina.

- La Figura 12 es una serie de diagramas que representa los cuatro tipos de estructura de O-glicano, llamados núcleos 1 a 4. La estructura de núcleo se esboza en líneas de puntos.
- 55

La Figura 13, que comprende Figura 13A y Figura 13B, es una serie de esquemas que muestran una realización a modo de ejemplo de la invención en la que residuos de hidrato de carbono que comprenden estructuras de hidratos de carbono complejas y/o estructuras de alta manosa son recortados a la estructura biantenaria de la primera generación. Un azúcar modificado que lleva un polímero soluble en agua (WSP) se conjuga entonces

con uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el procedimiento de recorte.

La Figura 14 es un esquema similar al mostrado en la Figura 2, en el que una estructura de alta manosa se “recorta” a la manosa de la que se bifurca la estructura biantenaria y un azúcar modificado que lleva un polímero soluble en agua se conjuga entonces con uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el procedimiento de recorte.

La Figura 15 es un esquema similar al mostrado en la Figura 2, en el que alta manosa se recorta a la GlcNAc a la que está unida la primera manosa, y un azúcar modificado que lleva un polímero soluble en agua se conjuga entonces con uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el procedimiento de recorte.

La Figura 16 es un esquema similar al mostrado en la Figura 2, en el que alta manosa se recorta a la primera GlcNAc unida a la Asn del péptido, tras lo cual un polímero soluble en agua se conjuga con uno o más residuos de azúcar que se han añadido posteriormente.

La Figura 17, que comprende la Figura 17A y 17B, es un esquema en el que un hidrato de carbono ligado en N se recorta y posteriormente se derivatiza con un resto de azúcar modificado (GlcNAc) que lleva un polímero soluble en agua.

La Figura 18, que comprende la Figura 18A y 18B, es un esquema en el que un hidrato de carbono ligado en N se recorta y posteriormente se derivatiza con un resto de ácido siálico que lleva un polímero soluble en agua.

La Figura 19 es un esquema en el que un hidrato de carbono ligado en N se recorta y posteriormente se derivatiza con uno o más restos de ácido siálico, y se termina con un ácido siálico derivatizado con un polímero soluble en agua.

La Figura 20 es un esquema en el que un sacárido ligado en O se “recorta” y posteriormente se conjuga con un azúcar modificado que lleva un polímero soluble en agua. En el esquema a modo de ejemplo, el resto de hidrato de carbono se “recorta” a la primera generación de la estructura biantenaria.

La Figura 21 es un esquema a modo de ejemplo para recortar el resto de hidrato de carbono de un glicopéptido ligado en O para producir una manosa disponible para conjugación con un azúcar modificado que tiene un polímero soluble en agua unido al mismo.

La Figura 22, que comprende Figura 22A a Figura 22C, es una serie de esquemas a modo de ejemplo. La Figura 22A es un esquema que ilustra la adición de un azúcar PEGilado, seguido de la adición de un azúcar no modificado. La Figura 22B es un esquema que ilustra la adición de más que un tipo de azúcar modificado sobre un glicano. La Figura 22C es un esquema que ilustra la adición de diferentes azúcares modificados sobre glicanos ligados en O y glicanos ligados en N.

La Figura 23 es un diagrama de diversos procedimientos de mejora de la función terapéutica de un péptido por remodelación de glicanos, que incluye conjugación.

La Figura 24 es un conjunto de esquemas para la remodelación de glicanos de un péptido terapéutico para tratar enfermedad de Gaucher.

La Figura 25 es un esquema para la remodelación de glicanos para generar glicanos que tienen un resto manosa-6-fosfato terminal.

La Figura 26 es un diagrama que ilustra las estructuras de la matriz de glicano encontradas en glucocerebrosidasa producida por CHO (Cerezyme™) después de la sialilación.

La Figura 27, que comprende las Figuras 27A a 27G, proporciona esquemas a modo de ejemplo para la remodelación de estructuras de glicano sobre factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). La Figura 27A es un diagrama que representa el péptido de G-CSF que indica el residuo de aminoácido al que se une un glicano, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 27B a 27G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 27A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 28, que comprende las Figuras 28A a 28AA, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre interferón-alfa. La Figura 28A es un diagrama que representa el péptido de la isoforma 14c de interferón-alfa que indica el residuo de aminoácido al que se une un glicano, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 28B a 28D son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 28A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 28E es un diagrama que representa el péptido de la isoforma 14c de interferón-alfa que indica el residuo de aminoácido al que se une un glicano, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 28F a 28N son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 28E basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 28O es un diagrama que representa los péptidos de la isoforma 2a o 2b de interferón-alfa que indican el residuo de aminoácido al que se une un glicano, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 28P a 28W son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 28O basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 28X es un diagrama que representa los péptidos de fusión de interferón-alfa-mucina que indica el (los) residuo(s) que se une(n) a glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al (a) los mismo(s). La Figura 28Y a 28AA son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano de los péptidos en la Figura 28X basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 28BB es un diagrama que representa los péptidos de fusión de interferón-alfa-mucina y péptidos de interferón-alfa que indica el (los) residuo(s) que se unen a glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. La Figura 28CC a 28EE son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano de los péptidos en la Figura 28BB basándose en el tipo de

célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 29, que comprende las Figuras 29A a 29S, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre interferón-beta. La Figura 29A es un diagrama que representa el péptido de interferón-beta que indica el residuo de aminoácido al que se une un glicano, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 29B a 29O son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 29A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 29P es un diagrama que representa el péptido de interferón-beta que indica el residuo de aminoácido al que se une un glicano, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 29Q a 29S son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 29P basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 30, que comprende las Figuras 30A a 30D, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre factor VII y factor VIIa. La Figura 30A es un diagrama que representa los péptidos de factor VII y factor VIIa A (línea continua) y B (línea discontinua) que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y las fórmulas para los glicanos. La Figura 30B a 30D son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 30A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 31, que comprende las Figuras 31A a 31G, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre factor IX. La Figura 31A es un diagrama que representa el péptido del factor IX que indica residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas de los glicanos. La Figura 31B a 31G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 31A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 32, que comprende las Figuras 32A a 32J, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre hormona estimuladora del folículo (FSH), que comprende las subunidades α y β . La Figura 32A es un diagrama que representa los péptidos de la hormona estimuladora del folículo FSH α y FSH β que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas a los mismos. La Figura 32B a 32J son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano de los péptidos en la Figura 32A basándose en el tipo de célula en la que se expresan los péptidos y las estructuras de glicano remodeladas deseadas.

La Figura 33, que comprende las Figuras 33A a 33J, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre eritropoyetina (EPO). La Figura 33A es un diagrama que representa el péptido de EPO que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. La Figura 33B a 33J son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 33A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 34, que comprende las Figuras 34A a 34K, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). La Figura 34A es un diagrama que representa el péptido de GM-CSF que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. La Figura 34B a 34G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 34A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 34H es un diagrama que representa el péptido de GM-CSF que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. La Figura 34I a 34K son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 34H basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 35, que comprende las Figuras 35A a 35N, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre interferón-gamma. La Figura 35A es un diagrama que representa un péptido de interferón-gamma que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 35B a 35G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 35A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 35H es un diagrama que representa un péptido de interferón-gamma que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 35I a 35N son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 35H basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 36, que comprende las Figuras 36A a 36O, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre α_1 -antitripsina (ATT, o inhibidor de α_1 proteasa). La Figura 36A es un diagrama que representa un péptido de AAT que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 36B a 36G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 36A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 36H es un diagrama que representa un péptido de AAT que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 36I a 36K son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 36H basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 36L es un

diagrama que representa un péptido de AAT que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 36M a 36O son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 36L basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 37, que comprende las Figuras 37A a 37K, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre glucocerebrosidasa. La Figura 37A es un diagrama que representa el péptido de glucocerebrosidasa que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 37B a 37G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 37A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 37H es un diagrama que representa el péptido de glucocerebrosidasa que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 37I a 37K son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 37H basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 38, que comprende las Figuras 38A a 38W, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre activador de plasminógeno de tipo tejido (TPA). La Figura 38A es un diagrama que representa el péptido de TPA que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. La Figura 38B a 38G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 38A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 38H es un diagrama que representa el péptido de TPA que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. La Figura 38I a 38K son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 38H basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 38L es un diagrama que representa un péptido de TPA mutante que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y la fórmula para los glicanos. La Figura 38M a 38O son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 38L basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 38P es un diagrama que representa un péptido de TPA mutante que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. La Figura 38Q a 38S son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 38P basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 38T es un diagrama que representa un péptido de TPA mutante que indica los residuos que se unen a glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. La Figura 38U a 38W son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 38T basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 39, que comprende las Figuras 39A a 39G, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre interleucina-2 (IL-2). La Figura 39A es un diagrama que representa el péptido de interleucina-2 que indica el residuo de aminoácido al que se une un glicano, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 39B a 39G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 39A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 40, que comprende las Figuras 40A a 40N, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre factor VIII. La Figura 40A son las fórmulas para los glicanos que se unen a los sitios de glicosilación ligados en N (A y A') y a los sitios ligados en O (B) de péptidos del factor VIII. La Figura 40B a 40F son diagramas de etapas de remodelación contempladas de los péptidos en la Figura 40A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 40G son las fórmulas para los glicanos que se unen a los sitios de glicosilación ligados en N (A y A') y a los sitios ligados en O (B) de péptidos del factor VIII. La Figura 40H a 40M son diagramas de etapas de remodelación contempladas de los péptidos en la Figura 40G basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y las estructuras de glicano remodeladas deseadas.

La Figura 41, que comprende las Figuras 41A a 41M, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre uroquinasa. La Figura 41A es un diagrama que representa el péptido de uroquinasa que indica un residuo que se une a un glicano contemplado para la remodelación, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 41B a 41G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 41A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 41H es un diagrama que representa el péptido de uroquinasa que indica un residuo que se une a un glicano contemplado para la remodelación, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 41I a 41M son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 41H basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 42, que comprende las Figuras 42A a 42K, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre ADNasa humana (ADNasah). La Figura 42A es un diagrama que representa el péptido de ADNasa humana que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 42B a 42G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 42A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 42H es un diagrama que

representa el péptido de ADNasa humana que indica residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 42I a 42K son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 42H basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 43, que comprende las Figuras 43A a 43L, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre insulina. La Figura 43A es un diagrama que representa el péptido de insulina mutado para contener un sitio de N-glicosilación y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 43B a 43D son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 43A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 43E es un diagrama que representa péptidos de fusión de insulina-mucina que indica un residuo(s) que se une(n) a un glicano contemplado para la remodelación, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida a los mismos. La Figura 43F a 43H son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 43E basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 43I es un diagrama que representa los péptidos de fusión de insulina-mucina y péptidos de insulina que indica un residuo(s) que se une(n) a un glicano contemplado para la remodelación y fórmulas para el glicano. La Figura 43J a 43L son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 43I basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 44, que comprende las Figuras 44A a 44K, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre el antígeno M (preS y S) de la proteína de superficie de la hepatitis B (HBsAg). La Figura 44A es un diagrama que representa el péptido del antígeno M que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. La Figura 44B a 44G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 44A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 44H es un diagrama que representa el péptido del antígeno M que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. La Figura 44I a 44K son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 44H basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 45, que comprende las Figuras 45A a 45K, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre hormona de crecimiento humana, que incluye N, V y variantes de las mismas. La Figura 45A es un diagrama que representa el péptido de la hormona de crecimiento humana que indica un residuo que se une a un glicano contemplado para la remodelación, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 45B a 45D son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano del péptido en la Figura 45A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 45E es un diagrama que representa los tres péptidos de fusión que comprenden el péptido de la hormona de crecimiento humana y parte o todo un péptido de mucina y que indica un residuo(s) que se une(n) a un glicano contemplado para la remodelación, y a modo de ejemplo fórmula(s) de glicanos unida(s) a los mismos. La Figura 45F a 45K son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano de los péptidos en la Figura 45E basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 46, que comprende las Figuras 46A a 46G, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre una proteína de fusión de receptor de TNF-región Fc de IgG (Enbrel™). La Figura 46A es un diagrama que representa un péptido de fusión de receptor de TNF-región Fc de IgG que puede mutarse para contener sitios de N-glicosilación adicionales que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación y fórmulas para los glicanos. El péptido de receptor de TNF se representa en línea gruesa, y las regiones Fc de IgG se representan en línea normal. La Figura 46B a 46G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 46A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 47 proporciona a modo de ejemplo esquemas para remodelar estructuras de glicano sobre un anticuerpo monoclonal anti-HER2 (Herceptin™). La Figura 47A es un diagrama que representa un anticuerpo monoclonal anti-HER2 que ha sido mutado para contener un sitio(S) de N-glicosilación que indica un residuo(s) sobre la cadena pesada del anticuerpo que se une(n) a un glicano contemplado para la remodelación, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 47B a 47D son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano de los péptidos en la Figura 47A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 48, que comprende las Figuras 48A a 48D, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre un anticuerpo monoclonal para la proteína F del virus respiratorio sincitial (Synagis™). La Figura 48A es un diagrama que representa un anticuerpo monoclonal para el péptido de la proteína F que está mutado para contener un sitio(s) de N-glicosilación(s) que indica un residuo(s) que se une(n) a un glicano contemplado para la remodelación, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 48B a 48D son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 48A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 49, que comprende las Figuras 49A a 49D, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre un anticuerpo monoclonal para TNF- α (Remicade™). La Figura 49A es un diagrama que representa un anticuerpo monoclonal para TNF- α que ha sido mutado para contener un sitio(s) de

N-glicosilación que indica un residuo que se une a un glicano contemplado para la remodelación, y una fórmula de glicano a modo de ejemplo unida al mismo. La Figura 49B a 49D son diagramas de etapas de remodelación contempladas del péptido en la Figura 49A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 50, que comprende las Figuras 50A a 50D, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre un anticuerpo monoclonal para la glicoproteína IIb/IIIa (Reopro™). La Figura 50A es un diagrama que representa un anticuerpo monoclonal mutante para péptidos de la glicoproteína IIb/IIIa que han sido mutados para contener un sitio(s) de N-glicosilación que indica el (los) residuo(s) que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 50B a 50D son diagramas de etapas de remodelación contempladas basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 50E es un diagrama que representa anticuerpo monoclonal para péptidos de fusión de la glicoproteína IIb/IIIa-mucina que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas a los mismos. La Figura 50F a 50H son diagramas de etapas de remodelación contempladas basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 50I es un diagrama que representa anticuerpo monoclonal para péptidos de fusión de la glicoproteína IIb/IIIa-mucina y anticuerpo monoclonal para péptidos de la glicoproteína IIb/IIIa que indica los residuos que se unen a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas a los mismos. La Figura 50J a 50L son diagramas de etapas de remodelación contempladas basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 51, que comprende las Figuras 51A a 51D, expone esquemas a modo de ejemplo para remodelar estructuras de glicano sobre un anticuerpo monoclonal para CD20 (Rituxan™). La Figura 51A es un diagrama que representa anticuerpo monoclonal para CD20 que ha sido mutado para contener un sitio(s) de N-glicosilación que indica el residuo que se une a glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 51B a 51D son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano de los péptidos en la Figura 51A basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada. La Figura 51E es un diagrama que representa anticuerpo monoclonal para CD20 que ha sido mutado para contener un sitio(s) de N-glicosilación que indica el (los) residuo(s) que se une(n) a los glicanos contemplados para la remodelación, y fórmulas de glicano a modo de ejemplo unidas al mismo. La Figura 51F a 51G son diagramas de etapas de remodelación contempladas del glicano de los péptidos en la Figura 51E basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y la estructura de glicano remodelada deseada.

La Figura 52, que comprende las Figuras 52A y 52B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente).

La Figura 53, que comprende las Figuras 53A y 53B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de interferón alfa (IFN-alfa) (SEC ID N°: 3 y 4, respectivamente).

La Figura 54, que comprende las Figuras 54A y 54B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de interferón beta (IFN-beta) (SEC ID N°: 5 y 6, respectivamente).

La Figura 55, que comprende las Figuras 55A y 55B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo del factor VIIa (SEC ID N°: 7 y 8, respectivamente).

La Figura 56, que comprende las Figuras 56A y 56B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo del factor IX (SEC ID N°: 9 y 10, respectivamente).

La Figura 57, que comprende las Figuras 57A mediante 57D, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de las cadenas alfa y beta de la hormona estimuladora del folículo (FSH), respectivamente (SEC ID N°: 11 a 14, respectivamente).

La Figura 58, que comprende las Figuras 58A y 58B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de eritropoyetina (EPO) (SEC ID N°: 15 y 16, respectivamente).

La Figura 59, que comprende las Figuras 59A y 59B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (SEC ID N°: 17 y 18, respectivamente).

La Figura 60, que comprende las Figuras 60A y 60B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de interferón gamma (IFN-gamma) (SEC ID N°: 19 y 20, respectivamente).

La Figura 61, que comprende las Figuras 61A y 61B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de inhibidor de α -1-proteasa (A-1-PI, o α -antitripsina) (SEC ID N°: 21 y 22, respectivamente).

La Figura 62, que comprende las Figuras 62A-1 a 62A-2, y 62B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de glucocerebrosidasa (SEC ID N°: 23 y 24, respectivamente).

La Figura 63, que comprende las Figuras 63A y 63B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de activador de plasminógeno de tipo tejido (TPA) (SEC ID N°: 25 y 26, respectivamente).

La Figura 64, que comprende las Figuras 64A y 64B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de interleucina-2 (IL-2) (SEC ID N°: 27 y 28, respectivamente).

La Figura 65, que comprende las Figuras 65A-1 a 65A-4 y la Figura 65B-1 a 65B-4, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo del factor VIII (SEC ID N°: 29 y 30, respectivamente).

La Figura 66, que comprende las Figuras 66A y 66B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de uroquinasa (SEC ID N°: 33 y 34, respectivamente).

La Figura 67, que comprende las Figuras 67A y 67B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de ADNasa recombinante humana (ADNasarh) (SEC ID N°: 39 y 40, respectivamente).

La Figura 68, que comprende las Figuras 68A y 68B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de un anticuerpo monoclonal humanizado para glicoproteína IIb/IIIa (SEC ID N°: 43 y 44, respectivamente).

La Figura 69, que comprende las Figuras 69A y 69B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de proteína S de un virus de la hepatitis B (HBsAg) (SEC ID N°: 45 y 46, respectivamente).

La Figura 70, que comprende las Figuras 70A y 70B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de la hormona de crecimiento humana (HGH) (SEC ID N°: 47 y 48, respectivamente).

La Figura 71, que comprende las Figuras 71A y 71B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF-R) de 75 kDa, que comprende una parte de Enbrel™ (fusión de receptor de factor de necrosis tumoral (TNF-R)/IgG) (SEC ID N°: 31 y 32, respectivamente).

La Figura 72, que comprende las Figuras 72A y 72B, es una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de las cadenas ligeras y pesadas, respectivamente, de Herceptin™ (anticuerpo monoclonal (MAb) para Her-2, receptor de factor de crecimiento epidérmico humano) (SEC ID N°: 35 y 36, respectivamente).

La Figura 73, que comprende las Figuras 73A y 73B, es una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente, de Synagis™ (MAb para péptido F del virus respiratorio sincitial) (SEC ID N°: 37 y 38, respectivamente).

La Figura 74, que comprende las Figuras 74A y 74B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de las regiones variables no humanas de Remicade™ (MAb para TNF α) (SEC ID N°: 41 y 42, respectivamente).

La Figura 75, que comprende las Figuras 75A y 75B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de la porción Fc de IgG humana (SEC ID N°: 49 y 50, respectivamente).

La Figura 76 es una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de la cadena ligera de la región variable madura de un anticuerpo murino anti-glicoproteína IIb/IIIa (SEC ID N°: 52).

La Figura 77 es una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de la cadena pesada de la región variable madura de un anticuerpo murino anti-glicoproteína IIb/IIIa (SEC ID N°: 54).

La Figura 78 es una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de la cadena ligera de la región variable de una IgG humana (SEC ID N°: 51).

La Figura 79 es una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de la cadena pesada de la región variable de una IgG humana (SEC ID N°: 53).

La Figura 80 es una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de una cadena ligera de una IgG humana (SEC ID N°: 55).

La Figura 81 es una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de una cadena pesada de una IgG humana (SEC ID N°: 56).

La Figura 82, que comprende las Figuras 82A y 82B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de la región variable de la cadena ligera madura de un anticuerpo murino anti-CD20 (SEC ID N°: 59 y 60, respectivamente).

La Figura 83, que comprende las Figuras 83A y 83B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a modo de ejemplo de la región variable de la cadena pesada madura de un anticuerpo murino anti-CD20 (SEC ID N°: 61 y 62, respectivamente).

La Figura 84, que comprende las Figuras 84A a 84E, es la secuencia de nucleótidos del vector de expresión para anticuerpos quiméricos en tándem TCAE 8 (SEC ID N°: 57).

La Figura 85, que comprende las Figuras 85A a 85E, es la secuencia de nucleótidos del vector de expresión para anticuerpos quiméricos en tándem TCAE 8 que contiene los dominios ligeros y pesados del anticuerpo murino anti-CD20 (SEC ID N°: 58).

La Figura 86 es una imagen de un gel de acrilamida que representa los resultados de análisis de FACE de la pre- y post-sialilación de TP10. La especie BiNA₀ no tiene residuos de ácido siálico. La especie BiNA₁ tiene un residuo de ácido siálico. La especie BiNA₂ tiene dos residuos de ácido siálico. Bi = biantenaria; AN = ácido neuramínico.

La Figura 87 es una gráfica que representa la concentración en plasma en $\mu\text{g/ml}$ con el tiempo de TP10 pre- y post-sialilación inyectado en ratas.

La Figura 88 es una gráfica que representa el área bajo la curva de la concentración en plasma-tiempo (ABC) en $\mu\text{g/h/ml}$ para TP10 pre- y post sialilado.

La Figura 89 es una imagen de un gel de acrilamida que representa los resultados de análisis de FACE de la pre- y post-fucosilación de TP10. La especie BiNA₂F₂ tiene dos residuos de ácido neuramínico (AN) y dos residuos de fucosa (F).

La Figura 90 es una gráfica que representa la unión *in vitro* de TP20 (sCR1sLe^x) glucosilado *in vitro* (diamantes) e *in vivo* en células CHO de Lec11 (cuadrados).

La Figura 91 es una gráfica que representa el análisis por HPLC 2-AA de glicoformas de la GlcNAc-ilación de

EPO.

La Figura 92, que comprende las Figuras 92A y 92B, es dos gráficas que representan el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB (Figura 92A) y el perfil de HPLC de los oligosacáridos escindidos de ARNasaB por N-glucanasa (Figura 92B). La mayoría de sitios de N-glicosilación del péptido se modifican con oligosacáridos de alta manosa constituidos por 5 a 9 residuos de manosa.

La Figura 93 es un esquema que representa la conversión de N-glicanos de alta manosa en N-glicanos híbridos. La enzima 1 es α 1,2-manosidasa, de *Trichoderma reesei* o *Aspergillus saitoi*. La enzima 2 es GnT-I (β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa I). La enzima 3 es GalT-I (β 1,4-galactosiltransferasa 1). La enzima 4 es α 2,3-sialiltransferasa o α 2,6-sialiltransferasa.

La Figura 94, que comprende las Figuras 94A y 94B, es dos gráficas que representa el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB tratada con una α 1,2-manosidasa de *T. reesei* recombinante (Figura 94A) y el perfil de HPLC de los oligosacáridos escindidos por N-glucanasa de la ARNasaB modificada (Figura 94B).

La Figura 95 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB tratada con una α 1,2-manosidasa comercialmente disponible purificada de *A. saitoi* (Glyko & CalBioChem).

La Figura 96 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB modificada tratando el producto mostrado en la Figura 94 con una GnT-I recombinante (GlcNAc transferasa-I).

La Figura 97 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB modificada tratando el producto mostrado en la Figura 96 con una GalT 1 recombinante (galactosiltransferasa 1).

La Figura 98 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB modificada tratando el producto mostrado en la Figura 97 con una ST3 Gal III recombinante (α 2,3-sialiltransferasa III) usando MFC-AS como donante para la transferasa.

La Figura 99 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB modificada tratando el producto mostrado en la Figura 97 con una ST3 gal III recombinante (α 2,3-sialiltransferasa III) usando MFC-AS-PEG (10 kDa) como donante para la transferasa.

La Figura 100 es una serie de esquemas que representa la conversión de N-glicanos de alta manosa en N-glicanos complejos. La enzima 1 es α 1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* o *Aspergillus saitoi*. La enzima 2 es GnT-I. La enzima 3 es GAIT 1. La enzima 4 es α 2,3-sialiltransferasa o α 2,6-sialiltransferasa. La enzima 5 es α -manosidasa II. La enzima 6 es α -manosidasa. La enzima 7 es GnT-II. La enzima 8 es α 1,6-manosidasa. La enzima 9 es α 1,3-manosidasa.

La Figura 101 es un diagrama del enlace catalizado por N-acetilglucosaminiltransferasa I a VI (GnT I-VI). R = GlcNAc β 1,4GlcNAc-Asn-X.

La Figura 102, que comprende las Figuras 102A y 102B, son gráficas que representan el análisis de HPLC 2-AA de dos lotes de EPO a los que se ha añadido N-acetilglucosamina. La Figura 102A representa el análisis del lote A y la Figura 102B representa el análisis del lote B.

La Figura 103 es una gráfica que representa el análisis de HPLC 2-AA de los productos la reacción introduciendo una tercera rama de glicano en EPO con GnT-V.

La Figura 104 es una gráfica que representa un espectro de MALDI-TOF de los glicanos de la preparación de EPO después del tratamiento con GnT-I, GnT-II, GnT-III, GnT-IV y GalT1, con grupos donantes apropiados.

La Figura 105 es una imagen de un gel de isoelectroenfoque (IEF) que representa los productos de la reacción de desialilación de FSH de pituitaria humana. Los carriles 1 y 4 son patrones de isoelectroenfoque (IEF). El carril 2 es FSH nativa. El carril 3 es FSH desialilada.

La Figura 106 es una imagen de un gel de SDS-PAGE de los productos de las reacciones para hacer la PEG-sialilación de FSHr. Los carriles 1 y 8 son patrones de peso molecular SeeBlue+2. El carril 2 es 15 μ g de FSH nativa. El carril 3 es 15 μ g de asialo-FSH (AS-FSH). El carril 4 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS. El carril 5 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (1 kDa). El carril 6 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (5 kDa). El carril 7 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (10 kDa).

La Figura 107 es una imagen de un gel de isoelectroenfoque de los productos de las reacciones para hacer la PEG-sialilación de FSH. Los carriles 1 y 8 son patrones de IEF. El carril 2 es 15 μ g de FSH nativa. El carril 3 es 15 μ g de asialo-FSH (AS-FSH). El carril 4 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS. El carril 5 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (1 kDa). El carril 6 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (5 kDa). El carril 7 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (10 kDa).

La Figura 108 es una imagen de un gel de SDS-PAGE de FSH no recombinante nativa producida en células de la pituitaria humana. Los carriles 1, 2 y 5 son patrones de peso molecular SeeBlue™+2. Los carriles 3 y 4 son FSH nativa a 5 μ g y 25 μ g, respectivamente.

La Figura 109 es una imagen de un gel de isoelectroenfoque (pH 3-7) que representa los productos de la reacción de asialilación de FSHr. Los carriles 1 y 4 son patrones de IEF. El carril 2 es FSHr nativa. El carril 3 es asialo-FSHr.

La Figura 110 es una imagen de un gel de SDS-PAGE que representa los resultados de la PEG-sialilación de asialo-FSHr. El carril 1 es FSHr nativa. El carril 2 es asialo-FSH. El carril 3 es los productos de la reacción de asialo-FSH y MFC-AS. Los carriles 4-7 son los productos de la reacción entre asialo-FSH y MFC-AS-PEG 0,5 mM (10 kDa) a 2 h, 5 h, 24 h y 48 h, respectivamente. El carril 8 es los productos de la reacción entre asialo-FSH y MFC-AS-PEG 1,0 mM (10 kDa) a 48 h. El carril 9 es los productos de la reacción entre asialo-FSH y MFC-AS-PEG 1,0 mM (1 kDa) a 48 h.

La Figura 111 es una imagen de un gel de isoelectroenfoque que muestra los productos de PEG-sialilación de asialo-FSHr con MFC-AS-PEG (1 kDa). El carril 1 es FSHr nativa. El carril 2 es asialo-FSHr. El carril 3 es los productos de la reacción de asialo-FSHr y MFC-AS a 24 h. Los carriles 4-7 son los productos de la reacción de asialo-FSHr y MFC-AS-PEG 0,5 mM (1 kDa) a 2 h, 5 h, 24 h y 48 h, respectivamente. El carril 8 es blanco. Los carriles 9 y 10 son los productos de la reacción a 48 h de asialo-FSHr y MFC-AS-PEG (10 kDa) a 0,5 mM y 1,0 mM, respectivamente.

La Figura 112 es una gráfica de la farmacocinética de FSHr y FSHr-AS-PEG (1 kDa y 10 kDa). Esta gráfica ilustra la relación entre el tiempo que un compuesto de FSHr está en la corriente sanguínea de la rata y la concentración media del compuesto de FSHr en la sangre para FSHr glucoPEGilada con respecto a FSHr no PEGilada.

La Figura 113 es una gráfica de los resultados del bioensayo de FSH usando células Sertoli. Esta gráfica ilustra la relación entre la concentración de FSH en el medio de incubación de células Sertoli y la cantidad de 17β -estradiol liberado de las células de Sertoli.

La Figura 114 es una imagen de un gel de SDS-PAGE: patrón (carril 1); transferrina nativa (carril 2); asialotransferrina (carril 3); asialotransferrina y MFC-AS (carril 4); carriles 5 y 6, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (1 kDa) a 0,5 mM y 5 mM, respectivamente; carriles 7 y 8, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (5 kDa) a 0,5 mM y 5 mM, respectivamente; carriles 9 y 10, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (10 kDa) a 0,5 mM y 5 mM, respectivamente.

La Figura 115 es una imagen de un gel de IEF: transferrina nativa (carril 1); asialotransferrina (carril 2); asialotransferrina y MFC-AS, 24 h (carril 3); asialotransferrina y MFC-AS, 96 h (carril 4); carriles 5 y 6, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (1 kDa) a 24 h y 96 h, respectivamente; carriles 7 y 8, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (5 kDa) a 24 h y 96 h, respectivamente; carriles 9 y 10, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (10 kDa) a 24 h y 96 h, respectivamente.

La Figura 116 es una imagen de un gel de isoelectroenfoque (pH 3-7) de asialo-factor VIIa. El carril 1 es factor VIIar; los carriles 2-5 son asialo-factor VIIa.

La Figura 117 es una gráfica de un espectro de MALDI de factor VIIa.

La Figura 118 es una gráfica de un espectro de MALDI de factor VIIa-PEG (1 kDa).

La Figura 119 es una gráfica que representa un espectro de MALDI del factor VIIa-PEG (10 kDa).

La Figura 120 es una imagen de un gel de SDS-PAGE del factor VIIa PEGilado. El carril 1 es asialo-factor VIIa. El carril 2 es el producto de la reacción de asialo-factor VIIa y MFC-AS-PEG (1 kDa) con ST3 gal3 después de 48 h. El carril 3 es el producto de la reacción de asialo-factor VIIa y MFC-AS-PEG (1 kDa) con ST3 gal3 después de 48 h. El carril 4 es el producto de la reacción de asialo-factor VIIa y MFC-AS-PEG (10 kDa) con ST3 gal3 a 96 h.

La Figura 121 es una imagen de un gel de IEF que representa el pl de los productos del procedimiento de desialilación. Los carriles 1 y 5 son patrones de IEF. El carril 2 es proteína del factor IX. El carril 3 es proteína del factor IXr. El carril 4 es la reacción de desialilación de proteína de factor IXr a 20 h.

La Figura 122 es una imagen de un gel de SDS-PAGE que representa el peso molecular de factor IX conjugado con tanto AS-PEG (1 kDa) como AS-PEG (10 kDa) después de la reacción con MFC-AS-PEG. Los carriles 1 y 6 son patrones de peso molecular SeeBlue +2. El carril 2 es F-IXr. El carril 3 es F-IXr desialilado. El carril 4 es factor IXr conjugado con AS-PEG (1 kDa). El carril 5 es factor IXr conjugado con AS-PEG (10 kDa).

La Figura 123 es una imagen de un gel de SDS-PAGE que representa los productos de reacción de sialilación directa de factor IX y encapuchado de ácido siálico de factor IX-AS-PEG. El carril 1 es patrones de proteína, el carril 2 es blanco; el carril 3 es factor IXr; el carril 4 es factor IXr-AS-PEG encapuchado con AS (10 kDa); el carril 5 es factor IXr-AS-PEG (10 kDa); el carril 6 es ST3 gal1; el carril 7 es ST3 gal3; los carriles 8, 9, 10 son factor IXr-AS-PEG (10 kDa) sin tratamiento con sialidasa previo.

La Figura 124 es una gráfica que representa un espectro de MALDI de los glicanos de EPO nativa.

La Figura 125 es una imagen de un gel de SDS-PAGE de los productos de reacciones de PEGilación usando MFC-NAN-PEG (1 kDa) y MFC-NAN-PEG (10 kDa).

La Figura 126 es una gráfica que representa los resultados del bioensayo *in vitro* de EPO PEGilada. Los diamantes representan los datos de EPO sialilada que no tiene moléculas de PEG. Los cuadrados representan los datos obtenidos usando EPO con PEG (kDa). Los triángulos representan los datos obtenidos usando EPO con PEG (10 kDa).

Descripción detallada de la invención

La presente invención incluye procedimientos y composiciones para la adición y/o delección *in vitro* sin células de azúcares a o de una molécula de péptido en un modo tal que se proporcione una molécula de glicopéptido que tiene un patrón de glicosilación personalizado o deseado específico, en el que el glicopéptido se produce a una escala industrial. En una realización preferida de la invención, el glicopéptido así producido ha unido al mismo un azúcar modificado que se ha añadido al péptido mediante una reacción enzimática. Una característica clave de la invención es tomar un péptido producido por cualquier tipo de célula y generar una estructura de glicano de núcleo sobre el péptido, tras lo cual la estructura de glicano se remodela luego *in vitro* para generar un glicopéptido que tiene un patrón de glicosilación adecuado para uso terapéutico en un mamífero. Más específicamente, según la presente invención es posible preparar una molécula de glicopéptido que tiene una molécula de azúcar modificado u otro compuesto conjugado a la misma, de forma que la molécula conjugada confiera una propiedad beneficiosa sobre el péptido. Según la presente invención, la molécula conjugada se añade al péptido enzimáticamente debido a que la

adición basada en enzimas de moléculas conjugadas a péptidos tiene la ventaja de regioselectividad y estereoselectividad. Por tanto, es posible usar los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento para remodelar un péptido para conferir al péptido una estructura de glicano deseada que tiene preferentemente un azúcar modificado unido al mismo. También es posible usar los procedimientos y composiciones de la invención para generar moléculas de péptido que tienen estructuras de glicano deseadas y/o modificadas a una escala industrial, proveyendo así por primera vez a la materia de una solución práctica para la eficiente producción de péptidos terapéuticos mejorados.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen generalmente el mismo significado que comúnmente es entendido por 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 en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de los ácidos nucleicos e hibridación son aquellos muy conocidos y comúnmente empleados en la materia. Técnicas convencionales se usan para la síntesis de ácidos nucleicos y de péptidos. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente según procedimientos convencionales en la materia y diversas referencias generales (por ejemplo, Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), que se proporcionan en el presente documento. La nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio usados en la química analítica y síntesis orgánicas descritas más adelante son aquellos muy conocidos y comúnmente empleados en la materia. Técnicas convencionales o modificaciones de las mismas se usan para síntesis químicas y análisis químicos.

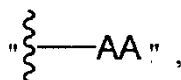
Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del sujeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

El término “anticuerpo,” como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un epítipo específico sobre un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son normalmente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, además de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos humanizados (Harlow y col., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow y col., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston y col., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird y col., 1988, Science 242:423-426).

Por el término “anticuerpo sintético”, como se usa en el presente documento, se indica un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago como se describe en el presente documento. El término también debe interpretarse que significa un anticuerpo que ha sido generado por la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en la que el ADN o secuencia de aminoácidos ha sido obtenida usando tecnología de secuencias de ADN sintético o de aminoácidos que está disponible y es muy conocida en la técnica.

Como se usa en el presente documento, una molécula biológica “funcional” es una molécula biológica en una forma en la que presenta una propiedad por la que se caracteriza. Una enzima funcional, por ejemplo, es una que presenta la actividad catalítica característica por la que se caracteriza la enzima.

Como se usa en el presente documento, la estructura



es el punto de conexión entre un aminoácido en la cadena peptídica y la estructura de glicano.

Oligosacáridos “ligados en N” son aquellos oligosacáridos que están ligados a un esqueleto de péptido mediante asparagina, a modo de un enlace asparagina-N-acetilglucosamina. Los oligosacáridos ligados en N también se llaman “N-glicanos”. Todos los oligosacáridos ligados en N tienen un núcleo de pentasacárido común de Man₃GlcNAc₂. Se diferencian en la presencia de, y en el número de, ramas (también llamadas antenas) de azúcares periféricos tales como N-acetilglucosamina, galactosa, N-acetilgalactosamina, fucosa y ácido siálico. Opcionalmente, esta estructura también puede contener una molécula de fucosa y/o una molécula de xilosa de núcleo.

Una “estructura de núcleo de trimanosilo elemental” se refiere a un resto de glicano que comprende únicamente una estructura de núcleo de trimanosilo, sin azúcares adicionales unidos a la misma. Si el término “elemental” no se incluye en la descripción de la “estructura de núcleo de trimanosilo”, entonces el glicano comprende la estructura de

núcleo de trisacárido con azúcares adicionales unidos a la misma. Opcionalmente, esta estructura también puede contener una molécula de fucosa y/o una molécula de xilosa de núcleo.

El término “glicopéptido de núcleo de trisacárido elemental” se usa en el presente documento para referirse a un glicopéptido que tiene estructuras de glicano constituidas principalmente por una estructura de núcleo de trisacárido elemental. Opcionalmente, esta estructura también puede contener una molécula de fucosa y/o una molécula de xilosa de núcleo.

Oligosacáridos “ligados en O” son aquellos oligosacáridos que están ligados a un esqueleto de péptido mediante treonina o serina.

Todos los oligosacáridos descritos en el presente documento se describen con el nombre o abreviatura para el sacárido no reductor (es decir, Gal), seguido de la configuración del enlace glicosídico (α o β), el enlace de anillo (1 ó 2), la posición de anillo del sacárido reductor que participa en el enlace (2, 3, 4, 6 u 8), y luego el nombre o abreviatura del sacárido reductor (es decir, GlcNAc). Cada sacárido es preferentemente una piranosa. Para una revisión de nomenclatura de glucobiología convencional véase *Essentials of Glycobiology*, Varki y col. eds., 1999, CSHL Press.

El término “ácido siálico” se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico (frecuentemente abreviado Neu5Ac, NeuAc o NANA). Un segundo miembro de la familia es ácido N-glucolil-neuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en que el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es 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)). También están incluidos ácidos siálicos 9-sustituidos tales como 9-O-acil C₁-C₆-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para 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 procedimiento de sialilación se desvela en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.

Un péptido que tiene “glicosilación deseada”, como se usa en el presente documento, es un péptido que comprende una o más moléculas de oligosacárido que se requieren para la actividad biológica eficiente del péptido.

Una “enfermedad” es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis, y en el que si la enfermedad no mejora, la salud del animal continúa entonces deteriorándose.

El “área bajo la curva” o “ABC”, como se usa en el presente documento en el contexto de administrar un fármaco de péptido a un paciente, se define como el área total bajo la curva que describe la concentración de fármaco en la circulación sistémica en el paciente en función del tiempo de cero a infinito.

El término “semivida” o “t_{1/2}”, como se usa en el presente documento en el contexto de administrar un fármaco de péptido a un paciente, se define como el tiempo requerido para que la concentración en plasma de un fármaco en un paciente se reduzca a la mitad. Puede haber más de una semivida asociada al fármaco de péptido que depende de múltiples mecanismos de eliminación, redistribución, y otros mecanismos muy conocidos en la técnica. Normalmente, las semividas alfa y beta se definen de forma que la fase alfa está asociada con la redistribución y la fase beta está asociada con la eliminación. Sin embargo, con fármacos de proteína que, en general, están confinados a la circulación sanguínea, puede haber al menos dos semividas de eliminación. Para algunos péptidos glicosilados, la rápida eliminación de la fase beta puede medirse por receptores sobre macrófagos, o células endoteliales que reconocen galactosa terminal, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa o fucosa. La eliminación de fase beta más lenta puede producirse mediante filtración glomerular renal para moléculas con un radio eficaz < 2 nm (aproximadamente 68 kD) y/o captación y metabolismo específico o no específico en tejidos. La glucoPEGilación puede encapuchar azúcares terminales (por ejemplo, galactosa o N-acetilgalactosamina) y así bloquear la rápida eliminación de la fase alfa mediante receptores que reconocen estos azúcares. También puede conferir un radio eficaz más grande y así disminuir el volumen de distribución y captación de tejido, prolongando así la fase beta tardía. Por tanto, el impacto preciso de la glucoPEGilación sobre las semividas de fase alfa y fase beta variará dependiendo del tamaño, estado de glicosilación, y otros parámetros como es muy conocido en la técnica. Más explicación de “semivida” se encuentra en *Pharmaceutical Biotechnology* (1997, DFA Crommelin y RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Ámsterdam, págs. 101 - 120).

El término “tiempo de residencia”, como se usa en el presente documento en el contexto de la administración de un fármaco de péptido a un paciente, se define como el tiempo promedio que el fármaco permanece en el cuerpo del paciente después de dosificarse.

Un “ácido nucleico aislado” se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de las secuencias que lo flanquean en un estado que se produce naturalmente, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en que se produce naturalmente. El término también se aplica a ácidos

nucleicos que se han purificado sustancialmente de otros componentes que acompañan naturalmente al ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN o proteínas que lo acompañan naturalmente en la célula. Por tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus autónomamente replicante, o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, como un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o digestión con enzima de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un ácido nucleico híbrido que codifica secuencia de péptidos adicional.

Un “polinucleótido” significa una única hebra o hebras paralelas o antiparalelas de un ácido nucleico. Por tanto, un polinucleótido puede ser tanto un ácido nucleico monocatenario como bicatenario.

El término “ácido nucleico” normalmente se refiere a polinucleótidos grandes. El término “oligonucleótido” normalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente no más de aproximadamente 50 nucleótidos.

En el presente documento se usa notación convencional para describir secuencias de polinucleótidos: el extremo a mano izquierda de una secuencia de polinucleótidos monocatenaria es el extremo 5'; la dirección a mano izquierda de una secuencia de polinucleótidos bicatenaria se denomina la dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de nucleótidos a transcritos de ARN nacientes se denomina la dirección de transcripción. La hebra de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina la “hebra codificante”; secuencias sobre la cadena de ADN que se localizan 5' con respecto a un punto de referencia sobre el ADN se denominan “secuencias en la dirección 5'”; secuencias sobre la hebra de ADN con respecto a un punto de referencia sobre el ADN se denominan “secuencias en la dirección 3'”.

“Que codifica” se refiere a la propiedad inherente de secuencias de nucleótidos específicas en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir de moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen tanto una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) como una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de la misma. Por tanto, una secuencia de ácidos nucleicos codifica una proteína si la transcripción y traducción de ARNm correspondiente al ácido nucleico produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Puede denominarse que tanto la hebra codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona normalmente en los listados de secuencias, como la hebra no codificante, usada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, codifican la proteína u otro producto de ese ácido nucleico o ADNc.

A menos que se especifique de otro modo, una “secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

“Homólogo”, como se usa en el presente documento, se refiere a la similitud de secuencias de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de péptido. Si una posición de subunidad en cualquiera de las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias de compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas el 50%, si el 90% de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten el 90% de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 3'ATTGCC5' y 3'TATGGC comparten el 50% de homología.

Como se usa en el presente documento, “homología” se usa sinónimamente con “identidad”.

La determinación de la identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos puede llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, un algoritmo matemático útil para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268), modificado como en Karlin y Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877). Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) y puede accederse, por ejemplo, en el sitio de la malla mundial del Centro nacional para información biotecnológica (NCBI) que tiene el localizador universal de recursos “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>”. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST (designado “blastn” en el sitio web de NCBI), usando los siguientes parámetros: penalización por hueco = 5; penalización por extensión de hueco = 2; penalización por desapareamiento = 3; recompensa por coincidencia = 1; valor esperado 10,0; y tamaño de palabra = 11 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico descrito en el presente documento. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST (designado “blastp” en el sitio web de NCBI) o el programa NCBI “blastp”, usando los siguientes parámetros: valor esperado 10,0, matriz de puntuación BLOSUM62 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en el presente documento. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, Gapped BLAST puede utilizarse como se describe en Altschul y col. (1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Alternativamente, PSI-Blast o PHI-Blast pueden usarse para realizar una

búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (*idem*) y relaciones entre moléculas que comparten un patrón común. Si se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast y PHI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

- 5 La identidad en porcentaje entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a aquellas descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo de la identidad en porcentaje, normalmente se cuentan coincidencias exactas.

- 10 Una “unidad de expresión de ácido nucleico heterólogo” que codifica un péptido se define como un ácido nucleico que tiene una secuencia codificante para un péptido de interés operativamente ligado a una o más secuencias de control de la expresión, tales como promotores y/o secuencias represoras en las que al menos una de las secuencias es heteróloga, es decir, no se encuentra normalmente en la célula huésped.

- 15 Describiendo dos polinucleótidos como “operativamente ligados” se indica que un resto de ácido nucleico monocatenario o bicatenario comprende los dos polinucleótidos dispuestos dentro del resto de ácido nucleico en tal forma que al menos uno de los dos polinucleótidos pueda ejercer un efecto fisiológico por el cual se caracteriza con respecto al otro. A modo de ejemplo, un promotor operativamente ligado a la región codificante de un ácido nucleico puede promover la transcripción de la región codificante.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término “secuencia promotora/reguladora” significa una secuencia de ácidos nucleicos que se requiere para la expresión de un producto génico operativamente ligado a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora del núcleo y en otros casos esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que expresa el producto génico en un modo específico para tejido.

- 25 Un “promotor constitutivo” es un promotor que acciona la expresión de un gen con el que está operativamente ligado, de una manera constante en una célula. A modo de ejemplo, promotores que accionan la expresión de genes de mantenimiento celulares se consideran que son promotores constitutivos.

Un promotor “inducible” es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente ligada a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula viva sustancialmente solo cuando un inductor que se corresponde con el promotor está presente en la célula.

- 30 Un promotor “específico para tejido” es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente ligada a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula viva sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

- 35 Un “vector” es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. En la técnica se conocen numerosos vectores que incluyen, pero no se limita a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados a compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Por tanto, el término “vector” incluye un plásmido autónomamente replicante o un virus. El término también debe interpretarse que incluye compuestos de no plásmido y no víricos que facilitan la transferencia de ácido nucleico en células tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Ejemplos de vectores víricos incluyen, pero no se limita a, vectores adenovíricos, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovíricos y similares.

- 40 “Vector de expresión” se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión operativamente ligadas a una secuencia de nucleótidos que va a expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción *in cis* para la expresión; otros elementos para la expresión pueden suministrarse por célula huésped o en un sistema de expresión *in vitro*. Vectores de expresión incluyen todos aquellos conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante.

Una célula “genéticamente manipulada” o “recombinante” es una célula que tiene una o más modificaciones al material genético de la célula. Se observa que tales modificaciones incluyen, pero no se limita a, inserciones de material genético, deleciones de material genético e inserción de material genético que es extracromosómicamente tanto si tal material se mantiene establemente como si no.

- 50 Un “péptido” es un oligopéptido, polipéptido, péptido, proteína o glicoproteína. El uso del término “péptido” en el presente documento incluye un péptido que tiene una molécula de azúcar unida al mismo cuando una molécula de azúcar está unida al mismo.

- 55 Como se usa en el presente documento, “forma nativa” significa la forma del péptido cuando es producida por las células y/u organismos en los que se encuentra en la naturaleza. Si el péptido se produce por una pluralidad de células y/u organismos, el péptido puede tener una variedad de formas nativas.

“Péptido” se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen juntos mediante enlaces amida, denominado alternativamente un péptido. Adicionalmente también están incluidos aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina. Los aminoácidos que no están codificados por ácidos nucleicos también pueden usarse en la presente invención. Además, los aminoácidos que han sido modificados para incluir grupos reactivos, sitios de glicosilación, polímeros, restos terapéuticos y biomoléculas también pueden usarse en la invención. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser tanto el isómero D como L de los mismos. Generalmente se prefiere el isómero L. Además, también son útiles otros peptidomiméticos en la presente invención. Como se usa en el presente documento, “péptido” se refiere a tanto péptidos glicosilados como sin glucosilar. También se incluyen péptidos que están incompletamente glicosilados por un sistema que expresa el péptido. Para una revisión general véase Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDS AND PROTEIN, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983).

El término “conjugado de péptido” se refiere a especies de la invención en las que un péptido está conjugado con un azúcar modificado como se expone en el presente documento.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, además de análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácido que funcionan de un modo similar a los aminoácidos de origen natural. Aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, además de aquellos aminoácidos que se modifican después, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce naturalmente, 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, metilsulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos de péptido modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce naturalmente. 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 un modo similar a un aminoácido que se produce naturalmente.

Como se usa en el presente documento, los aminoácidos se representan por el nombre completo de los mismos, por el código de tres letras correspondiente al mismo, o por el código de una letra correspondiente al mismo, como se indica en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1: Aminoácidos, y los códigos de tres letras y de una letra

Nombre completo	Código de tres letras	Código de una letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	Y
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Th	T
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W

La presente invención también proporciona análogos de proteínas o péptidos que comprenden una proteína como se ha identificado anteriormente. Los análogos pueden diferenciarse de proteínas o péptidos de origen natural por diferencias de secuencias de aminoácidos conservativas o por modificaciones que no afectan la secuencia, o por ambos. Por ejemplo, pueden hacerse cambios de aminoácidos conservativos que, aunque alteren la secuencia primaria de la proteína o péptido, no alteran normalmente su función. Las sustituciones de aminoácidos conservativas normalmente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos:

glicina, alanina;
 valina, isoleucina, leucina;
 ácido aspártico, ácido glutámico;
 asparagina, glutamina;
 serina, treonina;
 lisina, arginina;
 fenilalanina, tirosina.

Las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluyen derivatización química *in vivo*, o *in vitro*, de péptidos, por ejemplo, acetilación o carboxilación. También se incluyen modificaciones de glicosilación, por ejemplo, aquellas hechas modificando los patrones de glicosilación de un péptido durante su síntesis y procesamiento o en más etapas de procesamiento; por ejemplo, exponiendo el péptido a enzimas que afectan la glicosilación, por ejemplo, enzimas de glicosilación o deglicosilación de mamífero. También están englobadas secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

Se apreciará, por supuesto, que los péptidos pueden incorporar residuos de aminoácidos que se modifican sin afectar la actividad. Por ejemplo, los extremos pueden derivatizarse para incluir grupos de bloqueo, es decir, sustituyentes químicos adecuados para proteger y/o estabilizar los extremos N y C de "degradación no deseable", un término que pretende englobar cualquier tipo de rotura enzimática, química o bioquímica del compuesto en sus extremos que es probable que afecte la función del compuesto, es decir, degradación secuencial del compuesto en un extremo terminal del mismo.

Grupos de bloqueo incluyen grupos protectores convencionalmente usados en la materia de la química de los péptidos que no afectarán adversamente las actividades *in vivo* del péptido. Por ejemplo, pueden introducirse grupos de bloqueo del extremo N adecuados por alquilación o acilación del extremo N. Ejemplos de grupos de bloqueo del extremo N adecuados incluyen grupos alquilo C₁-C₅ ramificados o sin ramificar, grupos acilo tales como formilo y grupos acetilo, además de formas sustituidas de los mismos, tales como los grupos acetamidometilo (Acm), Fmoc o Boc. Análogos de desamino de aminoácidos también son grupos de bloqueo del extremo N útiles y pueden tanto acoplarse al extremo N del péptido como usarse en lugar del residuo extremo N. Grupos de bloqueo del extremo C adecuados, en los que el grupo carboxilo del extremo C está tanto incorporado como no, incluyen ésteres, cetonas o amidas. Grupos alquilo formadores de éster o cetona, particularmente grupos alquilo inferior tales como metilo, etilo y propilo, y grupos amino formadores de amida, tales como aminas primarias (-NH₂), y grupos mono- y di-alquilamino, tales como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino y similares, son ejemplos de grupos de bloqueo del extremo C. Análogos de aminoácidos descarboxilados tales como agmatina también son grupos de bloqueo del extremo C útiles y pueden tanto acoplarse al residuo del extremo C del péptido como usarse en su lugar. Además, se apreciará que los grupos amino y carboxilo libres en los extremos pueden eliminarse completamente del péptido para dar formas desamino y descarboxiladas del mismo sin afectar la actividad del péptido.

También pueden incorporarse otras modificaciones sin afectar adversamente a la actividad y éstas incluyen, pero no se limita a, la sustitución de uno o más de los aminoácidos en la forma isomérica L natural con aminoácidos en la forma isomérica D. Por tanto, el péptido puede incluir uno o más residuos de D-aminoácido, o puede comprender aminoácidos que están todos en la forma D. También se contemplan formas retro-inversas de péptidos según la presente invención, por ejemplo, péptidos invertidos en los que todos los aminoácidos están sustituidos con formas de D-aminoácido.

También se contemplan sales de adición de ácido de la presente invención en equivalentes funcionales. Por tanto, para su uso en la invención es adecuado un péptido según la presente invención tratado con un ácido inorgánico tal como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares, o un ácido orgánico tal como acético, propiónico, glicólico, pirúvico, oxálico, málico, malónico, succínico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, cinámico, mandélico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico, y similares, para proporcionar una sal soluble en agua del péptido.

También se incluyen péptidos que han sido modificados usando técnicas biológicas moleculares comunes de manera que mejore su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como agente terapéutico. Análogos de tales péptidos incluyen aquellos que contienen residuos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos que no existen de forma natural. Los péptidos de la invención no se limitan a productos de cualquiera de los procedimientos a modo de ejemplo específicos enumerados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "MALDI" es una abreviatura de desorción/ionización láser asistida por matriz. Durante la ionización, AS-PEG (ácido siálico-poli(etilenglicol)) puede eliminarse parcialmente de la estructura de N-glicano de la glicoproteína.

Como se usa en el presente documento, el término "glicosiltransferasa" se refiere a cualquier enzima/proteína que tenga la capacidad para transferir un azúcar donante a un resto aceptor.

Como se usa en el presente documento, el término “azúcar modificado” se refiere a un hidrato de carbono que se produce naturalmente o que no se produce naturalmente que se añade enzimáticamente sobre un aminoácido o un residuo de glicosilo de un péptido en un procedimiento de la invención. El azúcar modificado está seleccionado de diversos sustratos enzimáticos que incluyen, pero no se limita a, nucleótidos de azúcar (mono-, di- y trifosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo) y azúcares que no están activados ni son nucleotídicos.

El “azúcar modificado” se funcionaliza covalentemente con un “grupo modificador”. Los grupos modificadores útiles incluyen, pero sin limitación, polímeros solubles en agua, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, biomoléculas y similares. El sitio de la funcionalización con el grupo modificador está seleccionado de forma que no prevenga que el “azúcar modificado” se añada enzimáticamente a un péptido.

El término “soluble en agua” se refiere a restos que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. Procedimientos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua son muy conocidos en la técnica. Polímeros solubles en agua a modo de ejemplo incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos), y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mixtas o estar compuestos de un único aminoácido, por ejemplo poli(lisina). Similarmente, los sacáridos pueden ser de secuencia mixta o estar compuestos de una única unidad de sacárido, por ejemplo, dextrano, amilosa, quitosano y poli(ácido siálico). Un poli(éter) a modo de ejemplo es poli(etilenglicol). La poli(etilenimina) es una poliamina a modo de ejemplo, y el ácido poli(aspártico) es un poli(ácido carboxílico) representativo.

La expresión “grupo de unión a glicosilo”, como se usa en el presente documento, se refiere a un residuo de glicosilo al que se une covalentemente un agente (p. ej., polímero soluble en agua, resto terapéutico, biomolécula). En los procedimientos de la invención, el “grupo de unión a glicosilo” pasa a estar unido covalentemente a un péptido glucosilado o no glucosilado, de modo que une el agente a un resto aminoácido y/o glicosilo sobre el péptido. Un “grupo de unión a glicosilo” normalmente deriva de un “azúcar modificado” mediante la unión enzimática del “azúcar modificado” a un resto aminoácido y/o glicosilo del péptido. Un “grupo de unión a glicosilo intacto” se refiere a un grupo de unión que deriva de un resto glicosilo en el que el monómero sacárido individual que se une al conjugado no se degrada, por ejemplo se oxida, por ejemplo mediante metaperyodato sódico. “Grupos de unión a glicosilo intactos” de la invención pueden proceder de un oligosacárido natural mediante la adición de unidad(es) de glicosilo o eliminación de una o más unidades de glicosilo de una estructura de sacárido parental.

Las expresiones “resto dirigido” y “agente dirigido”, como se usan en el presente documento, hacen referencia a especies que se localizarán en un tejido o región concreto del cuerpo. La localización está mediada por un reconocimiento específico de determinantes moleculares, el tamaño molecular del agente o conjugado dirigido, las interacciones iónicas, las interacciones hidrofóbicas y similares. Los expertos en la técnica conocen otros mecanismos de dirigir un agente a un tejido o región concretos.

Como se usa en el presente documento, “resto terapéutico” significa cualquier agente útil para terapia, que incluye pero no se limita a, antibióticos, agentes antiinflamatorios, fármacos antitumorales, citotoxinas y agentes radioactivos. “Resto terapéutico” incluye profármacos de agentes bioactivos, constructos en los que más de un resto terapéutico está unido a un vehículo, por ejemplo agentes multivalentes. Resto terapéutico también incluye péptidos y constructos que incluyen péptidos. Ejemplos de péptidos incluyen los divulgados en la Figura 1 y las Tablas 5 y 6, en el presente documento.

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 alquilantes, antraciclinas, antibióticos, agentes antimetabólicos, procarbazona, hidroxiaurea, asparaginasa, corticosteroides, interferones y agentes radiactivos. Asimismo, dentro del alcance de la expresión “fármaco antitumoral” abarca conjugados de péptidos con actividad antitumoral, por ejemplo TNF- α . Conjugados incluyen, entre otros, 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” significa cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Otras toxinas incluyen, por ejemplo, ricina, CC-1065 y análogos, las duocarmicinas. Otras toxinas más incluyen la toxina diftérica y el veneno de serpiente (p. ej., veneno de cobra).

Como se usa en el presente documento, “un agente radiactivo” incluye cualquier radioisótopo que es eficaz en el diagnóstico o destrucción de un tumor. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, indio-111, cobalto-60 y tecnecio. Además, elementos radiactivos naturales tales como uranio, radio y torio, que normalmente representan mezclas de radioisótopos, son ejemplos adecuados de un agente radiactivo. Los iones metálicos normalmente están quelados con un resto quelante orgánico.

En la técnica se conocen muchos grupos quelantes útiles, éteres de corona, criptandos y similares, y se pueden

incorporar en los compuestos de la invención (p. e., 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, pág. 279-312; Lindoy, THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES; Cambridge University Press, Cambridge, 1989; Dugas, BIOORGANIC CHEMISTRY; Springer-Verlag, New York, 1989, y referencias contenidas en las mismas.

Además, los expertos en la técnica disponen de una serie de vías que permiten la unión de agentes quelantes, éteres de 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, pág. 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 de la actividad del conjugado y es no reactiva con el sistema inmunitario del sujeto. Ejemplos incluyen entre otros, cualquier vehículo farmacéutico convencional tal como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes. Otros vehículos pueden incluir también soluciones estériles, comprimidos, incluidos comprimidos recubiertos, y cápsulas. Normalmente, dichos vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, estearato de magnesio o de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glucoles u otros excipientes conocidos. Dichos vehículos pueden también incluir aditivos aromatizantes y colorantes u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante procedimientos convencionales bien conocidos.

Como se usa en el presente documento, "administrar" significa administración oral, administración como supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal o subcutánea, administración intratecal o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo una mini-bomba osmótica, al sujeto.

El término "aislado" se refiere a un material que carece sustancialmente o esencialmente de componentes, que se usan para producir el material. Para los conjugados peptídicos de la invención, el término "aislado" se refiere a un material que carece sustancialmente o esencialmente de componentes, que normalmente acompaña al material en la mezcla usada para preparar el conjugado peptídico. "Aislado" y "puro" se usan de forma intercambiable. Normalmente, conjugados peptídicos aislados de la invención tienen un nivel de pureza que preferentemente se expresa como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza para los conjugados peptídicos es de aproximadamente 60 % a aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 % y el extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o más de aproximadamente 90 %.

Cuando los conjugados peptídicos tienen una pureza superior a aproximadamente el 90 %, sus purezas también se expresan, preferentemente, como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza es de aproximadamente 90 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 % o aproximadamente 98 %. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 100 %.

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

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

"Homogeneidad" se refiere a la consistencia estructural en una población de restos aceptores a los que están conjugados los azúcares modificados. Por tanto, en un conjugado peptídico de la invención en el que cada resto de azúcar modificado está conjugado a un sitio aceptor que tiene la misma estructura que el sitio aceptor al que está conjugado los demás azúcares modificados, se dice que el conjugado peptídico tiene una homogeneidad de aproximadamente el 100 %. Normalmente, la homogeneidad se expresa como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad para los conjugados peptídicos es de aproximadamente 60 % a aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 % y el extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o más de aproximadamente 90 %.

Quando los conjugados peptídicos tienen una homogeneidad superior o igual a aproximadamente el 90 %, sus purezas también se expresan, preferentemente, como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de homogeneidad es de aproximadamente 90 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 % o aproximadamente 98 %. El extremo superior del intervalo de homogeneidad es de aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 100 %. La pureza de lo conjugados peptídicos normalmente se determina mediante uno o más procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM), espectrometría de tiempo vuelo-desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOFF), electroforesis capilar y similares.

“Glicoforma sustancialmente uniforme” o un “patrón de glicosilación sustancialmente uniforme” cuando hace referencia a una especie glucopeptídica, hace referencia al porcentaje de restos aceptores que están glicosilados mediante la glicosiltransferasa de interés (p. ej. fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de una α 1,2 fucosiltransferasa existe un patrón de fucosilación sustancialmente uniforme si sustancialmente todo (como se define más adelante) el Gal β 1,4-GlcNAc-R y los análogos sialilados del mismo están fucosilados en un conjugado peptídico de la invención. Un experto en la técnica entenderá que el material de partida puede contener restos aceptores glicosilados (p. ej., restos de Gal β 1,4-GlcNAc-R fucosilados). Por tanto, el porcentaje calculado de glicosilación incluirá restos aceptores que están glicosilados mediante los procedimientos de la invención, así como los restos aceptores ya glicosilados en el material de partida.

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

Descripción de la invención

I. Procedimiento para remodelar las cadenas de glicano

La presente invención incluye procedimientos y composiciones para la adición y/o delección *in vitro* de azúcares a o desde una molécula de glicopéptido de un modo tal que proporciona una molécula peptídica que tiene un patrón de glicosilación adaptado o deseado específico, preferentemente que incluye la adición al mismo de un azúcar modificado. Una característica clave de la invención es tomar un péptido producido por cualquier tipo de célula y generar una estructura de glicano central sobre el péptido, tras lo cual la estructura de glicano se elimina *in vitro* para generar un péptido que tiene un patrón de glicosilación adecuado para uso terapéutico en un mamífero.

La importancia del patrón de glicosilación de un péptido es bien conocida en la técnica, así como las limitaciones de los presentes procedimientos *in vivo* para la producción de péptidos glicosilados adecuadamente, en particular cuando estos péptidos se producen usando metodología de ADN recombinante. Además, hasta la presente invención no ha sido posible generar glicopéptidos que tengan una estructura de glicano deseada sobre los mismos, en los que el péptido se pueda producir a escala industrial.

En la presente invención, un péptido producido por una célula se trata enzimáticamente *in vitro* mediante la adición sistemática de las enzimas y sustratos adecuados, de modo que se elimina los restos de azúcar que no deben estar presentes sobre el péptido, y se añaden los restos de azúcar, que opcionalmente incluyen azúcares modificados, que se deben añadir al péptido, de un modo que proporcionan un glicopéptido que tiene una “glicosilación deseada”, como se define en otros lugares en el presente documento.

A. Procedimiento para remodelar glicanos unidos a N

En un aspecto, la presente invención aprovecha el hecho de que la mayoría de los péptidos de interés comercial o farmacéutico comprenden una estructura común de cinco azúcares denominada en el presente documento núcleo de trimanosilo, que está unida a través de N a asparagina en la secuencia Asn-X-Ser/Thr sobre una cadena peptídica. El núcleo de trimanosilo elemental consiste esencialmente en dos residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y tres residuos de manosa (Man) unidos a un péptido, es decir comprende estos cinco residuos de azúcar y sin azúcares adicionales, a excepción de que opcionalmente puede incluir un residuo de fucosa. La primera GlcNAc está unida al grupo amida de la asparagina y la segunda GlcNAc está unida a la primera mediante un enlace β 1,4. Un residuo de manosa se une a la segunda GlcNAc mediante un enlace β 1,4 y dos residuos de manosa se unen a esta manosa mediante un enlace α 1,3 y un enlace α 1,6, respectivamente. En la figura 2, lado izquierdo, se muestra una representación esquemática de una estructura central de trimanosilo. Aunque es el caso en el que las estructuras de glicano sobre la mayoría de los péptidos comprenden otros azúcares además del núcleo de trimanosilo, la estructura central de trimanosilo representa una característica esencial de los glicanos unidos por N sobre los péptidos de mamífero.

La presente invención incluye la generación de un péptido que tiene una estructura central de trimanosilo como elemento fundamental de la estructura de las moléculas de glicano contenidas en el mismo. Dada la variedad de los sistemas celulares usados para producir péptidos, sean los propios sistemas naturales o impliquen metodología de ADN recombinante, la presente invención proporciona procedimientos mediante los cuales una molécula de glicano en un péptido producido en cualquier tipo de célula se puede reducir a una estructura central de trimanosilo. Una vez

que se ha generado la estructura central de trimanosilo elemental, es posible usar los procedimientos descritos en el presente documento para generar *in vitro* una estructura de glicano deseada sobre el péptido que confiere al péptido una o más propiedades que potencien la eficacia terapéutica del péptido.

Debe quedar claro, a partir del debate en el presente documento, que la expresión “núcleo de trimanosilo” se usa para describir la estructura de glicano mostrada en la Figura 2, lado izquierdo. Los glicopéptidos que tienen una estructura central de trimanosilo pueden también tener azúcares adicionales añadidos y, en su mayor parte, tienen estructuras adicionales añadidas con independencia de si los azúcares dan lugar a un péptido que tiene una estructura de glicano deseada. La expresión “estructura central de trimanosilo elemental” se define en otros lugares en el presente documento. Cuando el término “elemental” no se incluye en la descripción de la “estructura central de trimanosilo”, el glicano comprende la estructura central de trimanosilo con azúcares adicionales añadidos a la misma.

La expresión “glicopéptido central de trimanosilo elemental” se usa en el presente documento para hacer referencia a un glicopéptido que tiene estructuras de glicano compuestas principalmente por una estructura central de trimanosilo elemental. No obstante, también puede contener, opcionalmente, un residuo de fucosa añadido. Como se trata en el presente documento, los glicopéptidos centrales de trimanosilo elemental son un material de partida óptimo y, por tanto, preferido, para los procedimientos de remodelado de glicano de la invención.

Otro material de partida óptimo para el procedimiento de remodelado de glicano de la invención es una estructura de glicano que tiene un núcleo de trimanosilo en el que se añaden uno o dos residuos adicionales de GlcNAc a cada uno de los residuos de manosa en $\alpha 1,3$ y $\alpha 1,6$ (véase, por ejemplo, la estructura sobre la segunda línea de la Figura 3, la segunda estructura desde la izquierda de la figura). Esta estructura se denomina en el presente documento “Man3GlcNAc4.” Opcionalmente, esta estructura puede contener también una molécula de fucosa central. Una vez que se ha generado la estructura de Man3GlcNAc4, es posible usar los procedimientos descritos en el presente documento para generar *in vitro* una estructura de glicano deseada sobre el glicopéptido que confiere al glicopéptido una o más propiedades que potencien la eficacia terapéutica del péptido.

En su forma nativa, los glicopéptidos unidos a N de la invención, y en particular los glicopéptidos de mamífero y humanos útiles en la presente invención, están glicosilados en N con una estructura central de trimanosilo y uno o más azúcares unidos a la misma.

Los términos “glicopéptido” y “glucopolipéptido” se usan de forma sinónima en el presente documento para hacer referencia a cadenas peptídicas que tienen restos de azúcar unidos a las mismas. En el presente documento no se hace distinción para diferenciar glucopolipéptidos o glicopéptidos pequeños de glucopolipéptidos o glicopéptidos grandes. Por tanto, las moléculas de hormonas que tienen muy pocos aminoácidos en su cadena peptídica (p. ej., a menudo solo tres aminoácidos) y otros péptidos mucho más grandes están incluidas en los términos generales “glucopolipéptido” y “glicopéptido”, siempre que tengan restos de azúcares unidos a las mismas. No obstante, el uso del término “péptido” no impide que el péptido sea un glicopéptido.

Un ejemplo de un glicopéptido unido a N que tiene una glicosilación deseada es un péptido que tiene un glicano unido a N que tiene un núcleo de trimanosilo con al menos un residuo de GlcNAc unido al mismo. Este residuo se añade al núcleo de trimanosilo usando la N-acetil-glucosaminiltransferasa I (GnT-I). Si se añade un segundo residuo de GlcNAc se usa la N-acetil-glucosaminiltransferasa II (GnT-II). Opcionalmente se pueden añadir residuos de GlcNAc adicionales con la GnT-IV y/o la GnT-V, y un tercer residuo GlcNAc bisectada se puede unir a la $\beta 1,4$ manosa del núcleo de trimanosilo usando la N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III). Opcionalmente, esta estructura se puede extender mediante tratamiento con la $\beta 1,4$ galactosiltransferasa para añadir un residuo de galactosa a cada GlcNAc no bisectada, e incluso más opcionalmente, usando las enzimas $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa, los residuos de ácido siálico se pueden añadir a cada residuo de galactosa. La adición de una GlcNAc bisectada al glicano no se requiere para la posterior adición de residuos de galactosa y ácido siálico; no obstante, con respecto a la afinidad por el sustrato de las enzimas GnT-III de rata y humana, la presencia de uno o más de los residuos de galactosa sobre el glicano impide la adición de la GlcNAc bisectada porque el glicano que contiene galactosa no es un sustrato de estas formas de GnT-III. Por tanto, en los casos en los que se desea la presencia de la GlcNAc bisectada y se usan estas formas de GnT-III, es importante que si el glicano contiene residuos de galactosa y/o ácido siálico añadidos, se eliminen antes de la adición de la GlcNAc bisectada. Otras formas de GnT-III pueden no requerir este orden específico de sustratos para su actividad.

Ejemplos de estructuras de glicano que representan los diversos aspectos de los péptidos que tienen “la glicosilación deseada” se muestran en las figuras que se proporcionan en el presente documento. Los procedimientos precisos para la generación *in vitro* de un péptido que tiene la “glicosilación deseada” se describen en otros lugares del presente documento. No obstante, la invención no debe interpretarse de ningún modo como que está únicamente limitada a una estructura cualquiera de glicano divulgada en el presente documento. En su lugar, la invención se debe interpretar que incluye todas y cada una de las estructuras de glicano que se pueden fabricar usando la metodología proporcionada en el presente documento.

En algunos casos, un núcleo de trimanosilo elemental solo puede constituir la glicosilación deseada de un péptido. Por ejemplo, se ha demostrado que un péptido que solo tiene un núcleo de trimanosilo está implicado en la

enfermedad de Gaucher (Mistry y col., 1966, Lancet 348: 1555-1559; Bijsterbosch y col., 1996, Eur. J. Biochem. 237:344-349).

De acuerdo con la presente invención se hacen evidentes los siguientes procedimientos para la generación de péptidos que tienen una glicosilación deseada.

5 a) Comenzando con un glicopéptido que tiene una o más moléculas de glicano que tienen como característica común una estructura central de trimanosilo y al menos una o más de una mezcla heterogénea u homogénea de uno o más azúcares añadidos, es posible aumentar la proporción de glicopéptidos que tienen una estructura central de trimanosilo elemental como la única estructura de glicano o que tienen Man3GlcNAc4 como la única estructura de glicano. Esto se consigue *in vitro* mediante la adición sistemática al glicopéptido de un número
10 adecuado de enzimas en una secuencia adecuada que escinden la mezcla heterogénea u homogénea de azúcares sobre la estructura de glicano hasta que se reduce a un núcleo de trimanosilo elemental o una estructura de Man3GlcNAc4. Ejemplos específicos de cómo se consigue esto dependerán de diversos factores, incluidos, en gran parte, el tipo de célula en la que se produce el péptido y, por tanto, el grado de complejidad de la(s) estructura(s) de glicano presente(s) en el péptido producido inicialmente por la célula. Ejemplos de
15 cómo se puede reducir una estructura de glicano compleja a un núcleo de trimanosilo elemental o una estructura de Man3GlcNAc4 se presentan en la Figura 3, que se describe con detalle en otros lugares del presente documento.

b) es posible generar un péptido que tenga una estructura central de trimanosilo elemental como la única estructura de glicano sobre el péptido aislando una célula natural cuya maquinaria de glicosilación produce
20 dicho péptido. Después, el ADN que codifica un péptido de elección se transfecta a la célula en la que el ADN se transcribe, se traduce y se glucosila de un modo tal que el péptido de elección tiene una estructura central de trimanosilo elemental como la única estructura de glicano del mismo. Por ejemplo, una célula que carece de una enzima GnT-I funcional producirá varios tipos de glicopéptidos. En algunos casos, estos serán glicopéptidos que no tienen azúcares adicionales añadidos al núcleo de trimanosilo. No obstante, en otros casos, los péptidos producidos pueden tener dos residuos de manosa adicionales unidos al núcleo de trimanosilo, lo que tiene como resultado un Man5 glicano. Este es también un material de partida deseado para el procedimiento de remodelado de la presente invención. Ejemplos específicos de la generación de dichas estructuras de glicano se describen en el presente documento.

c) Como alternativa, es posible someter a ingeniería genética una célula para conferir una maquinaria de glicosilación específica de un modo tal que se produce un péptido que tiene un núcleo de trimanosilo elemental o estructura de Man3GlcNAc4 como la única estructura de glicano sobre el péptido. Después, el ADN que
30 codifica un péptido de elección se transfecta a la célula en la que el ADN se transcribe, se traduce y se glucosila de un modo tal que el péptido de elección tiene un mayor número de glicanos que comprenden únicamente una estructura central de trimanosilo elemental. Por ejemplo, ciertos tipos de células que se han sometido a ingeniería genética para que carezcan de GnT-I, pueden producir un glicano que tiene una estructura central de trimanosilo elemental o, dependiendo de la célula, pueden producir un glicano que tiene un núcleo de trimanosilo más dos residuos adicionales de manosa unidos (Man5). Cuando la célula produce una estructura de glicano Man5, la célula se puede someter más a ingeniería genética para expresar manosidasa 2, que escinde los dos residuos de manosa adicionales para generar el núcleo de trimanosilo. Como alternativa, el
40 Man5 glicano puede incubarse *in vitro* con manosidasa 3 para tener el mismo efecto.

d) es fácilmente evidente a partir de la discusión en b) y c) que no es necesario que las células produzcan únicamente péptidos que tengan un núcleo de trimanosilo elemental o estructuras Man3GlcNAc4 unidos a los mismos. En su lugar, a menos que las células descritas en b) y c) produzcan péptidos que tengan estructuras centrales de trimanosilo elemental 100 % (es decir que no tienen azúcares adicionales unidas a los mismos) o
45 100 % de estructuras Man3GlcNAc4, las células, de hecho, producen una mezcla heterogénea de péptidos que tienen, en combinación, estructuras centrales de trimanosilo elemental o estructuras Man3GlcNAc4 como la única estructura de glicano además de estas estructuras que tienen azúcares adicionales unidas a los mismos. La proporción de péptidos que tienen un núcleo de trimanosilo o una estructura de Man3GlcNAc4 que tiene azúcares adicionales unidos a los mismos, frente a los que tienen una estructura, variará en función de la célula que los produzca. La complejidad de los glicanos (es decir, cuál y cómo muchos azúcares se unen al núcleo de trimanosilo) también variará en función de la célula que los produzca.

e) Una vez que un glicopéptido que tiene un núcleo de trimanosilo elemental o un núcleo de trimanosilo con uno o dos residuos de dos GlcNAc unidos se produce mediante a), b) o c) anteriores, de acuerdo con la presente invención, *in vitro* se añaden moléculas de azúcar adicionales a la estructura central de trimanosilo para generar
55 un péptido que tiene la glicosilación deseada (es decir, un péptido que tiene una estructura de glicano adaptada *in vitro*).

f) No obstante, cuando es el caso en el que se produce un péptido que tiene un núcleo de trimanosilo elemental o una estructura de Man3GlcNAc4 con algunos pero no todos los azúcares deseados unidos al mismo, solo es necesario añadir cualquier azúcar deseado restante sin reducir la estructura de glicano al núcleo de trimanosilo elemental o la estructura de Man3GlcNAc4. Por tanto, en algunos casos, un péptido que tiene una estructura de glicano que tiene una estructura central de trimanosilo con azúcares adicionales unidos al mismo será un sustrato adecuado para el remodelado.

Aislamiento de un glicopéptido central de trimanosilo elemental

Los glicopéptidos con el núcleo de trimanosilo elemental o Man3GlcNAc4 de la invención se pueden aislar y purificar, en caso necesario, usando técnicas bien conocidas en la técnica de la purificación de péptidos. Las técnicas adecuadas incluyen técnicas cromatográficas, técnicas de enfoque isoeléctrico, técnicas de ultrafiltración y similares. Usando cualquiera de estas técnicas se puede preparar una composición de la invención en la que los glicopéptidos de la invención se aíslan de otros péptidos y de otros componentes que normalmente se encuentran dentro del medio de cultivo celular. El grado de purificación puede ser de, por ejemplo, el 90 % con respecto a otros péptidos o del 95 %, o incluso superior, por ejemplo del 98 %. Véase, por ejemplo, Deutscher y col. (ed., 1990, Guide to Peptide Purification, Harcourt Brace Jovanovich, San Diego).

La heterogeneidad de los glicanos unidos a N presentes en los glicopéptidos producidos mediante la metodología de la técnica anterior normalmente solo permite el aislamiento de una pequeña porción de los glicopéptidos diana que se puede modificar para producir los glicopéptidos deseados. En los presentes procedimientos, se pueden producir grandes cantidades de glicopéptidos centrales de trimanosilo elemental y otros glicopéptidos deseados, incluidos glicanos Man3GlcNAc4, que después se pueden modificar para generar grandes cantidades de péptidos que tienen la glicosilación deseada.

El enriquecimiento específico de cualquier tipo concreto de glicano unido a un péptido se puede conseguir usando lectinas que tengan una afinidad por el glicano deseado. Dichas técnicas son bien conocidas en la materia de glucobiología.

Una característica clave de la invención que se describe con mayor detalle más adelante es que una vez que se genera una estructura de glicano central en cualquier péptido, la estructura de glicano se remodela *in vitro* para generar un péptido que tiene una glicosilación deseada que tiene mejor uso terapéutico en un mamífero. El mamífero puede ser cualquier tipo de mamífero adecuado y es, preferentemente, un ser humano.

Los diversos escenarios y los procedimientos y composiciones precisas para generar péptidos con la glicosilación deseada se harán evidentes a partir de la divulgación siguiente.

El objetivo último de la producción de los péptidos para uso terapéutico en mamíferos es que los péptidos deberán comprender estructuras de glicano que facilitan más que impiden el beneficio terapéutico del péptido. Como se divulga a lo largo de la presente especificación, los péptidos producidos en las células se pueden tratar *in vitro* con diversas enzimas que catalizan la escisión de los azúcares que no deben estar presentes en el glicano y la adición de azúcares que deben estar presentes en el glicano, de modo que se genera un péptido que tiene la glicosilación deseada y, por tanto, adecuado para el uso terapéutico en mamíferos. La generación de las diferentes glicoformas de los péptidos en las células se ha descrito anteriormente. Ahora se describen diversos mecanismos para la generación de péptidos que tienen la glicosilación deseada, en los que el material de partida, es decir el péptido producido por una célula, puede diferir de un tipo de célula a otro. Como será evidente a partir de la presente divulgación, no es necesario que el material de partida sea uniforme con respecto a su composición en glicano. No obstante, es preferible que el material de partida se enriquezca para ciertas glicoformas con el fin de que se produzcan grandes cantidades del producto final, es decir, los péptidos correctamente glicosilados.

En una realización preferida de acuerdo con la presente invención, los acontecimientos de degradación y de síntesis que dan lugar a un péptido que tiene la glicosilación deseada implican en algún momento la generación de una estructura central de trimanosilo elemental o una estructura de Man3GlcNAc4 sobre el péptido.

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

La adición o eliminación de cualquier resto carbohidrato presente en el péptido se consigue química o enzimáticamente. La desglicosilación química se realiza, preferentemente, mediante la exposición de la variante peptídica al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o a un compuesto equivalente. Este tratamiento tiene como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares a excepción del azúcar de unión (N-acetilgucosamina o N-acetilgalactosamina), al tiempo que deja intacto al péptido. La desglicosilación química se describe en Hakimuddin y col., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 y en Edge y col., 1981, Anal. Biochem. 118: 131. La escisión enzimática de los restos carbohidrato sobre variantes peptídicas se puede conseguir mediante el uso de diversas endo y exoglicosidasas como describen Thotakura y col., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350.

La adición química de los restos glicosilo se lleva a cabo mediante cualquier procedimiento reconocido en la técnica. La adición enzimática de restos de azúcar se consigue, preferentemente, usando una modificación de los procedimientos expuestos en el presente documento, sustituyendo las unidades de glicosilo nativas por los azúcares

modificados usados en la invención. Otros procedimientos de añadir restos de azúcar se divulgan en las patentes de EE.UU. Nº 5.876.980. 6.030.815. 5.728.554 y 5.922.577.

Puntos de unión ejemplares para determinados residuos glicosilo incluyen, pero no se limitan a, (a) sitios para N- y O-glicosilación; (b) restos glicosilo terminales que son aceptores para una glicosiltransferasa; (c) arginina, asparagina e histidina; (d) grupos carboxilo libres; (e) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína; (f) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina; (g) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (h) el grupo amida de la glutamina. Ejemplos de procedimientos de uso en la presente invención se describen en el documento WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pág. 259-306 (1981).

Tratando específicamente con los ejemplos mostrados en varias de las figuras proporcionadas en el presente documento se presenta una descripción de la secuencia de las reacciones enzimáticas *in vitro* para la producción de estructuras de glicano deseadas sobre los péptidos. Las condiciones precisas de la reacción para cada una de las conversiones enzimáticas divulgadas más adelante son bien conocidas para los expertos en la técnica de glucobiología y, por tanto, no se repiten en el presente documento. Para una revisión de las condiciones de la reacción para estos tipos de reacciones véase Sadler y col., 1982, Methods in Enzymology 83:458-514 y las referencias citadas en el mismo.

En la Figura 2 se muestra la estructura de un glicano central de trimanosilo elemental en el lado izquierdo. Es posible convertir esta estructura en una estructura de glicano completa que tenga una GlcNAc bisectada incubando la estructura central de trimanosilo elemental en presencia de la GnT-I, seguida de la GnT-II y seguridad después de la GnT-III, y un donante de azúcar que comprende UDP-GlcNAc, en la que GlcNAc se añade secuencialmente a la estructura central de trimanosilo elemental para generar un núcleo de trimanosilo que tiene una GlcNAc bisectada.

En la Figura 4 se muestra la conversión de una GlcNAc bisectada que contiene glicano central de trimanosilo en una estructura de glicano compleja que comprende galactosa y ácido N-acetilneuramínico. La GlcNAc bisectada que contiene glicano central de trimanosilo se incuba primero con galatossiltransferasa y UDP-Gal como molécula donante, en la que dos residuos de galactosa se añaden a los residuos de GlcNAc periféricos sobre la molécula. Después, la enzima NeuAc-transferasa se usa para añadir dos residuos de NeuAc uno a cada uno de los residuos de galactosa.

En la Figura 5 se muestra la conversión de una estructura de glicano rica en manosa en un glicano central de trimanosilo elemental. El glicano rico en manosa (Man9) se incuba secuencialmente en presencia de la manosidasa 1 para generar una estructura de Man5 y, después, en presencia de manosidasa 3, en la que todos menos tres residuos de manosa se eliminan del glicano. Como alternativa, la incubación de la estructura de Man9 se puede recortar para dar otra vez la estructura central de trimanosilo únicamente mediante incubación en presencia de manosidasa 3. De acuerdo con los esquemas presentados en las Figuras 2 y 4 anteriores es posible la conversión de este glicano central de trimanosilo elemental en una molécula de glicano compleja.

En la Figura 6 se muestra una estructura compleja típica de glicano unido a N producida en células vegetales. Es importante destacar que cuando las células vegetales son deficientes en la actividad enzimática GnT-I no se puede añadir xilosa y fucosa al glicano. Por tanto, el uso de células defectivas en GnT-I proporciona una ventaja concreta en la presente invención en cuanto a que estas células producen péptidos que tienen un núcleo de trimanosilo elemental sobre el cual se pueden añadir azúcares adicionales sin realizar ninguna reacción de "recorte". De un modo similar, en los casos en los que la estructura producida en una célula vegetal puede ser de la variedad Man5 de glicano, si no hay GnT-I en estas células no se puede añadir xilosa y fucosa a la estructura. En este caso, la estructura de Man5 se puede recortar a un núcleo de trimanosilo elemental (Man3) usando manosidasa 3. De acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento, ahora es posible añadir restos de azúcar deseados al núcleo de trimanosilo para generar una estructura de glicano deseada.

En la Figura 7 se muestra una estructura compleja típica de glicano unido a N producida en células de insecto. Como es evidente también puede haber azúcares adicionales tales como, por ejemplo, fucosa. Además, aunque no se muestra aquí, las células de insecto pueden producir glicanos ricos en manosa que tienen nueve residuos de manosa y pueden tener azúcares adicionales añadidos. También es el caso en células de insecto que células defectivas en GnT-I evitan la adición de residuos de fucosa al glicano. Por tanto, la producción de un péptido en células de insecto se consigue, preferentemente, en una célula defectiva en GnT-I. El glicano producido de este modo se puede recortar *in vitro*, en caso necesario, usando cualquiera de los procedimientos y esquemas descritos en el presente documento y se pueden añadir azúcares adicionales *in vitro* usando también los procedimientos y esquemas proporcionados en el presente documento.

En la Figura 3 se muestran estructuras de glicano en varias etapas de finalización. Específicamente, se muestra la generación enzimática *in vitro* de una estructura central de trimanosilo elemental de una estructura de glicano de carbohidrato completa que no contiene un residuo de GlcNAc bisectada. También se muestra la generación de una estructura de glicano a partir de la misma que contiene una GlcNAc bisectada. Se muestran varias estructuras de glicano intermedias que se pueden producir. Estas estructuras pueden producirse en células o se pueden producir en las reacciones de recorte *in vitro* descritas en el presente documento. Se pueden añadir restos de azúcar *in vitro*

a la estructura central de trimanosilo elemental o a cualquier estructura intermedia adecuada con el fin de producir un glicano deseado.

En la Figura 8 se muestra una serie de posibles reacciones *in vitro* que se pueden realizar para recortar y añadir sobre glicanos que comienzan con una estructura rica en manosa. Por ejemplo, un glicano Man9 se puede recortar usando manosidasa 1 para generar un glicano Man5 o se puede recortar hasta un núcleo de trimanosilo usando manosidasa 3 o una o más manosidasas microbianas. Después se pueden usar GnT-I y o GnT-II para transferir residuos de GlcNAc adicionales sobre el glicano. Además, se muestra la situación que no se produciría cuando la molécula de glicano se produce en una célula que no tiene GnT-I (véase el recuadro sombreado). Por ejemplo, solo se puede añadir fucosa y xilosa a un glicano cuando la GnT-I está activa y facilita la transferencia de una GlcNAc a la molécula.

La Figura 9 representa estrategias bien conocidas para la síntesis de estructuras de glicano biantenales, triantenales e incluso tetraantenales comenzando con la estructura central de trimanosilo. De acuerdo con los procedimientos de la invención, es posible sintetizar cada una de estas estructuras *in vitro* usando las enzimas y condiciones de reacción adecuadas bien conocidas en la técnica de glucobiología.

En la Figura 10 se muestra un esquema para la síntesis de estructuras de carbohidratos todavía más complejas comenzando con una estructura central de trimanosilo. Por ejemplo, se muestra un esquema para la producción *in vitro* de estructuras antigénicas x de Lewis y a de Lewis que pueden o no estar sialiladas. Dichas estructuras, cuando están presentes en un péptido, pueden conferir al péptido ventajas inmunológicas para regular por aumento o regular por disminución la respuesta inmunitaria. Además, dichas estructuras son útiles para dirigir el péptido a células específicas, en cuanto a que estos tipos de estructuras están implicados en la unión a péptidos de adhesión celular y similares.

La Figura 11 es un esquema ejemplar para preparar una matriz de péptidos unidos a O que se originan con serina o treonina.

La Figura 12 es una serie de diagramas que representan los cuatro tipos de estructura de glicano unida a O denominadas núcleos 1 a través de 4. La estructura central se subraya con líneas discontinuas. Los azúcares que también se pueden incluir en esta estructura incluyen residuos de ácido siálico añadidos a los residuos de galactosa y residuos de fucosa añadidos a los residuos de GlcNAc.

Por tanto, en realizaciones preferidas, la presente invención proporciona un procedimiento de fabricar un glicopéptido glucosilado unido a N proporcionando un glicopéptido aislado y purificado al que está unido un núcleo de trimanosilo elemental o una estructura de Man3GlcNAc4, poniendo en contacto el glicopéptido con una enzima glicosiltransferasa y una molécula donante que tiene un resto glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el resto glicosilo al glicopéptido. La adaptación de un glicopéptido central de trimanosilo o glicopéptido Man3GlcNAc4 para producir un péptido que tiene un patrón de glicosilación deseado se consigue después mediante la adición secuencial de los restos de azúcar deseados usando técnicas bien conocidas en la materia.

Determinación de la estructura primaria del glicano

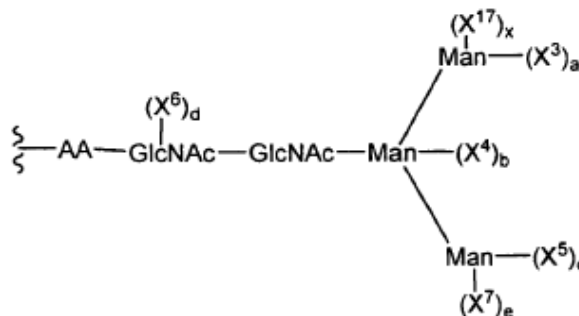
Cuando una célula produce glicopéptido unido a N, como se indica en otros lugares del presente documento, puede comprender una mezcla heterogénea de estructuras de glicano que se debe reducir a un núcleo de trimanosilo común generalmente elemental o a una estructura de Man3GlcNAc4, antes de añadir otros restos de azúcar al mismo. Con el fin de determinar exactamente qué azúcares se deben eliminar de cualquier estructura de glicano concreta, en ocasiones es necesario identificar la estructura primaria del glicano. En la materia se conocen bien técnicas para determinar la estructura primaria del glicano y se describen con detalle en, por ejemplo, Montreuil, "Structure and Biosynthesis of Glycopeptides" en Polysaccharides in Medicinal Applications, pág. 273-327, 1996, Eds. Severian Damitriu, Marcel Dekker, NY. Por tanto, es sencillo para un experto en la materia de glucobiología aislar una población de péptidos producidos por una célula y determinar la o las estructuras de los glicanos unidos a los mismos. Por ejemplo, se dispone de procedimientos eficientes para (i) romper los enlaces glicosídicos mediante escisión química tal como hidrólisis, acetólisis, hidrazinólisis, o mediante desaminación nitrosa; (ii) metilación completa seguida de hidrólisis o metanólisis y mediante cromatografía de gases-líquidos y espectroscopia de masas de los monosacáridos parcialmente metilados; y (iii) la definición de enlaces anómicos entre monosacáridos usando exoglicosidasas, que también proporcionan información sobre la estructura primaria del glicano mediante degradación secuencial. En concreto, las técnicas de espectroscopia de masas y de espectrometría por resonancia magnética nuclear (RMN), especialmente RMN de campo alto, se han usado con éxito para determinar la estructura primaria del glicano.

Los kits y el equipo para el análisis de los carbohidratos también están disponibles comercialmente. En Glyko, Inc. (Novato, CA) se dispone de electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE®). En el análisis FACE se liberan glicoconjugados del péptido con Endo H o N-glucanasa (PNGasa F) para los glicanos unidos a N o hidrazina para los glicanos unidos a Ser/Thr. Después, el glicano se marca en el extremo reductor con un fluoróforo de un modo no discriminante por estructura. Los glicanos marcados con el fluoróforo se separan después en geles de poliacrilamida en base a la proporción carga/masa del sacárido, además del volumen hidrodinámico. Se toman

imágenes del gel con luz UV y la composición de los glicanos se determina mediante la distancia de migración en comparación con los patrones. Los oligosacáridos se pueden secuenciar de este modo analizando los desplazamientos de migración debidos a la eliminación secuencial de los sacáridos mediante digestión con exoglucosidasa.

5 Realización ejemplar

El remodelado de la glicosilación unida a N se ilustra mejor con referencia a la Fórmula 1:



en la que X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 and X^{17} son residuos monosacáridos u oligosacáridos (seleccionados de forma independiente); y a, b, c, d, e y x son 0, 1 o 2 ((seleccionados de forma independiente), con la condición de que al menos un miembro seleccionado de a, b, c, d, e y x son 1 o 2.

La Fórmula 1 describe la estructura de glicano que comprende el núcleo de trimanosilo que está unido, preferentemente de forma covalente, a un residuo de asparagina sobre una estructura peptídica. Sistemas de expresión preferidos expresarán y secretarán péptidos exógenos con glicanos unidos a N que comprenden el núcleo de trimanosilo. Usando el procedimiento de remodelado de la invención, las estructuras de glicano en estos péptidos se pueden remodelar de forma conveniente en cualquier estructura de glicano deseada. Ejemplos de condiciones de reacción se encuentran a lo largo de los ejemplos y en la bibliografía.

En realizaciones preferidas, las estructuras de glicano se remodelan de un modo tal que la estructura descrita en la Fórmula 1 tenga determinantes específicos. La estructura del glicano se puede elegir para potenciar la actividad biológica del péptido, dar al péptido una nueva actividad biológica, eliminar la actividad biológica del péptido o mejor aproximación al patrón de glicosilación del péptido nativo, entre otros.

En la primera realización preferida, los glicanos unidos a N del péptido se remodelan para que se aproximen mejor al patrón de glicosilación de las proteínas humanas nativas. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 1 se remodela para tener los restos siguientes:

X^3 y X^5 = β -GlcNAc-Gal-SA;
a y c = 1;
d = 0 o 1;
b, e y x = 0.

Esta realización es particularmente ventajosa para los péptidos humanos expresados en sistemas de expresión celular heterólogos. Remodelando las estructuras de glicano unidas a N a esta configuración, el péptido se puede hacer menos inmunogénico en un paciente humano y/o más estable, entre otros.

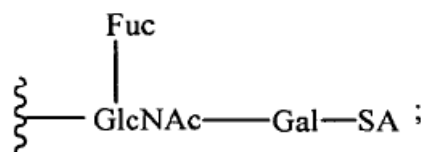
En la segunda realización preferida, los glicanos unidos a N del péptido se remodelan de modo que tengan un residuo de GlcNAc bisectada sobre el núcleo de trimanosilo. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 1 se remodela para tener los restos siguientes:

X^3 y X^5 son β -GlcNAc-Gal-SA;
a y c = 1;
 X^4 es GlcNAc;
b=1;
d = 0 o 1;
e y x = 0.

Esta realización es particularmente ventajosa para moléculas de anticuerpo recombinantes expresadas en sistemas de celulares heterólogos. Cuando la molécula de anticuerpo incluye una citotoxicidad celular mediada por Fc, se sabe que la presencia de oligosacáridos bisectados unidos al dominio Fc aumentó espectacularmente la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

En una tercera realización preferida, los glicanos unidos a N del péptido se remodelan de modo que tengan un resto X de Lewis sialilado. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 1 se remodela para tener los restos siguientes:

X^3 y X^5 son



5

a, c, d = 1;
b, e y x = 0;
 X^6 = fucosa.

10 Esta realización es particularmente ventajosa cuando se pretende dirigir el péptido que se está remodelando a moléculas de selectina y células que exhiben las mismas.

En una cuarta realización preferida, los glicanos unidos a N del péptido se remodelan para tener un resto conjugado.

El resto conjugado puede ser una molécula de PEG, otro péptido, una molécula pequeña tal como un fármaco, entre otros. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 1 se remodela para tener los restos siguientes:

15 X^3 y X^5 son β -GlcNAc-Gal-SA-R;
a y c = 1 o 2;
d = 0 o 1;
b, d, e y x = 0;
en la que R = grupo conjugado

20 El resto conjugado puede ser una molécula de PEG, otro péptido, una molécula pequeña tal como un fármaco, entre otros. Por tanto, esta realización es útil para conjugar el péptido a las moléculas de PEG que ralentizarán la eliminación del péptido de la circulación sanguínea del paciente, a péptidos que se dirigirán ambos péptidos a un tejido o célula específico o a otro péptido de uso terapéutico complementario.

25 Para un experto en la técnica quedará claro que la invención no está limitada a las moléculas de glicano preferidas descritas anteriormente. Las realizaciones preferidas son únicamente unas pocas de las muchas moléculas de glicano útiles que se pueden elaborar mediante el procedimiento de remodelado de la invención. Los expertos en la técnica conocerán cómo diseñar otros glicanos útiles.

30 En las primeras realizaciones ejemplares, el péptido se expresa en una célula CHO (línea celular de ovario de hámster chino) de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con sitios consenso de glicano unido a N se expresa y secreta en células CHO, los glicanos unidos a N tendrán las estructuras representadas en la fila superior de la Figura 3. Aunque todas estas estructuras pueden estar presentes, las estructuras con mucho más frecuentes son las dos del lado derecho. En los términos de la Fórmula 1,
 X^3 y X^5 son β -GlcNAc-Gal-(SA);

35 a y c = 1;
b, d, e y x = 0.

40 Por tanto, en una realización ejemplar, los glicanos unidos a N de los péptidos expresados en las células CHO se remodelan en el glicano humanizado preferido poniendo en contacto los péptidos con una glicosiltransferasa que es específica de una molécula aceptora de galactosa y una molécula donante de ácido siálico. Este procedimiento se ilustra en la Figura 3 y el Ejemplo 2. En otra realización ejemplar, los glicanos unidos a N de un péptido expresado y secretado por las células CHO se remodelan para que sean las estructuras PEGiladas preferidas. El péptido se pone en contacto primero con una glucosidasa específica de ácido siálico para eliminar el resto SA terminal y, después, se pone en contacto con una glicosiltransferasa específica de un resto aceptor de galactosa y un resto aceptor de ácido siálico, en presencia de moléculas donantes de nucleótido de ácido siálico-PEG. Opcionalmente, el péptido se puede poner en contacto después con una glicosiltransferasa específica de un resto aceptor de galactosa y un resto aceptor de ácido siálico en presencia de moléculas donantes de nucleótido-ácido siálico para garantizar completar la protección en los extremos del SA de todas las moléculas de glicano.

50 En otras realizaciones ejemplares, el péptido se expresa en células de insecto, tal como la línea celular SF-9, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con sitios consenso de glicano unido a N se expresa y secreta en células SF-9, los glicanos unidos a N tendrán a menudo las estructuras representadas en la fila superior de la Figura 7. En los términos de Fórmula 1:

X^3 y X^5 son β -GlcNAc;
 a y $c = 0$ o 1 ;
 $b = 0$;
 X^6 es fucosa,
 $d = 0, 1$ o 2 ; y
 e y $x = 0$.

El núcleo de trimanosa está presente en la gran mayoría de los glicanos unidos a N fabricados por células de insecto y, en ocasiones también está presente una GlcNAc antenal y/o residuo(s) de fucosa. En una realización ejemplar, los glicanos unidos a N de un péptido expresado y secretado en células de insecto se remodelan en el glicano humanizado preferido poniendo en contacto primero los glicanos con una glucosidasa específica de moléculas de fucosa, después poniendo en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de la molécula aceptora de manosa en cada antena del núcleo de trimanosa, una molécula donante de GlcNAc en presencia de moléculas de nucleótido-GlcNAc, después poniendo en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptora de GlcNAc, una molécula donante de Gal, en presencia de moléculas de nucleótido-Gal y, después, poniendo en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptora de galactosa, una molécula donante de ácido siálico en presencia de moléculas de nucleótido-SA. Un experto en la técnica apreciará que las moléculas de fucosa, si existen, se pueden eliminar en cualquier momento durante el procedimiento. En otra realización ejemplar, el glicano humanizado del ejemplo anterior se remodela además en el glicano de x de Lewins sialilado poniendo en contacto el glicano además con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptora de GlcNAc, una molécula donante de fucosa en presencia de moléculas de nucleótido-fucosa. Este procedimiento se ilustra en la Figura 10 y el Ejemplo 3.

En otras realizaciones ejemplares, el péptido se expresa en levaduras, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con sitios consenso de glicano unido a N se expresa y secreta en *Saccharomyces cerevisiae*, los glicanos unidos a N tendrán las estructuras representadas a la izquierda en la Figura 5. Los glicanos unidos a N siempre tendrán el núcleo de trimanoso, que a menudo se elaborarán con manosa o polisacáridos relacionados de hasta 1.000 residuos. En los términos de la Fórmula 1:

X^3 y $X^5 = \beta$ -Man - Man - (Man)₀₋₁₀₀₀;
 a y $c = 1$ o 2 ;
 b, d, e y $x = 0$.

En una realización ejemplar, los glicanos unidos a N de un péptido expresado y secretado por células de levadura se remodelan en el núcleo de trimanosa elemental poniendo en contacto primero los glicanos con una glucosidasa específica de moléculas de $\alpha 2$ manosa, después poniendo en contacto con una glucosidasa específica de moléculas de $\alpha 6$ manosa. Este procedimiento se ilustra en la Figura 5 y el Ejemplo 6. En otra realización ejemplar, los glicanos unidos a N se remodelan además para hacer un glicano adecuado para un anticuerpo recombinante con función de toxicidad celular mediada por Fc poniendo en contacto los glicanos centrales de trimanosa elemental con una glicosiltransferasa específica de la molécula aceptora de manosa en cada antena del núcleo de trimanosa, una molécula donante de GlcNAc en presencia de moléculas de nucleótido-GlcNAc, después poniendo en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptora de manosa en medio del núcleo de trimanosa, una molécula donante de GlcNAc en presencia de moléculas de nucleótido-GlcNAc; después, poniendo en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptora de GlcNAc, una molécula donante de Gal en presencia de moléculas de nucleótido-Gal y, después, poniendo en contacto los glicanos con glicosiltransferasa específica de una molécula aceptora de galactosa, una molécula donante de ácido siálico en presencia de moléculas de nucleótido-SA. Este procedimiento se ilustra en las Figuras 2, 3 y 4.

En otra realización ejemplar, el péptido se expresa en células bacterianas, en particular células de *E. coli*, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con sitios consenso de glicanos unidos a N se expresa en células de *E. coli*, los sitios consenso unidos a N no estarán glicosilados. En una realización ejemplar se construye una molécula de glicano humanizada a partir de la estructura peptídica poniendo en contacto los péptidos con una glicosiltransferasa específica de un sitio consenso unido a N y una molécula donante de GlcNAc en presencia de nucleótido-GlcNAc; y después poniendo en contacto secuencialmente los glicanos en crecimiento con glicosiltransferasas específicas de los restos aceptores y donantes en presencia del resto donante requerido hasta que se completa la estructura de glicano deseada. Cuando un péptido con glicanos unidos a N se expresa en células eucariotas pero sin las secuencias líder adecuadas que dirigen el péptido naciente al aparato de Golgi, es probable que el péptido maduro no esté glucosilado. En este caso también, se puede proporcionar glicosilación unida a N al péptido elaborando a partir del sitio consenso unido a N del péptido como se ha mencionado anteriormente. Cuando una proteína está modificada químicamente con un resto de azúcar, se puede generar como se ha mencionado anteriormente.

Con estos ejemplos se pretende ilustrar la invención. Un experto en la técnica apreciará que las etapas tomadas en cada ejemplo pueden poder realizarse, en algunas circunstancias, en un orden diferente para obtener el mismo resultado. Un experto en la técnica también entenderá que un conjunto diferente de etapas también puede producir el mismo glicano resultante. El glicano remodelado preferido no es, de ningún modo, específico del sistema de expresión en el que el péptido se expresa. Los glicanos remodelados son solo ilustrativos y un experto en la técnica

sabr   cómo tomar los principios a partir de estos ejemplos y aplicarlos a los péptidos producidos en diferentes sistemas de expresión para hacer glicanos no descritos específicamente en el presente documento.

B. Procedimiento para remodelar glicanos unidos a O

5 La O-glicosilación se caracteriza por la unión de varios monosacáridos en un enlace O-glicosídico a hidroxiamino  cidos. La O-glicosilación es una amplia modificación postraducciona en los reinos animal y vegetal.

10 La complejidad estructural de los glicanos unidos con O a proteínas supera considerablemente la de los glicanos unidos a N. Los residuos de serina o treonina de un péptido recién traducido pasan a estar modificados en virtud de una peptidil GalNAc transferasa en los compartimentos cis a trans del Golgi. El sitio de la l-glicosilación no solo está determinado por la especificidad de secuencia de la glicosiltransferasa, sino también la regulación epigenética
15 mediada por competición entre diferentes sitios de sustrato y por competición con otras glicosiltransferasas responsables para formar el glicano.

20 El glicano unido a O se ha definido arbitrariamente como que tiene tres regiones: el núcleo, la región estructural y la región periférica. La región "central" de un glicano unido a O es los dos o tres azúcares más internos de la cadena de glicano proximales al péptido. La región estructural contribuye principalmente a la longitud de la cadena de glicano formada mediante elongación uniforme. La región periférica exhibe un elevado grado de complejidad estructural. La complejidad estructural de los glicanos unidos a O comienza con la estructura del núcleo. En la
15 mayoría de los casos, el primer residuo de azúcar añadido al sitio consenso del glicano unido a O es GalNAc; no obstante, el azúcar puede también ser GlcNAc, glucosa, manosa, galactosa o fucosa, entre otros. La Figura 11 es un diagrama de algunas de las estructuras del núcleo de glicano unido a O conocidas y las enzimas responsables de su síntesis *in vivo*.

25 En células de mamífero se encuentran al menos ocho estructuras centrales unidas a O diferentes, todas en base a un residuo núcleo-  -GalNAc. Las cuatro estructuras centrales representadas en la Figura 12 son las más frecuentes. El núcleo 1 y el núcleo 2 son las estructuras más abundantes en células de mamífero y el núcleo 3 y el núcleo 4 se encuentran en los sistemas de expresión características de órgano más restringidos. Los glicanos unidos a O se revisan en Montreuil, Structure and Synthesis of Glycopeptides, en Polysaccharides in Medicinal Applications, pág.
273-327, 1996, Eds. Severian Damitriu, Marcel Dekker, NY, and in Schachter and Brockhausen, The Biosynthesis of Branched O-Linked Glycans, 1989, Society for Experimental Biology, pág. 1-26 (Gran Bret  a).

30 En la presente divulgación será evidente que la estructura glicano de los péptidos glicosilados en O se puede remodelar usando técnicas similares a las descritas para glicanos unidos a N. Los O-glicanos difieren de los N-glicanos en que est  n unidos a un residuo de serina o treonina en lugar de a un residuo de asparagina. Como se describe en el presente documento con respecto al remodelado de N-glicano, se pueden usar las enzimas hidrolíticas para escindir los restos de azúcar indeseados en un glicano unido a O y se pueden añadir los azúcares
35 deseados adicionales para generar una estructura de glicano unido a O adaptado sobre el péptido (véanse las Figuras 11 y 12).

40 La etapa inicial en la glicosilación-O en células de mamífero es la unión de N-acetilgalactosamina (GalNAc) usando cualquiera de una familia de al menos once   -N-acetilgalactosaminiltransferasas conocidas, cada una de las cuales tiene una especificidad por el péptido aceptor restringida. En general, el péptido aceptor reconocido por cada enzima constituye una secuencia de al menos diez aminoácidos. Los péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos reconocida por una GalNAc-transferasa concreta se convierten en O-glicosilados en el sitio aceptor si se expresan
45 en una célula que expresa la enzima y si se localizan adecuadamente en el aparato de Golgi en el que también hay UDP-GalNAc.

No obstante, en el caso de las proteínas recombinantes, la unión inicial de la GalNAc puede no tener lugar. La enzima   -N-acetilgalactosaminiltransferasa nativa de la célula de expresión puede tener una especificidad por la secuencia consenso que difiere de la del péptido recombinante que se est   expresando.

50 El péptido recombinante deseado se puede expresar en una célula bacteriana, tal como *E. coli*, que no sintetiza cadenas de glicano. En estos casos, es ventajoso añadir el resto de GalNAc inicial *in vitro*. El resto de GalNAc se puede introducir *in vitro* sobre el péptido una vez que el péptido recombinante se ha recuperado en forma soluble, poniendo en contacto el péptido con la GalNAc transferasa adecuada en presencia de UDP-GalNAc.

55 En una realización puede estar presente una secuencia adicional de aminoácidos que constituyen un aceptor eficaz para transferir un azúcar unido a O. Dicha secuencia de aminoácidos est   codificada por una secuencia de ADN condensada en marco con la secuencia de codificación del péptido o, como alternativa, se puede introducir por medios químicos. Por otro lado, el péptido puede carecer de cadenas de glicano. Como alternativa, el péptido puede tener cadenas de glicano unido a N y/o a O pero requieren un sitio de glicosilación adicional cuando se desea un sustituyente de glicano adicional.

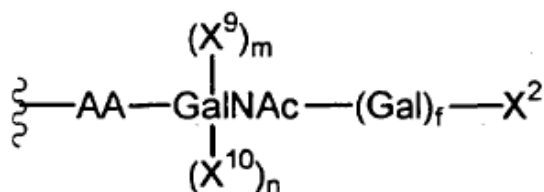
En una realización ejemplar, la secuencia de aminoácidos de PTTTK-COOH, que es la secuencia aceptora natural de GalNAc en la mucina MUC-1 humana, se añade como cola de fusión. La proteína de fusión se expresa después en *E. coli* y se purifica. Después, el péptido se pone en contacto con GalNAc-transferasas T3 o T6 humanas

recombinantes en presencia de UDP-GalNAc para transferir un residuo de GalNAc sobre el péptido *in vitro*.

Esta cadena de glicano sobre el péptido se puede además alargar usando los procedimientos descritos con referencia a los glicanos unidos a N o unidos a O en el presente documento. Como alternativa, la reacción de la GalNAc transferasa se puede llevar a cabo en presencia de UDP-GalNAc al que PEG está sustituido covalentemente en las posiciones O-3, 4 o 6 o en la posición N-2. La glicoconjugación se describe con detalle en otros lugares del presente documento. Cualquier antigenicidad introducida en el péptido por la nueva secuencia peptídica puede enmascarse de forma conveniente mediante PEGilación del glicano asociado. La técnica de fusión del sitio aceptor se puede usar para introducir no solo un resto de PEG sino para introducir otro glicano o restos que no son glicanos, incluyendo toxinas, antiinfecciosos, agentes citotóxicos, quelantes para radionucleótidos, y glicanos con otras funcionalidades, tales como dirigidos a tejidos.

Realizaciones ejemplares

El remodelado de la glicosilación unida a O se ilustra mejor con referencia a la Fórmula 2:



La Fórmula 2 describe una estructura de glicano que comprende una GalNAc que está unida, preferentemente de forma covalente, a un residuo de serina o treonina sobre una estructura peptídica. Aunque esta estructura se usa para ilustrar las formas más frecuentes de glicanos unidos a O, no debe interpretarse que limitan la invención únicamente a estos glicanos unidos a O. Otras Formas de glicanos unidos a O se ilustran en la Figura 11. Sistemas de expresión preferidos útiles en la presente invención expresan y secretan péptidos exógenos que tienen glicanos unidos a O que comprenden el residuo GalNAc. Usando los procedimientos de remodelado de la invención, las estructuras de glicano en estos péptidos se pueden remodelar de forma conveniente para generar cualquier estructura de glicano deseada. Un experto en la técnica apreciará que los glicanos unidos a O se pueden remodelar usando los mismos principios, enzimas y condiciones de reacción que los disponibles en la técnica una vez armada con la presente divulgación. Ejemplos de condiciones de reacción se encuentran a lo largo de los ejemplos.

En realizaciones preferidas, las estructuras de glicano se remodelan de un modo tal que la estructura descrita en la Fórmula 2 tenga restos específicos. La estructura del glicano se puede elegir para potenciar la actividad biológica del péptido, conferir al péptido una nueva actividad biológica, eliminar o alterar una actividad biológica del péptido o aproximar mejor al patrón de glicosilación del péptido nativo, entre otros.

En la primera realización preferida, los glicanos unidos a O del péptido se remodelan para que se aproximen mejor al patrón de glicosilación de las proteínas humanas nativas. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 2 se remodela para tener los restos siguientes:

X^2 es β -SA; o β -SA-SA;
 f y $n = 0$ o 1 ;
 X^{10} es SA;
 $m = 0$.

Esta realización es particularmente ventajosa para los péptidos humanos expresados en sistemas de expresión celular heterólogos. Remodelando las estructuras de glicano unidas a O a esta configuración, el péptido se puede hacer menos inmunogénico en un paciente humano y/o más estable.

En la otra realización preferida, los glicanos unidos a O del péptido se remodelan de modo que muestran un antígeno X de Lewis sialilado. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 2 se remodela para tener los restos siguientes:

X^2 es β -SA;
 X^{10} es Fuc o β -GlcNAc(Fuc)-Gal-SA;
 f y $n = 1$;
 $m = 0$.

Esta realización es particularmente ventajosa cuando el péptido que se está remodelando es más eficaz cuando está dirigido a una molécula de selectina y a células que exhiben las mismas.

En otra realización preferida más, los glicanos unidos a O del péptido se remodelan para que contengan un resto conjugado. El resto conjugado puede ser una molécula de PEG, otro péptido, una molécula pequeña tal como un

fármaco, entre otros. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 2 se remodela para tener los restos siguientes:

X^2 es $|-SA-R$;

$f = 1$;

n y $m = 0$;

en la que R es el grupo conjugado.

Esta realización es útil para conjugar el péptido a las moléculas de PEG que ralentizarán la eliminación del péptido de la circulación sanguínea del paciente, a péptidos que se dirigirán ambos péptidos a un tejido o célula específico o a otro péptido de uso terapéutico complementario.

Para un experto en la técnica quedará claro que la invención no está limitada a las moléculas de glicano preferidas descritas anteriormente. Las realizaciones preferidas son únicamente unas pocas de las muchas moléculas de glicano útiles que se pueden elaborar mediante los procedimientos de remodelado de la invención. Los expertos en la técnica conocerán cómo diseñar otros glicanos útiles una vez armados con la presente invención.

En esta primera realización ejemplar, el péptido se expresa en células CHO (línea celular de hámster chino) de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con sitios consenso de glicano unido a O se expresa y secreta en células CHO, la mayoría de los glicanos unidos a O tendrán a menudo la estructura en los términos de Fórmula 2:

$X^2 = |-SA$;

$f = 1$;

m y $n = 0$.

Por tanto, la mayoría de los glicanos en células CHO no requieren remodelado con el fin de ser aceptables para usar en un paciente humano. En una realización ejemplar, los glicanos unidos a O de un péptido expresado y secretado por una célula CHO se remodelan de modo que contengan una estructura X de Lewis sialilada poniendo en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica del resto aceptor de GalNAc y el resto donante de fucosa en presencia de nucleótido-fucosa. Este procedimiento se ilustra en los glicanos unidos a N en la Figura 10 y el Ejemplo 3.

En otras realizaciones ejemplares, el péptido se expresa en células de insecto, tal como SF9, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con sitios consenso de glicano unido a O se expresa y secreta en la mayoría de las células SF9, la mayoría de los glicanos unidos a O tendrán la estructura, en los términos de Fórmula 2:

$X^2 = H$;

$f = 0$ o 1 ;

n y $m = 0$.

Véase, por ejemplo, Marchal y col., (2001, Biol. Chem. 382:151-159). En una realización ejemplar, el glicano unido a O sobre un péptido expresado en una célula de insecto se remodela a un glicano humanizado poniendo en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de GalNAc y una molécula donante de galactosa en presencia de nucleótido-Gal; y, después, poner en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de Gal y una molécula donante de SA en presencia de nucleótido-SA. En otra realización ejemplar, los glicanos unidos a O se remodelan después a partir de la forma humanizada en la forma x de Lewins sialilado poniendo en contacto además los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de GlcNAc, una molécula donante de fucosa en presencia de moléculas de nucleótido-fucosa.

En otra realización ejemplar más, el péptido se expresa en células fúngicas, en particular células de O (línea celular de hámster chino) de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con sitios consenso de glicano unido a O se expresa y secreta en células *S. cerevisiae* de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con sitios consenso de glicanos unidos a O se expresa y secreta en células de *S. cerevisiae*, la mayoría de los glicanos unidos a O tienen la estructura:

$|-AA-Man-Man_{1-2}$.

Véase Genmill y Trimble (1999, Biochim. Biophys. Acta 1426:227-237). Con el fin de remodelar estos glicanos unidos a O para uso en seres humanos, es preferible que el glicano se escinda a nivel del aminoácido y se reconstruya a partir de ahí-

En una realización ejemplar, el glicano es el glicano unido a O sobre un péptido expresado en una célula fúngica y se remodela en un glicano humanizado poniendo en contacto el glicano con una endoglucosilasa específica de un enlace aminoácido GalNAc y, después, poniendo en contacto el glicano con una glicosiltransferasa específica de un sitio consenso unido a O y una molécula donante de GalNAc en presencia de nucleótido-GalNAc; poniendo en contacto el glicano con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de GalNAc y una molécula donante de galactosa en presencia de nucleótido-Gal; y, después, poniendo en contacto los glicanos con una glicosiltransferasa específica de una molécula aceptor de Gal y una molécula donante de SA en presencia de

nucleótido-SA.

Como alternativa, en otra realización ejemplar, el glicano es el glicano unido a O en un péptido expresado en una célula fúngica y se remodela en un glicano humanizado poniendo en contacto el glicano con una proteína O-manosa β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (POMGnTI) en presencia de GlcNAc-nucleótido; poniendo en contacto después el glicano con una galactosiltransferasa en presencia de nucleótido-Gal; y, después, poniendo en contacto el glicano con una sialiltransferasa en presencia de nucleótido-SA.

En otra realización ejemplar, el péptido se expresa en células bacterianas, en particular células de *E. coli*, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con un sitio consenso de glicanos unido a O se expresa en células de *E. coli*, el sitio consenso unido a O no estarán glicosilados. En este caso, la molécula de glicano deseada se debe elaborar a partir de la estructura peptídica de un modo similar al que se ha descrito para la expresión en *S. cerevisiae* anteriormente. Además, cuando un péptido que tiene un glicano unido a O se expresa en una célula eucariota sin las secuencias líder adecuadas que dirigen el péptido naciente al aparato de Golgi, es probable que el péptido maduro no esté glucosilado. En este caso también, se puede añadir al péptido una estructura de glicosilo unido a O elaborando el glicano directamente a partir del sitio consenso unido a O del péptido. Además, cuando una proteína está modificada químicamente con un resto de azúcar, también se puede remodelar como se ha mencionado anteriormente.

Con estos ejemplos se pretende ilustrar la invención y no limitarla en modo alguno. Un experto en la técnica apreciará que las etapas tomadas en cada ejemplo pueden poder realizarse, en algunas circunstancias, en un orden diferente para alcanzar el mismo resultado. Un experto en la técnica también entenderá que un conjunto diferente de etapas también puede producir el mismo glicano resultante. Además, el glicano remodelado preferido no es, de ningún modo, específico del sistema de expresión en el que el péptido se expresa. Los glicanos remodelados son solo ilustrativos y un experto en la técnica sabrá cómo tomar los principios a partir de estos ejemplos y aplicarlos a los péptidos producidos en diferentes sistemas de expresión para hacer glicanos no descritos específicamente en el presente documento.

C. Glicoconjugación en general

La invención proporciona procedimientos de preparar un conjugado de un péptido glucosilado o no glucosilado. Los conjugados de la invención se forman entre péptidos y polímeros solubles en agua de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. También se proporcionan conjugados que incluyen dos o más péptidos unidos entre sí mediante una rama ligadora, es decir conjugados multifuncionales. Los conjugados multifuncionales de la invención pueden incluir dos o más copias del mismo péptido o un conjunto de diversos péptidos con diferentes estructuras y/o propiedades.

Los conjugados de la invención se forman mediante la unión enzimática de un azúcar modificado al péptido glucosilado o no glucosilado. El azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido y el grupo modificador en el azúcar se convierte en lo que en el presente documento se denomina "grupo de unión a glicosilo intacto". Usando la selectividad exquisita de las enzimas, tal como las glicosiltransferasas, el presente procedimiento proporciona péptidos portadores de un grupo deseado en una o más localizaciones específicas. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, un azúcar modificado se une directamente a un locus seleccionado sobre la cadena peptídica o, como alternativa, el azúcar modificado se cuelga sobre un resto carbohidrato de un péptido. Los péptidos en los que los azúcares modificados están unidos a un carbohidrato peptídico y directamente a un residuo de aminoácido de la estructura peptídica también están dentro del alcance de la presente invención.

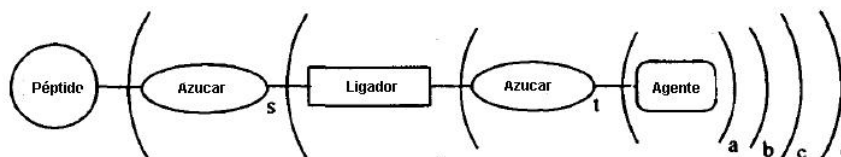
A diferencia de las estrategias de elaboración de péptidos químicas y enzimáticas, los procedimientos de la invención hacen posible unir péptidos y glicopéptidos que tienen un patrón de derivación sustancialmente homogéneo; las enzimas usadas en la invención son, en general, selectivas de un residuo de aminoácido concreto o una combinación de residuos de aminoácido del péptido. Los procedimientos son también prácticos para la producción a gran escala de péptidos modificados y glicopéptidos. Por tanto, los procedimientos de la invención proporcionan un medio práctico para la preparación a gran escala de péptidos que tienen patrones de derivación sustancialmente uniformes preseleccionados. Los procedimientos son particularmente bien adecuados para la modificación de péptidos terapéuticos, incluidos, sin limitación, los péptidos que se glucosilan de forma incompleta durante la producción en células en cultivo celular (p. ej., células de mamífero, células de insecto, células vegetales, células fúngicas, células de levaduras o células procariotas) o plantas o animales transgénicos.

Los procedimientos de la invención también proporcionan conjugados de péptidos glicosilados y no glicosilados con mayor semivida terapéutica debido a, por ejemplo, una menor tasa de eliminación o menor tasa de captación por el sistema inmunitario o retículo-endotelial (RES). Además, los procedimientos de la invención proporcionan un medio para enmascarar determinantes antigénicos en péptidos, de modo que se reduce o elimina una respuesta inmunitaria del huésped contra el péptido. La unión selectiva de los agentes de direccionamiento también se puede usar para dirigir un péptido a un tejido concreto o receptor de superficie celular que sea específico del agente dirigido concreto. Además, se proporciona una clase de péptidos que están modificados específicamente con un resto terapéutico.

1. Los conjugados

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un péptido y un resto seleccionado. El enlace entre el péptido y el resto seleccionado incluye un grupo de unión a glicosilo intacto interpuesto entre el péptido y el resto seleccionado. Como se trata en el presente documento, el resto seleccionado es esencialmente cualquier especie que se puede unir a una unidad sacárida que tiene como resultado un "azúcar modificado" que es reconocido por una enzima transferasa adecuada que cuelga el azúcar modificado sobre el péptido. El componente sacárido del azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido y un resto seleccionado se convierte en un "grupo de unión a glicosilo intacto". El grupo de unión a glicosilo se forma a partir de cualquier mono u oligosacáridos que, tras modificar con un resto seleccionado, es un sustrato de una transferasa adecuada.

Normalmente, los conjugados de la invención corresponden 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 "agente" es un agente terapéutico, un agente bioactivo, un marcador detectable, resto soluble en agua o similar. El "agente" puede ser un péptido, por ejemplo una enzima, anticuerpo, antígeno etc. El ligador puede ser cualquiera de una amplia gama de grupos de unión, más adelante. Como alternativa, el ligador puede ser un enlace sencillo o un "ligador de orden cero". La identidad del péptido es sin limitaciones. Ejemplos de péptidos se proporcionan en la Figura 1.

De acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, el resto seleccionado es un polímero soluble en agua. El polímero soluble en agua está unido covalentemente al péptido a través de un grupo de unión a glicosilo intacto. El grupo de unión a glicosilo está unido covalentemente a un residuo de aminoácido o a un residuo de glicosilo del péptido. Como alternativa, el grupo de unión a glicosilo está unido a una o más unidades de glicosilo de un glicopéptido. La invención también proporciona conjugados en los que el grupo de unión a glicosilo está unido a un residuo de aminoácido y a un residuo de glicosilo.

Además de proporcionar conjugados que se forman a través de un grupo de unión a glicosilo intacto añadido enzimáticamente, la presente invención proporciona conjugados que son altamente homogéneos en sus patrones de sustitución. Usando los procedimientos de la invención es posible formar conjugados peptídicos en los que esencialmente todos los restos de azúcar modificados en una población de conjugados de la invención están unidos a múltiples copias de un residuo de aminoácido o de glicosilo estructuralmente idéntico. Por tanto, en un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos poliméricos solubles en agua que están unidos covalentemente al péptido a través de un grupo de unión a glicosilo intacto. En un conjugado preferido de la invención, esencialmente cada miembro de la población está unido mediante el grupo de unión a glicosilo a un residuo de glicosilo del péptido y cada residuo de glicosilo del péptido al que está unido el grupo de unión a glicosilo tiene la misma estructura.

También se proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos polímeros solubles en agua unidos covalentemente al péptido a través de un grupo de unión a glicosilo intacto. En una realización preferida, esencialmente cada miembro de la población de restos polímeros solubles en agua está unido a un residuo de aminoácido del péptido a través de un grupo de unión a glicosilo intacto y cada residuo de aminoácido que tiene un grupo de unión a glicosilo intacto unido al mismo tiene la misma estructura.

También se divulgan conjugados análogos a los descritos anteriormente en los que el péptido está conjugado a un resto terapéutico, resto diagnóstico, resto de direccionamiento, resto toxina o similar mediante un grupo de unión a glicosilo intacto. Cada uno de los restos citados anteriormente puede ser una molécula pequeña, polímero natural (p. ej., péptidos) o polímero sintético.

En una divulgación ejemplar, la interleucina-2 (IL-2) está conjugada a la transferrina mediante un ligador bifuncional que incluye un grupo de unión a glicosilo intacto en cada extremo del resto de PEG (Esquema 1). Por ejemplo, un extremo del ligador PEG está funcionalizado con un ligador de ácido siálico intacto que está unido a la transferrina y el otro está funcionalizado con un ligador GalNAc intacto que está unido a la IL-2.

En otra divulgación ejemplar, EPO se conjuga a la transferrina. En otra realización ejemplar, EPO se conjuga al factor de crecimiento neurotrófico derivado de la glía (GDNF). En estas realizaciones, cada conjugación se consigue mediante ligador bifuncional que incluye un grupo de unión a glicosilo intacto en cada extremo del resto de PEG, como se ha mencionado anteriormente. La transferrina transfiere la proteína a través de la barrera

hematoencefálica.

Como se establece en las Figuras adjuntas, los conjugados de la invención pueden incluir grupos de unión a glicosilo intactos que son mono o multivalentes (p. ej., estructuras antenales), véase las Figuras 13-21. Los conjugados de la invención también incluyen grupos de unión a glicosilo que son glicanos unidos a O que se originan de serina o treonina (Figura 10). Por tanto, los conjugados de la invención incluyen ambas especies en las que un resto seleccionado está unido a un péptido a través de un grupo de unión a glicosilo monovalente. También se incluyen dentro de la invención, conjugados en los que más de un resto seleccionado está unido a un péptido a través de un grupo de unión multivalente. Una o más proteínas se pueden conjugar juntas para aprovechar sus propiedades biofísicas y biológicas.

En otra realización más, la invención proporciona conjugados que se localizan de forma selectiva en un tejido concreto debido a la presencia de un agente de direccionamiento como componente del conjugado. En una realización ejemplar, el agente de direccionamiento es una proteína. Proteínas ejemplares incluyen transferrina (cerebro, acumulación de sangre), suero humano-glicoproteína α -(HS) (hueso, cerebro, acumulación de sangre), anticuerpos (cerebro, tejido con antígeno específico de anticuerpo, acumulación de sangre), factores de coagulación V-XII (tejido dañado, coágulos, cáncer, acumulación de sangre), proteínas séricas, por ejemplo glicoproteína α -ácida, fetuína, α -fetoproteína (cerebro, acumulación de sangre), β 2-glicoproteína (hígado, pacas de aterosclerosis, cerebro, acumulación de sangre), G-CSF, GM-CSF, M-CSF, y EPO (estimulación inmunitaria, cánceres, acumulación de sangre, sobreproducción de glóbulos rojos, neuroprotección) y albúmina (incremento de la semivida).

Además de los conjugados tratados anteriormente, la presente invención proporciona procedimientos para preparar estos y otros conjugados. Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de formar un conjugado covalente entre un resto seleccionado y un péptido. Adicionalmente, la invención proporciona procedimientos para dirigir conjugados de la invención a un tejido o región concretos del cuerpo.

En realizaciones ejemplares, el conjugado se forma entre un polímero soluble en agua, seleccionado de óxidos de polialquileño y polipéptidos y un péptido glucosilado o no glucosilado. El polímero está conjugado al péptido a través de un grupo de unión glicosilo intacto que se interpone entre, y se une covalentemente, tanto al péptido como al polímero soluble en agua. El procedimiento incluye poner en contacto el péptido con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una glicosiltransferasa para la cual el azúcar modificado es un sustrato. La reacción se lleva a cabo en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido. El resto de azúcar del azúcar modificado se selecciona preferentemente de azúcares de nucleótidos, azúcares activados y azúcares que no son de nucleótidos ni están activados.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento para unir dos o más péptidos a través de un grupo de unión. El grupo de unión es de cualquier estructura útil y se puede seleccionar de estructuras de cadena lineal o de cadena ramificada. Preferentemente, cada extremo del ligador, que está unido a un péptido, incluye un azúcar modificado (es decir, un grupo de unión a glicosilo intacto naciente).

En un procedimiento ejemplar de la invención, dos péptidos se unen entre sí a través de un resto ligador que incluye un ligador de PEG. El constructo se adapta a la estructura general establecida en el recuadro anterior. Como se ha descrito en el presente documento, el constructo de la invención incluye dos grupos de unión a glicosilo intactos (es decir, $s + t = 1$). El centro en un ligador PEG que incluye dos grupos glicosilo es a efectos de claridad y no debe interpretarse como limitante de la identidad de las ramas ligadoras de uso en esta realización de la invención.

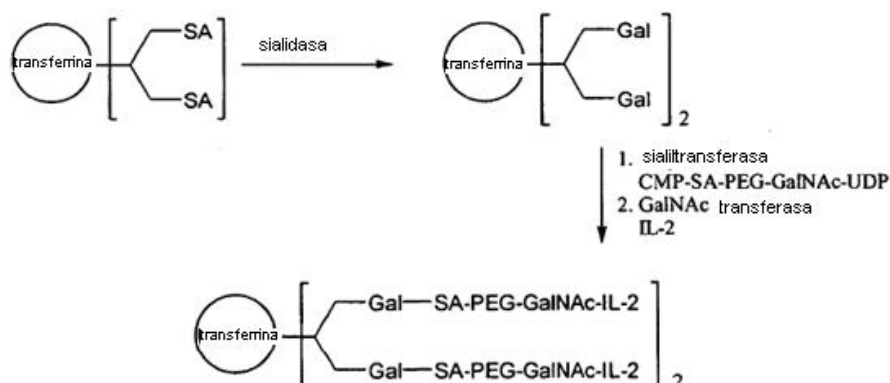
Por tanto, un resto de PEG está funcionalizado en un primer extremo con una primera unidad de glicosilo y un segundo extremo con una segunda unidad de glicosilo. La primera y la segunda unidad de glicosilo son, preferentemente, sustratos para diferentes transferasas, lo que permite la unión ortogonal de los péptidos primero y segundo a la primera y la segunda unidad de glicosilo, Respectivamente. En la práctica, el ligador (glucosil)¹-PEG-(glucosil)² se pone en contacto con el primer péptido y una primera transferasa para la cual la primera unidad de glicosilo es un sustrato, formando de este modo el (péptido)¹-(glucosil)¹-PEG-(glucosil)². Después, opcionalmente, la primera transferasa y/o péptido sin reaccionar se eliminan de la mezcla de reacción. El segundo péptido y una segunda transferasa para la que la segunda unidad de glicosilo es un sustrato se añaden al conjugado (péptido)¹-(glucosil)¹-PEG-(glucosil)², formando el (péptido)¹-(glucosil)¹-PEG-(glucosil)²-(péptido)². Los expertos en la técnica apreciarán que el procedimiento indicado anteriormente también es aplicable a la formación de conjugados entre más de dos péptidos mediante, por ejemplo, el uso de un PEG ramificado, dendrímero, poli(aminoácido), polisacárido o similar.

Como se ha indicado anteriormente, en una divulgación ejemplar, la interleucina-2 (IL-2) está conjugada a la transferrina mediante un ligador bifuncional que incluye un grupo de unión a glicosilo intacto en cada extremo del resto de PEG (Esquema 1). El conjugado de IL-2 tiene una semivida in vivo que aumenta sobre la de la IL-2 sola en virtud del mayor tamaño molecular del conjugado. Además, la conjugación de la IL-2 a la transferrina sirve para dirigir selectivamente el conjugado al cerebro. Por ejemplo, un extremo del ligador PEG se funcionaliza con un CMP-ácido siálico y el otro se funcionaliza con un UDP-GalNAc. El ligador se combina con IL-2 en presencia de una GalNAc transferasa, lo que tiene como resultado la unión de la GalNAc de la rama ligadora a un residuo de serina

y/o treonina en la IL-2.

En otra divulgación ejemplar, la transferrina se conjuga con un ácido nucleico para usar en terapia génica.

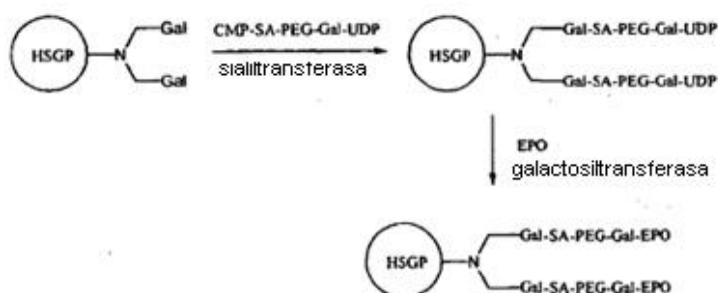
Esquema 1



- 5 Los procedimientos descritos anteriormente se pueden llevar a cabo a través de tantos ciclos como se desee y no están limitados a formar un conjugado entre dos péptidos con un único ligador. Además, los expertos en la técnica apreciarán que las reacciones que funcionalizan los grupos de unión a glicosilo intactos en los extremos del ligador PEG (u otros) con el péptido se pueden producir de forma simultánea en el mismo vaso de reacción o se pueden llevar a cabo de un modo escalonado. Cuando las reacciones se llevan a cabo de un modo escalonado, el
- 10 conjugado producido en cada etapa se purifica opcionalmente entre uno o más componentes de la reacción (p. ej., enzimas, péptidos).

Una divulgación ejemplar más se expone en el Esquema 2. El Esquema 2 muestra un procedimiento de preparar un conjugado que dirige una proteína seleccionada, por ejemplo EPO, al hueso e incrementa la semivida en circulación de la proteína seleccionada.

Esquema 2

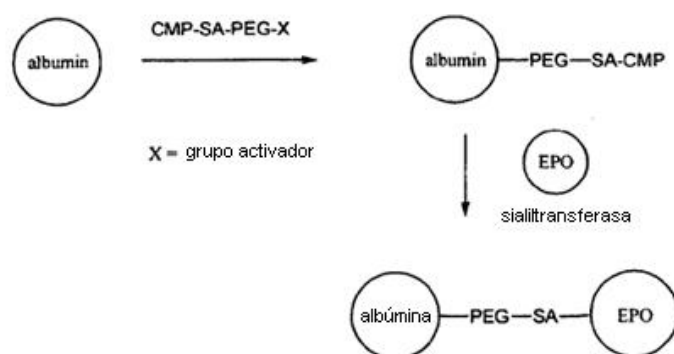


- El uso de derivados reactivos de PEG (u otros ligadores) para unir uno o más restos peptídicos al ligador está dentro del alcance de la presente invención. La invención no está limitada por la identidad del análogo de PEG reactivo. Muchos derivados activados de poli(etilenglicol) están disponibles comercialmente y en la bibliografía. Dentro de las
- 20 capacidades de un experto entra elegir y sintetizar en caso necesario un derivado de PEG activado adecuado 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
- 25 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, New York, 1992, pág. 347-370;
- 30 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 EE.UU, N° 4.806.595, concedida a Noishiki y col. (1989). Oreos grupos de unión incluyen el enlace uretano entre grupos amino y PEG activado. Véase, Veronese, y col., Appl. Biochem. Biotechnol., 11: 141-152 (1985).

- 5 En otra divulgación ejemplar en la que se usa un derivado de PEG reactivo, la invención proporciona un procedimiento para extender la semivida en la circulación sanguínea de un péptido seleccionado, en esencia dirigir el péptido a la acumulación de sangre, conjugando el péptido con un polímero sintético o natural de un tamaño suficiente para retrasar la filtración de la proteína por el glomérulo (p. ej., albúmina). Esta divulgación se ilustra en el Esquema 3 en el que la eritropoyetina (EPO) se conjuga con albúmina a través de un ligador PEG usando una combinación de modificación química y enzimática.

Esquema 3



- Por tanto, como se muestra en el Esquema 3, un residuo de aminoácido de la albúmina se modifica con un derivado de PEG reactivo, tal como X-PEG-(CMP-ácido siálico), en el que X es un grupo activador (p. ej. éster activo, isotiocianato, etc.). El derivado de PEG y EPO se combinan y ponen en contacto con una transferasa para la cual CMP-ácido siálico es un sustrato. En una realización ilustrativa adicional, una ϵ -amina de lisina se hace reaccionar con el éster N-hidroxisuccinimida del ligador de PEG para formar el conjugado de albúmina. El CMP-ácido siálico del ligador se conjuga enzimáticamente a un residuo adecuado sobre la EPO, por ejemplo Gal, de modo que se forma el conjugado. Los expertos apreciarán que el procedimiento descrito anteriormente no está limitado a las parejas de reacción expuestas. Además, el procedimiento se puede poner en práctica para formar conjugados que incluyan más de dos restos proteicos mediante, por ejemplo, el uso de un ligador ramificado que tenga más de dos extremos.

2. Azúcares modificados

- Las especies donantes de glicosilo modificado ("azúcares modificados") se seleccionan preferentemente de nucleótidos de azúcar modificados, de azúcares modificados activados y de azúcares modificados que son sacáridos simples que no son de nucleótidos ni están activados. Cualquier estructura de carbohidrato deseada se puede añadir a un péptido usando los procedimientos de la invención. Normalmente, la estructura será un monosacárido, pero la presente invención no está limitada al uso de azúcares monosacáridos modificados; también son útiles los oligosacáridos y los polisacáridos.

- El grupo modificador se une a un resto azúcar por medios enzimáticos, medios químicos o una combinación de los mismos, de modo que se produce un azúcar modificado. Los azúcares se sustituyen en cualquier posición que permita la unión del resto modificador, aunque debe seguir permitiendo que el azúcar funcione como sustrato de la enzima usada para ligar el azúcar modificado al péptido. En una realización preferida, cuando el ácido siálico es el azúcar, el ácido siálico está sustituido con el grupo modificador en la posición 9 en la cadena lateral de piruvilo o en la posición 5 en el resto amina que normalmente está acetilado en el ácido siálico.

- En determinadas realizaciones de la presente invención se usa un nucleótido con azúcar modificado para añadir el azúcar modificado al péptido. Nucleótidos ejemplares con azúcar que se usan en la presente invención en su forma modificada incluyen nucleótidos mono, di o trifosfatos o análogos de los mismos. En una realización preferida, el nucleótido con azúcar modificado se selecciona de un UDP-glucósido, CMP-glucósido o GDP-glucósido. Incluso más preferentemente, el nucleótido con azúcar modificado se selecciona de UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, GDP-manosa, GDP-fucosa, CMP-ácido siálico o CMP-NeuAc. Los derivados de N-acetilamina de los nucleótidos con azúcar también son útiles en el procedimiento de la invención.

La invención también proporciona procedimientos para sintetizar un péptido modificado usando un azúcar modificado, por ejemplo galactosa, fucosa y ácido siálico modificados. Cuando se usa un ácido siálico modificado, en estos procedimientos se pueden usar una sialiltransferasa o una transalidasa (sólo para el ácido siálico unido en

α -2,3).

En otras realizaciones, el azúcar modificado es un azúcar activado. Los azúcares modificados activados que son útiles en la presente invención normalmente son glicósidos que se han alterado sintéticamente para incluir un grupo saliente activado. Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo saliente activado" hace referencia a los restos que se desplazan fácilmente en reacciones de sustitución nucleofílica reguladas por enzimas. En la técnica se conocen muchos azúcares activados. Véase, por ejemplo, Vocadlo y col., en CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOLOGY, Vol. 2, Ernst y co., Ed., Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Alemania, 2000; Kodama y col., Tetrahedron Lett. 34: 6419 (1993); Loughheed, y col., J. Biol. Chem. 274: 37717 (1999)).

Ejemplos de grupos activadores (grupos salientes) incluyen flúor, cloro, bromo, éster de tosilato, éster de mesilato, éster de triflato y similares. Grupos salientes activados preferidos, para su uso en la presente invención, son los que no estorban estéricamente de forma significativa la transferencia enzimática del glucósido al aceptor. En consecuencia, realizaciones preferidas de derivados de glucósido activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, siendo los fluoruros de glicosilo particularmente preferidos. Entre los fluoruros de glicosilo, los más preferidos son fluoruro de α -galactosilo, fluoruro de α -manosilo, fluoruro de α -glicosilo, 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 -glicosilo, fluoruro de β -fucosilo, fluoruro de β -xilosilo, fluoruro de β -sialilo, fluoruro de β -N-acetilglucosaminilo y fluoruro de β -N-acetilgalactosaminilo.

A modo de ilustración, se pueden preparar fluoruros de glicosilo a partir del azúcar libre acetilando primero el azúcar y después tratándolo con HF/piridina. Esto genera el anómero termodinámicamente más estable de fluoruros de glicosilo protegido (acetilado), es decir el fluoruro de α -glicosilo). Si se desea el anómero menos estable (es decir, el fluoruro de β -glicosilo), se puede preparar convirtiendo el azúcar peracetilado con HBr/HOAc o con HCl para generar el bromuro o cloruro anomérico. Este 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 pueden desproteger mediante reacción con una base suave (catalítica) en metanol (p. ej., NaOMe/MeOH). Además, muchos fluoruros de glicosilo están disponibles comercialmente.

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

En otra realización ejemplar, el azúcar modificado es un oligosacárido que tiene una estructura antenal. En una realización preferida, uno o más de los extremos de la antena portan el resto modificador. Cuando más de un resto modificador está unido a un oligosacárido que tiene una estructura antenal, el oligosacárido es útil para "amplificar" el resto modificador; cada unidad de oligosacáridos conjugada con el péptido une múltiples copias del grupo modificador al péptido. La estructura general de un quilato típico de la invención como se expone en la figura anterior abarca especies multivalentes que son el resultado de preparar un conjugado de la invención usando una estructura antenal. En la técnica se conocen muchas estructuras de sacárido antenales y el presente procedimiento se puede poner en práctica con ellas sin limitaciones.

Ejemplos de grupos modificadores se tratan a continuación. Los grupos modificadores se pueden seleccionar de una o más propiedades deseables. Los ejemplos de propiedades incluyen, pero no se limita a, mayor farmacocinética, mayor farmacodinámica, mejor biodistribución, que proporciona una especie polivalente, mejor solubilidad en agua, mayor o menor lipofiliidad y direccionamiento tisular.

D. Conjugados peptídicos

a) Polímeros solubles en agua

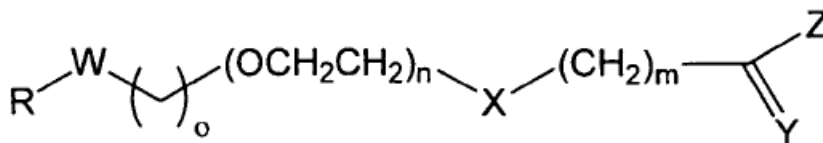
La hidrofiliidad de un péptido seleccionado se potencia mediante conjugación con moléculas polares, tales como moléculas que contienen amina, éster, hidroxilo y polihidroxilo. Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limita a, polilisina, polietilenimina, poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol). Polímeros solubles en agua preferidos son, esencialmente, no fluorescentes o emiten una cantidad tan mínima de fluorescencia que son inadecuados para usar como marcadores fluorescentes en un ensayo. Se pueden usar polímeros que no sean azúcares naturales. Además, también se contempla el uso de un azúcar de otro modo natural que está modificado por la unión covalente de otra entidad (p. ej., poli(Etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(aspartato), biomolécula, resto terapéutico, resto diagnóstico etc.). En otra realización ejemplar, un resto de azúcar terapéutico se conjuga con una rama ligadora y la rama ligadora-azúcar se conjuga después con un péptido a través de un procedimiento de la invención.

En la bibliografía se describen procedimientos y químicas para la activación de polímeros y sacáridos solubles en agua, así como procedimientos para conjugar sacáridos y polímeros a varias especies. Procedimientos de uso habitual para la activación de polímeros incluyen activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorohidrina, divinilsulfona, carbodiimida, haluros de sulfonilo, triclorotriazina etc. (véase, R. F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND

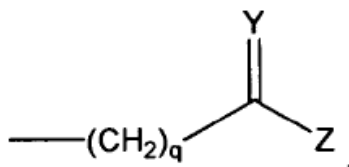
CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson y col., (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L., y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

- 5 En la técnica se conocen vías para preparar moléculas de PEG reactivo y formar conjugados usando las moléculas reactivas. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.672.662 divulga un conjugado soluble en agua y aislable de un éster activo de un polímero ácido seleccionado de poli(óxidos de alquileo) lineales o ramificados, poli(polióles oxetilados), poli(alcoholes olefinicos) y poli(acrilomorfolina), en los que el polímero tiene aproximadamente 44 o más unidades recurrentes.
- 10 La patente de EE.UU. N° 6,376,604 establece un procedimiento para preparar un éster de 1-benzotriazolcarbonato soluble en agua de un polímero soluble en agua y no peptídico haciendo reaccionar un hidroxilo terminal del polímero con carbonato de di(1-benzotriazolo) en un disolvente orgánico. El éster activo se usa para formar conjugados con un agente biológicamente activo, tal como una proteína o péptido.
- 15 El documento WO 99/45964 describe un conjugado que comprende un agente biológicamente activo y un polímero soluble en agua activado que comprende un armazón polimérico que tiene al menos un extremo unido al armazón polimérico a través de un enlace estable, en el que al menos un extremo comprende un resto ramificado que tiene grupos reactivos proximales unidos al resto ramificado, 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 WO 96/21469, la patente de EE.UU. N° 5.932.462 describe un conjugado formado con una molécula de PEG ramificada que incluye un extremo ramificado que incluye grupos funcionales reactivos. Los grupos reactivos libres
- 20 están disponibles para reaccionar con una especie biológicamente activa, tal como una proteína o péptido, formando conjugados entre el poli(etilenglicol) y la especie biológicamente activa. La patente de EE.UU. N° 5.446.090 describe un ligador de PEG bifuncional y su uso en la formación de conjugados que tienen un péptido en cada uno de los extremos del ligador de PEG.
- 25 Los conjugados que incluyen enlaces de PEG degradables se describen en los documentos WO 99/34833 y WO 99/14259, así como en la patente de EE.UU. N° 6.348.558. Dichos enlaces degradables son aplicables en la presente invención.
- Aunque tanto los derivados de PEG reactivo como los conjugados formados usando los derivados se conocen en la técnica, hasta la presente invención no se ha reconocido que se podía formar un conjugado entre PEG (u otro polímero) y otra especie, tal como un péptido o glicopéptido, a través de un grupo de unión a glicosilo intacto.
- 30 Los expertos en la técnica conocen muchos polímeros solubles en agua y son útiles para poner en práctica la presente invención. El polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en óxidos de polialquileo y polipéptidos, por ejemplo, poli(etilenglicol), péptidos y proteínas. La presente invención puede ponerse en práctica con cualquier polímero soluble en agua, como se ha definido anteriormente, con la única limitación de que el polímero debe incluir un punto en el que pueda unirse el conjugado restante.
- 35 Procedimientos para activación de polímeros también se pueden encontrar en el documento WO 94/17039, en la patente de EE.UU. N° 5.324.844, en los documentos WO 94/18247, WO 94/04193, en la patente de EE.UU. N° 5.219.564, en la patente de EE.UU. N° 5.122.614, en el documento WO 90/13540, en la patente de EE.UU. N° 5.281.698, y más en el documento WO 93/15189, y, para la conjugación entre polímeros y enzimas activados, por ejemplo, el factor de coagulación VIII (documento WO 94/15625), hemoglobina (documento WO 94/09027), la
- 40 molécula transportadora de oxígeno (patente de EE.UU. N° 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese y col., App. Biochem. Biotech. 11: 141-45 (1985)).
- Polímeros solubles en agua preferidos son aquellos en los que una proporción sustancial de las moléculas de polímero en una muestra del polímero tienen aproximadamente el mismo peso molecular; dichos polímeros son "homodispersos".
- 45 La presente invención se ilustra además por referencia a un conjugado de poli(etilenglicol). Se dispone de 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).
- 50 Las moléculas de poli(etilenglicol) adecuadas para usar en la invención incluyen, pero no se limita a, las descritas por la siguiente Fórmula 3:

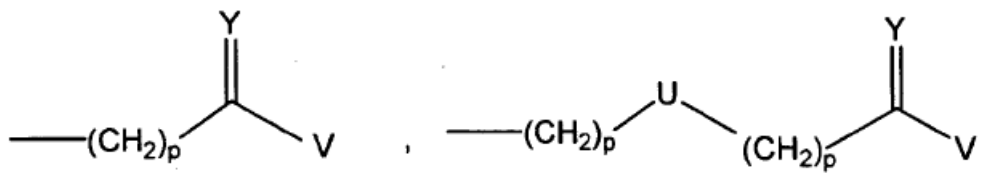
Fórmula 3.



R= H, alquilo, bencilo, arilo, acetal, OHC-, H₂N-CH₂CH₂-, HS-CH₂CH₂-,

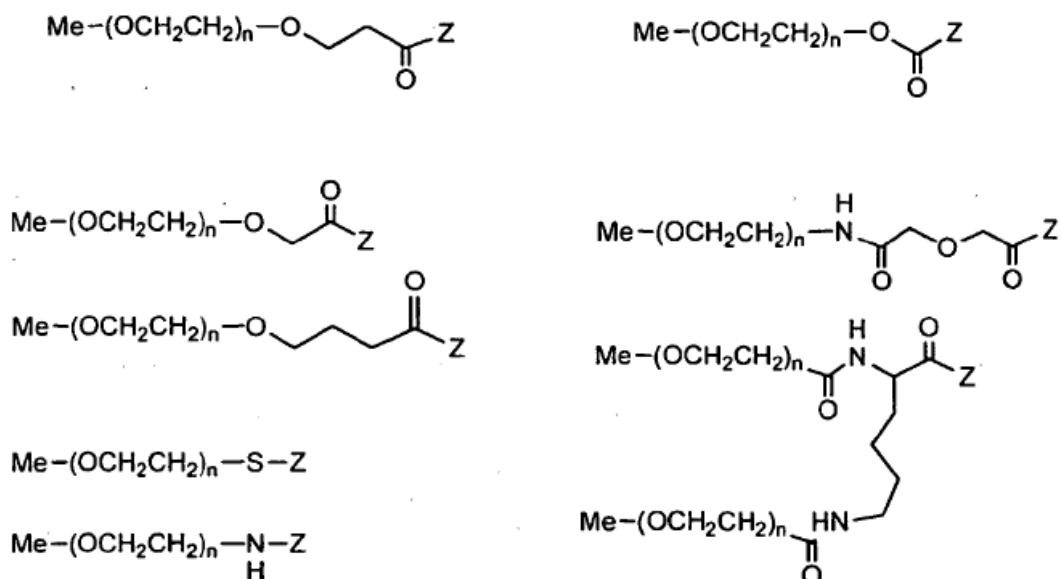


- 5 -azúcar-nucleótido, proteína, metilo, etilo;
X, Y, W, U (seleccionados de forma independiente) = O, S, NH, N-R';
R', R'' (seleccionados de forma independiente) = alquilo, bencilo, arilo, alquilo, arilo, piridilo, arilo sustituido, arilalquilo, acilarilo;
n = 1 a 2.000;
10 m, q, p (seleccionados de forma independiente) = 0 a 20
o = 0 a 20;
Z = HO, NH₂, halógeno, S-R''', ésteres activados,



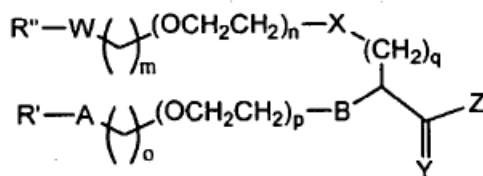
- 15 -azúcar-nucleótido, proteína, imidazol, HOBT, tetrazol, haluro; y
V = HO, NH₂, halógeno, S-R''', ésteres activados, amidas activadas, -azúcar-nucleótido, proteína.

En realizaciones preferidas, la molécula de poli(etilenglicol) se selecciona de las siguientes:

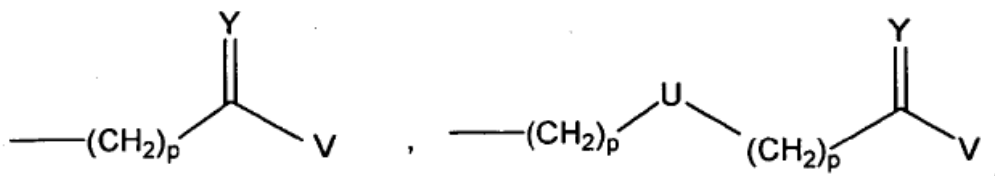


El poli(etilenglicol) útil en la formación del conjugado de la invención es lineal o ramificado. Las moléculas de poli(etilenglicol) adecuadas para usar en la invención incluyen, pero no se limita a, las descritas por la siguiente Fórmula:

Fórmula 4



R', R'', R''' (seleccionados de forma independiente) = H, alquilo, bencilo, arilo, acetal, OHC-, H₂N-CH₂CH₂-, HS-CH₂CH₂-, -(CH₂)_qCY-Z, -azúcar-nucleótido, proteína, metilo, etilo, heteroarilo, acilalquilo, acilarilo, acilalquilarilo; X, Y, W, A, B (seleccionados de forma independiente) = O, S, NH, N-R', (CH₂)₁; n, p (seleccionados de forma independiente) = 1 a 2.000; m, q, o (seleccionados de forma independiente) = 0 a 20; Z = HO, NH₂, halógeno, S-R'', ésteres activados,



-azúcar-nucleótido, proteína;

V = HO, NH₂, halógeno, S-R'', ésteres activados, amidas activadas, -azúcar-nucleótido, proteína.

La semivida *in vivo*, el área debajo de la curva y/o el tiempo de residencia de los péptidos terapéuticos también se pueden potenciar con polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol (PEG) u polipropilenglicol (PPG). Por ejemplo, la modificación química de proteínas con PEG (PEGilación) aumenta su tamaño molecular y disminuye su accesibilidad en superficie y del grupo funcional, cada uno de los cuales dependen del tamaño del PEG unido a la proteína. Esto tiene como resultado una mejora de las semividas en plasma y de la estabilidad proteolítica y una disminución de la inmunogenicidad y la captación hepática (Chaffee y col., J. Clin. Invest. 89: 1643-1651 (1992); Pyatak y col., Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol. 29: 113-127 (1980)). Se ha notificado que la PEGilación de la interleucina-2 aumenta su potencia 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)).

En una realización preferida, la semivida *in vivo* de un péptido derivado de un polímero soluble en agua mediante un procedimiento de la invención ha aumentado con respecto a la semivida *in vivo* del péptido no derivado. En otra realización preferida, el área bajo la curva de un péptido derivado de un polímero soluble en agua usando un procedimiento de la invención ha aumentado con respecto al área bajo la curva del péptido no derivado. En otra realización preferida, el tiempo de residencia de un péptido derivado de un polímero soluble en agua usando un procedimiento de la invención ha aumentado con respecto al tiempo de residencia del péptido no derivado. Las técnicas para determinar la semivida *in vivo*, el área bajo la curva y el tiempo de residencia son bien conocidas en la materia. Descripciones de estas técnicas se pueden encontrar en J.G. Wagner, 1993, Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist, Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster PA.

El incremento de la semivida *in vivo* del péptido se expresa mejor como un intervalo del porcentaje de incremento en esta cantidad. El extremo inferior del intervalo del porcentaje de incremento es de aproximadamente 40 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 100 % o aproximadamente 150 % o aproximadamente 200 %. El extremo superior del intervalo es de aproximadamente 60 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 150 % o más de aproximadamente 250 %.

En una realización ejemplar, la presente invención proporciona una hormona estimuladora del folículo PEGilada (Ejemplos 9 y 10). También se desvela una transferrina PEGilada (Ejemplo 13).

Otros polímeros solubles en agua ejemplares de uso en la invención incluyen, pero no se limita a, poli(óxidos de alquileo), poli(polioloxietilados), poli(alcoholes olefinicos) y poli(acrilomorfolina), dextrano, almidón, poli(aminoácidos) etc.

b) Polímeros insolubles en agua

Los conjugados de la invención pueden incluir también uno o más polímeros insolubles en agua. Esta realización de la invención se ilustra mediante el uso del conjugado como vehículo con el cual liberar un péptido terapéutico de un modo controlado. En la técnica se conocen sistemas de liberación de fármacos poliméricos. Véase, por ejemplo,

5 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 técnica apreciarán que sustancialmente cualquier sistema de liberación de fármacos conocido es aplicable a los conjugados de la presente invención.

Los polímeros insolubles en agua representativos incluyen, pero no se limita a, polifosfazina, alcoholes de polivinilo, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poliacrilamidas, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos

10 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), polióxido de etileno, poli(tereftalato de etileno), poli(acetato de vinilo), cloruro de polivinilo, poliestireno, polivinilpirrolidona, pluronics y polivinilofenol y copolímeros de los mismos.

Los polímeros naturales modificados sintéticamente de uso en conjugados de la invención incluyen, pero no se limita a, alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa y nitrocelulosas. Los miembros particularmente preferidos de las clases amplias de polímeros naturales modificados sintéticamente incluyen, pero

20 no se limita a, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboximetilcelulosa, triacetato de celulosa, sal de sodio de sulfato de celulosa y polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos y ácido alginico.

Estos y los otros polímeros tratados 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 sintetizarse a partir de monómeros obtenidos de estos

25 suministradores usando técnicas estándar.

Los polímeros biodegradables representativos de uso en los conjugados de la invención incluyen, pero no se limita a, poliláctidos, poliglicólidos y copolímeros de los mismos, poli(tereftalato de etileno), ácido poli(butírico), ácido

30 poli(valérico), poli(láctida-cocaprolactona), poli(láctida-coglicólido), polianhídridos, polioctoésteres, mezclas y copolímeros de los mismos. De particular uso son las composiciones que forman geles, como las que incluyen colágeno, pluronics y similares.

Los polímeros de uso en la invención incluyen polímeros "híbridos" que incluyen materiales insolubles en agua que tienen dentro de al menos una porción de su estructura una molécula biorreabsorbible. Un ejemplo de dicho

35 polímero es uno que incluye un copolímero insoluble en agua, que tiene una región biorreabsorbible, una región hidrófila y una pluralidad de grupos funcionales reticulables por cadena polimérica.

Para los fines de la presente invención, "materiales insolubles en agua" incluye materiales que son sustancialmente insolubles en agua o ambientes que contienen agua. Por tanto, aunque ciertas regiones o segmentos del copolímero pueden ser hidrófilas o incluso solubles en agua, la molécula polimérica, como un nodo, no se disuelve en agua en

40 ningún grado sustancial.

Para los fines de la presente invención, la expresión "molécula biorreabsorbible" incluye una región que es capaz de metabolizarse o degradarse y reabsorberse y/o eliminarse por vías de excreción normales del cuerpo. Dichos metabolitos o productos de degradación son, preferentemente, sustancialmente no tóxicos para el cuerpo.

La región biorreabsorbible puede ser hidrófoba o hidrófila, siempre que la composición copolimérica como un todo no se haga soluble en agua. Por tanto, la región biorreabsorbible se selecciona en base a la preferencia de que el

45 polímero, como un todo, permanezca insoluble en agua. En consecuencia, las propiedades relativas, es decir los tipos de grupos funcionales contenidos y las proporciones relativas de la región biorreabsorbible y la región hidrófila se seleccionan para garantizar que las composiciones biorreabsorbibles útiles siguen siendo insolubles en agua.

Polímeros reabsorbibles ejemplares incluyen, por ejemplo, copolímeros de bloque reabsorbibles producidos de forma sintética de poli(ácido α -hidroxi-carboxílico)/poli(alquilenos), (véase Cohn y col., patente de EE.UU. N° 4.826.945). Estos copolímeros no están reticulados y son solubles en agua, de modo que el cuerpo puede excretar las composiciones de copolímeros 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).

50 Polímeros biorreabsorbibles preferidos en el presente documento incluyen uno o más componentes seleccionados de poli(ésteres), poli(hidroxiácidos), poli(lactonas), poli(amidas), poli(éster-amidas), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(fosfazinas), poli(fosfoésteres), poli(tioésteres), polisacáridos y mezclas de los mismos. Todavía más preferentemente, el polímero biorreabsorbible incluye un componente de

55 Polímeros biorreabsorbibles preferidos en el presente documento incluyen uno o más componentes seleccionados de poli(ésteres), poli(hidroxiácidos), poli(lactonas), poli(amidas), poli(éster-amidas), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(fosfazinas), poli(fosfoésteres), poli(tioésteres), polisacáridos y mezclas de los mismos. Todavía más preferentemente, el polímero biorreabsorbible incluye un componente de

poli(hidroxiácido). De los poli(hidroxiácidos) se prefieren ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido policaproico, ácido polibutírico, ácido polivalérico y copolímeros y mezclas de los mismos.

Además de formar fragmentos que se absorben in vivo ("biorreabsorbidos"), los recubrimientos poliméricos preferidos para usar en los procedimientos de la invención también pueden formar un fragmento excretable y/o metabolizable.

En la presente invención también se pueden usar copolímeros de mayor orden. Por ejemplo, Casey y col., patente de EE.UU. N° 4.438.253, concedida 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 usar como suturas monofilamento reabsorbibles. 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.

También se pueden utilizar otros recubrimientos basados en ácidos láctico y/o glicólico. Por ejemplo, Spinu, patente de EE.UU. N° 5.202.413, concedida el 13 de abril de 1993, divulga copolímeros de multi-bloque biodegradables que tienen bloques ordenados secuencialmente de poliláctida y/o poliglicólido producidos mediante polimerización con apertura de anillo de láctida y/o glicólido sobre un diol oligomérico o un residuo de diamina, seguido de la extensión de la cadena con un compuesto difuncional, tal como un diisocianato, diacilcloruro o diclorosilano.

Las regiones biorreabsorbibles de los recubrimientos útiles en la presente invención se pueden denominar hidrolíticamente y/o enzimáticamente escindibles. Para los fines de la presente invención, "hidrolíticamente escindible" hace referencia a la susceptibilidad del copolímero, especialmente de las regiones biorreabsorbibles, a la hidrólisis en agua o a un ambiente que contiene agua. De un modo similar, "enzimáticamente escindible" como se usa en el presente documento hace referencia a la susceptibilidad del copolímero, especialmente de la región biorreabsorbible, a ser escindida por enzimas endógenas o exógenas.

Cuando se introducen en el cuerpo, la región hidrofílica se puede procesar en fragmentos excretables y/o metabolizables. Por tanto, la región hidrofílica puede incluir, por ejemplo, poliéteres, óxidos de polialquileo, polioles, poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(alquiloxazolinás), polisacáridos, carbohidratos, péptidos, proteínas y copolímeros y mezclas de los mismos. Además, la región hidrofílica puede ser también, por ejemplo, un óxido de poli(alquileo). Dichos óxidos de poli(alquileo) 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 de absorber cantidades relativamente grandes de agua. Los ejemplos de compuestos formadores de hidrogeles incluyen, pero no se limita a, ácidos poliacrílicos, carboximetilcelulosa sódica, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, gelatina, carragenina y otros polisacáridos, ácido hidroxietilmetacrílico (HEMA), así como derivados de los mismos y similares. Se pueden producir hidrogeles estables, biodegradables y biorreabsorbibles. Además, las composiciones de hidrogeles pueden incluir subunidades que exhiban una o más de estas propiedades.

Se conocen composiciones de hidrogeles biocompatibles cuya integridad se puede controlar mediante reticulación y actualmente se prefieren para usar en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, Hubbell y col., patentes de EE.UU. N° 5.410.016, concedida el 25 de abril de 1995 y 5.529.914, concedida el 25 de junio de 1996, divulgan sistemas solubles en agua que son copolímeros de bloque reticulados que tienen un segmento de bloque central soluble en agua en medio de dos extensiones hidrolíticamente lábiles. Dichos copolímeros se protegen en sus extremos adicionalmente con funcionalidades de acrilato fotopolimerizables. Cuando se reticulan, 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 forma de realización preferida, el gel es un gel termorreversible. Actualmente se prefieren geles termorreversibles que incluyen componentes, tales como pluronics, colágeno, gelatina, ácido hialurónico, polisacáridos, hidrogel de poliuretano, hidrogel de poliuretano-urea y combinaciones de los mismos.

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 para los expertos en la técnica, por ejemplo como se describe en Eppstein y col., patente de EE.UU. N° 4.522,811, concedida el 11 de junio de 1985. Por ejemplo, se pueden preparar formulaciones en liposomas disolviendo lípido(s) adecuados, (tales como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, aracadoil fosfatidil colina y colesterol) en un disolvente inorgánico que después se evapora, dejando tras de sí una película fina de lípido seco sobre la superficie del envase. Después, en el envase se introduce una solución acuosa del compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable. Después, el envase se agita a mano para liberar el material lipídico de los laterales del envase y para dispersar los agregados lipídicos, de modo que se forma la suspensión liposómica.

Las micropartículas citadas anteriormente y los procedimientos de preparar las micropartículas se ofrecen a modo de ejemplo y no se pretende que definan el alcance de las micropartículas de uso en la presente invención. Será

evidente para los expertos en la técnica que en la presente invención se puede usar una matriz de nanopartículas.

c) Biomoléculas

En otra forma de realización preferida, el azúcar modificado es portador de una biomolécula. En realizaciones adicionales preferidas, la biomolécula es una proteína funcional, enzima, antígeno, anticuerpo, péptido, ácido nucleico (p. ej., nucleótidos sencillos o nucleósidos, oligonucleótidos, polinucleótidos u ácidos nucleicos de una o más cadenas), lectina, receptor o una combinación de los mismos.

Algunas biomoléculas preferidas son, esencialmente, no fluorescentes o emiten una cantidad tan mínima de fluorescencia que son inadecuados para usar como marcadores fluorescentes en un ensayo. Otras biomoléculas pueden ser fluorescentes. El uso de un azúcar de otro modo natural que está modificado por la unión covalente de otra entidad (p. ej., PEG, biomolécula, resto terapéutico, resto diagnóstico etc.) es adecuado. En una realización ejemplar, un resto de azúcar, que es una biomolécula, se conjuga con una rama ligadora y el casete ligador-azúcar se conjuga después con un péptido a través de un procedimiento de la invención.

Las biomoléculas útiles en la práctica de la presente invención pueden derivar de cualquier fuente. Las biomoléculas se pueden aislar de fuentes naturales o se pueden producir mediante procedimientos sintéticos. Los péptidos pueden ser péptidos naturales o péptidos mutados. Las mutaciones se pueden efectuar mediante mutagénesis química, mutagénesis dirigida a sitio u otros medios de inducir mutaciones conocidas para los expertos en la técnica. Los péptidos útiles en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, enzimas, antígenos, anticuerpos y receptores. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, bien intactos o fragmentos. Los péptidos son, opcionalmente, los productos de un programa de evolución dirigida.

Los péptidos y ácidos nucleicos tanto naturales como sintéticos son de utilidad en la presente invención, estas moléculas se pueden unir a un componente residuo de azúcar o a un agente de reticulación por cualquier grupo reactivo disponible. Por ejemplo, los péptidos se pueden unir a través de un grupo amina, carboxilo, sulfhidrilo o hidroxilo reactivo. El grupo reactivo puede residir en un extremo del péptido o en un sitio interno de la cadena peptídica. Los ácidos nucleicos se pueden unir a través de un grupo reactivo sobre una base (p. ej., amina exocíclica= o un grupo hidroxilo disponible sobre un resto de azúcar (p-ej., 3' o 5'-hidroxilo). Las cadenas peptídicas o de ácidos nucleicos se pueden derivar además en uno o más sitios para permitir la unión de grupos reactivos adecuados a la cadena. Véase Chrisey y col. *Nucleic Acids Res.* 24: 3031-3039 (1996).

En una realización preferida adicional, la biomolécula se selecciona para dirigir el péptido modificado mediante los procedimientos de la invención a un tejido específico, de modo que se potencia la liberación del péptido en ese tejido respecto a la cantidad de péptido no derivado que se libera en el tejido. En una realización más preferida adicional, la cantidad del péptido derivado liberado en un tejido específico en un periodo de tiempo seleccionado se potencia mediante derivación en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 40 % y más preferentemente al menos aproximadamente un 100 %. Actualmente, las biomoléculas preferidas para aplicaciones dirigidas incluyen anticuerpos, hormonas y ligandos para receptores de superficie celular.

En una forma de realización preferida en el presente documento, el grupo modificador es una proteína. En una realización ejemplar, la proteína es un interferón. Los interferones son glicoproteínas antivirales que, en seres humanos, son secretados por fibroblastos primarios humanos tras la inducción con virus o con ARN bicatenario. Los interferones son de interés como agentes terapéuticos, por ejemplo, antivirales y tratamiento de la esclerosis múltiple. Para referencias sobre 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(Suppl 1):S61-S65 (1989); Kagawa, y col., *J. Biol. Chem.*, 263(33):17508-17515 (1988); Hershenson, y col., U.S. Patent No. 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); and Adolf, y col., *J. Interferon Res.*, 10:255-267 (1990). Para referencias relevantes al interferón- α , véase, Asano, y col., *Eur. J. Cancer*, 27(Suppl 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).

En un conjugado de interferón ejemplar, el interferón β está conjugado con un segundo péptido a través de una rama ligadora. La rama ligadora incluye un grupo de unión al glicosilo intacto a través del cual se une al segundo péptido mediante un procedimiento de la invención. La rama ligadora incluye también opcionalmente un grupo de unión al glicosilo intacto a través del cual se une al interferón.

La invención proporciona un conjugado de la hormona estimuladora del folículo (FSH). La FSH es una hormona glicoproteica. Véase, por ejemplo, Saneyoshi, y col. *Biol. Reprod.*, 65:1686-1690 (2001); Hakola, y col., *J. Endocrinol.*, 158:441-448 (1998); Stanton, y col., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 125:133-141 (1996); Walton, y col., *J. Clin.*

Endocrinol. Metab., 86(8):3675-3685 (08/2001); Ulloa-Aguirre, y col., Endocrine, 11(3):205-215 (12/1999); Castro-Fernández, y col., J. Clin. Endocrinol. Metab., 85(12):4603-4610 (2000); Prevost, Rebecca R., Pharmacotherapy, 18(5): 1001-1010 (1998); Linskens, y col., The FASEB Journal, 13:639-645 (04/1999); Butnev, y col., Biol. Reprod., 58:458-469 (1998); Muyan, y col., Mol. Endo., 12(5):766-772 (1998); Min, y col., Endo. J., 43(5):585-593 (1996); Boime, y col., Recent Progress in Hormone Research, 34:271-289 (1999); y Rafferty, y col., J. Endo., 145:527-533 (1995). El conjugado de FSH se puede formar de un modo similar al descrito para el interferón.

También se desvela un conjugado, en el que el conjugado incluye eritropoyetina (EPO). Se sabe que la EPO participa en la respuesta a la hipoxia para estimular la producción de glóbulos rojos. Para las referencias pertinentes, véase Cerami y col., Seminars in Oncology, 28(2)(Suppl 8):66-70 (04/2001). Un conjugado de EPO ejemplar se forma de un modo análogo al conjugado del interferón.

También se desvela un conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano. El G-CSF es una glicoproteína que estimula la proliferación, diferenciación y activación de las células progenitoras neutropoyéticas en neutrófilos funcionalmente maduros. Se sabe que el G-CSF inyectado se elimina rápidamente del cuerpo. 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 Böning, y col., Bone Marrow Transplantation, 28:259-264 (2001). Un conjugado ejemplar del G-CSF se prepara como se ha tratado anteriormente para el conjugado de los interferones. Un experto en la técnica apreciará que muchas otras proteínas se pueden conjugar al interferón usando los procedimientos y composiciones de la invención, incluidos, pero sin limitación, los péptidos indicados en la Tabla 6 (que se presentan en otros lugares del presente documento) y la Figura 1, y en las Figuras 27-51, en las que se presentan esquemas de modificación individuales.

En una realización ejemplar adicional, se proporciona un conjugado con biotina. Por tanto, por ejemplo, un péptido biotinilado de forma selectiva se elabora mediante la unión de un resto avidina o estreptavidina portador de uno o más grupos modificadores.

En una realización preferida adicional, la biomolécula se selecciona para dirigir el péptido modificado mediante los procedimientos de la invención a un compartimento intracelular específico, de modo que se potencia la liberación del péptido en dicho compartimento intracelular respecto a la cantidad de péptido no derivado que se libera en el tejido. En una realización preferida adicional más, la cantidad del péptido derivado liberado en compartimento intracelular específico en un periodo de tiempo seleccionado se potencia mediante derivación en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 40 % y más preferentemente al menos aproximadamente un 100 %. En otra realización particularmente preferida, la biomolécula está unida al péptido mediante un ligador escindible que se puede hidrolizar una vez internalizado. Actualmente, las biomoléculas preferidas para aplicaciones dirigidas intracelulares incluyen transferrina, lactotransferrina (lactoferrina), melanotransferrina (p97), ceruloplasmina y transportador de cationes divalentes. Los enlaces contemplados incluyen, pero no se limita a, proteína-azúcar-ligador-azúcar-proteína, proteína-azúcar-ligador-proteína y formas multivalentes de los mismos, y proteína-azúcar-ligador-fármaco, en la que el fármaco incluye moléculas pequeñas, péptidos, lípidos, entre otros.

La liberación específica de sitio y orientada a la diana de agentes terapéuticos es deseable con el fin de tratar una amplia variedad de enfermedades humanas, tales como diferentes tipos de neoplasias malignas y ciertos trastornos neurológicos. Dichos procedimientos se acompañan de menos efectos secundarios y una eficacia mayor del fármaco. Varios principios dependen del diseño de estos sistemas de liberación. Para una revisión, véase Garnett, Advanced Drug Delivery Reviews, 53:171-216, 2001).

Una consideración importante a la hora de diseñar un sistema de liberación de fármaco a tejidos diana específicamente. El descubrimiento de los antígenos de superficie tumoral ha hecho posible desarrollar abordajes terapéuticos en los que se apunta específicamente a las células tumorales que muestran antígenos de superficie definible y las mata. Existen tres clases principales de anticuerpos monoclonales terapéuticos (MAb) que han mostrado eficacia en ensayos clínicos humanos en el tratamiento de neoplasias malignas. (1) MAb sin conjugar, que induce directamente la inhibición del crecimiento y/o apoptosis o activa indirectamente los mecanismos de defensa del huésped para que actúe la citotoxicidad antitumoral; (2) MAb conjugado con fármaco que libera preferentemente una potente toxina citotóxica en las células tumorales y, por tanto, minimiza la citotoxicidad sistémica asociada habitualmente con quimioterapia convencional y (3) MAb conjugado con radioisótopos, que libera una dosis esterilizante de radiación en el tumor. Véase, la revisión de Reff y col., Cancer Control 9:152-166 (2002).

Con el fin de dar a los Mab el poder de matar células malignas, los Mab pueden conectarse con a una toxina que puede obtenerse de una planta, bacteria u hongo, para formar proteínas quiméricas denominadas inmunotoxinas. Las toxinas vegetales de uso habitual se dividen en dos clases: (1) holotoxinas (o proteínas de inactivación del ribosoma de clase II), tales como ricina, abrina, lectinas de muérdago y modeccina, y (2) hemotoxinas (proteínas de inactivación del ribosoma de clase I), tales como la proteína antiviral de la hierba camín, saporina, briodina 1, bouganina y gelonina. Las toxinas bacterianas de uso habitual incluyen la toxina diftérica (DT) y la exotoxina de pseudomonas (PE). Kreitman, Current Pharmaceutical Biotechnology 2:313-325 (2001).

Las inmunotoxinas convencionales contienen un Mab conjugado químicamente a una toxina que está mutada o modificada químicamente para minimizar la unión a las células normales. Ejemplos incluyen anti-ricina bloqueada en B4, que está dirigido al CD5, y la RFB2-cadena A de ricina desglicosilada, que está dirigida al CD22. Las inmunotoxinas recombinantes desarrolladas más recientemente son proteínas quiméricas que consisten en la región variable de un anticuerpo dirigido contra un antígeno tumoral condensado con una toxina proteica usando tecnología de ADN recombinante. Con frecuencia, la toxina también está modificada genéticamente para eliminar los sitios de unión al tejido normal pero manteniendo su citotoxicidad. Un gran número de antígenos de diferenciación, receptores sobreexpresados o antígenos específicos del cáncer como dianas para las inmunotoxinas, por ejemplo CD19, CD22, CD20, el receptor de la IL-2 (CD25), CD33, el receptor de la IL-4, el receptor del EGF y sus mutantes, ErbB2, carbohidrato de Lewis, mesotelina, el receptor de la transferrina, el receptor del GM-CSF, Ras, Bcr-Abl y c-Kit, para el tratamiento de varias neoplasias malignas, incluidas cánceres hematopoyéticos, glioma y cánceres de mama, de colon, de ovarios, de vejiga urinaria y gastrointestinal. Véase, por ejemplo, Brinkmann y col., Expert Opin. Biol. Ther. 1:693-702 (2001); Perentesis and Sievers, Hematology/Oncology Clinics of North America 15:677-701 (2001).

Los Mab conjugados con radioisótopos se usan como otro medio de tratar las neoplasias malignas humanas, en particular las neoplasias malignas hematopoyéticas, con un nivel elevado de especificidad y eficacia. Los isótopos más usados para tratamientos son los emisores de alta energía, tales como ^{131}I y ^{90}Y . Recientemente, el Mab humanizado anti-CD33 marcado con ^{213}Bi también se ha analizado en ensayos clínicos con humanos en fase I. Reff y col., ant.

Se han usado numerosos Mab para fines terapéuticos. Por ejemplo, el uso de rituximab (RituxanTM), un Mab anti-cd20 quimérico recombinante, para tratar ciertas neoplasias malignas hematopoyéticas fue autorizado por la FDA en 1997. Otros MAb aprobados desde entonces para usos terapéuticos en el tratamiento de cánceres humanos incluyen: alemtuzumab (Campath-1HTM), un anticuerpo de rata humanizado contra CD52; y gemtuzumab ozogamicina (MylotargTM), un Mab anti-CD33 de ratón humanizado conjugado con caliqueamicina. Asimismo, actualmente la FDA está examinando la seguridad y eficacia de varios otros Mab para los fines de liberación específica de sitio de agentes citotóxicos o radiación, por ejemplo ZevalinTM radiomarcada y BexxarTM. Reff y col., ant.

Una segunda consideración importante en el diseño de un sistema de liberación de fármacos es la accesibilidad de un tejido diana a un agente terapéutico. Esto es un tema de preocupación en el caso del tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso central (SNC), en la que la barrera hematoencefálica impide la difusión de macromoléculas. Se han desarrollado varios abordajes para sortear la barrera hematoencefálica para liberar de forma eficaz agentes terapéuticos en el SNC.

La comprensión del mecanismo de transporte de hierro desde el plasma al cerebro proporciona una útil herramienta para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). El hierro, transportado en el plasma por la transferrina, es un componente esencial de casi todos los tipos de células. El cerebro necesita hierro para los procesos metabólicos y recibe hierro a través de los receptores de la transferrina localizados en las células endoteliales capilares del cerebro a través de transcitosis y endocitosis mediadas por el receptor. Moos y Morgan, Cellular and Molecular Neurobiology 20:77-95 (2000). Se han establecido sistemas de liberación en base a la interacción transferrina-receptor de transferrina para la liberación eficiente de péptidos, proteínas y liposomas en el cerebro. Por ejemplo, los péptidos se pueden acoplar a un Mab dirigido contra el receptor de transferrina para conseguir una mayor captación por el cerebro, Moos y Morgan, ant. De un modo similar, cuando se acoplan a un Mab dirigido contra el receptor de transferrina, se potencia el transporte del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a través de la barrera hematoencefálica. Song y col., The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 301:605-610 (2002); Wu y co., Journal of Drug Targeting 10:239-245 (2002). Además, se ha comunicado un sistema de liberación liposómico para el transporte eficaz del fármaco quimioterapéutico, doxorubicina, en el glioma C6, en el que la transferrina estaba unida a los extremos distantes de las cadenas de PEG liposómico. Eavarone y col., J. Biomed. Mater. Res. 51:10-14 (2000). Una serie de patentes de EE.UU. también están relacionadas con procedimientos de liberación que sortean la barrera hematoencefálica en base a la interacción transferrina-receptor de transferrina. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5,154,924; 5,182,107; 5,527,527; 5,833,988; 6,015,555.

Existen otras parejas de conjugación adecuadas para un agente farmacéutico para sortear la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5,672,683, 5,977,307 y el documento WO 95/02421 se refieren a un procedimiento de liberar un agente neurofarmacéutico a través de la barrera hematoencefálica, en el que el agente se administra en forma de una proteína de fusión con un ligando que es reactivo con un receptor de células endoteliales capilares cerebrales; el documento WO 99/00150 describe un sistema de liberación de fármacos en el que el transporte de un fármaco a través de la barrera hematoencefálica se facilita mediante conjugación con un Mab dirigido contra el receptor humano de la insulina; el documento WO 89/10134 describe un péptido quimérico que incluye un péptido capaz de atravesar la barrera hematoencefálica a una velocidad relativamente alta y un neuropéptido hidrófilo incapaz de transcitosis, como medio de introducir neuropéptidos hidrófilos en el cerebro; el documento WO 01/60411 A1 proporciona una composición farmacéutica que puede transportar fácilmente un ingrediente farmacéuticamente activo en el cerebro. El ingrediente activo se une a una proteína específica de hibernación que se usa como conjugado y se administra con una hormona tiroidea o una sustancia que estimula la producción de hormona tiroidea. Además, se ha explorado una vía alternativa de liberación de fármaco para atravesar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, se ha demostrado que la liberación

intranasal de agentes terapéuticos sin la necesidad de conjugar es un prometedor procedimiento de liberación alternativo (Frey, 2002, *Drug Delivery Technology*, 2(5):46-49).

Además de facilitar el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica, la interacción transferrina-receptor de transferrina también es útil para dirigir específicamente a determinadas células tumorales, ya que muchas células tumorales sobreexpresan el receptor de la transferrina sobre su superficie. Esta estrategia se ha usado para liberar macromoléculas bioactivas en células K562 a través de un conjugado con transferrina (et al., *The Journal of Biological Chemistry* 266:4309-4314 (1991)), y para liberar insulina en células Caco-2 de tipo enterocito a través de un conjugado con transferrina (Shah y Shen, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85: 1306-1311 (1996)).

Además, a medida que se sabe más sobre las funciones de varias proteínas transportadoras de hierro, como el receptor de la lactotransferrina, melanotransferrina, ceruloplasmina y el transportador de cationes divalentes y su patrón de expresión, se ha encontrado que algunas de las proteínas implicadas en el mecanismo del transporte del hierro (p. ej., melanotransferrina) o sus fragmentos tienen una eficacia similar en lo que respecta a la ayuda al transporte de agentes terapéuticos a través de la barrera hematoencefálica o para llegar a tejidos específicos (documentos WO 02/13843 A2, WO 02/13873 A2). Para una revisión sobre el uso de la transferrina y proteínas relacionadas implicadas en la captación de hierro como conjugados en la liberación de fármacos, véase Li y Qian, *Medical Research Reviews* 22:225-250 (2002).

El concepto de liberación específica de tejido de agentes terapéuticos va más allá de la interacción entre la transferrina y el receptor de la transferrina o sus proteínas relacionadas. Por ejemplo, se ha descrito un sistema de liberación específico en el hueso en el que las proteínas se conjugan con un aminobisfosfonato que busca el hueso para mejorar la liberación de proteínas a tejido mineralizado. Uludag y Yang, *Biotechnol. Prog.* 18:604-611 (2002). Para una revisión sobre este tema, véase Vyas y col., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System* 18:1-76 (2001).

Se pueden usar varios ligadores en el proceso de generar bioconjugados con el fin de liberar específicamente agentes terapéuticos. Ligadores adecuados incluyen reactivos de reticulación homo y heterobifuncionales, que pueden ser escindibles mediante, por ejemplo, disociación catalizada por ácido, o no ser escindibles (véase, por ejemplo, Srinivasachar and Neville, *Biochemistry* 28: 2501-2509 (1989); Wellhoner y col., *The Journal of Biological Chemistry* 266:4309-4314 (1991)). La interacción entre muchos patrones de unión conocidos, tales como biotina y avidina/estreptavidina, también se puede usar como medio para unir un agente terapéutico y una pareja de conjugado que garantiza la liberación específica y eficaz del agente terapéutico. Usando los procedimientos de la invención, las proteínas se pueden usar para liberar moléculas en compartimentos intracelulares como conjugados. Para el direccionamiento intracelular de compuestos terapéuticos conjugados se pueden usar proteínas, péptidos, hormonas, citoquinas, moléculas pequeñas o similares que se unen a receptores de superficie celular específicos que se internalizan tras la unión del ligando. Normalmente, el complejo receptor-ligando se internaliza en vesículas intracelulares que se liberan en compartimentos celulares específicos, incluidos, pero sin limitación, el núcleo, las mitocondrias, el aparato de Golgi, el RE, los lisosomas y los endosomas, en función de la localización intracelular a la que está dirigida el receptor. Conjugando el ligando del receptor con la molécula deseada, el fármaco será transportado por el complejo receptor-ligando y liberado en los compartimentos intracelulares a los que normalmente está dirigido el receptor. Por tanto, el fármaco puede liberarse en una localización intracelular específica de la célula en la que es necesaria tratar una enfermedad.

Se pueden usar muchas proteínas para dirigir agentes terapéuticos a tejidos y órganos específicos. Estas proteínas incluyen, pero no se limita a, factores de crecimiento (EPO, HGH, EGF, factor de crecimiento neural, FGF, entre otros), citoquinas (GM-CSF, G-CSF, la familia de los interferones, interleucinas, entre otros), hormonas (FSH, LH, las familias de esteroides, estrógenos, corticosteroides, insulina, entre otros), proteínas séricas (albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, proteínas séricas humanas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos) y vitaminas (folato, vitamina C, vitamina A, entre otros). Se dispone de agentes de direccionamiento que son específicos de receptores de la mayoría de los tipos celulares.

Configuraciones de enlaces contempladas incluyen, entre otras, proteína-azúcar-ligador-azúcar-proteína, proteína-azúcar-ligador-proteína y formas multivalentes de la misma, proteína-azúcar-ligador-proteína y formas multivalentes de la misma, proteína-azúcar-ligador-agente terapéutico en la que el agente terapéutico incluye, pero no se limita a, moléculas pequeñas, péptidos y lípidos. En algunas realizaciones se usa un ligador hidrolizable que se puede hidrolizar una vez internalizado. Se puede usar un ligador lábil a ácidos para aprovechar cuando el conjugado proteico se internaliza en los endosomas o lisosomas que tienen un pH ácido. Una vez internalizado en el endosoma o el lisosoma, el ligador se hidroliza y el agente terapéutico se libera del agente de direccionamiento.

En una realización ejemplar, la transferrina se conjuga a través de un ligador con una enzima deseada para dirigirla a una célula que presente receptores de transferrina en un paciente. El paciente podría, por ejemplo, requerir tratamiento de sustitución enzimático para dicha enzima concreta. En realizaciones particularmente preferidas, la enzima es una de la que carece un paciente con una enfermedad del almacenamiento lisosómico (véase la Tabla 4). Una vez en la circulación, el conjugado transferrina-enzima se une a los receptores de transferrina y se internaliza en los endosomas precoces (Xing y col., 1998, *Biochem. J.* 336:667; Liy col., 2002, *Trends in Pharmacol. Sci.* 23:206; Suhaila y col., 1998, *J. Biol. Chem.* 273:14355). Otros agentes de direccionamiento contemplados relacionados con

la transferrina incluyen, pero no se limita a, lactotransferrina (lactoferrina), melanotransferrina (p97), ceruloplasmina y transportador de cationes divalentes.

- 5 En otra realización ejemplar, los conjugados transferrina-distrofina entrarían en los endosomas mediante la vía de la transferrina. Una vez allí, la distrofina se libera debido a un ligador hidrolizable que después se puede pasar al compartimento intracelular cuando sea necesario. Esta realización se puede usar para tratar a un paciente con distrofia muscular suplementando un gen de distrofina defectuoso genéticamente y/o su proteína con el péptido distrofina funcional conectado a la transferrina.

E. Restos terapéuticos

- 10 En otra realización preferida, el azúcar modificado incluye un resto terapéutico. Los expertos en la técnica apreciarán que existe un solapamiento entre la categoría de restos terapéuticos y biomoléculas; muchas biomoléculas tienen propiedades o potencial terapéuticos.

- 15 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 están en investigación. Los restos terapéuticos pueden tener una acción demostrada en un estado de enfermedad dado o puede que exista la hipótesis de que muestran una acción deseable en un estado de enfermedad dado. En una realización preferida, los restos terapéuticos son compuestos que se están sometiendo a detección selectiva según su capacidad para interactuar con un tejido de elección. Los restos terapéuticos, que son útiles en la práctica de la presente invención, incluyen fármacos de un amplio abanico de clases farmacológicas que tienen diversas actividades farmacológicas. En algunas realizaciones se prefiere usar restos terapéuticos que no son azúcares. Una excepción a esta preferencia es el uso de un azúcar de otro modo natural que está modificado por la unión covalente de otra entidad, tal como un PEG, una biomolécula, un resto terapéutico, un resto diagnóstico y similar. En otra realización ejemplar, un resto de azúcar terapéutico se conjuga con una rama ligadora y el casete de la rama ligadora-azúcar se conjuga después con un péptido a través de un procedimiento de la invención.

- 25 Procedimientos para conjugar agentes terapéuticos y diagnósticos con otras varias especies son bien conocidos para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; and Dunn y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991.

- 30 En una realización ejemplar, el resto terapéutico está unido al azúcar modificado mediante un enlace que se rompe en determinadas condiciones. Ejemplos de condiciones incluyen, pero no se limita a, un pH (p. ej. del estómago, el intestino, las vacuolas de endocitosis) seleccionado, la presencia de una enzima activa (p. ej., esterasa, proteasa, reductasa, oxidasas), luz, calor y similar. 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).

- 35 Clases de restos terapéuticos útiles incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los AINE pueden seleccionarse de, por ejemplo, las siguientes categorías: (p. ej., derivados de ácido propiónico, derivados de ácido acético, derivados de ácido dinámico, derivados de ácido bifenilcarboxílico y oxicams); fármacos antiinflamatorios esteroideos que incluyen hidrocortisona y similar; adyuvantes; fármacos antihistamínicos (p. ej., clorfeniramina, triprolidina); fármacos antitusivos (p. ej., dextrometorfano, codeína, caramifeno y carbetapentano); fármacos antiprurícticos (p. ej., metildiazina y trimeprazina); fármacos anticolinérgicos (p. ej., escopolamina, atropina, homatropina, levodopa); fármacos antieméticos y antináuseas (p. ej., ciclizina, meclizina, clorpromazina, buclizina); fármacos anoréxicos (p. ej., benzfetamina, fenetermina, clorfenetermina, fenfluramina); fármacos estimulantes del sistema nervioso central (p. ej., anfetamina, metanfetamina, dextroanfetamina y metilfenidato); fármacos antiarrítmicos (p. ej., propanolol, procainamida, disopiramida, quinidina, encainida); fármacos bloqueantes β-adrenérgicos (p. ej., metoprolol, acebutolol, betaxolol, labetalol y timolol); fármacos cardiotónicos (p. ej., milrinona, amrinona y dobutamina); fármacos antihipertensores (p. ej., enalapril, clonidina, hidralazina, minoxidilo, guanadrel, guanetidina); fármacos diuréticos (p. ej., amilorida e hidroclorotiazida); fármacos vasodilatadores (p. ej., diltiazem, amiodarona, isoxsuprina, nilidrina, tolazolina y verapamilo); fármacos vasoconstrictores (p. ej., dihidroergotamina, ergotamina y metilsergida); fármacos antiulcerosos (p. ej., ranitidina y cimetidina); fármacos anestésicos (p. ej., lidocaína, bupivacaína, clorprocaína, dibucaína); fármacos antidepresivos (p. ej., imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina); fármacos tranquilizantes y sedantes (p. ej., clordiazepóxido, benaciticina, benzquinamida, flurazepam, hidroxizina, loxapina y promazina); fármacos antispécóticos (p. ej., clorprotixeno, flufenazina, haloperidol, molindona, tioridazina y trifluoperazina); fármacos antimicrobianos (antibacterianos, antifúngicos, antiprotos y antivirales).

- 55 Clases de restos terapéuticos útiles incluyen adyuvantes. Los adyuvantes pueden seleccionarse por ejemplo de conjugados de hemocianina de lapa californiana, lipopéptido derivado de micoplasma MALP-2, monofosforilo lípido A, subunidad B de la toxina del cólera, toxina termolábil de Escherichia coli, epítipo universal de linfocitos T colaboradores del toxoide del tétanos, interleucina-12, oligodesoxinucleótidos CpG, bromuro de dimetildioctadecilamonio, ciclodextrina, escualeno, sales de aluminio, vesículas de membrana externa del

meningococo (VME), montanida ISA, TiterMax™ (disponible en Sigma, St. Louis MO), absorción de nitrocelulosa, complejos estimulantes inmunitarios tales como Quil A, Gerbu™ adyuvante (Gerbu Biotechnik, Kirchwald, Germany), treonil muramil dipéptido, limosina alfa, bupivacaína, GM-CSF, adyuvante incompleto de Freund, MTP-PE/MF59 (Ciba/Geigy, Basilea, Suiza), polifosfazeno, saponina derivada del árbol Quillaja saponaria, y formulación adyuvante de Syntex (Biocine, Emeryville, CA), entre otros bien conocidos en la técnica.

Los fármacos antimicrobianos que se prefieren para incorporar en la presente composición incluyen, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de fármacos β -lactámicos, fármacos quinolonas, ciprofloxacino, norfloxacino, tetraciclina, eritromicina, amikacina, triclosan, doxiciclina, capreomicina, clorhexidina, clortetraciclina, oxitetraciclina, clindamicin, etambutol, hexamidina isotionato, metronidazol, pentamidina, gentamicina, kanamicina, linaomicina, metaciclina, metenamina, minociclina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomycin, tobramicina, miconazol y amantadina.

Otros restos farmacológicos de uso en la práctica de la presente invención incluyen fármacos antineoplásicos (p. ej., antiandrógenos (p.ej., leuprolida o flutamida), agentes citocidas (p. ej., adriamicina, doxorubicina, taxol, ciclofosfamida, busulfan, cisplatino, β -2-interferón) anti-estrógenos (p. ej., tamoxifeno), antimetabolitos (p. ej., fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina). También incluidos en esta clase están los agentes basados en radioisótopos para diagnóstico y tratamiento, y toxinas conjugadas tales como ricina, geldanamycin, mitansina, CC-1065, C-1027, las duocarmicinas, caliqueamicina y estructuras relacionadas y análogos de los mismos.

El resto terapéutico también puede ser una hormona (p. ej., medroxiprogesterona, estradiol, leuprolida, megestrol, octreotida o somatostatina); fármacos relajantes musculares (p. ej., cinnamedrina, ciclobenzaprina, flavoxato, orfenadrina, papaverina, mebeverina, idaverina, ritodrina, difenoxilato, dantroleno y azumolen); fármacos antiespasmódicos; fármacos activos en hueso (p. ej., difosfonato y fosfonoalquilfosfinato fármacos compuestos); fármacos moduladores endocrinos (p. ej., anticonceptivos (p. ej., etinodiol, etinilestradiol, noretindrona, mestranol, desogestrel, medroxiprogesterona), moduladores de la diabetes (p. ej., gliburida o clorpropamida), anabólicos tales como testolactona o estanozolol, pirógenos (p. ej., metiltestosterona, testosterona o fluoximesterona), antiidiuréticos (p. ej., desmopresina) y calcitoninas).

También de uso en la presente invención son los estrógenos (p. ej., dietilestilbesterol), glucocorticoides (p. ej., triamcinolona, betametasona, etc.) y progesteronas, tales como noretindrona, etinodiol, noretindrona, levonorgestrel; agentes tiroideos (p. ej., liotironina o levotiroxina) o agentes anti-tiroideos (p. ej., metimazol); también se pueden usar fármacos antihiperprolactinémicos (p. ej., cabergolina); supresores hormonales (p. ej., danazol o goserelina), oxióticos (p. ej., metilergonovina u oxitocina) y prostaglinas tales como mioprostol, alprostadil o dinoprostona.

Otros grupos modificadores útiles incluyen fármacos inmunomoduladores (p. ej. antihistamínicos, estabilizantes de los mastocitos, tales como lodoxamida y/o cromolin, esteroides (p. ej., triamcinolona, beclometazona, cortisona, dexametazona, prednisolona, metilprednisolona, beclometazona, o clobetasol), antagonistas de la histamina H_2 (p. ej., famotidina, cimetidina, ranitidina), inmunosupresores (p.ej., azatioprina, ciclosporina), etc. También sin útiles los grupos con actividad antiinflamatoria tales sulindac, etodolac, ketoprofeno y ketorolac. Otros fármacos de uso junto con la presente invención serán evidentes para el experto en la técnica.

F. Preparación de azúcares modificados

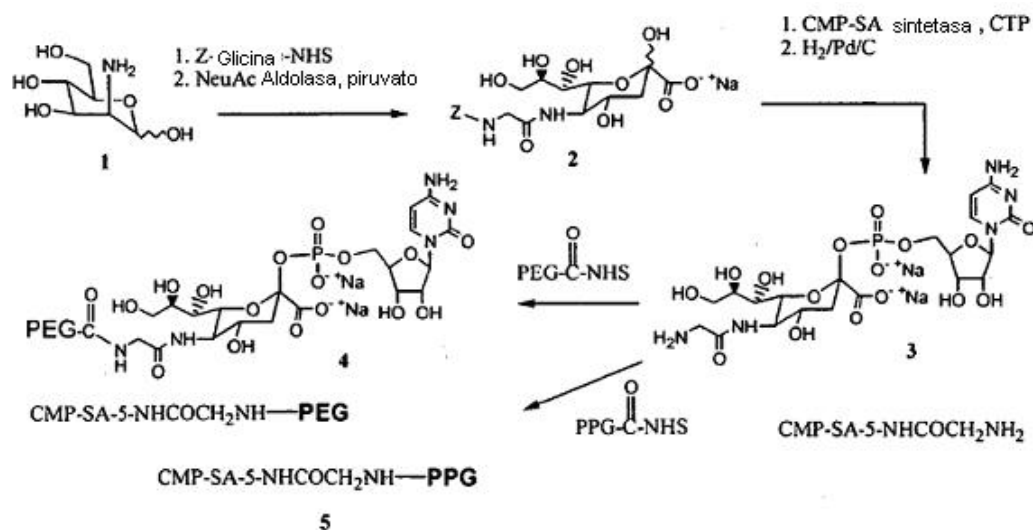
Los azúcares modificados útiles en la formación de conjugados de la invención se tratan en el presente documento. La discusión se centra en la preparación de un azúcar modificado con un polímero soluble en agua por claridad de ilustración. En particular la discusión se centra en la preparación de azúcares modificados que incluyen un resto de poli(etilenglicol). Los expertos apreciarán que los procedimientos expuestos en el presente documento son ampliamente aplicables a la preparación de azúcares modificados, por lo que la discusión no debe interpretarse como limitante del alcance de la invención.

En general, el resto de azúcar y el grupo modificador están unidos entre sí a través del uso de grupos reactivos, que normalmente se transforman mediante el proceso de unión en un nuevo grupo funcional orgánico o especie no reactiva. Los grupos funcionales reactivos de azúcar se localizan en cualquier posición del resto de azúcar. Los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente las que se conocen bien en la técnica de la química de bioconjugados. Las clases de reacciones actualmente favorecidas disponibles con restos de azúcar reactivos son los que proceden en condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, pero no se limita a, sustituciones nucleofílicas (p. ej., reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrófilas (p. ej., reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (p. ej., reacción de Michael, reacción de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se tratan en, por ejemplo, Smith y March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 5th Ed., John Wiley & Sons, New York, 2001; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; and Feeney et al., MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Los grupos funcionales reactivos útiles pendientes de un núcleo de azúcar o grupo modificador incluyen, pero no se limita a:

- (a) grupos carboxilo y varios derivados de los mismos, incluidos, entre otros, éteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de acilo, imidazoles de acilo, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo y aromáticos;
- (b) grupos hidroxilo que se pueden convertir en, por ejemplo, ésteres, éteres, aldehídos etc.
- 5 (c) grupos haloalquilo, en los que el haluro se puede desplazar después con un grupo nucleofílico tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbaanión o un ion alcóxido, de modo que tiene como resultado la unión covalente de un grupo nuevo en el grupo funcional del átomo de halógeno;
- (d) grupos dienófilo, que son capaces de participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo grupos maleimido;
- 10 (e) grupos aldehído y cetona, de modo que es posible la derivación posterior mediante la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o mediante mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquil-litio.
- (f) grupos de haluro de sulfonilo para la posterior reacción con aminas, por ejemplo para formar sulfonamidas;
- (g) grupos tiol, que se pueden convertir en, por ejemplo, disulfuros o reaccionar con haluros de alquilo y de acilo;
- 15 (h) grupos amina o sulfhidrido que pueden ser, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados;
- (i) alquenos, que pueden sufrir, por ejemplo, cicloadiciones, acilación, adición de Michael etc., y
- (j) epóxidos que pueden reaccionar con, por ejemplo, aminas y compuestos hidroxilo.
- 20 Los grupos funcionales reactivos se pueden elegir de un modo tal que no participen ni interfieran en las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o el grupo modificador. Como alternativa, un grupo funcional reactivo se puede proteger de participar en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica entenderán cómo proteger un grupo funcional concreto de un modo tal que no interfiera en un conjunto seleccionado de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo, Greene y col., PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, New York, 1991.
- 25 En la discusión siguiente, se exponen 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 núcleo del azúcar al que se une el grupo modificador. El centro de la discusión sobre derivados de ácido siálico es son con fines aclaratorios únicamente y no debe interpretarse como limitantes del ámbito de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden activar u derivar diversos restos de azúcar de un modo análogo al
- 30 expuesto usando ácido siálico como ejemplo. Por ejemplo se dispone de numerosos procedimientos para modificar galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y fucosa, por nombrar algunos sustratos de azúcar, que se modifican con facilidad 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).
- 35 En una realización ejemplar, el péptido que se modifica mediante un procedimiento de la invención es un péptido que se produce en células de mamífero (p. ej., células CHO) o en un animal transgénico y, por tanto, contiene cadenas de oligosacáridos unidos a N y/o unidos a O, que están sialiladas de forma incompleta. Las cadenas de oligosacáridos del glicopéptido que carece de un ácido siálico y que contiene un residuo de galactosa terminal se pueden PEGilar, PPGilar o modificar de otro modo con un ácido siálico modificado.
- 40 En el esquema 4, el glucósido manosamina¹ se trata con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (p. ej., glicina), que convierte el residuo de amino azúcar en el correspondiente aducto de amida de aminoácido protegido. El aducto se trata con una aldolasa para formar el ácido siálico 2. El compuesto 2 se convierte en el correspondiente derivado de CMP mediante la acción de la CMP-SA sintetasa, seguido de hidrogenación catalítica del derivado de MCP para producir el compuesto 3. La amina introducida mediante la formación del aducto de glicina se usa como un locus de unión de PEG o PPG haciendo reaccionar el compuesto 3 con un derivado de PEG o PPG
- 45 activado (p. ej., PEG-C(O)NHS, PPG-C(O)NHS), produciendo 4 o 5, respectivamente.

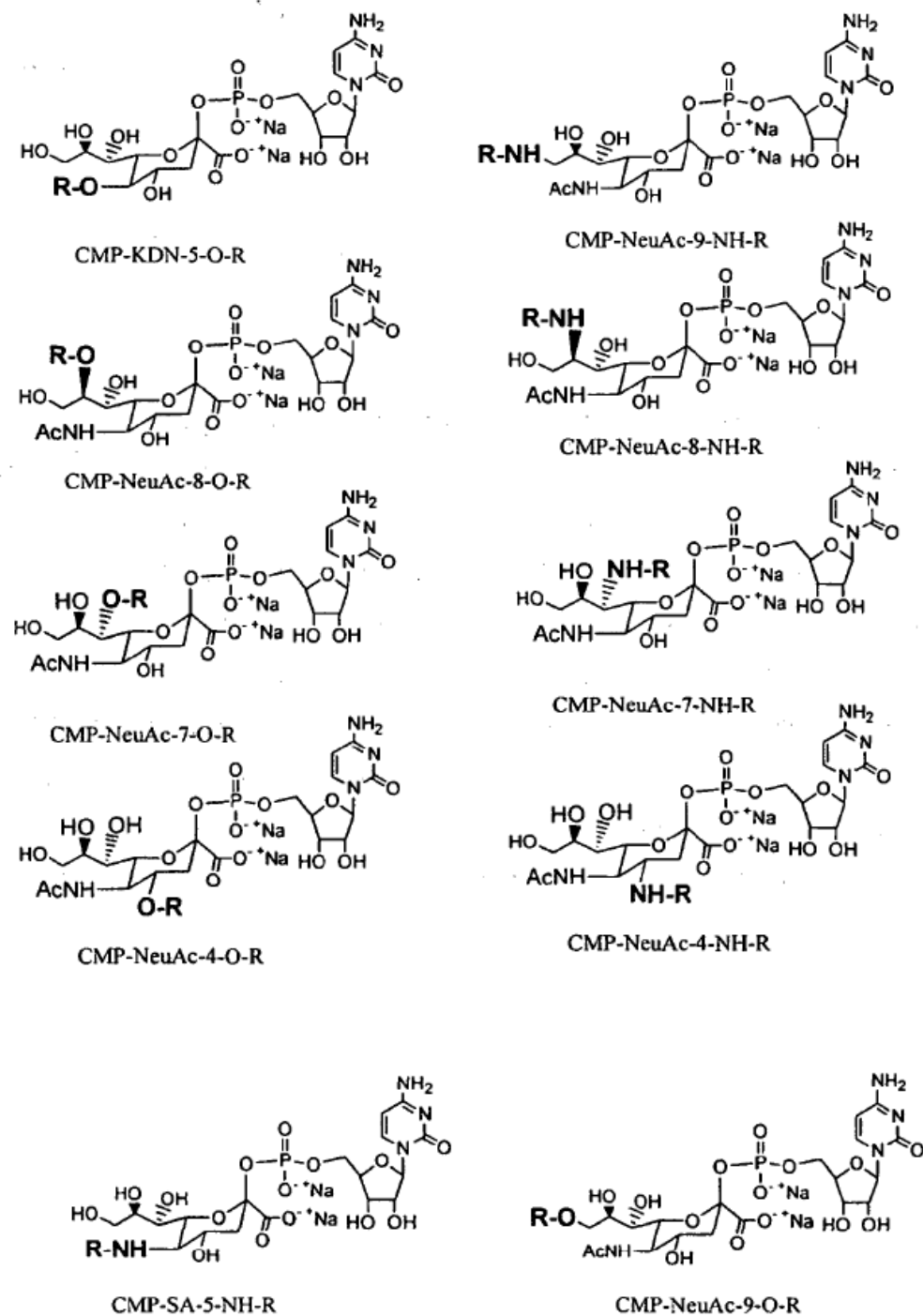
Esquema 4



La tabla 2 expone ejemplos representativos de monofosfatos de azúcar que se derivatizan con un resto de PEG o de PPG. Determinados de los compuestos de la Tabla 2 se preparan mediante el procedimiento del esquema 1. Otros derivados se preparan mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Keppler y col., Glycobiology, 11: 11R (2001); y Charter y col., Glycobiology 10: 1049 (2000)). Otros análogos de PEG y PEG reactivos a amina están disponibles comercialmente o se pueden preparar mediante procedimientos fácilmente accesibles para los expertos en la técnica.

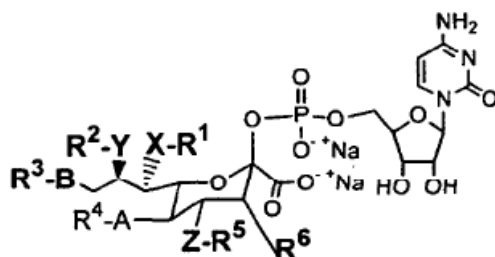
5

Tabla 2. Ejemplos de monofosfatos de azúcar que se derivatizan con un resto de PEG o PPG



Los fosfatos de azúcar modificado de uso en la práctica de la presente invención se pueden sustituir en otras posiciones, además de las indicadas anteriormente. Sustituciones preferidas actualmente de ácido siálico se exponen en la Fórmula 5.

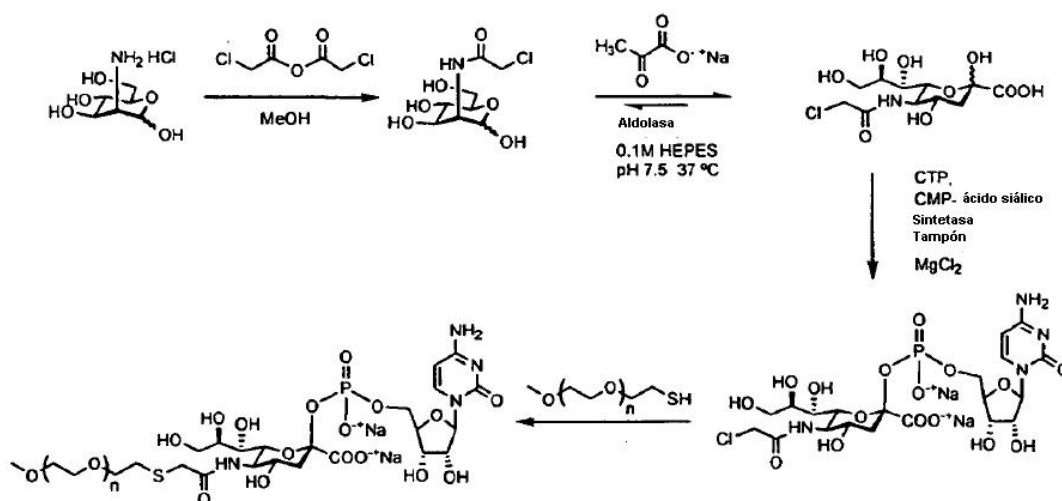
Fórmula 5



en la que X es un grupo ligador que se selecciona, preferentemente, de -O-, -N(H)-, -S-, CH₂-, y N(R)₂, en las que cada R es un miembro seleccionado de forma independiente de R¹-R⁵. Los símbolos Y, Z, A y B representan cada uno un grupo que se selecciona del grupo expuesto anteriormente para la identidad de X. X, Y, Z, A y B se seleccionan cada uno de forma independiente y, por tanto, pueden ser iguales o diferentes. Los símbolos R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ representan H, polímeros, un polímero soluble en agua, resto terapéutico, biomolécula u otro resto. El símbolo R⁶ representa H, OH, o un polímero. Como alternativa, estos símbolos representan un ligador que está unido a un polímero, polímero soluble en agua, resto terapéutico, biomolécula u otro resto.

En otra realización ejemplar, una manosamina simultáneamente se acila y se activa para una sustitución nucleofílica mediante el uso de anhídrido cloroacético como se indica en el Esquema 5.

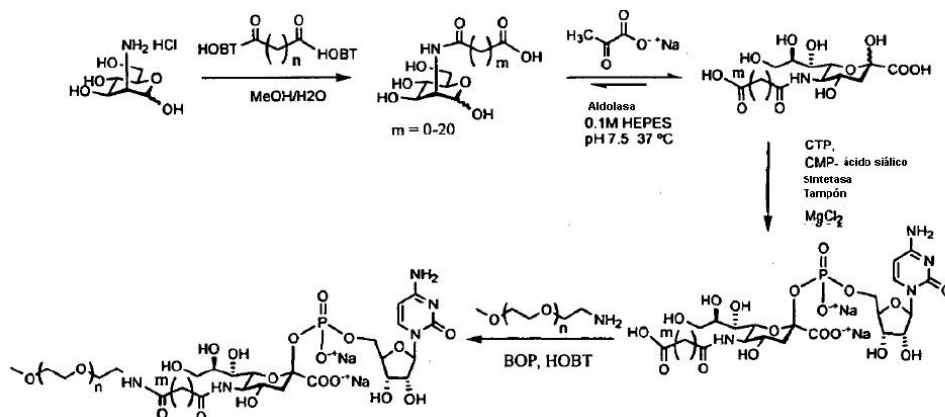
Esquema 5



El glicano derivado de cloro resultante se pone en contacto con piruvato en presencia de una aldolasa, formando un ácido siálico derivado de cloro. El azúcar del nucleótido correspondiente se prepara mediante el contacto del derivado de ácido siálico con trifosfatos nucleotídicos adecuados y una sintetasa. El grupo de cloro del resto de ácido siálico se desplaza después con un derivado de PEG nucleofílico, tal como tio-PEG.

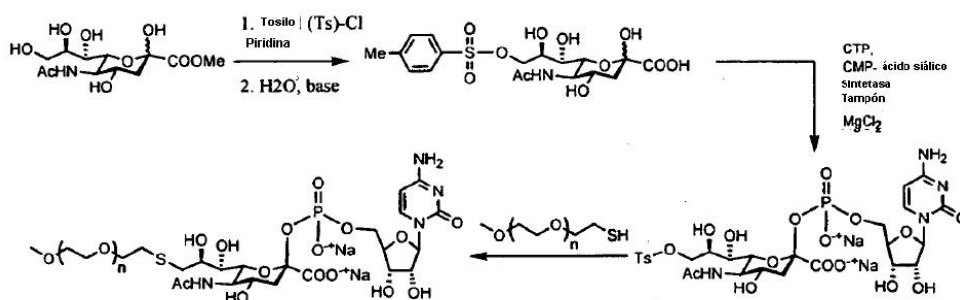
En una realización ejemplar adicional, como se muestra en el Esquema 6, se acila una manosamina con un bis-HOPT dicarboxilato, produciendo el correspondiente ácido amidoalquilcarbosílico, que después se convierte en un derivado de ácido siálico. El derivado de ácido siálico se convierte en un azúcar de nucleótido y el ácido carboxílico se activa y reacciona con un derivado de PEG nucleofílico, tal como amino-PEG.

Esquema 6



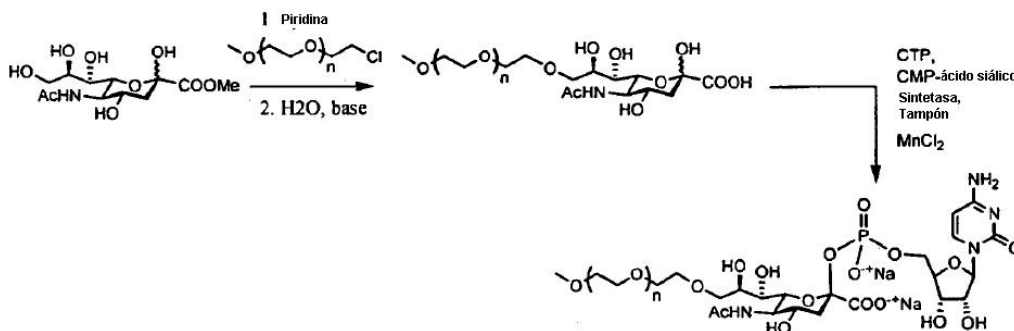
En otra realización ejemplar expuesta en el Esquema 7, un ácido neuramínico protegido con amina y con carboxilo se activa convirtiendo el grupo hidroxilo primario en el correspondiente éster de p-toluenosulfonato y el éster metílico se escinde. El ácido neuramínico activado se convierte en el correspondiente azúcar de nucleótido y el grupo activador se desplaza mediante una especie de PEG nucleofílica, tal como tio-PEG.

Esquema 7

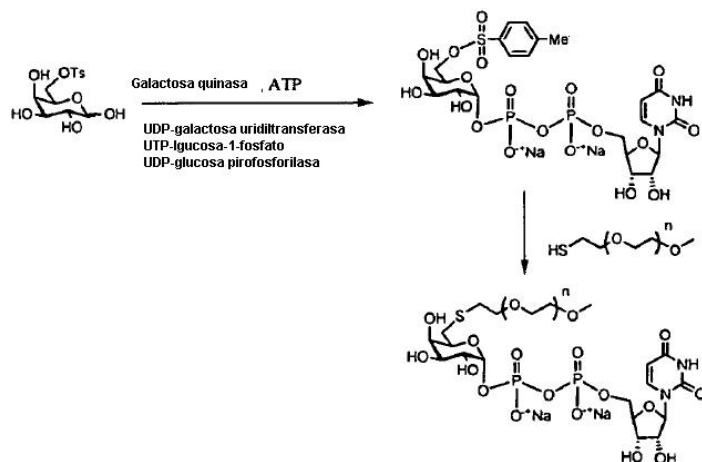


En otra realización ejemplar adicional, como se expone en el Esquema 8, el resto hidroxilo primario de un derivado de ácido neuramínico protegido con amina y con carboxilo se alquila usando un PEG electrofílico, tal como cloro-PEG. Después se escinde el éster metílico y el PEG-azúcar se convierte en un azúcar de nucleótido.

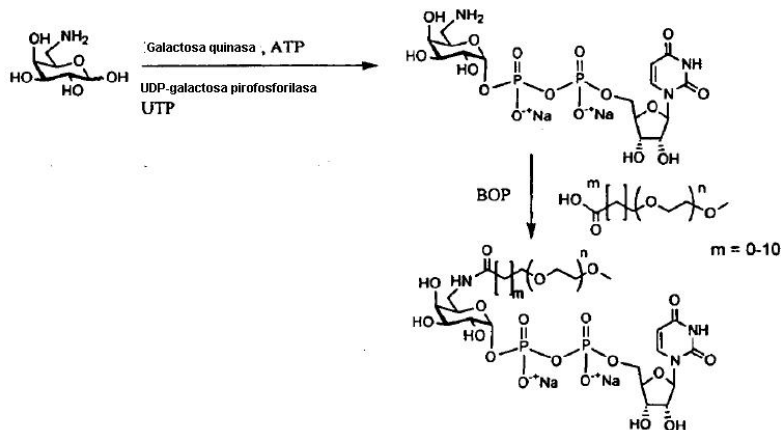
Esquema 8



Los glicanos distintos al ácido siálico pueden derivatizarse con PEG usando los procedimientos expuestos en el presente documento. Los propios glicanos derivatizados también se encuentran en el ámbito de la invención. Por tanto, el esquema 9 proporciona una vía sintética ejemplar a un azúcar de nucleótido de galactosa PEGilada. El grupo hidroxilo primario de la galactosa se activa como el correspondiente éster de toluenosulfonato, que después se convierte en un azúcar del nucleótido.

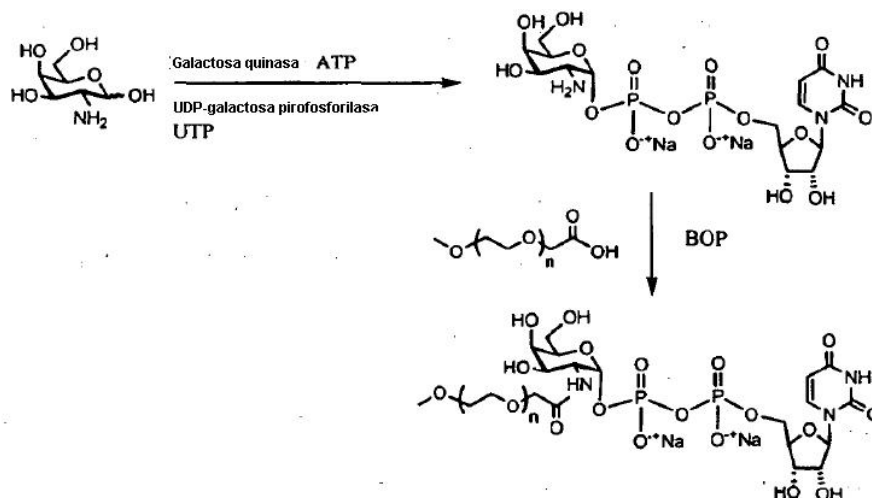
Esquema 9

El esquema 10 establece una vía ejemplar para preparar un derivado de galactosa-PEG que se basa en un resto de galactosa-6-amina. Por tanto, la galactosamina se convierte en un azúcar de nucleótido y el resto amina de galactosamina se funcionaliza con un derivado activo de PEG.

Esquema 10

El esquema 11 proporciona otra vía ejemplar de los derivados de galactosa. El punto de partida para el Esquema 11 es la galactosa-2-amina, que se convierte en un azúcar de nucleótido. El resto amina del azúcar de nucleótido es el lugar para unir un derivado de PEG, tal como metoxi-PEG ((mPEG) ácido carboxílico).

Esquema 11



Los restos ejemplares unidos a los conjugados divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limita a, derivados de PEG (p. ej., acil-alkil-PPG, alkil-acil-PPG carbamoil-PPG, aril-PPG), ácido poliaspártico, poliglutamato, polilisina, restos terapéuticos, restos diagnósticos, manosa-6-fosfato, heparina, heparán, SLex, manosa, manosa-6-fosfato, Sialil Lewis X, FGF, VFGF, proteínas (p.ej., transferrina), condroitina, queratan, dermatan, dextrano, dextrano modificado, amilosa, bisfosfato, poli-SA, ácido hialurónico, queritan, albúmina, integrinas, oligosacáridos antenales, péptidos y similares. Procedimientos para conjugar los diversos grupos modificadores con un resto sacárido son fácilmente accesibles a los expertos en la técnica (POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY : BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., Plenum Pub. Corp., 1992; POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMICAL AND BIOLOGICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., ACS Symposium Series No. 680, American Chemical Society, 1997; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; and Dunn y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

Purificación de azúcares, azúcares de nucleótidos y derivados

Los azúcares de nucleótidos y derivados producidos por los procedimientos anteriores se pueden usar sin purificar. No obstante, normalmente se prefiere recuperar el producto. Se pueden usar técnicas estándar bien conocidas para la recuperación de sacáridos glicosilados, tales como cromatografía en capa fina o gruesa, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico o filtración por membrana. Se prefiere usar filtración por membrana, más preferentemente usando una membrana osmótica inversa o una o más técnicas de cromatografía en columna para la recuperación como se trata en lo sucesivo en el presente documento y en la bibliografía citada en el presente documento. Por ejemplo, la filtración por membrana, en la que las membranas tienen un valor de corte de peso molecular de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 10.000, se puede usar para eliminar proteínas para reactivos que tienen un peso molecular inferior a 10.000 Da. La filtración por membrana u ósmosis inversa se pueden usar para eliminar las sales y/o purificar los sacáridos del producto (véase, por ejemplo, el documento WO 98/15581). Las membranas con nanofiltros son una clase de membranas para ósmosis inversa por las que pasan sales monovalentes pero retienen las sales polivalentes y los solutos son carga mayores de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Daltons, dependiendo de la membrana usada. Por tanto, en una aplicación típica, los sacáridos preparados mediante los procedimientos de la presente invención quedarán retenidos en la membrana y las sales contaminantes pasarán.

G. Grupos de reticulación

La preparación del azúcar modificado para usar en los procedimientos de la presente invención incluye la unión de un grupo modificador a un residuo de azúcar y la formación de un aducto estable, que es un sustrato de una glicosiltransferasa. Por tanto, a menudo se prefiere usar un agente de reticulación para conjugar el grupo modificador y el azúcar. Compuestos bifuncionales ejemplares que se pueden usar para unir grupos modificadores a los restos carbohidrato incluyen, pero no se limita a, poli(etilenglicoles) bifuncionales, poliamidas, poliésteres, poliésteres y similares. En la bibliografía se conocen los abordajes generales para la unión de carbohidratos 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., el documento WO 92/18135. En la siguiente discusión, los grupos reactivos se tratan como que comienzan en el resto de azúcar del azúcar modificado naciente. El centro del debate se proporciona con fines ilustrativos. Los expertos en la técnica apreciarán que la

discusión es relevante para los grupos reactivos en el grupo modificador también.

Una estrategia ejemplar implica la incorporación de un sulfhidrilo protegido sobre el azúcar usando el reticulador heterobifuncional SPDP (n-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato y desproteger después el sulfhidrilo para la formación de un puente disulfuro con otro sulfhidrilo en el grupo modificador.

- 5 Si el SPDP afecta perjudicialmente a la capacidad del azúcar modificado para actuar como sustrato de la glicosiltransferasa, se usa uno de una serie de reticuladores tales como 2-iminotiolano o N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) para formar un puente disulfuro. El 2-iminotiolano reacciona con aminas primarias, que incorporan un sulfhidrilo no protegido sobre la molécula que contiene la amina. SATA también reacciona con aminas primarias, pero incorpora un sulfhidrilo protegido, que después se desacetila usando hidroxilamina para producir un sulfhidrilo libre. En cada caso, el sulfhidrilo incorporado es libre de reaccionar con otros sulfhidrilos o sulfhidrilo protegido, como SPDP, formando el puente disulfuro requerido.

- 15 La estrategia descrita anteriormente es ejemplar y no limitante de los ligadores de uso en la invención. Se dispone de otros reticuladores que se pueden usar en diferentes estrategias para reticular el grupo modificador del péptido. Por ejemplo, TPCH(S-(2-tiopiridil)-L-cisteína hidrazina y TPMPH ((S-(2-tiopiridilo) mercapto-propionohidrazida) reaccionan con restos de carbohidratos que se han oxidado previamente mediante tratamiento suave con peryodato, formando de este modo un enlace hidrazona entre la porción hidrazina del reticulador y los aldehídos generados con peryodato. TPCH y TPMPH introducen un grupo sulfhidrilo protegido con 2-piridiltiona sobre el azúcar, que se puede desproteger con DTT y después usar para conjugar, formando así puentes disulfuro entre los componentes.

- 20 Si el puente disulfuro es inadecuado para producir azúcares modificados estables se pueden usar otros reticuladores que incorporan enlaces más estables entre componentes. Los reticuladores heterobifuncionales GMBS (N-gama-malimidobutirilo)succinimida) y SMCC (succinimidil 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano) reaccionan con aminas primarias e introducen de este modo un grupo maleimida en el componente. El grupo maleimida puede reaccionar después con los sulfhidrilos del otro componente, que se pueden introducir mediante los reticuladores mencionados anteriormente, formando de este modo un enlace tioéter estable entre los componentes. Si la hidrancia estérica entre componentes interfiere con la actividad de cualquiera de los componentes o la capacidad del azúcar modificado para actuar como sustrato de la glicosiltransferasa, se pueden usar reticuladores que introduzcan largos brazos espaciadores entre los componentes e incluyen derivados de algunos de los reticuladores mencionados anteriormente (es decir, SPDP). Por tanto, existen abundantes reticuladores adecuados que son útiles; cada uno de los cuales se selecciona en función del efecto que tiene sobre el conjugado peptídico óptimo y la producción de azúcar modificado.

- 30 Se usa una variedad reactivos para modificar los componentes del azúcar modificado con reticulaciones químicas intramoleculares (para revisiones de los reactivos de reticulación y procedimientos de reticulación véase: Wold, F., Meth. Enzymol. 25: 623-651, 1972; Weetall, H. H., and Cooney, D. A., In: ENZYMES AS DRUGS. (Holcenberg, y Roberts, eds.) pp. 395-442, Wiley, New York, 1981; Ji, T. H., Meth. Enzymol. 91: 580-609, 1983; Mattson et al., Mol. Biol. Rep. 17: 167-183, 1993). Los reactivos de reticulación preferidos derivan de varios reactivos de reticulación de longitud cero, homobifuncionales y heterobifuncionales. Los reactivos de reticulación de longitud cero incluyen conjugación directa de dos grupos químicos intrínsecos sin introducción de material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de un puente disulfuro pertenecen a esta categoría. Otro ejemplo son los reactivos que inducen la condensación de un carboxilo y un grupo amino primario para formar un enlace amida, tales como carbodiimidas, etilcloroformiato, reactivo de Woodward K (2-etil-5-fenilisoaxazolio-3'-sulfonato) y carbonildiimidazo. Además de estos reactivos químicos, la enzima transglutaminasa (glutamyl-péptido γ -glutamyltransferasa; EC 2.3.2.13) se puede usar como reactivo de reticulación de longitud cero. Esta enzima cataliza las reacciones de transferencia de acilo en los grupos carboxamida de los residuos glutamínico unidos a proteína, normalmente con un grupo amino primario como sustrato. Reactivos homo y heterobifuncionales preferidos contienen dos sitios idénticos o dos diferentes, respectivamente, que pueden ser reactivos para grupos amino, sulfhidrilo, guanidino, indol o no específicos.

2. Sitios específicos preferidos de reactivos de reticulación

a. Grupos reactivos con amino

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

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

Los imidoésteres son los reactivos de acilación más específicos para la reacción con los grupos amina de los componentes de azúcar modificados. A un pH entre 7 y 10, los imidoésteres solo reaccionan con aminas primarias.

Las aminas primarias atacan los imidatos nucleofílicamente para producir un intermedio que rompe la amidina a un pH alto o a un nuevo imidato a un pH bajo. El nuevo imidato puede reaccionar con otra amina primaria, por tanto reticulando dos grupos amino, un caso de un imidato supuestamente monofuncional que reacciona bifuncionalmente. El producto principal de la reacción 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 se retiene.

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

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

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

Los ésteres de p-nitrofenilo de ácidos mono y dicarboxílicos también son grupos reactivos con amino útiles. Aunque la especificidad del reactivo no es muy alta, los grupos α - y ϵ -amino parecen reaccionar más rápidamente.

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

Los cloruros de sulfonilo aromáticos reaccionan con diversos sitios de los componentes del azúcar modificado, pero la reacción con los grupos amino es la más importante, que tiene como resultado un enlace sulfonamida estable.

b. Grupos reactivos con sulfhidrilo

En otra forma de realización preferida, los sitios son grupos reactivos con sulfhidrilo. Ejemplos no limitantes útiles de grupos reactivos con sulfhidrilo incluyen maleimidas, haluros de alquilo, disulfuros de piridilo y tioftalimidas.

Las maleimidas reaccionan, preferentemente, con el grupo sulfhidrilo de los componentes de azúcar modificado para formar enlaces tioéter estables. También reaccionan a una velocidad mucho más lenta con grupos amina primarias y los grupos imidazol de las histidinas. No obstante, a pH 7 el grupo maleimida se puede considerar en el grupo específico de sulfhidrilo, ya que a este pH la velocidad de la reacción de los tioles simples es 1.000 veces mayor que la de la correspondiente amina.

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

Los disulfuros de piridilo reaccionan con tres sulfhidrilos mediante intercambio de disulfuro para dar disulfuros mixtos. Como resultado, los disulfuros de piridilo son los grupos reactivos con sulfhidrilo más específicos.

Las tioftalimidas reaccionan con los grupos sulfhidrilo libres para formar disulfuros.

c. Residuo reactivo con carboxilo

En otra realización, las carbodiimidas solubles en agua y disolvente orgánico se usan como reactivos a carboxilo. Estos compuestos reaccionan con los grupos carboxilo libres formando una pseudourea que después se puede acoplar a las aminas disponibles dando un enlace amida. Los procedimientos para modificar un grupo carboxilo con carbodiimida son bien conocidos en la técnica (véase, Yamada y col., Biochemistry 20: 4836-4842, 1981).

3. Sitios no específicos preferidos en reactivos de reticulación

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

Reticuladores ejemplares no específicos incluyen grupos fotoactivables completamente inertes en la oscuridad que se convierten en especies reactivas tras la absorción de un fotón de la energía adecuada. En una realización preferida, los grupos fotoactivables se seleccionan de precursores de nítrenos generados tras el calentamiento o fotólisis de las azidas. Los nítrenos deficientes en electrones son extremadamente reactivos y pueden reaccionar con diversos enlaces químicos, incluyendo N-H, O-H, C-H, and C=C. Aunque se pueden usar tres tipos de azidas

- (derivados arilo, alquilo y acilo), las arilazidas son actualmente las preferidas. La reactividad de las arilazidas tras la fotólisis es mejor con enlaces N-H y O-H que con C-H. Los arilnitrenos deficientes en electrones expanden el anillo rápidamente para formar deshidroazepinas, que tienden a reaccionar con nucleófilos en lugar de formar productos de inserción C-H. La reactividad de las arilazidas se puede aumentar mediante la presencia de sustituyentes aceptores de electrones tales como grupos nitro o hidroxilo en el anillo. Dichos sustituyentes empujan la máxima absorción de arilazidas a una longitud de onda más larga. Las arilazidas insustituídas tienen un máximo de absorción en el intervalo de 260-280 nm, mientras que el hidroxilo y las nitroarilazidas absorben significativamente la luz más allá de 305 nm. Por tanto, los hidroxilo y las nitroarilazidas son más preferibles ya que permiten usar condiciones de fotólisis menos dañinas para el componente de afinidad que las arilazidas insustituídas.
- 5 En otra realización preferida, los grupos fotoactivables se seleccionan de arilazidas fluoradas. Los productos de la fotólisis de las arilazidas fluoradas son arilnitrenos, todos los cuales sufren las reacciones características de este grupo, incluida la inserción del enlace C-H, con una eficiencia elevada (Keana y col., J Org. Chem. 55: 3640-3647, 1990).
- 10 En otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan de residuos de benzofenona. Los reactivos de benzofenona normalmente dan rendimientos de reticulación mayores que los reactivos de arilazida.
- 15 En otra realización preferida, los grupos fotoactivables se seleccionan de compuestos diazo que forman un carbeno deficiente en electrones tras fotólisis. Estos carbenos sufren diversas reacciones, incluida la inserción en enlaces C-H, la adición a dobles enlaces (incluidos sistemas aromáticos), atracción de hidrógenos y coordinación con los centros nucleofílicos para dar iones de carbono.
- 20 En otra realización más, los grupos fotoactivables se seleccionan de diazopiruvatos. Por ejemplo, el éster de p-nitrofenilo del diazopiruvato de p-nitrofenilo reacciona con aminas alifáticas para dar amidas de ácido diazopirúvico que sufren fotólisis ultravioleta para formar aldehídos. El componente de afinidad modificado con diazopiruvato fotolisado reaccionará como el formaldehído o el glutaraldehído formando reticulaciones.

4. Reactivo homobifuncional

a. Reticuladores homobifuncionales reactivos con aminas primarias

- 25 La síntesis, propiedades y aplicaciones de reticuladores reactivos con amina se describen comercialmente en la bibliografía (para revisiones de procedimientos y reactivos de reticulación, véase anteriormente). Muchos de los reactivos están disponibles (p. ej., Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).
- 30 Ejemplos no limitantes preferidos de ésteres de NHS homobifuncionales incluyen glutamato de disuccinimidilo (DSG), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS), tartarato de disuccinimidilo (DST), tartarato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis-2-(succinimidoxicarbonilo)etilsulfona (BSOCOES), bis-2-(sulfosuccinimidoxi-carbonilo)etilsulfona (sulfo-BSOCOES), glicolbis(succinimidilsuccinato) de etileno (EGS), glicolbis(succinimidilsuccinato) de etileno (EGS), ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP) y ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (sulfo-DSP).
- 35 Ejemplos no limitantes preferidos de imidoésteres homobifuncionales incluyen malonimidato de dimetilo (DMM), succinimidato de dimetilo (DMSC), adipimato de dimetilo (DMS), pimelimidato de dimetilo (DMP), suberimidato de dimetilo (DMS), dimetil-3,3'-oxidipropionimidato (DODP), dimetil-3,3'-metilendioxi)dipropionimidato (DMDP), dimetil-3'-(dimetilendioxi)dipropionimidato (DDDP), dimetil-3,3'-(tetrametilendioxo)-dipropionimidato (DTDP) y dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP).
- 40 Ejemplos no limitantes preferidos de isotiocianatos homobifuncionales incluyen: p-fenilendiisotiocianato (DITC) y estilbeno de ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico (DIDS).
- Ejemplos no limitantes preferidos de isocianatos homobifuncionales incluyen xilenodiisocianato, tolueno-2,4-diisocianato, tolueno-2-isocianato-4-isotiocianato, 3-metoxidifenilmetano-4,4'-diisocianato, 2,2'-dicarboxi-4,4'-azofenildiisocianato y hexametilendiisocianato.
- 45 Ejemplos no limitantes preferidos de arilhaluros homobifuncionales incluyen 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB) y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenil-sulfona.
- Ejemplos no limitantes preferidos de reactivos de aldehído alifáticos homobifuncionales incluyen glioxal, malodialdehído y glutaraldehído.
- 50 Ejemplos no limitantes preferidos de reactivos de acilación homobifuncionales incluyen ésteres de nitrofenilo de ácidos dicarboxílicos.
- Ejemplos no limitantes preferidos de cloruros de sulfonilo aromáticos homobifuncionales incluyen cloruro de fenol-2,4-disulfonilo y cloruro de α -naftol-2,4-disulfonilo.
- Ejemplos no limitantes preferidos de reactivos homobifuncionales reactivos con amino adicionales incluyen eritritolbiscarbonato que reacciona con aminas para dar biscarbamatos.

b. Reactivos reticuladores homobifuncionales con grupos sulfhidrilo libres

La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la literatura (para revisiones de procedimientos y reactivos de reticulación, véase anteriormente). Muchos de los reactivos están disponibles comercialmente (p. ej., Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Ejemplos no limitantes preferidos de maleimidas homobifuncionales incluyen bismaleimidohexano (BMH), N,N'-(1,3-fenileno) bismaleimida, N,N'-(1,2-fenileno)bismaleimida, azofenildimaleimida y bis(N-maleimidometil)éter.

Ejemplos no limitantes preferidos de disulfuros de piridilo homobifuncionales incluyen 1,4-di-3'-(2'-piridilditio)propionamidobutano (DPDPB)

Ejemplos no limitantes preferidos 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)benzamina, N,N'-di(bromoacetil)fenilhidrazina y 1,2-di(bromoacetil)amino-3-fenilpropano.

c. Reticuladores fotoactivables homobifuncionales

La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la literatura (para revisiones de procedimientos y reactivos de reticulación, véase anteriormente). Algunos de los reactivos están disponibles comercialmente (p. ej., Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Ejemplos no limitantes preferidos de reticuladores fotoactivables homobifuncionales incluyen bis-(3-(4-azidosalicilamido)etil)disulfuro (BASED), di-N-(2-nitro-4-azidofenil)-cistamina-S,S-dióxido (DNCO) y 4,4'-ditiobisfenilazida.

5. Reactivos heterobifuncionalesa. Reactivos heterobifuncionales reactivos a amino con un resto de piridildisulfuro

La síntesis, propiedades y aplicaciones de dichos reactivos se describen en la literatura (para revisiones de procedimientos y reactivos de reticulación, véase anteriormente). Muchos de los reactivos están disponibles comercialmente (p. ej., Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Ejemplos no limitantes preferidos de reactivos heterofuncionales con un resto de disulfuro de piridilo y un éster de NHS reactivo con amino incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil 6-3-(2-piridilditio)propionamidohexanoato (LC-SPDP), sulfosuccinimidil 6-3-(2-piridilditio)propionamidohexanoato (sulfo-LCSPDP), 4-succinimidiloxycarbonil-oc-metil-a-(2-piridilditio)tolueno (SMPT) y sulfosuccinimidil 6- α -metil- α -(2-piridilditio)toluamidohexanoato (sulfo-LC-SMPT).

b. Reactivos heterobifuncionales reactivos a amino con un resto de maleimida

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

c. Reactivos heterobifuncionales reactivos a amino con un resto de haluro de alquilo

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

Un ejemplo preferido de un reactivo heterobifuncional con un éster de NHS reactivo a amino y un resto de dihaluro de alquilo es N-hidroxisuccinimidil-2,3-dibromopropionato (SDBP). El SDBP introduce reticulaciones intramoleculares en el componente de afinidad conjugando sus grupos amino. La reactividad del resto de dibromopropionilo hacia los grupos de amina primaria se controla mediante la temperatura de la reacción (McKenzie y col., Protein Chem. 7: 581-592 (1988)).

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

Los expertos en la técnica conocen otros agentes de reticulación. Véase, por ejemplo, Pomato y col., patente de EE.UU. N° 5.965.106. Está dentro de las capacidades de un experto en la técnica elegir un agente de reticulación adecuado para una aplicación concreta.d. Grupos de unión escindibles

En otra realización más, el grupo ligador se proporciona con un grupo que se puede escindir para liberar el grupo modificador 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); Bouizar y col., Eur. J. Biochem. 155: 141-147 (1986); Park y col., J Biol. Chem. 261: 205-210 (1986); Browning y col., J. Immunol. 143: 1859-1867 (1989). Además, se dispone de un amplio abanico de grupos ligadores bifuncionales (tanto homo como heterobifuncionales) escindibles comercialmente en suministradores tales como Pierce.

Los restos escindibles ejemplares se pueden escindir usando luz, calor o reactivos tales como tioles, hidroxilamina, bases, peryodato y similares. Además, ciertos grupos preferidos se escinden in vivo en respuesta a la endocitosis (p. ej., cisaconitilo, véase Shen y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 1048 (1991)). Grupos escindibles preferidos comprenden un resto escindible que es un miembro seleccionado del grupo que consiste en grupos disulfuro, éster, imida, carbonato, nitrobenzilo, fenacilo y benzoína.e. Conjugación de azúcares modificados a péptidos

Los azúcares modificados se conjugan con un péptido glicosilado o no glicosilado usando una enzima adecuada para mediar en la conjugación. Preferentemente, las concentraciones del o los azúcares donantes modificados, enzima(s) y péptido(s) aceptores se seleccionan de un modo tal que la glicosilación procede hasta que el aceptor se consume. Las consideraciones que se tratan más adelante, aunque se exponen en el contexto de una sialiltransferasa, generalmente son aplicables a otras reacciones de la glicosiltransferasa.

Se conocen una serie de procedimientos de usar glicosiltransferasas para sintetizar estructuras de oligosacáridos deseadas y en general aplicables a la presente invención. Procedimientos ejemplares se describen en, por ejemplo, el documento WO 96/32491, Ito y col., Pure Appl. Chem. 65: 753 (1993) y las patentes de EE.UU. n1 5.352.670, 5.374.541 y 5.545.553.

La presente invención se pone en práctica usando una única glicosiltransferasa o una combinación de glicosiltransferasas. Por ejemplo, se puede usar una combinación de una sialiltransferasa y una galactosiltransferasa. En dichas 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 al medio de reacción una vez que la reacción enzimática está completa o casi completa. Realizando dos reacciones enzimáticas en secuencia en un único vaso, los rendimientos globales mejoran sobre los procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Además, se reduce la limpieza y la eliminación de los disolventes y subproductos sobrantes.

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

En otra realización, al menos dos de las enzimas son glicosiltransferasas y el último azúcar añadido a la estructura de sacárido del péptido es un azúcar no modificado. En su lugar, el azúcar modificado está interno en la estructura del glicano y, por tanto, no tiene que ser el último azúcar en el glicano. En una realización ejemplar, la galactosiltransferasa puede catalizar la transferencia de Gal-PEG desde UDP-Gal-PEG al glicano, seguido de incubación en presencia de ST3Gal3 y CMP-SA, que sirve para añadir un ácido no modificado de "protección terminal" al glicano (Figura 22A).

En otra realización, al menos dos de las enzimas son glicosiltransferasas y al menos dos azúcares modificados se añaden a las estructuras de glicano en el péptido. De este modo se pueden añadir dos o más glicoconjugados diferentes a uno o más glicanos en un péptido. Este procedimiento genera estructuras de glicano que tienen dos o más azúcares modificados funcionalmente diferentes. En una realización ejemplar, la incubación del péptido con GnT-I, II y UDP-GlcNAc-PEG sirve para añadir una molécula de a GlcNAc-PEG al glicano; la incubación con galactosiltransferasa y UDP-Gal sirve para añadir un residuo de Gal al mismo y la incubación con ST3Gal3 y CMP-SA-Man-6-Fosfato sirve para añadir una molécula de SA-manosa-6-fosfato al glicano. Esta serie de reacciones tiene como resultado una cadena de glicano que tiene las características funcionales de un glicano PEGilado así como actividad dirigida de manosa-6-fosfato (Figura 22B).

En otra realización, al menos dos de las enzimas usadas en la reacción son glicosiltransferasas y, de nuevo, se añaden azúcares modificados diferentes a los glicanos unidos a N o unidos a O en el péptido. Esta realización es útil cuando se van a añadir dos azúcares modificados diferentes a los glicanos de un péptido, pero cuando es

importante para separar espacialmente unos de otros los azúcares modificados en el péptido. Por ejemplo, si los azúcares modificados comprenden moléculas voluminosas, incluyendo, pero sin limitación, PEG y otras moléculas tales como una molécula ligadora, puede ser preferible este procedimiento. Los azúcares modificados se pueden añadir de forma simultánea a las estructuras de glicano sobre un péptido o se pueden añadir secuencialmente. En una realización ejemplar, la incubación con ST3Gal3 y CMP-SA-PEG sirve para añadir ácido siálico-PEG a los glicanos unidos a N, mientras que la incubación con ST3Gal1 and CMP-SA-bis-fosfonato sirve para añadir ácido siálico-bis-fosfonato a los glicanos unidos a O (Figura 22C).

En otra realización, el procedimiento usa una o más exo o endoglucosidasas. La glucosidasa normalmente es un mutante que se ha sometido a ingeniería para formar enlaces glicosilo en lugar de romperlos. La glucanasa mutante, en ocasiones denominada glucosintasa, normalmente incluye una sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido ácido en el sitio activo. Por ejemplo, cuando la endoglucanasa es endo-H, los residuos del sitio activo sustituido normalmente serán Asp en la posición 130, Glu en la posición 132 o una combinación de los mismos. Los aminoácidos se sustituyen en general con serina, alanina, asparagina o glutamina. Las exoglucosidasas tales como la transialidasa también son útiles.

La enzima mutante cataliza la reacción, normalmente mediante una etapa de síntesis que es análoga a la reacción inversa de la etapa de hidrólisis con engoglucanasa. En estas realizaciones, la molécula donante de glicosilo (p. ej., una estructura de oligo o monosacárido deseado) contiene un grupo saliente y la reacción procede con la adición de la molécula donante a un residuo de GlcNAc sobre la proteína. Por ejemplo, el grupo saliente puede ser un halógeno, tal como flúor. En otras realizaciones el grupo saliente es un resto Asn o Asn-péptido. En otras realizaciones más, el residuo GlcNAc en la molécula donante de glicosilo está modificado. Por ejemplo, el residuo GlcNAc puede comprender un resto de 1,2-oxazolina.

En una realización preferida, cada una de las enzimas usadas para producir un conjugado de la invención está presente en una cantidad catalítica. La cantidad catalítica de una enzima concreta varía de acuerdo con la concentración del sustrato de dicha enzima, así como con las condiciones de la reacción, tales como la temperatura, el tiempo y el valor del pH. Medios para determinar la cantidad catalítica de una enzima dada en concentraciones de sustrato y condiciones de reacción preseleccionadas son bien conocidos para los expertos en la técnica.

La temperatura a la cual se lleva a cabo un proceso descrito anteriormente puede variar desde justo encima de la congelación a la temperatura a la cual la enzima más sensible se desnaturaliza. La temperatura preferida varía de aproximadamente 0 °C a aproximadamente de 55 °C y, más preferentemente, de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C. En otra realización ejemplar, uno o más componentes del presente procedimiento se llevan a cabo a una temperatura elevada usando una enzima termofílica.

La mezcla de reacción se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para que el aceptor se glicosile, formando de este modo el conjugado deseado. Algunos de los conjugados a menudo se pueden detectar tras unas pocas horas obteniéndose cantidades recuperables en 24 horas o menos. Los expertos en la técnica entienden que la velocidad de la reacción depende de una serie de factores variables (p. ej., la concentración de la enzima la concentración del donante, la concentración del aceptor, la temperatura, el volumen del disolvente), que se optimizan para un sistema seleccionado.

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

En el siguiente debate, la invención se ejemplifica mediante la conjugación de los restos de ácido siálico modificados a un péptido glucosilado. El ácido siálico modificado ejemplar está marcado con PEG. El centro del siguiente debate sobre el uso de ácido siálico modificado con PEG y péptidos glicosilados es por claridad de ilustración y no se pretende sugerir que la invención esté limitada a la conjugación de estos dos compañeros. Un experto entiende que el debate es, generalmente, aplicable a las adiciones de restos de glicosilo modificados aparte del ácido siálico. Además, el debate es igualmente aplicable a la modificación de una unidad de glicosilo con agentes distintos al PEG, incluidos otros polímeros solubles en agua, restos terapéuticos y biomoléculas.

Se puede usar un abordaje enzimático para la introducción selectiva de carbohidratos PEGilados o PPGilados sobre un péptido o glicopéptido. El procedimiento usa azúcares modificados que contienen PEG, PPG o un grupo funcional reactivo enmascarado y se combina con la glicosiltransferasa o glicosintasa adecuada. Seleccionando la glicosiltransferasa que producirá el enlace carbohidrato deseado y usando el azúcar modificado como sustrato donante, el PEG o el PPG se pueden introducir directamente sobre el armazón peptídico, sobre los residuos de azúcar existentes de un glicopéptido o sobre los residuos de azúcar que se han añadido a un péptido.

Un aceptor para la sialiltransferasa está presente en el péptido que se va a modificar mediante los procedimientos de la presente invención bien como una estructura natural o como una colocada en ese lugar de forma recombinante, enzimática o química. Los aceptores adecuados incluyen, por ejemplo, aceptores de galactosilo tales como Gal β 1,4GlcNAc, Gal β 1,4GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, lacto-Ntetraosa, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,3Ara, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,4Glc (lactosa), y otros aceptores conocidos para los expertos en la técnica (véase, por

ejemplo, Paulson y col., J. Biol. Chem. 253 5617-5624 (1978)).

5 En una realización, un aceptor para la sialiltransferasa está presente sobre el péptido que se va a modificar tras la síntesis *in vivo* del péptido. Dichos péptidos se pueden sialilar usando los procedimientos reivindicados sin la modificación previa del patrón de glicosilación del péptido. Como alternativa, los procedimientos de la invención se pueden usar para sialilar un péptido que no incluye un aceptor adecuado; uno primero modifica el péptido para incluir un aceptor por procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. En una realización ejemplar se añade un residuo GalNAc mediante la acción de una GalNAc transferasa.

10 En una realización ejemplar, el aceptor de galactosilo se ensambla uniendo un residuo de galactosa a un aceptor adecuado unido al péptido, por ejemplo una GlcNAc. El procedimiento incluye incubar el péptido que se va a modificar con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de una galactosiltransferasa (p. ej., gal β 1,3 o gal β 1,4), y un donante de galactosilo adecuado (p. ej., UDP-galactosa). La reacción se deja proceder sustancialmente hasta finalizar o, como alternativa, la reacción se detiene cuando se añade una cantidad preseleccionada del residuo de galactosa. Otros procedimientos de ensamblar un aceptor de sacárido seleccionado serán evidentes para el experto en la técnica.

15 En otra realización más, los oligosacáridos unidos a péptido se "recortan" primero todo o en parte para exponer un aceptor a la sialiltransferasa o un resto al cual se pueden añadir uno o más residuos adecuados para obtener un aceptor adecuado. Enzimas tales como glicosiltransferasas y endoglicosidasas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.716.812) son útiles para las reacciones de unión y recorte. Un debate detallado del "recorte" y remodelado de los glicanos unidos a N y unidos a O se proporciona en otros lugares del presente documento.

20 En el siguiente debate, el procedimiento de la invención se ejemplifica mediante el uso de azúcares modificados que tiene un polímero soluble en agua unido a ellos. El centro del debate se proporciona con fines ilustrativos. Los expertos apreciarán que el debate es igualmente relevante para las realizaciones en las que el azúcar modificado porta un resto terapéutico, biomolécula o similar.

25 Una realización ejemplar de la invención en la que un residuo de carbohidrato se "recorta" antes de la adición del azúcar modificado se expone en la Figura 13, que expone un esquema en el que la manosa alta se recorta a la estructura biantenal de primera generación. Un azúcar modificado porta un polímero hidrosoluble se conjuga con uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el "recorte". En un ejemplo, se añade un polímero soluble en agua a través de un resto de GlcNAc conjugado al polímero soluble en agua. La GlcNAc modificada está unida a uno o ambos residuos de manosa terminales de la estructura biantenal. Como alternativa, se puede añadir una
30 GlcNAc no modificada a uno o los dos extremos de las especies ramificadas.

En otra realización ejemplar, se añade un polímero soluble en agua a uno o los dos residuos terminales de manosa de la estructura biantenal mediante un azúcar modificado que tiene un residuo galactosa, que está conjugado con un residuo GlcNAc añadido a los residuos de manosa terminales. Como alternativa, se puede añadir una Gal no modificada a uno o los dos extremos de los residuos GlcNAc.

35 En otro ejemplo más, se añade un polímero soluble en agua sobre un residuo Gal usando un ácido siálico modificado.

Otra realización ejemplar se expone en la Figura 14, que muestra un esquema similar al mostrado en la Figura 13 en el que la estructura de alta manosa se "recorta" a la manosa de la cual sale la estructura biantenal. En un ejemplo, se añade un polímero soluble en agua a través de una GlcNAc modificada con el polímero. Como alternativa, a la manosa se añade una GlcNAc no modificada, seguida de una Gal con un polímero soluble en agua unido. En otra
40 realización más, residuos de GlcNAc y Gal no modificados se añaden de forma secuencial a la manosa, seguidos de un resto de ácido siálico modificado con un polímero soluble en agua.

La Figura 15 expone una realización ejemplar adicional usando un esquema similar al mostrado en la Figura 13 en el que la estructura de alta manosa se "recorta" a la GlcNAc a la cual está unida la primera manosa. La GlcNAc está conjugada a un residuo de Gal portador de un polímero soluble en agua. Como alternativa, a la GlcNAc, se añade una Gal no modificada, seguida de la adición de un ácido siálico modificado con un azúcar soluble en agua. En otro ejemplo más, la GlcNAc terminal se conjuga con Gal y la GlcNAc se fucosila después con una fucosa modificada portadora de un polímero soluble en agua.

La Figura 16 es un esquema similar al mostrado en la Figura 13 en el que la estructura de alta manosa se recorta "a la primera GlcNAc unida a la Asn del péptido. En un ejemplo, la GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc) está conjugada con una GlcNAc portadora de un polímero soluble en agua.
50

En otro ejemplo, la GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc) está modificada con Gal, que es portadora de un polímero soluble en agua. En otra realización más, la GlcNAc está modificada con Gal, seguida de conjugación al Gal de un ácido siálico modificado con polímero soluble en agua.

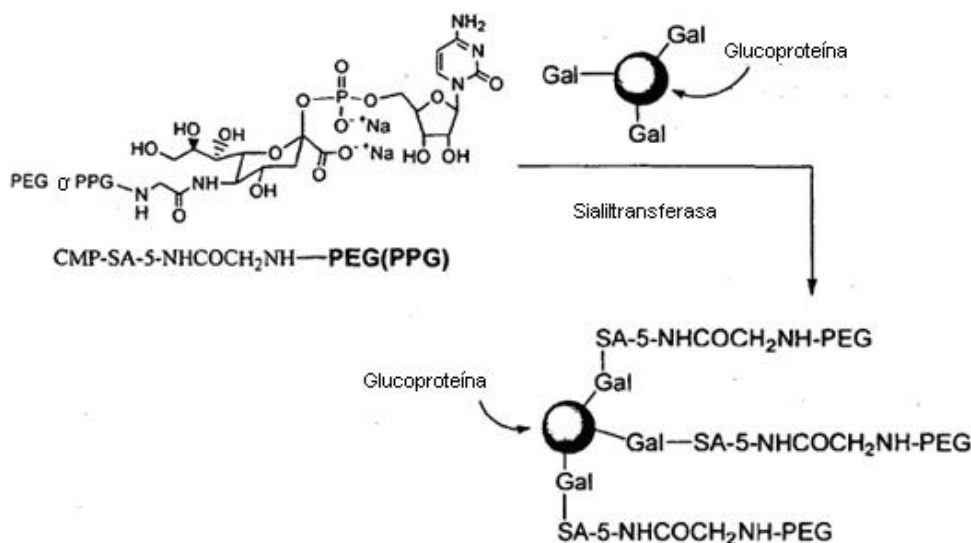
55 Otras realizaciones ejemplares se exponen en las Figuras 17-21. Una ilustración de la matriz de los tipos de reacción con los que la presente invención se puede poner en práctica se proporciona en cada una de las figuras

5 mencionadas anteriormente.

Los ejemplos expuestos anteriormente proporcionan una ilustración de la potencia de los procedimientos expuestos en el presente documento. Usando los procedimientos de la invención es posible "recortar" y crear un residuo de carbohidrato de sustancialmente cualquier estructura deseada. El azúcar modificado se puede añadir a los extremos del resto de carbohidrato como se ha indicado anteriormente o puede ser un intermedio entre el núcleo peptídico y el extremo del carbohidrato.

10 En una realización ejemplar se elimina un ácido siálico existente de un glicopéptido usando una sialidasa, de modo que desenmascara todos o casi todos los residuos de galactosilo subyacentes. Como alternativa, un péptido o glicopéptido se marca con residuos de galactosa o un residuo de oligosacáridos que termina en una unidad de galactosa. Tras la exposición o la adición de los residuos de galactosa se usa una sialiltransferasa adecuada para añadir un ácido siálico modificado. El enfoque se resume en el Esquema 12.

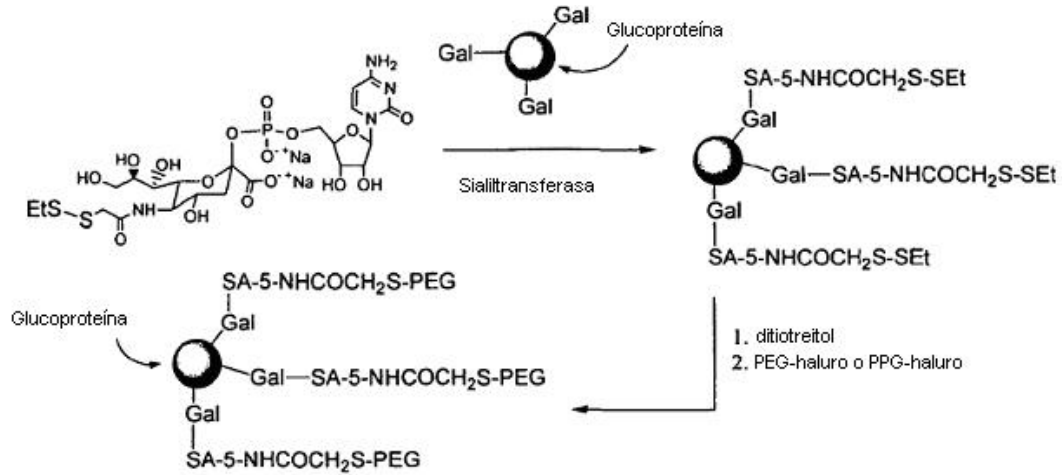
Esquema 12



15 En otro abordaje adicional, resumido en el Esquema 13, una funcionalidad reactiva enmascarada está presente en el ácido siálico. El grupo reactivo enmascarado no está, preferentemente, afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al péptido. Tras la unión covalente del ácido siálico modificado al péptido, el enmascaramiento se elimina y el péptido se conjuga con un agente tal como PEG, PPG, un resto terapéutico, biomolécula u otro agente. El agente se conjuga con el péptido de un modo específico mediante su reacción con el grupo reactivo no enmascarado del residuo de azúcar modificado.

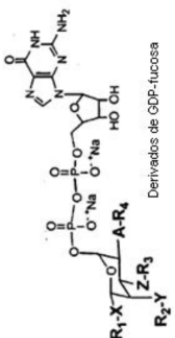
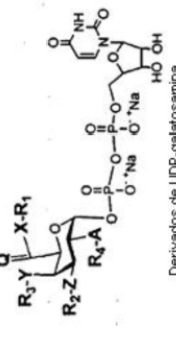
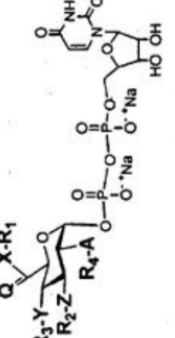
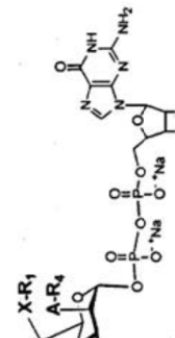
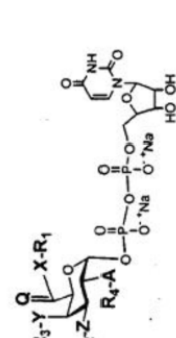
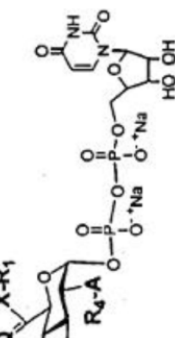
20

Esquema 13



Cualquier azúcar modificado se puede usar con su glicosiltransferasa adecuada dependiendo de los azúcares terminales de las cadenas laterales del oligosacáridos del glicopéptido (Tabla 3). Como se ha tratado anteriormente, el azúcar terminal del glicopéptido requerido para la introducción de la estructura PEGilada o PPGilada se puede introducir de forma natural durante la expresión o se puede producir después de la expresión usando la o las glicosidasas, glicosiltransferasas o mezcla de glicosidasas y glicosiltransferasas adecuadas.

Tabla 3

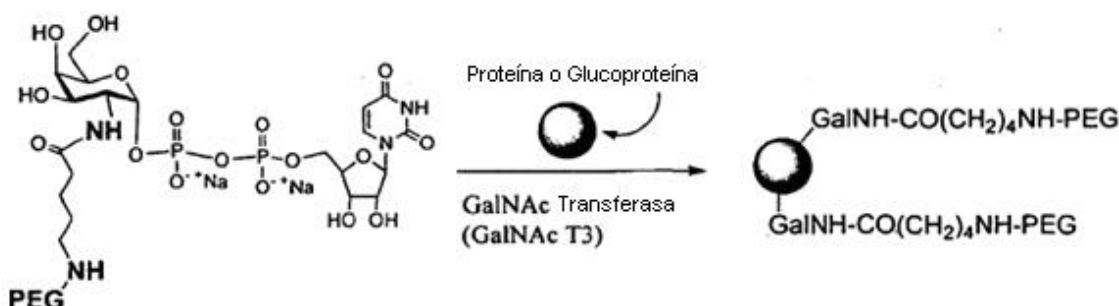
 Derivados de GDP-ribose	 Derivados de UDP-galactosa (cuando A = NH, R₄ puede ser acetilo)	 Derivados de UDP-glucosamina (cuando A = NH, R₄ puede ser acetilo)
 Derivados de GDP-manosa	 Derivados de UDP-galactosa	 Derivados de UDP-glucosa
X = O, NH, S, CH₂, N-(R₁₋₅) Y = X; Z = X; A = X; B = X. Q = H₂, O, S, NH, N-R. R, R₁₋₄ = H, Ligador-M, M M = Ligando de interés	Ligando de interés = acil-PEG, acil-PPG, alquil-PEG, acil-alquil-PEG, acil-alquil-PEG, carbamoil-PEG, carbamoil-PPG, PEG, PPG, acil-aril-PEG, acil-aril-PPG, aril-PEG, aril-PPG, Manosa-6-fosfato, heparina, heparán, Slex, manosa, FGF, VFGF, proteína, condroitina, queratán, albúmina, integrinas, péptidos etc.	Ligando de interés = acil-PEG, acil-PPG, alquil-PEG, acil-alquil-PEG, acil-alquil-PEG, carbamoil-PEG, carbamoil-PPG, PEG, PPG, acil-aril-PEG, acil-aril-PPG, aril-PEG, aril-PPG, Manosa-6-fosfato, heparina, heparán, Slex, manosa, FGF, VFGF, proteína, condroitina, queratán, albúmina, integrinas, péptidos etc.

En una realización ejemplar adicional, la UDP-galactosa-PEG reacciona con β 1,4-galactosiltransferasa de leche bovina de modo que transfiere la galactosa modificada a la estructura de N-acetilglucosamina terminal adecuada. Los residuos de GlcNAc terminales sobre el glicopéptido se pueden producir durante la expresión, como puede pasar en los sistemas de expresión de mamíferos, insectos, plantas u hongos, pero también se pueden producir tratando el glicopéptido con una sialidasa y/o glicosidasa y/o glicosiltransferasa, según sea necesario.

En otra realización ejemplar se usa una GlcNAc transferasa, como GnTI-V, para transferir PEGilada-Glc-Nc a un residuo de manosa en un glicopéptido. En otra realización de ejemplo adicional, las estructuras de glicano unidas a N y/o unidas a O se eliminan enzimáticamente de un glicopéptido para exponer un aminoácido o un residuo de glicosilo terminal que después de conjuga con el azúcar modificado. Por ejemplo, se usa una endoglucanasa para eliminar las estructuras unidas a N de un glicopéptido para exponer una GlcNAc terminal como GlcNAc unida a Asn en el glicopéptido. UDP-Gal-PEG y la galactosiltransferasa adecuada se usan para introducir la funcionalidad galactosa-PEG –PPG en la GlcNAc expuesta.

En una realización alternativa, el azúcar modificado se añade directamente al armazón peptídico usando una glicosiltransferasa conocida para transferir residuos de azúcar al armazón peptídico. Esta realización de ejemplo se expone en el Esquema 14. Las glicosiltransferasas ejemplares útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limita a, GalNAc transferasas (Gal-NAc T1-14), GlcNAc transferasas, fucosiltransferasas, glicosiltransferasas, xilosiltransferasas, manosiltransferasas y similares. El uso de este abordaje permite la adición directa de azúcares modificados a péptidos que carecen de cualquier carbohidrato o, como alternativa, sobre los glicopéptidos existentes. En ambos casos, la adición del azúcar modificado se produce en posiciones específicas en el armazón peptídico como se define mediante la especificidad de sustrato de la glicosiltransferasa y no de un modo aleatorio como se produce durante la modificación del armazón peptídico de una proteína usando procedimientos químicos. Se puede introducir una matriz de agentes en las proteínas o glicopéptidos que carecen de la secuencia peptídica del sustrato de la glicosiltransferasa sometiendo a ingeniería la secuencia de aminoácidos adecuada en la cadena peptídica.

Esquema 14



En cada una de las realizaciones ejemplares expuestas anteriormente, se puede usar una o más etapas adicionales de modificación química o enzimática tras la conjugación del azúcar modificado al péptido. En una realización ejemplar se usa una enzima (p. ej., la fucosiltransferasa) para colgar una unidad de glicosilo (p. ej., fucosa) sobre el azúcar modificado terminal unido al péptido. En otro ejemplo se usa una reacción enzimática para "proteger" sitios a los que el azúcar modificado no se ha podido conjugar. Como alternativa se usa una reacción química para alterar la estructura del azúcar modificado conjugado. Por ejemplo, el azúcar modificado conjugado se hace reaccionar con agentes que estabilizan o desestabilizan su unión con el componente peptídico al que está unido el azúcar modificado. En otro ejemplo, un componente del azúcar modificado se desprotege tras su conjugación con el péptido. Un experto apreciará que hay una serie de procedimientos enzimáticos y químicos que son útiles en los procedimientos de la invención en una etapa posterior a la conjugación del azúcar modificado con el péptido. La elaboración posterior del conjugado azúcar modificado – péptido entra dentro del alcance de la invención.

Direccionamiento peptídico con manosa 6-fosfato

En una realización ejemplar, el péptido se deriva con al menos un resto de manosa-6-fosfato. El resto de manosa-6-fosfato dirige el péptido a un lisosoma de una célula y es útil para, por ejemplo, dirigir proteínas terapéuticas a lisosomas para el tratamiento de las enfermedades del almacenamiento en lisosomas.

Las enfermedades del almacenamiento en lisosomas son un grupo de más de 40 trastornos que son el resultado de defectos en genes que codifican enzimas que degradan los productos de deshecho de glicolípidos o polisacáridos dentro de los lisosomas de las células. Los productos enzimáticos, por ejemplo azúcares y lípidos se reciclan después en productos nuevos. Cada uno de estos trastornos es el resultado de un rasgo recesivo autosómico hereditario o ligado al cromosoma X que afecta a los niveles de enzimas en el lisosoma. En general no hay una actividad biológica ni funcional de las enzimas afectadas en las células y tejidos de los individuos afectados. La

Tabla 4 proporciona una lista de las enfermedades del almacenamiento representativas y del defecto enzimático asociado con las enfermedades. En estas enfermedades, la deficiencia de la función enzimática crea un depósito sistémico progresivo de sustratos de lípidos o carbohidratos en los lisosomas de las células del cuerpo, lo que en última instancia causa pérdida de función orgánica y la muerte. La etiología genética, las manifestaciones clínicas, la biología molecular y la posibilidad de las enfermedades de almacenamiento lisosómico se detallan en Scriver y col., eds., THE METABOLIC AND MOLECULAR BASIS OF INHERITED DISEASE, 7.sup. Ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995).

Tabla 4: Enfermedades del almacenamiento lisosómico y defectos enzimáticos asociados

Enfermedad	Defecto enzimático
Enfermedad de Pompe	α -glucosidasa ácida (maltasa ácida)
MPSI* (enfermedad de Hurler)	α -L-iduronidasa
MPSII (enfermedad de Hunter)	iduronato sulfatasa
MPSIII (Sanfilippo)	heparán N-sulfatasa
MPS IV (Morquio A)	galactosa-6-sulfatasa
MPS IV (Morquio B)	β -galactosidasa ácida
MPS VII (enfermedad de Sly)	β -glucuronidasa
Enfermedad de células I	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa
Enfermedad de Schindler	α -N-acetilgalactosaminidasa (α -galactosidasa B)
Enfermedad de Wolman	Lipasa ácida
Enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol	Lipasa ácida
Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida lisosomal
Enfermedad de Niemann-Pick	esfingomielinasa ácida
Enfermedad de Gaucher	glucocerebrosidasa
Enfermedad de Krabbe	galactosilceramidasa
Enfermedad de Fabry	α -galactosidasa A
GM1 gangliosidosis	β -galactosidasa ácida
Galactosialidosis	β -galactosidasa y neuraminidasa
Enfermedad de Tay-Sach	hexosaminidasa A.
Enfermedad de Sandhoff	hexosaminidasa A y B

*MPS = mucopolisacaridosis

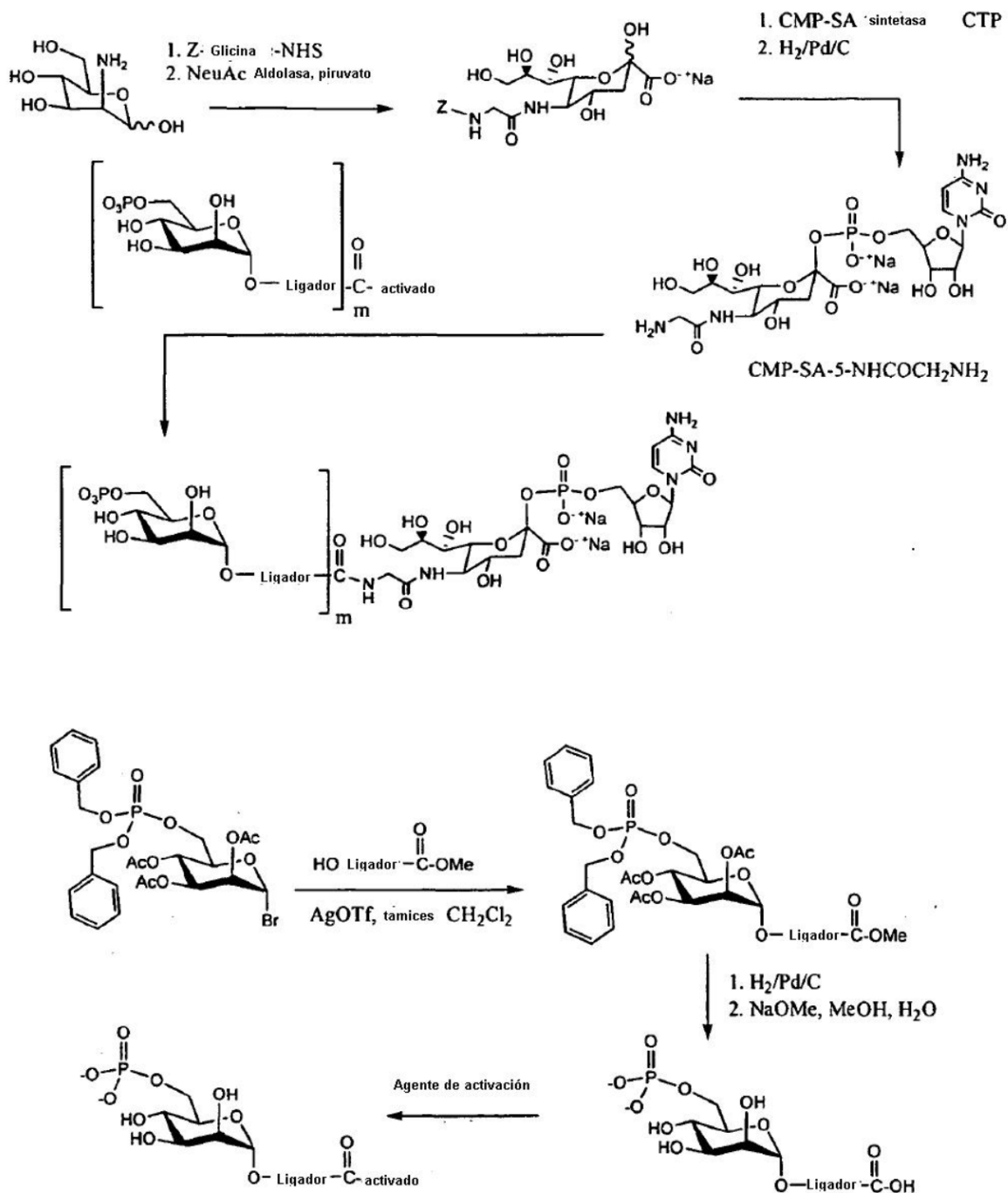
De Duve sugirió primero que la sustitución de la enzima lisosómica ausente con una enzima exógena biológicamente activa podría ser un abordaje viable al tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico (De Duve, Fed. Proc. 23: 1045 (1964)). Desde entonces, en varios estudios se ha sugerido que el tratamiento de sustitución enzimático puede ser beneficioso para tratar varias enfermedades de almacenamiento lisosómico. El mejor éxito se ha mostrado en individuos con la enfermedad de Gaucher de tipo 1, que han sido tratados con la enzima exógena (β -glucocerebrosidasa), preparada a partir de placenta (Ceredase™) o, más recientemente, de forma recombinante (Cerezyme™). Se ha sugerido que la sustitución enzimática puede también ser beneficiosa para tratar la enfermedad de Fabry, así como otras enfermedades de almacenamiento lisosómico. Véase, por ejemplo, Dawson y col., Ped. Res. 7(8): 684-690 (1973) (*in vitro*) y Mapes y col. Science 169: 987 (1970) (*in vivo*). Se han notificado ensayos clínicos de tratamiento de sustitución enzimática para pacientes de Fabry usando perfusiones de plasma normal (Mapes y col., Science 169: 987-989 (1970)), α -galactosidasa A purificada de placenta (Brady y col., N Eng. J. Med. 279: 1163 (1973)); o α -galactosidasa A purificada de bazo o plasma (Desnick y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76: 5326-5330 (1979)) y han demostrado la eficacia bioquímica de la sustitución enzimática directa para la enfermedad de Fabry. Estos estudios indican el potencial de eliminación, o de reducir significativamente, el almacenamiento patológico de glicolípidos mediante la repetida sustitución de la enzima. Por ejemplo, en un estudio (Desnick y col., ant.), la inyección intravenosa de la enzima purificada tuvo como resultado una reducción temporal de los niveles de plasma del sustrato lipídico almacenado, globotriasilceramida.

En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de procedimientos para proporcionar cantidades suficientes de enzimas lisosomales biológicamente activas, tales como la α -galactosidasa a, a las células deficientes en la misma. Recientemente se han intentado abordajes recombinantes para abordar estas necesidades, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº. 5.658.567; 5.580.757; Bishop y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 83: 4859-4863 (1986); Medin y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 93: 7917-7922 (1996); Novo, F. J., Gene Therapy. 4: 488-492 (1997); Ohshima y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 94: 2540-2544 (1997); y Sugimoto y col., Human Gene Therapy 6: 905-915, (1995). A través de la dirección mediada por la manosa-6-fosfato de péptidos terapéuticos a los lisosomas, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para liberar cantidades suficientes de péptidos

lisosomales biológicamente activos a las células deficientes.

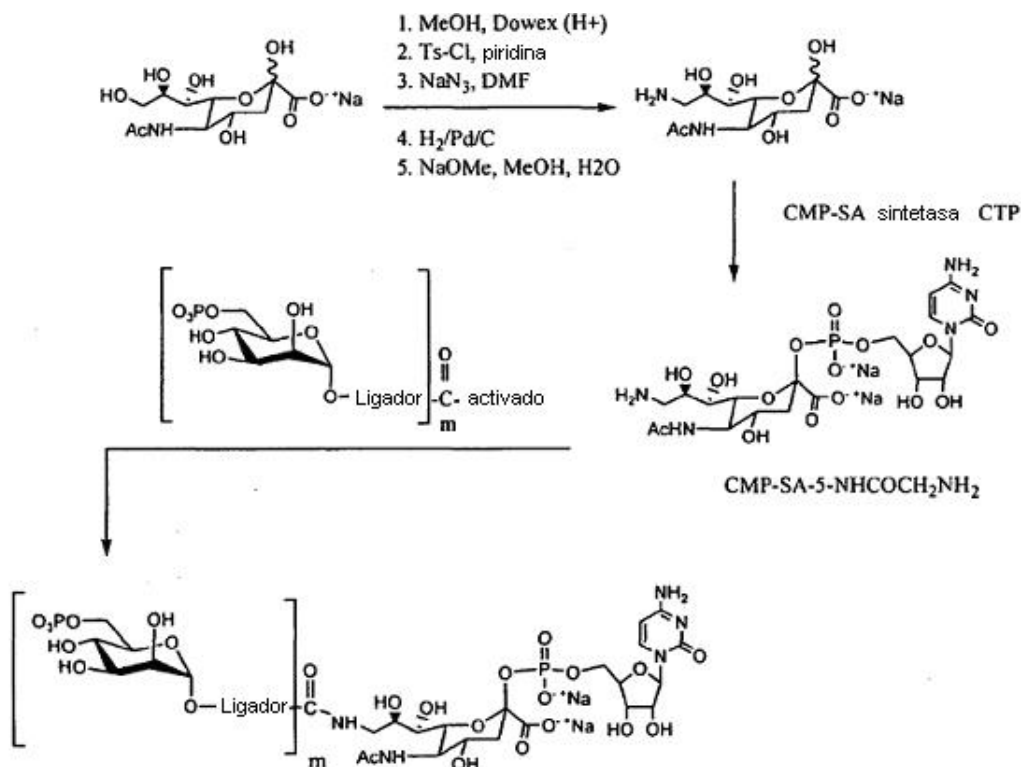
- Por tanto, en una realización ejemplar, la presente invención proporciona un péptido de acuerdo con la Tabla 6 que se obtiene con manosa-6-fosfato (Figura 23 y Figura 24). El péptido se puede preparar de forma recombinante o química. Además, el péptido puede tener la secuencia natural completa o puede estar modificado por, por ejemplo, truncamiento, extensión o puede incluir sustituciones o deleciones. Ejemplos de proteínas que se remodelan usando un procedimiento de la presente invención incluyen la glucocerebrosidasa, la β -glucosidasa, la α -galactosidasa A, la α -glucosidasa ácida (maltasa ácida). Péptidos modificados representativos que están en uso clínico incluyen Ceredase™, Cerezyme™, y Fabryzyme™. Un grupo glicosilo en péptidos modificados y clínicamente relevantes también se puede alterar usando un procedimiento de la invención. La manosa-6-fosfato está unida al péptido a través de un grupo de unión a glicosilo. En una realización ejemplar, el grupo de unión a glicosilo deriva de ácido siálico. Ejemplos de grupos de unión a glicosilo derivados de ácido siálico se exponen en la Tabla 2, en los que uno o más de los restos "R" son manosa-6-fosfato o un grupo espaciador que tiene uno o más restos de manosa-6-fosfato unidos al mismo. El resto de ácido siálico modificado es, preferentemente, e residuo terminal de un oligosacáridos unido a la superficie del péptido (Figura 25).
- Además de la manosa-6-fosfato, los péptidos de la invención pueden derivatizarse adicionalmente con un resto tal como un polímero soluble en agua, un resto terapéutico o un resto de direccionamiento adicional. Los procedimientos para unir estos y otros grupos se indican en el presente documento. En una realización ejemplar, el grupo distinto a manosa-6-fosfato se une al péptido a través de un derivado de ácido siálico derivado de acuerdo con la Tabla 2, en la que uno o más de los restos "R" son un grupo distinto a manosa-6-fosfato.
- En una realización ejemplar, se prepara un resto de ácido siálico modificado con una rama ligadora a base de glicina protegida con Cbz. El correspondiente azúcar del nucleótido se prepara y el grupo Cbz se elimina mediante hidrogenación catalítica. El azúcar del nucleótido resultante tiene una amina reactiva disponible que se pone en contacto con un derivado de manosa-6-fosfato activado, proporcionando un azúcar del nucleótido derivado de manosa-6-fosfato que es útil en la práctica de los procedimientos de la invención.
- Como se muestra en el siguiente esquema (esquema 15), un derivado de manosa-6-fosfato activado ejemplar se forma convirtiendo un fosfotriéster protegido con 2-bromo-bencilo en el triflato correspondiente, in situ, y haciendo reaccionar el triflato con un ligador que tiene un resto que contiene oxígeno reactivo, formando un enlace éter entre el azúcar y el ligador. Los grupos protectores bencilo se eliminan mediante hidrogenación catalítica y el éster metílico del ligador se hidroliza, proporcionando el correspondiente ácido carboxílico. El ácido carboxílico se activa por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Un procedimiento de activación ejemplar reside en la conversión del ácido carboxílico en el éster N-hidroxisuccinimida.

Esquema 15



En otra realización ejemplar, como se muestra en el siguiente esquema (Esquema 16), un ácido siálico N-acetilado se convierte en una amina mediante manipulación del resto piruvilo. Por tanto, el hidroxilo primario se convierte en un éster sulfonato y reacciona con azida sódica. La azida se reduce catalíticamente en la correspondiente amina. El azúcar se convierte después en su análogo nucleotídico y se acopla, a través del grupo amina, a la manosa-6-fosfato derivada de la rama ligadora preparada como se ha tratado anteriormente.

Esquema 16



Los péptidos útiles para tratar enfermedades del almacenamiento lisosómico se pueden obtener con otros restos de direccionamiento, incluidos, entre otros, transferina (para liberar el péptido a través de la barrera hematoencefálica y a los endosomas), carnitina (para liberar el péptido en las células musculares) y fosfonatos, por ejemplo bisfosfonatos (para dirigir el péptido al hueso y a otros tejidos calciferosos). El reto dirigido y el péptido terapéutico se conjugan por cualquier procedimiento tratado en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica.

En una realización ejemplar, el agente direccionador y el péptido terapéutico se acoplan a través de un resto ligador. En esta realización, al menos uno del péptido terapéutico o el agente direccionador se acopla al resto ligador a través de un grupo de unión a glicosilo de acuerdo con el procedimiento de la invención. En una realización ejemplar, el resto ligador incluye un poli(éter) tal como poli(etilenglicol). En otra realización ejemplar, el resto ligador incluye al menos un enlace que se degrada in vivo, liberando el péptido terapéutico del agente direccionador, a lo que sigue la liberación del conjugado en el tejido o región del cuerpo al que se ha dirigido.

En otra realización ejemplar más, la distribución in vivo del resto terapéutico se altera alternando una glicoforma del resto terapéutico sin conjugar el péptido terapéutico con un resto direccionador. Por ejemplo, el péptido terapéutico se puede alejar de la captación por el sistema reticuloendotelial protegiendo un resto de galactosa terminal de un grupo glicosilo con ácido siálico (o un derivado del mismo) (Figuras 23 y 26). La sialización para cubrir la Gal terminal evita la captación del péptido por los receptores de la asialoglicoproteína hepática (ASGP) y puede extender la semivida del péptido en comparación con los péptidos que solo tienen cadenas de glicano complejas, en ausencia de sialilación.

II. Péptidos /Glicopéptidos de la invención

En una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende múltiples copias de un solo péptido que tiene un núcleo de trisacárido elemental como la estructura de glicano primaria unida al mismo. En realizaciones preferidas, el péptido puede ser una molécula terapéutica. La forma natural del péptido puede comprender glicanos unidos a N complejos o puede ser un glicano rico en manosa. El péptido puede ser un péptido de mamífero y es, preferentemente, un péptido de ser humano. En algunas realizaciones, el péptido se selecciona del grupo que consiste en una inmunoglobulina, eritropoyetina, péptido activador de tipo tisular y otros (véase la Figura 1).

Péptidos ejemplares cuyos glicanos se pueden remodelar usando los procedimientos de la divulgación se indican en la Figura 1.

Tabla 5. Péptidos preferidos para remodelado de glicano

<u>Hormonas y factores de crecimiento</u>	<u>Receptores y receptores quiméricos</u>
G-CSF	CD4
GM-CSF	Receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R)
TPO	Fusión TNF-R:IgG Fc
EPO	Alfa-CD20
Variantes de EPO	PSGL-1
FSH	Complemento
HGH	GlyCAM o su quimera
Insulina	N-CAM o su quimera
alfa-TNF	<u>Anticuerpos Monoclonales (Inmunoglobulinas)</u>
Leptina	MAb-anti-RSV
<u>Enzimas e inhibidores</u>	MAb-anti-receptor de IL-2
TPA	MAb-anti-CEA
Variantes de TPA	MAb-anti-glicoproteína IIb/IIIa
Uroquinasa	MAb-anti-EGF
Factores VII, VIII, IX, X	MAb-anti-Her2
DNasa	MAb-CD20
Glucocerebrosidasa	MAb-alfa-CD3
Hirudina	MAb-TNF α
α 1 antitripsina (inhibidor de α 1 proteasa)	MAb-CD4
	MAb-PSGL-1
Antitrombina III	Mab-anti proteína F del virus respiratorio sincitial
α -glucosidasa ácida (maltasa ácida)	
α galactosidasa A	<u>Células</u>
α -L-iduronidasa	Glóbulos rojos
Uroquinasa	Glóbulos blancos (p. ej., linfocitos T, linfocitos B,
Citoquinas y citoquinas quiméricas	células dendríticas, macrófagos, células NK,
Interleucina-1 (IL-1), 1B, 2, 3, 4	neutrófilos, monocitos)
Interferón-alfa (IFN-alfa)	Células madre
IFN-alfa-2b	Otras
IFN-beta	Antígeno de superficie de la hepatitis B (HbsAg)
IFN-gamma	
Toxina diftérica quimérica-IL-2	

Tabla 6. Péptidos más preferidos para remodelado de glicano

Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)	Interleucina-2 (IL-2)
Interferón α	Factor VIII
Interferón β	hrDNasa
Factor de coagulación VII	Insulina
Factor de coagulación IX	Proteína de superficie de la Hepatitis B (HbsAg)
Hormona estimuladora de los folículos(FSH)	Hormona de crecimiento humana (HGH)
Eritropoyetina (EPO)	Uroquinasa
Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)	Fusión del receptor de TN -IgG Fc (Enbrel™)
Interferón γ	MAB-Her-2 (Herceptin™)
Inhibidor de la α_1 proteasa (α_1 antitripsina)	MAB-proteína F del virus sincitial respiratorio (Synagis™)
Activador del plasminógeno de tipo tisular (TPA)	MAB-CD20 (Rituxan™)
Glucocerebrosidasa (Cerezyme™)	MAB-TNF α (Remicade™)
	MAB-Glicoproteína IIb/IIIa (Reopro™)

Una lista más detallada de péptidos útiles en la divulgación y su fuente se proporciona en la Figura 1.

5 Otros péptidos ejemplares que se modifican mediante los procedimientos de la divulgación incluyen miembros de la familia de las inmunoglobulinas (p. ej., anticuerpos, moléculas del MHC, receptores de linfocitos T, y similares), receptores intercelulares (p. ej., integrinas, receptores de hormonas o factores de crecimiento y similares), lectinas y citoquinas (p. ej., interleucinas). Ejemplos adicionales incluyen el activador del plasminógeno de tipo tisular (TPA), renina, factores de coagulación como el factor VIII y el factor IX, bombesina, trombina, factor de crecimiento hematopoyético, factores estimulantes de las colonias, antígenos virales, péptidos del complemento, α_1 -antitripsina, eritropoyetina, ligando 1 del glicopéptido de la selectina P (PSGL-1), factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos, anti-trombina III, interleucinas, interferones, péptidos A y C, fibrinógeno, herceptin™, leptina, glicosidasas, entre muchos otros. La lista de péptidos es un ejemplo y no debe considerarse exclusiva. En su lugar, es evidente a partir de la divulgación proporcionada en el presente documento que los procedimientos de la invención son aplicables a cualquier péptido con una estructura de glicano deseada.

15 Los procedimientos de la divulgación también son útiles para modificar péptidos quiméricos, incluidos péptidos quiméricos que incluyen un resto derivado de una inmunoglobulina, tal como IgG.

20 Los péptidos modificados por los procedimientos de la divulgación pueden ser péptidos sintéticos o silvestres o pueden ser péptidos mutados, producidos mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida a sitio. Normalmente, la glicosilación de péptidos está unida a N o unida a O. Un enlace a N ejemplar es la unión del azúcar modificado a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto hidrocaburo a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un péptido crea un posible sitio de glicosilación. Como se describe en el presente documento, glicosilación unida a O se refiere a la unión de un azúcar (p. ej., N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa o xilosa) a una cadena lateral hidroxil de un ácido hidroxilamino, preferentemente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

30 Varias realizaciones ejemplares de la divulgación se tratan más adelante. Aunque varias de estas realizaciones usan péptidos que tienen nombres comerciales y otros péptidos específicos como péptido ejemplar, estos ejemplos no están confinados a ningún péptido específico. Las realizaciones ejemplares siguientes se contemplan que incluyen todos los equivalentes peptídicos y variantes de cualquier péptido. Dichas variantes incluyen, pero no se limita a, añadir y delecionar sitios de glicosilación unida a N y unida a O y las proteínas de fusión con sitios de glicosilación añadidos. Un experto en la técnica apreciará que las realizaciones siguientes y los procedimientos básicos divulgados en las mismas se pueden aplicar a muchos péptidos con igual éxito.

35

La invención proporciona procedimientos para la modificación de la hormona estimuladora del Folículo (FSH). Las Figuras 32A a 32J presentan algunos ejemplos. En la Figura 32 B, FSH se expresa en un sistema de mamífero y se modifica mediante el tratamiento de la sialidasa para acortar los restos de ácido siálico de los extremos, seguido por PEGilación utilizando ST3Gal3 y un donante de ácido siálico-PEG. En la Figura 32C, la FSH expresada en células de mamífero se trata en primer lugar con sialidasa para acortar los restos de ácido siálico, a continuación se PEGila utilizando ST3Gal3 y un donante de ácido siálico-PEG, y a continuación se sialila utilizando ST3Gal3 y un donante de ácido siálico. La Figura 32D proporciona un esquema para la modificación de la FSH expresada en un sistema de mamífero. El polipéptido se trata con sialidasa y galactosidasa para acortar sus restos de ácido siálico y galactosa, a continuación se galactosila utilizando un donante de galactosa y una galactosiltransferasa, y a continuación se PEGila utilizando ST3Gal3 y un donante de ácido siálico-PEG. En la Figura 32E, la FSH expresada en células de mamífero se modifica en el siguiente procedimiento. La FSH se trata en primer lugar con sialidasa para acortar los restos de ácido siálico, a continuación se PEGila utilizando ST3Gal3 y un donante de ácido siálico-PEG, y a continuación se sialila utilizando ST3Gal3 y un donante de ácido siálico. La Figura 32F ofrece otro ejemplo de modificación de la FSH producida por células de mamífero. El polipéptido se modifica protegiendo los extremos de los restos de los extremos adecuados con un donante de ácido siálico que está modificado con ácido levulínico, añadiendo una cetona reactiva al donante de ácido siálico. Tras la adición a un resto glicosilo del péptido, la cetona se derivatiza con un resto tal como hidrazina- PEG o amina- PEG. En la Figura 32G, la FSH expresada en un sistema de mamífero se modifica en otro procedimiento: el polipéptido se remodela con la adición de ácido siálico utilizando un donante de ácido siálico y una α 2,8-sialiltransferasa. En la Figura 32H, la FSH se expresa en células de insecto y se modifica en el siguiente procedimiento: Se añade en primer lugar N-acetilglucosamina a la FSH utilizando un donante de N-acetilglucosamina adecuado y uno o más de GnT I, II, IV, y V; a continuación, la FSH se PEGila utilizando un donante de PEG-galactosa y una galactosiltransferasa. La Figura 32I representa gráficamente un esquema de modificación de la FSH producida por levadura. De acuerdo con este esquema, la FSH se trata en primer lugar con endoglucanasa para acortar los grupos glicosilo, se galactosila utilizando un donante de galactosa y una galactosiltransferasa, y a continuación se PEGila con ST3Gal3 y un donante de ácido siálico-PEG. En la Figura 32J, la FSH expresada por células de mamífero se pone en contacto en primer lugar con ST3Gal3 y dos restos de ácido siálico reactivos mediante un enlazador, de tal manera que el polipéptido se une a un ácido siálico reactivo mediante el enlazador y un segundo resto de ácido siálico. El polipéptido se pone en contacto a continuación con ST3Gal1 y gonadotropina coriónica (CG) desialilada producida en CHO y de esta manera queda unida con la CG mediante el segundo resto de ácido siálico. A continuación, la FSH se sialila utilizando un donante de ácido siálico y ST3Gal3 y/o ST3Gal1.

A. Creación o eliminación de sitios de glicosilación unidos a N

La presente invención contempla el uso de péptidos en los que el(los) sitio(s) de la(s) cadena(s) de glicano del péptido se ha(n) alterado con respecto al péptido natural. Normalmente, las cadenas de glicano unidas a N se unen a la estructura del péptido primario en los restos de la asparagina en los que el resto de la asparagina está comprendido en una secuencia de aminoácidos que se reconoce por una glicosiltransferasa unida a membrana en el retículo endoplásmico (ER). Normalmente, el sitio de reconocimiento en la estructura peptídica primaria es la secuencia asparagina-X-serina/treonina en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico. Aunque este sitio de reconocimiento es típico, la invención abarca además péptidos que tienen cadenas de glicano unidas a N y otros sitios de reconocimiento en los que se añaden cadenas unidas a N utilizando glicosiltransferasas naturales o recombinantes.

Puesto que se conoce el sitio de reconocimiento para la glicosilación unida a N de un péptido, está comprendido en el alcance del conocimiento de las personas expertas en la técnica crear secuencias peptídicas primarias mutadas en las que se elimina un sitio natural de reconocimiento de la glicosilación unido a N, o de forma alternativa o adicional, se crean uno o más sitios de reconocimiento de la N-glicosilación adicionales. De manera más sencilla, se puede eliminar un resto de asparagina procedente de la secuencia primaria del péptido, eliminando de esta forma el sitio de unión de un glicano, eliminando de esta manera un glicano procedente del péptido maduro. Por ejemplo, se puede modificar con ingeniería genética un sitio de reconocimiento natural con la secuencia de asparagina-serina-serina para conseguir la secuencia leucina-serina-serina, eliminando de esta manera un sitio de glicosilación unido a N en esta posición.

Además, se puede eliminar un sitio de glicosilación unido a N alterando los restos del sitio de reconocimiento de tal manera que incluso aunque el resto de asparagina esté presente, están ausentes uno o más de los restos de reconocimiento adicionales. Por ejemplo, una secuencia natural de asparagina-serina-serina puede estar mutada a asparagina-serina-lisina, eliminando de esta manera un sitio de N-glicosilación en esta posición. En el caso de los sitios de glicosilación unidos a N que comprenden restos diferentes de los sitios de reconocimiento típicos descritos anteriormente, el técnico experto puede determinar la secuencia y los restos requeridos para el reconocimiento por la glicosiltransferasa adecuada, y a continuación mutar al menos un resto de tal manera que la glicosiltransferasa adecuada ya no reconozca este sitio. En otras palabras, está comprendido en el conocimiento del experto en la técnica manipular la secuencia primaria de un péptido de tal manera que tanto se creen como se eliminen sitios de glicosilación, o ambos, generando de esta forma un péptido que tiene un modelo de glicosilación alterado. La invención no debe considerarse por tanto como limitada a cualquier secuencia peptídica primaria proporcionada en el presente documento como la única secuencia para la remodelación del glicano, sino en su lugar, debe tomarse de forma que incluya cualquiera y todas las secuencias peptídicas adecuadas para la remodelación del glicano.

Para crear un péptido mutante, la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia primaria del péptido se altera de tal manera que los codones naturales que codifican los restos de aminoácidos naturales se mutan para generar un codón que codifica otro resto de aminoácido. Son comunes en la materia las técnicas para alterar la secuencia del ácido nucleico y se describen, por ejemplo, en cualquier manual de biología molecular bien conocido.

Además, el ácido nucleico que codifica una estructura peptídica primaria se puede sintetizar *in vitro*, utilizando técnicas normalizadas. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico se puede sintetizar en una "máquina génica" utilizando protocolos tales como el procedimiento de la fosforamidita. Si se requiere sintetizar químicamente ADN bicatenario para una aplicación tal como la síntesis de un ácido nucleico o de uno de sus fragmentos, entonces cada hebra complementaria se sintetiza por separado. La producción de ácidos nucleicos cortos (60 a 80 pares de bases) es técnicamente sencilla y se puede llevar a cabo sintetizando las hebras complementarias y a continuación hibridándolas. Para la producción de ácidos nucleicos más largos (> 300 pares de bases), se pueden requerir estrategias especiales, debido a que la eficacia del acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis química del ADN rara vez es del 100%. Para superar este problema, se ensamblan genes sintéticos (bicatenarios) en forma modular a partir de fragmentos monocatenarios que tienen de 20 a 100 nucleótidos de longitud. Para revisiones sobre las síntesis de nucleótidos, véanse, por ejemplo, Glick y Pasternak (Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA, 1994, ASM Press), Itakura y col. (1984, Annu. Rev. Biochem. 53: 323), y Climie y col. (1990, Pro. Nat'l Acad. Sci. USA 87: 633).

Adicionalmente, se pueden realizar cambios en la secuencia del ácido nucleico que codifica el péptido mediante mutagénesis dirigida al emplazamiento. Como se apreciará, esta técnica emplea normalmente un vector de fago que existe en forma tanto monocatenaria como bicatenaria. Los vectores típicos en la mutagénesis dirigida al emplazamiento incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos están fácilmente disponibles y los expertos en la técnica conocen generalmente bien su uso. Se emplean también de forma rutinaria plásmidos bicatenarios en la mutagénesis dirigida al emplazamiento que elimina la etapa de transferir el ácido nucleico de interés desde un plásmido a un fago.

En general, la mutagénesis dirigida al emplazamiento se lleva a cabo en primer lugar obteniendo un vector monocatenario o fundiendo las dos hebras de un vector bicatenario que incluye en el interior de su secuencia una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Un cebador de oligonucleótido que soporta la secuencia mutada deseada se prepara por lo general de forma sintética. A continuación, este cebador se hibrida con el vector monocatenario, y se somete a enzimas de polimerización del ADN tales como el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli*, a fin de completar la síntesis de la hebra que soporta la mutación. De esta manera, se forma un heteroduplete en el que una hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hebra soporta la mutación deseada. Este vector heteroduplete se utiliza a continuación para transformar o transfectar las células adecuadas, tales como las células de *E. coli*, y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que soportan la disposición de la secuencia mutada. Kunkel y col. (1987, Kunkel y col., Methods Enzymol. 154: 367-382) diseñaron un esquema de selección genética para enriquecer los clones que incorporan el oligonucleótido mutagénico. De forma alternativa, el uso de la PCRTM con enzimas termoestables comercialmente disponibles tales como la polimerasa Taq se puede emplear para incorporar un cebador de oligonucleótido mutagénico en un fragmento de ADN amplificado que se puede clonar a continuación en un vector de clonación o expresión adecuado. Los procedimientos de la mutagénesis mediada por la PCRTM de Tomic y col. (1990, Nucl. Acids Res., 12: 1656) y Uppender y col. (1995, Biotechniques, 18: 29-31) proporcionan dos ejemplos de dichos protocolos. Se puede utilizar también una PCRTM que emplea una ligasa termoestable además de una polimerasa termoestable para incorporar un oligonucleótido mutagénico fosforilado en un fragmento de ADN amplificado que se puede clonar a continuación en un vector de clonación o de expresión adecuado. El procedimiento de mutagénesis descrito por (1994, Biotechniques 16:410-412) proporciona un ejemplo de uno de dichos protocolos.

No todas las secuencias Asn-X-Ser/Thr están N-glicosiladas, lo que sugiere que el contexto en el que se presenta el motivo es importante. En otra solución, se crean bibliotecas de péptidos mutantes que tienen novedosos sitios consenso unidos a N con el fin de identificar novedosos sitios unidos a N que están glicosilados *in vivo* y son beneficiosos para la actividad, la estabilidad u otras características del péptido.

Tal como se ha señalado anteriormente, la secuencia consenso para la adición de cadenas de glicano unidas a N en glicoproteínas es Asn-X-ser/Thr en la que X puede ser cualquier aminoácido. La secuencia de nucleótidos que codifica las dos posiciones del aminoácido en el lado carboxiterminal de la Asn puede estar mutada para codificar un resto de Ser y/o Thr utilizando procedimientos normalizados conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica. Tal como se ha indicado anteriormente, no todos los sitios Asn-x-ser/Thr se modifican por la adición de glicanos. Por tanto, cada proteína mutada recombinante debe expresarse en un sistema de expresión fúngico, de levadura o animal o de mamífero y analizarse para establecer la adición de una cadena de glicano unida a N. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para la caracterización de los sitios de glicosilación. Además, se puede determinar la función biológica de la glicoproteína mutada recombinante utilizando ensayos normalizados para la proteína concreta que se está examinando. De esta manera es una cuestión sencilla manipular la secuencia primaria de un péptido e identificar los sitios de glicosilación novedosos contenidos en el mismo, y determinar adicionalmente el efecto del novedoso sitio sobre la actividad biológica del péptido.

En una realización alternativa, la secuencia de nucleótidos que codifica las dos posiciones del aminoácido en el lado aminoterminal de los restos Ser/Thr puede mutarse para codificar una Asn utilizando los procedimientos normalizados conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica. Se han descrito anteriormente los procedimientos para determinar si se ha creado un novedoso sitio de glicosilación y el efecto de este sitio sobre la actividad biológica del péptido

B. Creación o eliminación de sitios de glicosilación unidos a O

La adición de un sitio de glicosilación unido a O a un péptido se lleva a cabo de forma conveniente alterando la secuencia de aminoácidos primaria del péptido de tal manera que contenga uno o más sitios de glicosilación unidos a O adicionales en comparación con la secuencia de aminoácidos primaria inicial del péptido. La adición de un sitio de glicosilación unido a O se puede llevar también a cabo mediante la incorporación al péptido de una o más especies de aminoácidos en el péptido que comprende un grupo –OH, preferiblemente restos de serina o treonina, en el interior de la secuencia del péptido, de tal manera que el grupo OH sea accesible y esté disponible para la glicosilación unida a O. Similar a la discusión de la alteración de los sitios de glicosilación unidos a N en un péptido, la secuencia de aminoácidos primaria del péptido se altera preferiblemente en los nucleótidos. Se pueden alterar los nucleótidos específicos en la secuencia de ADN que codifica el péptido de tal manera que una secuencia de aminoácidos deseada sea codificada por la secuencia. Se realiza(n) una(s) mutación(es) en el ADN preferiblemente utilizando los procedimientos conocidos en la técnica, tales como las técnicas de síntesis del ADN mediante el procedimiento de la fosforamidita y la mutagénesis dirigida al emplazamiento descrita anteriormente.

De forma alternativa, la secuencia de nucleótidos que codifica un presunto sitio para la adición de glicano unido a O se puede añadir a la molécula de ADN en una o algunas copias en cualquiera de los extremos 5' o 3' de la molécula. La secuencia de ADN alterada se expresa a continuación en uno cualquiera de un sistema de expresión fúngico, de levadura o animal o de mamífero y se analiza para establecer la adición de la secuencia al péptido y si esta secuencia es un sitio de glicosilación unido a N funcional o no. De manera breve, se introduce una secuencia aceptora de un péptido sintético tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de la molécula del nucleótido. En principio, la adición de este tipo de molécula es menos perturbadora que la glicoproteína resultante cuando se expresa en un sistema de expresión adecuado. A continuación, el ADN alterado se expresa en células CHO u otro sistema de expresión adecuado y las proteínas expresadas se examinan por tanto para la presencia de un sitio de glicosilación unido a O. además, se puede determinar la presencia o ausencia de cadenas de glicano.

En otro enfoque más, se pueden encontrar sitios ventajosos para nuevos sitios unidos a O en un péptido creando bibliotecas del péptido que contiene diversos sitios unidos a O nuevos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos consenso para la adición de N-acetilgalactosamina mediante una N-acetilgalactosaminiltransferasa depende de la transferasa específica utilizada. Se puede realizar un barrido de la secuencia de aminoácidos de un péptido para identificar los grupos de aminoácidos contiguos que se pueden mutar para generar sitios potenciales para la adición de cadenas de glicano unidas a O. Se pueden generar estas mutaciones utilizando los procedimientos normalizados conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica tal como se ha descrito anteriormente. Con el fin de determinar si cualquier sitio de glicosilación descubierto se encuentra realmente glicosilado, cada péptido mutado recombinante se expresa a continuación en un sistema de expresión adecuado y se analiza posteriormente para la adición del sitio y/o la presencia de una cadena de glicano unida a O.

C. Síntesis química de péptidos

Aunque la estructura primaria de los péptidos útiles en la invención se puede generar de forma más eficaz en un sistema de expresión basado en células, está comprendido en el alcance de la presente invención que los péptidos se puedan generar sintéticamente. Es bien conocida en la técnica la síntesis química de péptidos e incluye, sin limitación, la síntesis en fase sólida por etapas y la condensación fragmentaria tanto en disolución como en fase sólida. Un síntesis en fase sólida por etapas clásica implica unir de forma covalente un aminoácido correspondiente al aminoácido situado en el extremo carboxilo de la cadena peptídica deseada a un soporte sólido y extender la cadena peptídica hacia el extremo amino mediante el acoplamiento por etapas de los derivados de aminoácidos activados que tienen grupos carboxilo activados. Tras la finalización del ensamblaje de la cadena peptídica completamente protegida unida a la fase sólida, la unión covalente de la fase sólida-péptido se escinde mediante la química adecuada y se retiran los grupos protectores para dar como resultado el péptido del producto. Véase, R. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis: The Synthesis of a Tetrapeptide, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963). Cuánto más larga es la cadena peptídica, más estimulante es obtener productos bien definidos de elevada pureza. Debido a la producción de mezclas complejas, la solución de síntesis en fase sólida por etapas tiene limitaciones de tamaño. En general, los péptidos bien definidos de 100 restos de aminoácidos contiguos o más no se preparan de forma rutinaria mediante la síntesis en fase sólida por etapas.

El procedimiento de condensación de segmentos implica la preparación de varios segmentos peptídicos mediante el procedimiento en fase sólida por etapas, seguido por la escisión a partir de la fase sólida y la purificación de estos segmentos protegidos máximamente. Los segmentos protegidos se condensan uno por uno al primer segmento, que se une a la fase sólida.

Los péptidos útiles en la presente invención se pueden sintetizar mediante síntesis en fase sólida exclusiva, procedimientos en fase sólida parciales, condensación fragmentaria o síntesis clásica en solución. Estos procedimientos de síntesis son bien conocidos de los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1963), Stewart y col., "Solid Phase Peptide Synthesis" (2ª Edición), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer y Rapp, Chem. Pept. Prot. 3:3 (1986), Atherton y col., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press 1989), Fields y Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis," Methods in Enzymology Volume 289 (Academic Press 1997), y Lloyd-Williams y co., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Peptides (CRC Press, Inc. 1997)). Están también normalizadas las variaciones en las estrategias de síntesis química total tales como la "ligadura química natural" y la "ligadura peptídica expresada" (véanse, por ejemplo, Dawson y col., Science 266: 776 (1994); Hackeng y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94: 7845 (1997), Dawson, Methods Enzymol. 287: 34 (1997), Muir y col, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:6705 (1998), y Severinov y Muir, J. Biol. Chem. 273: 16205 (1998)). También útiles son los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida desarrollados por Gryphon Sciences, South San Francisco, CA. Véanse las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 6.326.468, 6.217.873, 6.174.530, y 6.001.364.

15 D. Modificaciones posteriores a la traducción

Una persona normalmente experta en la técnica apreciará que los péptidos pueden experimentar una modificación posterior a la traducción además de la adición a los anteriores de glicanos unidos a N y/o unidos a O. Se contempla que los péptidos que tienen modificaciones posteriores a la traducción diferentes a la glicosilación se pueden utilizar como péptidos de la invención, siempre que la actividad biológica deseada o la función del péptido se mantengan o mejore. Dichas modificaciones posteriores a la traducción pueden ser modificaciones naturales realizadas normalmente *in vivo*, o modificaciones del péptido realizadas por modificación con ingeniería genética, realizadas *in vitro*. Las modificaciones conocidas contempladas incluyen, pero no se limita a, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de retículas covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gammacarboxilación, glicosilación, formación de anclaje a GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos a péptidos mediada por ARN de transferencia tal como arginilación, y ubiquitinación. Las enzimas que se pueden utilizar para llevar a cabo muchas de esta modificaciones son bien conocidas en la técnica, y están comercialmente disponibles de compañías tales como Boehringer Mannheim (Indianápolis, IN) y Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), entre otras.

Los expertos en la técnica conocen bien dichas modificaciones que se han descrito con gran detalle en la bibliografía específica. Algunas modificaciones particularmente comunes, glicosilación, unión lipídica, sulfatación, gammacarboxilación o restos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP, por ejemplo, se describen en los textos más básicos, tales como Peptides--Structure and Molecular Properties, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993). Muchas revisiones detalladas están disponibles sobre este sujeto, tales como la de Wold, F., Post-translational Covalent Modification of Peptides, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York 1-12 (1983); Seifter y col. (Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990)) y Rattan y col. (Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992)).

También se pueden introducir en la molécula *in vitro* modificaciones covalentes de un péptido haciendo reaccionar restos de aminoácidos diana del péptido con un agente orgánico derivatizante que sea capaz de reaccionar con cadenas secundarias seleccionadas o restos de aminoácidos de los extremos. Los restos más comúnmente derivatizados son cisteinilo, histidilo, lisinilo, arginilo, tirosilo, glutaminilo, asparaginilo y restos amino de los extremos. Hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo y treonilo, metilación de los grupos alfa-amino de lisina, histidina, y cadenas secundarias de histidina, acetilación de la amina N-terminal y amidación de los grupos carboxílicos C de los extremos. Dichos restos derivatizados pueden mejorar la solubilidad, la absorción, la vida media biológica y similar. Los restos pueden también eliminar o atenuar cualquier efecto secundario indeseable del péptido y similar.

Además, es útil la derivatización con agentes bifuncionales para reticular el péptido a matrices de soportes insolubles en agua o a otros vehículos macromoleculares. Los agentes de reticulación comúnmente utilizados incluyen glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, imidoésteres homobifuncionales, 1,1-bis(-diazoloacetil)-2-feniletano, y maleimidas bifuncionales. Los agentes derivatizantes tales como metil-3-[9p-azidofenil]] ditiopropioimidato dan como resultado productos intermedios fotoactivables que son capaces de formar retículas en presencia de luz. De forma alternativa, se pueden emplear matrices reactivas insolubles en agua tales como hidratos de carbono activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de los Estados Unidos N^{os} 3.969.287 y 3.691.016 para la inmovilización de péptidos.

55 E. Péptidos de fusión /péptidos

Los péptidos útiles en la presente invención pueden comprender péptidos de fusión. Los péptidos de fusión son particularmente ventajosos cuando se desea combinar características biológicas y/o funcionales de dos péptidos en una molécula peptídica. Dichos péptidos de fusión pueden presentar combinaciones de actividad y función

biológicas que no se encuentran en la naturaleza para crear moléculas novedosas y útiles de aplicaciones terapéuticas e industriales. Las actividades biológicas de interés incluyen, pero no se limita a, la actividad enzimática, la actividad del receptor y/o el ligando, motivos inmunógenos, y dominios estructurales.

Dichos péptidos de fusión son bien conocidos en la técnica, y los procedimientos de creación son bien conocidos de los expertos en la técnica. Por ejemplo, se ha preparado un péptido de fusión humano del interferón α humano en el que el péptido resultante tiene los beneficios terapéuticos del interferón α combinados con una vida larga en circulación de la albúmina, creando de esta forma una composición terapéutica que permite una frecuencia de dosificación reducida y unos efectos secundarios en pacientes potencialmente reducidos. Véanse, Albuferon™ de Human Genome Sciences, Inc. y la Patente de los Estados Unidos N° 5.766.883. Otros péptidos de fusión incluyen las moléculas de anticuerpo que se describen en otra parte en el presente documento.

F. Generación de moléculas "biológicamente activas" más pequeñas

Los péptidos utilizados en la invención pueden ser variantes de péptidos naturales, en las que se utiliza un fragmento del péptido natural en lugar del péptido natural de longitud completa. Además, se contemplan pre-péptidos y pre-péptidos. Los péptidos variantes pueden ser de un tamaño más pequeño que el péptido natural, y pueden comprender uno o más dominios de un péptido más grande. Puede ser ventajosa la selección de dominios peptídicos específicos cuando se desea que el péptido tenga la actividad biológica de determinados dominios, pero no se desea que el péptido tenga la actividad biológica de otros dominios. Se incluyen también truncamientos del péptido y eliminaciones internas que pueden potenciar el efecto terapéutico deseado del péptido. Se contempla que cualquiera de dichas formas de un péptido sea útil en la presente invención con la condición que se preserve la actividad biológica deseada del péptido.

Versiones más cortas de los péptidos pueden tener ventajas únicas que no se encuentran en el péptido natural. En el caso de la albúmina humana, se ha encontrado que la forma truncada que comprende tan poco como el 63% del péptido de la albúmina natural es ventajosa como expansor del volumen plasmático. Se considera que el péptido truncado de la albúmina es mejor que el péptido natural para este fin terapéutico debido a que se requiere una dosis del péptido individual de la mitad a dos tercios de la albúmina de suero humano natural, o de la albúmina de suero humano recombinante para conseguir el efecto osmótico coloidal equivalente. Véase la Patente de los estados unidos n° 5.380.712.

Se han encontrado también péptidos "biológicamente activos" más pequeños que tienen actividad terapéutica potenciada en comparación con el péptido natural. El potencial terapéutico de la IL-2 está limitado por diversos efectos secundarios dominados por el síndrome de extravasación vascular. Se ha encontrado que una versión sintetizada químicamente más corta del péptido que consiste en los restos 1-30 que corresponden a la hélice α completa se pliega adecuadamente y contiene la actividad biológica de la IL-2 natural sin los efectos secundarios colaterales.

G. generación de péptidos novedosos

El péptido de la invención puede ser un derivado de una secuencia primaria de un péptido natural, o se puede modificar con ingeniería genética utilizando cualquiera de los muchos medios conocidos por los expertos en la técnica. Dichos péptidos modificados con ingeniería genética pueden diseñarse y/o seleccionarse debido a las propiedades potenciadas o novedosas en comparación con el péptido natural. Por ejemplo, los péptidos se pueden modificar con ingeniería genética para tener velocidades de reacción enzimáticas aumentadas, afinidad de unión aumentada o disminuida para un sustrato o ligando, afinidad de unión aumentada o disminuida para un receptor, especificidad alterada para un sustrato, ligando, receptor u otra molécula de enlace, estabilidad aumentada o disminuida *in vitro* y/o *in vivo*, o inmunogenicidad aumentada o disminuida en un animal.

H. mutaciones

1. Mutación de diseño lógico

Los péptidos útiles en los procedimientos de la invención se pueden mutar con el fin de potenciar una actividad o función biológica deseada, para disminuir una propiedad indeseable del péptido, y/o añadir actividades o funciones novedosas para el péptido. Se puede utilizar un "diseño lógico del péptido" para generar péptidos alterados. Una vez que se conoce la secuencia y la estructura del aminoácido del péptido y se planifica una mutación deseada, las mutaciones se pueden preparar de la forma más conveniente para el ácido nucleico y el codón correspondiente que codifica el resto de aminoácido que se desea mutar. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente cómo debe alterarse la secuencia del ácido nucleico basándose en el código genético universal y el conocimiento de las preferencias del codón en el sistema de expresión de elección. Se puede realizar una mutación en un codón para cambiar el resto de aminoácido que se polimerizará en el péptido durante la traducción. De forma alternativa, un codón puede estar mutado de tal manera que el resto de aminoácido codificado correspondiente sea el mismo, pero la elección sea más adecuada para el sistema de expresión del péptido deseado. Por ejemplo, se pueden sustituir los restos cis por otros aminoácidos para eliminar los enlaces de disulfuro del péptido maduro, pueden mutarse los dominios catalíticos para alterar la actividad biológica, y en general, se pueden modificar con ingeniería genética las isoformas del péptido. Dichas mutaciones pueden ser mutaciones puntuales, eliminaciones, inserciones y

truncamientos, entre otras.

Son bien conocidas en la materia las técnicas para mutar aminoácidos específicos en un péptido. La técnica de la mutagénesis dirigida al emplazamiento, discutida anteriormente, es muy adecuada para la mutación dirigida de codones. El procedimiento de mutagénesis mediada por oligonucleótidos se discute también en detalle en Sambrook y col. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, comenzando en la página 15.51). se pueden realizar eliminaciones, inserciones y truncamientos sistemáticos utilizando la mutagénesis de inserción del enlazador, la digestión con la nucleasa Bal31, y la mutagénesis de barrido del enlazador, entre otros procedimientos bien conocidos de los expertos en la técnica (Sambrook y col., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

Se ha utilizado satisfactoriamente el diseño lógico del péptido para aumentar la estabilidad de las enzimas con respecto a la termoinactivación y a la oxidación. Por ejemplo, se ha mejorado la estabilidad de una enzima mediante la eliminación de restos de asparagina en la α -amilasa (Declerck y col., 2000, *J. Mol. Biol.* 301: 1041-1057), la introducción de elementos estructurales más rígidos tales como prolina en la α -amilasa (Igarashi y col., 1999, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 1535-1540) y la D-xilosa isomerasa (Zhu y col., 1999, *Peptide Eng.* 12: 635-638). Además, la introducción de contactos hidrófobos adicionales estabiliza la 3-isopropilmalto deshidrogenasa (Akanuma y col., 1999, *Eur. J. Biochem.* 260: 499-504) y la formiato deshidrogenasa obtenidas de *Pseudomonas* sp. (Rojkova y col., 1999, *FEBS Lett.* 445: 183-188). Los mecanismos que retrasan el efecto estabilizante de estas mutaciones son generalmente aplicables a muchos péptidos. Se contempla que estas y similares mutaciones sean útiles con respecto a los péptidos remodelados en los procedimientos de la presente invención

2. Técnicas de mutagénesis aleatorias

Se pueden generar péptidos novedosos útiles en los procedimientos de la invención utilizando técnicas que introducen mutaciones aleatorias en la secuencia de codificación del ácido nucleico: A continuación, el ácido nucleico se expresa en un sistema de expresión deseado, y se evalúa el péptido resultante para establecer las propiedades de interés. Son bien conocidas en la materia las técnicas para introducir mutaciones aleatorias en las secuencias de ADN que incluyen mutagénesis mediante la PCR, mutagénesis de saturación, y soluciones de oligonucleótidos degenerados. Véase Sambrook y Russell (2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) y Ausubel y col. (2002, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY).

En la mutagénesis mediante la PCR se utiliza la fidelidad reducida de la polimerasa Taq para introducir mutaciones aleatorias en un fragmento de ADN clonado (Leung y co., 1989, *Technique* 1: 11-15). Este es un procedimiento muy poderoso y relativamente rápido para introducir mutaciones aleatorias en una secuencia de ADN. La región de ADN que se va a mutagenizar se amplifica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en condiciones que reducen la fidelidad de la síntesis de ADN mediante la ADN polimerasa Taq utilizando, por ejemplo, una relación dGTP/dATP alterada y añadiendo Mn^{2+} a la reacción de la PCR. El combinado de fragmentos de ADN amplificados se inserta en vectores de clonación adecuados para proporcionar bibliotecas de mutantes aleatorios.

La mutagénesis por saturación permite la rápida introducción de un gran número de sustituciones de bases individuales en fragmentos de ADN clonados (Mayers y col., 1985, *Science* 229: 242). Esta técnica incluye la generación de mutaciones, por ejemplo, mediante tratamiento o irradiación química de ADN monocatenario *in vitro*, y la síntesis de una hebra de ADN complementario. Se puede modular la frecuencia de la mutación modulando la severidad del tratamiento, y se pueden obtener esencialmente todas las sustituciones de bases posibles. Debido a que este procedimiento no implica una selección genética de los fragmentos de mutantes, se obtienen sustituciones neutras, así como aquellas que alteran la función. La distribución de mutaciones puntuales no está sesgada hacia elementos de secuencias conservados.

Se puede generar también una biblioteca de homólogos de ácidos nucleicos a partir de un conjunto de secuencias de oligonucleótidos degenerados. Se puede llevar a cabo la síntesis química de secuencias de oligonucleótidos degenerados en un sintetizador automático de ADN, y se pueden unir a continuación los genes sintéticos en un vector de expresión adecuado. Se conoce en la técnica la síntesis de oligonucleótidos degenerados (véanse, por ejemplo, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura y col. (1981) *Recombinant DNA, Proc 3^{er} Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp. 273-289; Itakura y col. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura y col. (1984) *Science* 198: 1056; Ike y col. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11: 477. Se han empleado dichas técnicas en la evolución dirigida de otros péptidos (véanse, por ejemplo, Scott y col. (1990) *Science* 249: 386-390; Roberts y col. (1992) *PNAS* 89: 2429-2433; Devlin y col. (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla y col. (1990) *PNAS* 87: 6378-6382; así como las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.223.409, 5.198.346, y 5.096.815).

a. Evolución dirigida

Se pueden generar también péptidos útiles en los procedimientos de la invención utilizando técnicas de "evolución dirigida". A diferencia de las técnicas de mutagénesis dirigida al emplazamiento en las que se requiere el conocimiento de la estructura del péptido, en la actualidad existen estrategias para generar bibliotecas de mutaciones a partir de las cuales se puede obtener péptidos con propiedades mejoradas sin conocimiento de las

características estructurales del péptido. Estas estrategias se conocen generalmente como tecnologías de “evolución dirigida” y son diferentes de los procedimientos de mutagénesis aleatoria tradicionales que implican someter la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de interés a ciclos repetitivos de mutación, exploración y amplificación.

En algunas técnicas de “evolución dirigida”, la diversidad de los ácidos nucleicos obtenidos se genera mediante procedimientos de mutación que crean de forma aleatoria mutaciones puntuales en la secuencia de ácido nucleico. Las técnicas de mutación puntuales incluyen, pero no se limita a, “PCR propensa a errorTM” (Caldwell y Joyce, 1994; PCR Methods Appl. 2: 28-33; y Ke y Madison, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3371-3372), mutagénesis dirigida a oligonucleótidos repetidos (Reidhaar-Olson y col., 1991, Methods Enzymol. 208: 564-586), y cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados de mutagénesis aleatoria.

Otro procedimiento para crear diversidad mediante el cual puede actuar la evolución dirigida es el uso de genes mutadores. El ácido nucleico de interés se cultiva en una cepa de células mutadoras, cuyo genoma codifica normalmente los genes de reparación del ADN defectuoso (Patente de los Estados Unidos N° 6.365.410; Selifonova y col., 2001, Appl. Environ. Microbiol. 67: 3645-3649; Long-McGie y col., 2000, Biotech. Bioeng. 68: 121-125; véase, Genencor International Inc., Palo Alto CA).

La consecución de diversidad utilizando técnicas de evolución dirigida se puede también llevar a cabo usando la mutagénesis de saturación junto con cebadores degenerados (Gene Site Saturation MutagenesisTM, Diversa Corp., San Diego, CA). En este tipo de mutagénesis de saturación se utilizan cebadores degenerados diseñados para cubrir la longitud de la secuencia de ácido nucleico que se va a diversificar para cebar la polimerasa en las reacciones de la PCR. De esta manera, cada codón de una secuencia de codificación de un aminoácido puede mutarse para codificar cada uno de los diecinueve aminoácidos usuales restantes. Se puede utilizar también esta técnica para introducir mutaciones, eliminaciones e inserciones en las regiones específicas de una secuencia de codificación de un ácido nucleico dejando a la vez sin tocar el resto de la molécula del ácido nucleico. Los procedimientos de la técnica de saturación de genes son bien conocidos en la técnica, y pueden encontrarse en la Patente de los estados unidos 6.171.820.

b. Transposición de ADN

Se pueden generar también péptidos novedosos útiles en los procedimientos de la invención utilizando las técnicas de transposición de genes, transposición de motivos, transposición de exones, y/o transposición de codones (denominadas en su conjunto “transposición de ADN”). Las técnicas de transposición del ADN también se pueden emplear para modular las actividades de péptidos útiles en la invención y se pueden utilizar para generar péptidos que tengan la actividad alterada. Véanse, generalmente, las Patentes de los Estados Unidos N°s 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Stemmer y col. (1994, Nature 370(6488): 389-391); Cramer y col. (1998, Nature 391 (6664): 288-291); Zhang y col. (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(9): 4504-4509); Stemmer y col. (1994, Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (22): 10747-10751), Patten y col. (1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8: 724-33); Harayama, (1998, Trends Biotechnol. 16 (2): 76-82); Hansson, y col., (1999, J. Mol. Biol. 287: 265-76); y Lorenzo y Blasco (1998, Biotechniques 24(2): 308-13).

La transposición del ADN implica el ensamblaje de dos o más segmentos de ADN mediante recombinación homóloga o específica del emplazamiento para generar la variación en la secuencia del polinucleótido. Se ha utilizado la transposición del ADN para generar variaciones novedosas en las proteínas del virus de tipo 1 de la inmunodeficiencia humana (Pekrun y col., 2002, J. Virol. 76(6): 2924-35), triazina hidrolasas (Raillard y col. 2001, Chem Biol 8(9): 891-898), proteínas del virus de la leucemia de murino (MLV) (Powell y col. 2000, Nat Biotechnol 18(12): 1279-1282), e indolglucitol fosfato sintasa (Merz y col. 2000, Biochemistry 39(5): 880-889).

La técnica de la transposición del ADN fue desarrollada con el fin de generar diversidad biomolecular imitando la recombinación natural permitiendo la recombinación homóloga *in vitro* del ADN (Stemmler, 1994, Nature 370: 389-391; y Stemmler, 1994, PNAS 91: 10747-10751). Generalmente, en este procedimiento, una población de genes relacionados se fragmenta y se somete a ciclos repetitivos de desnaturalización, rehibridación, seguidas por la extensión de los salientes 5' mediante la polimerasa Taq. Con cada ciclo, la longitud de los fragmentos aumenta, y se produce la recombinación del ADN cuando los fragmentos que se originan a partir de diferentes genes se hibridan entre sí. La fragmentación inicial del ADN se lleva a cabo usualmente mediante digestión de la nucleasa, utilizando normalmente ADNasa (véanse las referencias a Stemmler, anteriormente), pero también se lleva a cabo mediante la síntesis interrumpida de la PCR (patente de los Estados Unidos 5.965.408; véase, Diversa Corp., San Diego, CA). Los procedimientos de transposición del ADN tienen ventajas sobre los procedimientos de mutaciones puntuales aleatorias en que se consigue la recombinación directa de mutaciones beneficiosas generadas por cada ciclo de transposición y existe por tanto una autoselección de fenotipos mejorados de péptidos.

Las técnicas de transposición del ADN son bien conocidas de los expertos en la técnica. Se encuentran explicaciones detalladas de dicha tecnología en Stemmler, 1994, Nature 370: 389-391 y Stemmler, 1994, PNAS 91: 10747-10751. La técnica de transposición del ADN se describe también en las patentes de los Estados Unidos 6.180.406, 6.165.793, 6.132.970, 6.117.679, 6.096.548, 5.837.458, 5.834.252, 5.830.721, 5.811.238, y 5.605.793.

La técnica proporciona también modificaciones incluso más recientes de la técnica básica de transposición del ADN. En un ejemplo, la transposición de exones, exones o combinaciones de exones que codifican dominios específicos de péptidos se amplifican utilizando oligonucleótidos quiméricos. A continuación se recombinan las moléculas amplificadas autocebando el ensamblaje de la PCR (Kolkman y Stemmler, 2001, Nat. Biotech. 19: 423-428). En otro ejemplo, utilizando la técnica de quimeragénesis aleatoria en la construcción de bibliotecas mediante moldes transitorios (RACHITT) se han hibridado fragmentos de ADN parental monocatenario sobre moldes monocatenarios de longitud completa (Coco y col., 2001, Nat. Biotechnol. 19: 354-359). En otro ejemplo más, el procedimiento de extensión por etapas (StEP), se emplea la termociclación con ciclos de hibridación/extensión muy abreviados para interrumpir repetidamente la polimerización del ADN a partir de moldes flanqueantes (Zhao y col., 1998, Nat. Biotechnol. 16: 258-261). En la técnica conocida como CLERY, se combina la transposición de la familia *in vitro* con la recombinación homóloga *in vivo* en levadura (Abecassis y col., 2000, Nucleic Acids Res. 28: E88). Para maximizar la recombinación intergénica, el ADN monocatenario procedente de hebras complementarias de cada uno de los ácidos nucleicos se digiere con ADNasa y se hibrida (Kikuchi y col., 2000, Gene 243: 133-137). Los extremos enromados de dos ácidos nucleicos truncados de longitudes variables que están unidos mediante una secuencia que se puede escindir se ligan a continuación para generar la fusión génica sin recombinación homóloga (Sieber y col., 2001, Nat Biotechnol. 19: 456-460; Lutz y col., 2001, Nucleic Acids Res. 29: E16; Ostermeier y col., 1999, Nat. Biotechnol. 17: 1205-1209; Lutz y Benkovic, 2000, Curr. Opin. Biotechnol. 11: 319-324). Se ha potenciado también la recombinación entre ácidos nucleicos con poca homología de secuencias en común utilizando extremos enromados mediados por exonucleasas de fragmentos de ADN y ligadura de los fragmentos juntos para recombinarlos (Patente de los Estados Unidos N° 6.361.974). La invención contempla el uso de todas y cada una de las variaciones descritas anteriormente como un medio de potenciar las propiedades biológicas de cualquiera de los péptidos y/o enzimas en los procedimientos de la invención.

Además de los protocolos publicados que detallan las técnicas de evolución dirigida y de transposición de genes, ahora están disponibles servicios comerciales que llevan a cabo los procedimientos de transposición génica y de selección en los péptidos de elección. Maxygen (Redwood City, CA) ofrece servicios comerciales para generar bibliotecas personalizadas de ADN transpuesto. Además, esta compañía llevará a cabo procedimiento personalizado de evolución dirigida que incluyen la transposición génica y la selección de una familia de péptidos de elección.

Optigenix, Inc. (Newark, DE) ofrece el servicio relacionado de transposición de plásmidos. Optigenix utiliza familias de genes para obtener mutantes de los anteriores que tienen nuevas propiedades. El ácido nucleico de interés se clona en un plásmido en un sistema de expresión de *Aspergillus*. A continuación se introduce el ADN de la familia relacionada en el sistema de expresión y se produce la recombinación de las regiones conservadas de la familia en el hospedador. A continuación se expresa el ADN mutante resultante y se explora el péptido producido a partir del anterior para la presencia de las propiedades deseadas y la ausencia de propiedades no deseadas.

c. Procedimientos de exploración

Tras cada ciclo repetitivo de "evolución", los péptidos deseados expresados mediante genes mutados se exploran según las características de interés. Los genes "candidatos" se amplifican a continuación y se combinan para el siguiente ciclo de transposición del ADN. El procedimiento de exploración utilizado es muy dependiente del péptido que está "evolucionando" y las características de interés. Características tales como la estabilidad del péptido, la actividad biológica, la antigenicidad, entre otras, se pueden seleccionar utilizando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Se describen en otra parte en el presente documento ensayos individuales para la actividad biológica de los péptidos preferidos útiles en los procedimientos de la invención.

d. Combinaciones de técnicas

El técnico experto apreciará que las anteriores técnicas de mutación y selección se pueden combinar entre sí y con procedimientos adicionales para generar la molécula peptídica mejor posible útil en los procedimientos de la invención. De esta manera, la invención no se limita a un procedimiento específico para la generación de péptidos, y debe considerarse que abarca todas y cada una de las metodologías descritas en el presente documento. Por ejemplo, se puede llevar a cabo inicialmente un procedimiento para introducir mutaciones puntuales en una secuencia de ácido nucleico, seguido por ciclos repetitivos de transposición, selección y amplificación del ADN. Se puede utilizar la introducción inicial de mutaciones puntuales para introducir diversidad en una población de genes de la que carece de esta, y el siguiente ciclo de transposición y exploración del ADN seleccionará y recombinará mutaciones puntuales ventajosas.

III. Glicosidasas y Glicosiltransferasas

A. Glicosidasas

Las Glicosidasas son glicosiltransferasas que utilizan agua como molécula aceptora, y como tales, son normalmente enzimas glucosidohidrolíticas. Las glicosidasas pueden usarse para la formación de enlaces glicosídicos *in vitro* controlando la termodinámica o la cinética de la mezcla de reacción. Incluso con condiciones modificadas de reacción, fuertes, puede ser difícil trabajar con las reacciones de las Glicosidasas, y las Glicosidasas tienden a dar

bajos rendimientos sintéticos como resultado de la reacción reversible de la transglucosilasa y la reacción hidrolítica competente.

Una glucosidasa puede funcionar reteniendo la estereoquímica al romper el enlace durante la hidrólisis o invirtiendo la estereoquímica al romper el enlace durante la hidrólisis, clasificándose la glucosidasa tanto como glucosidasa “retenedora” como glucosidasa “inversora”, respectivamente. Las glicosidasas retenedoras tienen dos restos críticos de ácido carboxílico presentes en el sitio activo, actuando un carboxilato como catalizador ácido/base y el otro como nucleófilo, mientras que en las glicosidasas inversoras, un ácido carboxílico funciona como ácido y el otro funciona como base.

Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para determinar la actividad y la especificidad del enlace de cualquier glucosidasa, incluyendo un protocolo de HPLC simplificado (Jacob y Scudder, 1994, *Methods in Enzymol.* 230: 280-300). En *Glycobiology, A Practical Approach*, (1993, Fukuda y Kobata eds., Oxford University Press Inc., Nueva York) se encuentra una discusión general sobre las glicosidasas y sobre el tratamiento con glicosidasas. Las glicosidasas útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, sialidasa, galactosidasa, endoglucanasa, manosidasa (es decir, α y β , ManI, ManII y ManIII), xilosidasa, fucosidasa, β -glucosidasa de *Agrobacterium* sp, manosidasa 2A de *Cellulomonas fimi*, glucosidasa de *Humicola insolens*, glucosidasa de *Sulfolobus solfataricus* y glucosidasa de *Bacillus licheniformis*.

La elección de las fucosidasas para uso en la invención depende el enlace de la fucosa con otras moléculas. Son bien conocidas por los expertos en la técnica las especificidades de muchas α -fucosidasas útiles en los procedimientos de la invención, y están comercialmente disponibles muchas variedades de fucosidasas (Glyko, Novato, CA; PROzyme, San Leandro, CA; Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA; entre otras). Las α -fucosidasas de interés incluyen, pero sin limitación, α -fucosidasas procedentes de *Turbo cornutus*, *Charonia lampas*, *Bacillus fulminans*, *Aspergillus niger*, *Clostridium perfringens*, riñón de bovino (Glyko), hígado de pollo (Tyagarajan y col., 1996, *Glycobiology* 6: 83-93) y α -fucosidasa II procedente de *Xanthomonas manihotis* (Glyko, PROzyme). La fucosidasa de hígado de pollo es particularmente útil para la eliminación de la fucosa del núcleo procedente de glicanos unidos a N.

B. Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas catalizan la adición de azúcares activados (azúcares NDP donantes), por etapas, a una proteína, glicopéptido, lípido o glicolípido o al extremo no reductor de un oligosacárido en crecimiento. Los glicopéptidos unidos a N se sintetizan mediante una transferasa y un donante del oligosacárido DOI-PP-NAG₂Glc₃Man₉ unido a lípido en una transferencia en bloque seguida por el acortamiento del núcleo. En este caso, la naturaleza del sacárido “nuclear” es algo diferente de las posteriores uniones. Se conocen en la técnica un número muy grande de glicosiltransferasas.

La glicosiltransferasa que se va a usar en la presente invención puede ser cualquiera lo suficientemente larga para que puede utilizar el azúcar modificado como un donante de azúcar. Los ejemplos de dichas enzimas incluyen la glicosiltransferasa de la ruta de Leloir, tal como galactosiltransferasa, N-acetilglucosaminiltransferasa, N-acetilgalactosaminiltransferasa, fucosiltransferasa, sialiltransferasa, manosiltransferasa, xilosiltransferasa, glucuroniltransferasa y similar.

Para la síntesis de sacáridos enzimáticos que implican reacciones de la glicosiltransferasa, la glicosiltransferasa se puede clonar o aislar a partir de cualquier fuente. Se conocen muchas glicosiltransferasas clonadas, así como sus secuencias de polinucleótidos (véase, por ejemplo Taniguchi y col., 2002, *Handbook of glycosyltransferases and related genes*, Springer, Tokio).

Las secuencias de aminoácidos de la glicosiltransferasa y las secuencias de nucleótidos que codifican las glicosiltransferasas a partir de las cuales se pueden deducir las secuencias de aminoácidos se encuentran en diversas bases de datos públicamente disponibles, que incluyen GenBank, Swiss-Prot, EMBL, y otras.

Las glicosiltransferasas que se pueden emplear en los procedimientos de la invención incluyen galactosiltransferasas, fucosiltransferasas, glicosiltransferasas, N-acetilgalactosaminiltransferasas, N-acetilglucosaminiltransferasas, gluconiltransferasas, sialiltransferasas, manosiltransferasas, transferasas de ácido glucurónico, transferasas de ácido galacturónico, y oligosacariltransferasas. Las glucotransferasas adecuadas incluyen aquellas obtenidas a partir de eucariotas, así como a partir de procariotas.

Se puede obtener el ADN que codifica las glicosiltransferasas mediante síntesis química, explorando transcritos inversos de células o cultivos de líneas celulares adecuadas, explorando bibliotecas genómicas procedentes de células adecuadas, o mediante las combinaciones de estos procedimientos. Se puede llevar a cabo la exploración del ARNm o del ADN genómico utilizando sondas de oligonucleótidos generadas a partir de la secuencia de ácido nucleico de la glicosiltransferasa. Se pueden marcar las sondas con una sonda detectable, tal como, pero sin limitación, un grupo fluorescente, un átomo radioactivo o un grupo quimioluminiscente de acuerdo con procedimientos conocidos y utilizarse en ensayos de hibridación convencionales. Como alternativa, se pueden obtener las secuencias de ácidos nucleicos de las glicosiltransferasas mediante el uso del procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), produciéndose los cebadores de oligonucleótidos de la PCR a partir de

la secuencia de ácido nucleico de las glicosiltransferasas. Véanse la Patente de los Estados Unidos N° 4.683.195 de Mullis y col. Y la Patente de los Estados Unidos N° 4.683.202 de Mullis.

Las enzimas glicosiltransferasas se pueden sintetizar en una célula hospedadora transformada con un vector que contiene el ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa. Un vector es una construcción de ADN que se puede replicar. Los vectores se utilizan tanto para amplificar el ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa como para expresar el ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa. Un vector de expresión es una construcción de ADN que se puede replicar en la que una secuencia de ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa se une de manera operable a secuencias control adecuadas capaces de efectuar la expresión de la enzima glicosiltransferasa en un hospedador adecuado. La necesidad de dichas secuencias control variará dependiendo del hospedador seleccionado y del procedimiento de transformación escogido. Generalmente, las secuencias control incluyen un promotor de la transcripción, una secuencia operadora opcional para el control de la transcripción, una secuencia que codifica los sitios de unión al ARNm ribosómico adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de la amplificación no requieren la expresión de los dominios control. Todo lo que se necesita es la capacidad de replicarse en un hospedador, conferida usualmente por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

1. Fucosiltransferasas

En algunas realizaciones, una glicosiltransferasa utilizada en el procedimiento de la invención es una fucosiltransferasa. Los expertos en la técnica conocen las fucosiltransferasas. Las fucosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen enzimas, que transfieren la L-fucosa a partir de GDP-fucosa a una posición hidroxilo de un azúcar aceptor. Las fucosiltransferasas que transfieren desde azúcares no nucleótidos a un aceptor son también de uso en la presente invención.

En algunas realizaciones, el azúcar aceptor es, por ejemplo, el grupo $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3,4)\text{GlcNAc}\beta$ - en un glucósido de oligosacárido. Las fucosiltransferasas adecuadas para esta reacción incluyen la $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3,4)\text{GlcNAc}\beta1-\alpha(1\rightarrow3,4)$ fucosiltransferasa (FTIII E.C. N° 2.4.1.65), que se caracterizó en primer lugar procedente 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 la $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta$ - α fucosiltransferasa (FTIV, FTV, FTVI) que se encuentran en suero humano. Se ha caracterizado también FTVII (E.C. N° 2.4.1.65), una sialil $\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta((1\rightarrow3)\text{GlcNAc}\beta$ fucosiltransferasa (véanse, Dumas, y col., Bioorg. Med. Letters 1: 425-428 (1991) y Kukowska-Latallo, y col., Genes and Development 4: 1288-1303 (1990)). Otras fucosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, $\alpha1,2$ fucosiltransferasa (E.C. N° 2.4.1.69). Se puede llevar a cabo la fucosilación enzimática mediante los procedimientos descritos en Mollicone, y col., Eur. J. Biochem. 191: 169-176 (1990) o en la Patente de los Estados Unidos N° 5.374.655.

2. Galactosiltransferasas

En otro grupo de realizaciones, la glicosiltransferasa es una galactosiltransferasa. Las galactosiltransferasas a modo de ejemplo incluyen $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasas (E.C. No. 2.4.1.151, véanse, por ejemplo., Dabkowski y col., Transplant Proc. 25: 2921 (1993) y Yamamoto y col. Nature 345: 229-233 (1990), bovina (GenBank j 04989, Joziassse y col., J. Biol. Chem. 264: 14290-14297 (1989)), de murino (GenBank m26925; Larsen y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86: 8227-8231 (1989)), de porcino (GenBank L36152; Strahan y col., Immunogenetics 41: 101-105 (1995)). Otra $\alpha1,3$ galactosiltransferasa adecuada es la que está implicada en la síntesis del antígeno B del grupo sanguíneo (EC 2.4.1.37, Yamamoto y col., J Biol. Chem. 265: 1146-1151 (1990) (humana)).

Adecuadas también para el uso en los procedimientos de la invención están 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)), de murino (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, $\alpha1,2$ galactosiltransferasas (procedentes, por ejemplo, de *Schizosaccharomyces pombe*, Chapell y col., Mol. Biol. Cell 5: 519-528 (1994)). Para las galactosiltransferasas adicionales adecuadas, véanse Taniguchi y col. (2002, Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, Springer, Tokio), Guo y col. (2001, Glycobiology, 11(10): 813-820), y Breton y col. (1998, J Biochem. 123: 1000-1009).

Es bien conocida la producción de proteínas tales como la enzima GalNAc T_{1-XIV} a partir de genes clonados mediante genomanipulación. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n° 4.761.371. Un procedimiento implica la recogida de suficientes muestras, a continuación se determina la secuencia de aminoácidos mediante secuenciación del extremo N. A continuación se usa esta información para aislar un clon de ADNc que codifica una transferasa de longitud completa (unida a membrana) que, tras su expresión en la línea Sf9 de células de insecto, da como resultado la síntesis de una enzima completamente activa. A continuación se determina la especificidad del aceptor de la enzima utilizando un análisis semicuantitativo de los aminoácidos que rodean los sitios de glicosilación conocidos en 16 proteínas diferentes seguido por los estudios de glicosilación *in vitro* de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que determinados restos de aminoácidos están representados en exceso en segmentos peptídicos glicosilados y que los restos situados en posiciones específicas que rodean los restos de serina y treonina

glicosilados pueden tener una importante influencia sobre la eficacia aceptora de los diferentes restos de aminoácidos.

3. Sialiltransferasas

Las sialiltransferasas son otro tipo de glicosiltransferasa que es útil en las células recombinantes y las mezclas de reacción de la invención. Los ejemplos de sialiltransferasas que son adecuadas para el uso en la presente invención incluyen ST3Gal III (por ejemplo, una ST3Gal III de rata o ser humano), ST3Gal IV, ST3Gal I, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II, y ST6GalNAc III (la nomenclatura de las sialiltransferasas utilizadas en el presente documento es la que se ha descrito en Tsuji y col., *Glycobiology* 6: v-xiv (1996)). Una $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa a modo de ejemplo denominada $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico al extremo Gal no reductor de un disacárido o glucósido Gal β 1 $\rightarrow$ 3Glc. Véanse, Van den Eijnden y col., *J. Biol. Chem.* 256: 3159 (1981), Weinstein y col., *J. Biol. Chem.* 257: 13845 (1982) y Wen y col., *J. Biol. Chem.* 267: 21011 (1992). Otra $\alpha(2,3)$ -sialiltransferasa (EC 2.4.99.4) a modo de ejemplo transfiere ácido siálico al extremo Gal no reductor del disacárido o glucósido. Véanse, Rearick y col., *J. Biol. Chem.* 254: 4444 (1979) y Gillespie y col., *J. Biol. Chem.* 267: 21004 (1992). Las enzimas adicionales a modo de ejemplo incluyen Gal- β -1,4-GlcNAc α -2,6 sialiltransferasa (Véase, Kurosawa y col. *Eur. J. Biochem.* 219: 375-381 (1994)).

De forma preferible para la glicosilación de los hidratos de carbono de los glicopéptidos, la sialiltransferasa será capaz de transferir ácido siálico a la secuencia Gal β 1,4GlcNAc-, Gal β 1,3GlcNAc-, o Gal β 1,3GalNAc-, las penúltimas secuencias más comunes subyacentes al ácido siálico terminal en las estructuras de hidratos de carbono completamente sialiladas (véase la Tabla 7). Las 2,8-sialiltransferasas capaces de transferir ácido siálico a α 2,3Gal β 1,4GlcNAc son también útiles en los procedimientos de la invención.

Tabla 7. Sialiltransferasas que utilizan la secuencia de Gal β 1,4GlcNAc como sustrato aceptor

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

Un ejemplo de una sialiltransferasa que es útil en los procedimientos reivindicados es ST3gal III, que se denomina también $\alpha(2,3)$ sialiltransferasa (EC 2.4.99.6). Esta enzima cataliza la transferencia de ácido siálico al Gal de un Gal β 1,3GlcNAc o de un glucósido Gal β 1,4GlcNAc (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 los oligosacáridos unidos a asparagina en glicopéptidos. El ácido siálico se une a Gal con la formación de un enlace α entre los dos sacáridos. La unión (el enlace) entre los sacáridos se realiza entre la posición 2 de NeuAC y la posición 3 de Gal. Esta enzima particular se puede aislar del hígado de rata (Weinstein y col., *J. Biol. Chem.* 257: 13845 (1982)); 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 de ADN genómico (Kitagawa y col. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 931-938) son conocidas, lo que facilita la producción de esta enzima mediante la expresión recombinante. En una realización preferida, los procedimientos de sialilación reivindicados usan una ST3Gal III de rata.

Otras sialiltransferasas a modo de ejemplo de uso en la presente invención incluyen aquellas aisladas de *Campylobacter jejuni*, que incluyen la $\alpha(2,3)$. Véase, por ejemplo, el documento WO99/49051.

Otras sialiltransferasas, incluyendo las relacionadas en la Tabla 7, son también útiles en un procedimiento para la sialilación de glicopéptidos comercialmente importantes económico y eficaz a gran escala. Como una sencilla prueba para encontrar la utilidad de estas otras enzimas, diversas cantidades de cada enzima (1-100 ml/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 tanto a ST6Gal I, ST3Gal III de bovino o a ambas sialiltransferasas. De forma alternativa, se pueden usar diferente glicopéptidos o glicopéptidos, u oligosacáridos unidos a N liberados enzimáticamente desde la estructura peptídica en lugar de asialo- α 1 AGP para esta evaluación. Las sialiltransferasas con la capacidad para sialilar oligosacáridos de glicopéptidos unidos a N más eficazmente que

ST6al I son útiles en un procedimiento a gran escala para la sialilación del péptido (tal como se ilustra para ST3Gal III en la presente divulgación).

4. Otras glicosiltransferasas

Un experto en la técnica entenderá que se pueden sustituir otras glicosiltransferasas en ciclos de transferasa similares, tal como se ha descrito en detalle para la sialiltransferasa. En particular, las glicosiltransferasas pueden ser también, por ejemplo, glicosiltransferasas, por ejemplo, Alg8 (Stagljev y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5977 (1994)) o Alg5 (Heesen y col., Eur. J. Biochem. 224: 71 (1994)).

Las N-acetilgalactosaminiltransferasas son también de uso en la práctica de la presente invención. Las N-acetilgalactosaminiltransferasas adecuadas incluyen, pero sin limitación, $\alpha(1,3)$ N-acetilgalactosaminiltransferasa, $\beta(1,4)$ N-acetilgalactosaminiltransferasas (Nagata y col., J. Biol. Chem. 267: 12082-12089 (1992) y Smith y col., J. Biol. Chem. 269: 15162 (1994)) y la N-acetilgalactosaminiltransferasa peptídica (Homa y col., J. Biol. Chem. 268: 12609 (1993)). Las N-acetilglucosaminiltransferasas adecuadas incluyen GnTI (2.4.1.101, Hull y col., BBRC 176: 608 (1991)), GnTII, GnTIII (Ihara y col., J. Biochem. 113: 692 (1993)), GnTIV, GnTV (Shoreibah y col., J. Biol. Chem. 268: 15381 (1993)) y GnTVI, N-acetilglucosaminiltransferasa unida a O (Bierhuizen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9326 (1992)), N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (Rajput y col., Biochem J. 285: 985 (1992)), y la hialuronano sintasa.

Las mannosiltransferasas son de utilidad para transferir restos de manosa modificados. Las mannosiltransferasas incluyen $\alpha(1,2)$ mannosiltransferasa, $\alpha(1,3)$ mannosiltransferasa, $\alpha(1,6)$ mannosiltransferasa, $\beta(1,4)$ mannosiltransferasa, Dol-P-Man sintasa, OCh1, y Pmt1 (véase, Kornfeld y col., Annu. Rev. Biochem. 54: 631-664 (1985)).

Son también útiles en la presente invención las xilosiltransferasas. Véase, por ejemplo, Rodgers, y col., Biochem. J., 288:817-822 (1992); y Elbain, y col., Patente de los Estados Unidos N° 6.168.937.

Se describen otros ciclos de glicosiltransferasa adecuados en Ichikawa y col., JACS 114: 9283 (1992), Wong y col., J. Org. Chem. 57: 4343 (1992), e Ichikawa y col. en CARBOHYDRATES AND CARBOHYDRATE POLYMERS. Yaltami, ed. (ATL Press, 1993).

Las glicosiltransferasas procariotas son también útiles en la práctica de la invención. Dichas glicosiltransferasas incluyen las enzimas implicadas en la síntesis de lipooligosacáridos (LOS), que se producen por muchas bacterias gram negativas. Los LOS tienen normalmente secuencias de glicano en los extremos que imitan los glicoconjugados que se encuentran sobre la superficie de las células epiteliales humanas o en las secreciones del hospedador (Preston y col., Critical Reviews in Microbiology 23(3): 139-180 (1996)). Dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, las proteínas de los operones *rfa* de especies tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, que incluyen una $\beta(1,6)$ galactosiltransferasa y una $\beta(1,3)$ galactosiltransferasa (véanse, por ejemplo., EMBL N° de Acceso. M80599 y M86935 (*E. coli*); EMBL N° de Acceso. S56361 (*S. typhimurium*)), una glicosiltransferasa (Swiss-Prot N° de Acceso. P25740 (*E. coli*)), una $\beta(1,2)$ -glicosiltransferasa (*rfaJ*) (Swiss-Prot n° de Acceso P27129 (*E. coli*) y Swiss-Prot N° de Acceso P19817 (*S. typhimurium*)), y una $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa (*rfaK*) (EMBL n° de Acceso U00039 (*E. coli*)). Otras glicosiltransferasas cuyas secuencias de aminoácidos son conocidas 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 *rh1* de *Pseudomonas aeruginosa*.

Son también adecuadas también para el uso en la presente invención las glicosiltransferasas que están implicadas en la producción de estructuras que contienen lacto-N-neotetraosa D-galactosil- $\beta(1,4)$ -N-acetil-D-glucosaminil- $\beta(1,3)$ -D-galactosil- $\beta(1,4)$ -D-glucosa, y la secuencia de trisacáridos del grupo sanguíneo P^k, D-galactosil- $\alpha(1,4)$ -D-galactosil- $\beta(1,4)$ -D-glucosa, que se han identificado en los LOS de los patógenos mucosales *Miseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Scholten y col., J. Med. Microbiol. 41: 236-243 (1994)). Se han identificado los genes de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* que codifican las glicosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de estas estructuras para los inmunotipos 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 locus que consta de tres genes, *IgtA*, *IgtB* e *IgE*, codifica las enzimas glicosiltransferasas requeridas para la adición de los últimos tres azúcares a la cadena de la lacto-N-neotetraosa (Wakarchuk y col., J. Biol. Chem. 271: 19166-73 (1996)). Recientemente se ha demostrado la actividad enzimática del producto de los genes *IgtB* e *IgtA*, proporcionando la primera evidencia directa de su función glicosiltransferasa propuesta (Wakarchuk y col., J. Biol. Chem. 271(45): 28271-276 (1996)). En *N. gonorrhoeae* existen dos genes adicionales, *IgtD* que añade β -D-GalNAc en la posición de la galactosa terminal de la estructura de la lacto-N-neotetraosa, e *IgtC* que añade una α -D-Gal terminal al elemento lactosa de un LOS truncado, creando de esta manera la estructura del antígeno del grupo sanguíneo P^k (Gotshlich (1994), *más arriba*). En *N. meningitidis*, un inmunotipo L1 independientemente expresa también el antígeno del grupo sanguíneo P^k y se ha demostrado que transporta un gen *IgtC* (Jennings y col., (1995), *más arriba*). Se describen también las glicosiltransferasas de *Miseria* y los genes asociados en el documento USPN 5.545.553 (Gotshlich). Se han caracterizado los genes de la $\alpha(1,2)$ -fucosiltransferasa y la $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferasa de *Helicobacter pylori* (Martin y col., J. Biol. Chem. 272: 21349-21356 (1997)). También, de uso en la presente invención son las glicosiltransferasas de *Campylobacter jejuni* (véase, Taniguchi y col., 2002, Handbook of glycosyltransferases and related genes,

Springer, Tokio).

B. Sulfotransferasas

La invención proporciona también procedimientos para producir péptidos que incluyen moléculas sulfatadas, incluyendo, por ejemplo, polisacáridos sulfatados tales como heparina, sulfato de heparán, carragenato, y los compuestos relacionados. Las Sulfotransferasas adecuadas incluyen, por ejemplo, condroitin-6-sulfotransferasa (ADNc de pollo descrito por Fukuta y col., J. Biol. Chem. 270: 18575-18580 (1995); N° de Acceso del GenBank D49915), glucosaminoglicano N-acetilglucosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 1 (Dixon y col., Genomics 26: 239-241 (1995); UL18918), y glucosaminoglicano N-acetilglucosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 2 (ADNc de murino descrito en Orellana y col., J. Biol. Chem. 269: 2270-2276 (1994) y Eriksson y col., J. Biol. Chem. 269: 10438-10443 (1994); ADNc humano descrito en el N° de Acceso al GenBank U2304).

C. Glicosiltransferasas unidas a células

En otra realización, las enzimas utilizadas en el procedimiento de la invención son glicosiltransferasas unidas a células. Aunque se conocen muchas glicosiltransferasas solubles (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.032.519), las glicosiltransferasas se encuentran por lo general en una forma unida a membrana cuando se asocian con células. Se considera que muchas de las enzimas unidas a membrana estudiadas hasta el momento son proteínas intrínsecas, esto es, no se liberan de las membranas por sonicación y requieren detergentes para su solubilización. Se han identificado glicosiltransferasas superficiales sobre las superficies de células de vertebrados e invertebrados, y también se ha reconocido que estas transferasas superficiales mantienen la actividad catalítica en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la función más reconocida de las glicosiltransferasas superficiales celulares es para el reconocimiento intercelular (Roth, 1990, Molecular Approaches to Supracellular Phenomena,).

Se han desarrollado procedimientos para alterar las glicosiltransferasas expresadas por células. Por ejemplo, Larsen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8227-8231 (1989), notifican una solución genética para aislar secuencias de ADNc clonadas que determinan la expresión de estructuras de oligosacáridos superficiales celulares y sus glicosiltransferasas análogas. Se ha transfectado una biblioteca de ADNc generada a partir de ARNm aislado de una línea de células de murino conocida que expresa UDP-galactosa: β -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida α -1,3-galactosiltransferasa en células COS-1. A continuación se han cultivado las células transfectadas y se han evaluado para la actividad de la α 1-3 galactosiltransferasa.

Francisco y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2713-2717 (1992), dan a conocer un procedimiento para anclar β -lactamasa a la superficie externa de *Escherichia coli*. Una fusión tripartita que consiste en (i) una secuencia señal de una proteína de la membrana externa, (ii) una sección extensora de la membrana de una proteína de la membrana externa, y (iii) se produce una secuencia de la β -lactamasa madura completa dando como resultado una molécula de β -lactamasa unida a una superficie activa. Sin embargo, el procedimiento de Francisco se limita solo a sistemas de células procariontas y como reconocen los autores, requiere la fusión tripartita completa para un funcionamiento adecuado.

D. Enzimas de fusión

En otras realizaciones a modo de ejemplo, los procedimientos de la invención utilizan péptidos de fusión que tienen más de una actividad enzimática que está implicada en la síntesis de un conjugado glucopeptídico deseado. Los péptidos de fusión pueden estar compuestos de, por ejemplo, un dominio catalíticamente activo de una glicosiltransferasa que se une a un dominio catalíticamente activo de una enzima auxiliar. El dominio catalítico de la enzima auxiliar puede, por ejemplo, catalizar una etapa en la formación de un azúcar de nucleótido que es un donante de la glicosiltransferasa, o catalizar una reacción implicada en un ciclo de glicosiltransferasa. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica una glicosiltransferasa puede unirse, en su estructura, a un polinucleótido que codifica una enzima implicada en una síntesis del azúcar de un nucleótido. El péptido de fusión resultante puede a continuación catalizar no solo la síntesis del azúcar de nucleótido, sino también la transferencia de un resto de azúcar a la molécula aceptora. El péptido de fusión puede estar unido a dos o más enzimas del ciclo en una secuencia de nucleótido que se puede expresar. En otras realizaciones, el péptido de fusión incluye los dominios catalíticamente activos de dos o más glicosiltransferasas. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.641.668. Los glicopéptidos modificados de la presente invención se pueden diseñar y fabricar fácilmente utilizando diversos péptidos de fusión adecuados (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente PCT/CA98/01180, que se ha publicado como documento WO 99/31224 el 24 de junio de 1999).

E. Enzimas inmovilizadas

Además de las enzimas unidas a células, la presente invención proporciona también el uso de enzimas que están inmovilizadas sobre un soporte sólido y/o soluble. En una realización a modo de ejemplo, se proporciona una glicosiltransferasa que está conjugada a un PEG mediante un enlazador de glicosilo intacto de acuerdo con los procedimientos de la invención. El conjugado PEG-enlazador-enzima está opcionalmente unido a un soporte sólido. El uso de enzimas soportadas en un sólido en los procedimientos de la invención simplifica las tareas de mezclar la reacción y de purificar el producto de reacción, y permite también la fácil recuperación de la enzima. El conjugado de glicosiltransferasa se utiliza en los procedimientos de la invención. Serán evidentes para los expertos en la técnica

otras combinaciones de enzimas y soportes.

F. Mutagénesis de glicosiltransferasas

Las novedosas formas de las glicosiltransferasas, sialiltransferasas, sulfotransferasas, y cualquier otra enzima utilizada en el procedimiento de la invención se pueden crear utilizando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, así como otros bien conocidos por los expertos en la técnica. De particular interés son las transferasas con especificidad aceptora alterada y/o especificidad donante. De interés también son las enzimas con mayores tasas de conversión y mayor estabilidad entre otras.

Las técnicas de mutagénesis de diseño lógico se pueden utilizar cuando se conoce la secuencia del péptido. Puesto que se conocen las secuencias y muchas de las estructuras terciarias de las transferasas y las glicosidasas utilizadas en la invención, estas enzimas son ideales para el diseño lógico de mutantes. Por ejemplo, el sitio catalítico de la enzima puede estar mutado para alterar la especificidad donante y/o aceptora de la enzima.

Los extensos datos estructurales terciarios en las glicosiltransferasas y las glucosidasa hidrolasas pueden dar idea de las mutaciones de estas enzimas que implican intercambios de dominios. Las glicosiltransferasas y glucosidasa hidrolasas son enzimas modulares (véase, Bourne y Henrissat, 2001, Current Opinion in Structural Biology 11:593-600). Las glicosiltransferasas se dividen en dos familias básicas según su estructura: GT-A y GT-B. Las glicosiltransferasas de la familia GT-A comprenden dos dominios disimilares, uno implicado en la unión del nucleótido y el otro en la unión del aceptor. De esta manera, se podría fusionar de forma conveniente la secuencia de ADN que codifica el dominio de un gen en marco con un dominio de un segundo gen para crear un nuevo gen que codifica una proteína con una nueva especificidad aceptora7donante. Dichos intercambios de dominios podrían incluir adicionalmente los módulos de hidratos de carbono y otros dominios accesorios.

Se pueden usar también técnicas de mutación aleatoria y/o evolución dirigida, tal como se ha descrito anteriormente, para crear novedosas formas de las glicosiltransferasas y Glicosidasas utilizadas en la invención.

IV. Sistemas de expresión *in vitro* e *in vivo*

A. Células para la producción de glicopéptidos

La acción de las glicosiltransferasas es clave para la glicosilación de los péptidos, de esta manera, la diferencia en la expresión de un conjunto de glicosiltransferasas en cualquier tipo de célula dado afecta el modelo de glicosilación de cualquier péptido dado producido en esta célula. Para una revisión de la glicosilación de péptidos dependiente de célula hospedadora, véase Kabata y Takasaki, "Structure and Biosynthesis of Cell Surface Carbohydrates," en Cell Surface Carbohydrates and Cell Development, 1991, pp. 1-24, Eds. Minoru Fukuda, CRC Press, Boca Raton, FL.

De acuerdo con la presente divulgación, el tipo de célula en la que el péptido se produce solo es relevante en lo que respecta al grado de remodelación requerido para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada. Por ejemplo, el número y la secuencia de las reacciones de digestión enzimáticas y el número y la secuencia de las reacciones sintéticas enzimáticas que se requieren para generar *in vitro* un péptido que tenga la glicosilación deseada variarán dependiendo de la estructura del glicano en el péptido producido por un tipo de célula concreto. Aunque la invención no debe considerarse en forma alguna limitada a la producción de péptidos procedentes de cualquier tipo de célula concreto incluyendo cualquier tipo de célula dado a conocer en el presente documento, se presenta ahora una discusión de algunos sistemas celulares que establecen la potencia de la presente invención y su dependencia del tipo de célula que la que se generan los péptidos.

En general, y para expresar un péptido a partir del ácido nucleico que lo codifica, el ácido nucleico debe incorporarse a un casete de expresión, que comprende un elemento promotor, un elemento terminador, y la secuencia de codificación del péptido unido de manera operable entre los dos. A continuación el casete de expresión se une de manera operable a un vector. Con este fin, se pueden emplear adápteros o enlazadores para unir los fragmentos del nucleótido o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar los sitios de restricción convenientes, la eliminación de nucleótidos superfluos, la eliminación de sitios de restricción, o similares. Con este fin, puede estar implicada la mutagénesis *in vitro*, la reparación del cebador, la restricción, la hibridación, las resustituciones, por ejemplo, transiciones y transversiones. Un vector lanzadera tiene los elementos genéticos necesarios para la replicación en una célula. Algunos vectores pueden replicarse solamente en procariotas, o pueden replicarse en procariotas y eucariotas. Dicho vector de expresión plásmido se mantendrá en uno o más sistemas de replicación, preferiblemente dos sistemas de replicación, que permiten el mantenimiento estable en el interior de una célula hospedadora de levadura para los fines de la expresión, y en el interior de un hospedador procariota para los fines de la clonación. Muchos vectores con características diversas están comercialmente disponibles en la actualidad. Los vectores son normalmente plásmidos o fagos, pero pueden ser también cósmidos o minicromosomas. De forma conveniente, muchos vectores comercialmente disponibles tendrán el promotor y el terminador del casete de expresión ya presente, y un sitio multienlazador en el que puede insertarse la secuencia de codificación del péptido de interés. El vector lanzadera que contiene el casete de expresión se transforma a continuación en *E. coli* donde se replica durante la división celular para generar una preparación de vector que es suficiente para transformar las células hospedadoras de la presente invención del sistema de expresión escogido. La anterior metodología es bien conocida por los expertos en la técnica, y los protocolos por los cuales se lleva a cabo se pueden encontrar en

Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

El vector, una vez purificado de las células en las que se amplifica, se transforma a continuación en las células del sistema de expresión. El protocolo de transformación depende del tipo de célula y de la naturaleza del vector. Se hacen crecer transformantes en un medio nutriente adecuado, y cuando es adecuado, se mantienen bajo presión selectiva para asegurar la retención del ADN endógeno. Cuando la expresión es inducible, se puede permitir el crecimiento de la levadura hospedadora para dar como resultado una elevada densidad de células, y a continuación se induce la expresión. El péptido heterólogo secretado maduro se puede cosechar mediante cualquier medio convencional, y purificarse mediante cromatografía, electroforesis, diálisis y, extracción disolvente-disolvente.

Son bien conocidas en la materia las técnicas de clonación molecular. Además, las técnicas para los procedimientos de clonación molecular se pueden encontrar en Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Glover y col., (1985, DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II); Gait y col., (1985, Oligonucleotide Synthesis); Hames y Higgins (1985, Nucleic Acid Hybridization); Hames y Higgins (1984, Transcription And Translation); Freshney y col., (1986, Animal Cell Culture); Perbal, (1986, Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press); Perbal, (1984, A Practical Guide To Molecular Cloning); Ausubel y col. (2002, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.).

B. Hongos y levaduras

Los péptidos producidos en levaduras se glucosilan y las estructuras de glicano presentes en los mismos son principalmente estructuras con un alto contenido en manosa. En el caso de los N-glicanos, las estructuras de glicano producidas en levaduras pueden contener como mucho nueve o más restos de manosa que pueden contener o no azúcares adicionales añadidos a los anteriores. En la Figura 5, lado de la izquierda se muestra un ejemplo del tipo de glicano en los péptidos producidos por células de levadura. Sin tener en cuenta el número de restos de manosa y el tipo y la complejidad de los azúcares adicionales añadidos a los anteriores, los N-glicanos como componentes de los péptidos producidos en células de levadura comprenden una estructura de un núcleo de trimanosilo tal como se muestra en la Figura 5. Cuando la estructura de glicano de un péptido producido en las células de levadura es una estructura con un alto contenido en manosa, es un tema sencillo para la persona normalmente experta eliminar, *in vitro*, utilizando las enzimas manosidasas disponibles, todos los restos de manosa procedentes de la molécula excepto aquellos que comprenden el núcleo de trimanosilo del glicano, generando de esta forma un péptido que tiene una estructura elemental de núcleo de trimanosilo unida a la anterior. Ahora, utilizando las técnicas disponibles en la materia, y provistos con la presente divulgación, es un tema sencillo añadir enzimáticamente, *in vitro*, restos de azúcar adicionales a la estructura elemental del núcleo de trimanosilo para generar un péptido que tenga una estructura de glicano deseada unida a la anterior. De forma similar, cuando el péptido producido por la célula de levadura comprende una estructura con un alto contenido de manosa además de otros azúcares complejos unidos a la anterior, es un tema sencillo escindir enzimáticamente todos los azúcares adicionales, incluyendo los restos extra de manosa, para llegar a una estructura elemental de núcleo de trimanosilo. Una vez que se produce la estructura elemental de núcleo de trimanosilo, es posible la generación de un péptido que tenga una glicosilación deseada siguiendo las directrices proporcionadas en el presente documento.

Por "levadura", se entiende levaduras ascoesporógenas (Endomicetales), levaduras basidioesporógenas, y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (Blastomicetos). Las levaduras ascoesporógenas se dividen en dos familias Spermophthoraceae y Saccharomycetaceae. La última está comprendida por cuatro subfamilias, *Schizosaccharomycoidae* (por ejemplo, género *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae*, y *Saccharomycoidae* (por ejemplo, genera *Pichia*, *Kluyveromyces*, y *Saccharomyces*). Las levaduras basidioesporógenas incluyen los géneros *Leucosporidium*, *Rhodospodium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium*, y *Filobasidiella*. Las levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos se dividen en dos familias, *Sporobolomycetaceae* (por ejemplo, géneros *Sporobolomyces*, *Bullera*) y *Cryptococcaceae* (por ejemplo, género *Candida*). De particular interés para la presente invención son las especies comprendidas en los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Kluyveromyces*, de forma especial *K. lactis* y *K. drosophilum*, *Candida*, *Hansenula*, *Schizpsaccaromyces*, *Yarrowia*, y *Chrysosporium*. Debido a que la clasificación de levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de la presente invención, las levaduras deben definirse tal como se describe en Skinner y col., eds. 1980) Biology and Activities of Yeast (Soc. App. Bacteriol. Symp. Serie N° 9).

Además de lo anterior, las personas normalmente expertas en la técnica están presumiblemente familiarizadas con la biología de las levaduras y la manipulación de la genética de las levaduras. Véanse, por ejemplo, Bacila y col., eds. (1978, Biochemistry and Genetics of Yeast, Academic Press, New York); y Rose y Harrison. (1987, The Yeasts (2ª ed.) Academic Press, Londres). Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para introducir ADN exógeno en levaduras hospedadoras. Existe una amplia variedad de procedimientos para la transformación de levaduras. Hinnen y col (1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1919-1933); Beggs, (1978, Nature 275(5676):104-109); y Stinchcomb y col., (Publicación EPO N° 45.573 enseñan la transformación de esferoplastos), Becker y Gaurante, (1991, Methods Enzymol. 194:182-187) enseñan la electroporación, Gietz y col. (2002, Methods Enzymol. 350: 87-96) y Mount y col. (1996, Methods Mol Biol. 53:139-145) enseñan el acetato de litio. Para una revisión de los sistemas de transformación de levaduras no de *Saccharomyces*, véase Wang y col. (Crit Rev Biotechnol. 2001;21(3): 177-218). Para los procedimientos generales sobre la genomanipulación de levaduras, véase Barr y col., (1989, Yeast genetic engineering, Butterworths, Boston).

Además de las levaduras naturales y de las células fúngicas, existen también cepas de levaduras y hongos que se han mutado y/o seleccionado para potenciar el nivel de expresión del gen exógeno, y la pureza, el procesamiento posterior a la traducción del péptido resultante, y la recuperación y la pureza del péptido maduro. Puede dirigirse también la expresión de un péptido exógeno hacia la ruta secretora de la célula, tal como se ilustra mediante la expresión de la insulina (véase (Kjeldsen, 2000, Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 277-286, y las referencias citadas en el anterior). En general, para dar lugar a que se secrete el péptido exógeno a partir de la célula de levadura, se pueden utilizar las señales de secreción derivadas de los genes de levaduras, tal como aquellos genes de la toxina asesina (Stark y Boyd, 1986, EMBO J. 5: 1995-2002) o de la feromona alfa (Kurjan y Herskowitz, 1982, Cell 30: 933; Brake y col., 1988, Yeast 4: S436).

Con respecto a los hongos filamentosos en general, se pueden encontrar los procedimientos para la manipulación genética en Kinghorn y Turner (1992, Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi, Blackie Academic and Professional, Nueva York). Se pueden encontrar directrices sobre vectores adecuados en Martinelli y Kinghorn (1994, Aspergillus: 50 años, Elsevier, Amsterdam).

1. *Saccharomyces*

En *Saccharomyces*, los vectores de levaduras adecuados para el uso que producen un péptido incluyen YRp7 (Struhl y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1035-1039, 1978), YEp13 (Broach y col., Gene 8: 121-133, 1979), vectores POT (Kawasaki y col., Patente de los Estados Unidos N° 4.931.373, que se incorpora por referencia en el presente documento), pJDB249 y pJDB219 (Beggs, Nature 275: 104-108, 1978) y sus derivados. Los promotores preferidos para el uso en levaduras incluyen promotores para la expresión del gen glucolítico en levaduras (Hitzeman y col., J. Biol. Chem. 255: 12073-12080, 1980; Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Genet. 1: 419-434, 1982; Kawasaki, Patente de los Estados Unidos N° 4.599.311) o los genes de la alcohol deshidrogenasa (Young y col., en Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Hollaender y col., (eds.), p. 355, Plenum, Nueva York, 1982; Ammerer, Meth. Enzymol. 101: 192-201, 1983), y el promotor de la ADH2-4^G (Russell y col., Nature 304: 652-654, 1983; Irani y Kilgore, Solicitud de patente de los Estados Unidos con N° de serie 07/784.653, documento CA 1.304.020 y documento EP 284 044). Las unidades de expresión pueden incluir también un terminador de la transcripción. Un terminador de la transcripción preferido es el terminador TPI1 (Alber y Kawasaki, *ibid.*).

Los ejemplos de vectores lanzadera de levaduras-bacterias incluyen Yep24 (Botstein y col. (1979) Gene 8: 17-24; pC1 (Brake y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4642-4646), e Yrp17 (Stinchcomb y col. (1982) J. Mol. Biol. 158:157). Adicionalmente un vector de expresión plásmido puede ser un plásmido de un alto o bajo número de copias, el número de copias varía generalmente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200. En el caso de vectores de levaduras con un alto número de copias, será generalmente al menos de 10, preferiblemente al menos 20, y usualmente no excederá de al menos 150 copias del vector en un único hospedador. Dependiendo del péptido heterólogo seleccionado, puede ser deseable tanto un alto como un bajo número de copias, dependiendo del efecto del vector y del péptido recombinante sobre el hospedador. Véase, por ejemplo, Brake y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4642-4646. Las construcciones de ADN de la presente invención se pueden integrar también en el genoma de la levadura mediante un vector de integración. Se conocen en la técnica ejemplos de dichos vectores. Véase, por ejemplo, Botstein y col. (1979) Gene 8:17-24.

La selección de una levadura adecuada y de otros microorganismos hospedadores para la práctica de la presente invención está comprendida en el conocimiento del experto en la técnica. De particular interés son las especies de *Saccharomyces* *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, y *S. oviformis*. Cuando se seleccionan las células hospedadoras de levadura para la expresión de un péptido deseado, las células hospedadoras de levaduras pueden incluir aquellas que muestran, entre otras, una buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica, y vigor global. Las levaduras y otros microorganismos están generalmente disponibles de una variedad de fuentes, que incluyen el Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, Calif.; y la American Type Culture Collection, Manassas VA. Para una revisión, véase Strathern y col., eds. (1981, The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para introducir ADN exógeno en levaduras hospedadoras.

2. *Pichia*

El uso de *Pichia methanolica* como célula hospedadora para la producción de péptidos recombinantes se da a conocer en las Solicitudes PCT WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536, y WO 98/02565. Las moléculas de ADN para uso en *P. methanolica* transformante se preparan comúnmente como plásmidos circulares bicatenarios, que se linealizan de forma preferible antes de la transformación. Para la producción de péptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y el terminador en el plásmido sean el de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen para la utilización de alcohol de *P. methanolica* (AUG1 o AUG2). Otros promotores útiles incluyen los procedentes de los genes de la dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD), y catalasa (CAT), así como los dados a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 5.252.726. Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma hospedador, se prefiere tener el segmento de expresión completo del plásmido flanqueado en ambos extremos por secuencias de ADN hospedador. Un marcador seleccionable preferido para uso en *Pichia methanolica* es un gen ADE2 de *P. methanolica*, que codifica la fosforibosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), que

permite a las células hospedadoras *ade2* crecer en ausencia de adenina. Para los procedimientos industriales a gran escala, en los que es deseable minimizar el uso de metanol, se prefieren las células hospedadoras en las que se eliminan ambos genes de utilización del metanol (AUG1 y AUG2). Se utiliza la electroporación para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un péptido de interés en células de *P. methanolicus*. Se prefiere transformar las células de *P. methanolicus* mediante electroporación utilizando un campo eléctrico alternante cuya intensidad disminuye de manera exponencial que tiene una fuerza del campo de entre 2,5 a 4,5 kV/cm, preferiblemente de aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (t) de entre 1 a 40 milisegundos, lo más preferible de aproximadamente 20 milisegundos. Para una revisión del uso de *Pichia pastoris* para la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpo, véase Fischer y col., (1999, Biotechnol Appl Biochem. 30 (Pt 2):117-120).

3. *Aspergillus*

Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para expresar péptidos en *Aspergillus* spp., que incluyen, pero no se limitan a aquellos descritos en Carrez y col., 1990, Gene 94: 147-154; Contreras, 1991, Bio/Technology 9: 378-381; Yelton y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474; Tilburn y col., 1983, Gene 26: 205-221; Kelly y. Hynes, 1985, EMBO J. 4: 475-479; Ballance y col., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 112: 284-289; Buxton y col., 1985, Gene 37: 207-214, y la Patente de los Estados Unidos N° 4.935.349. Se encuentran ejemplos de promotores útiles en *Aspergillus* en la Patente de los Estados Unidos N° 5.252.726. Se encuentran cepas de *Aspergillus* útiles para la expresión de péptidos en la Patente de los Estados Unidos N° 4.935.349. La producción comercial de péptidos exógenos está disponible de Novoenzymes para *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*.

4. *Trichoderma*

Trichoderma tiene determinadas ventajas sobre otras especies de células hospedadoras recombinantes para la expresión de los péptidos deseados. Es fácil hacer crecer este organismo en grandes cantidades y tiene la capacidad de glucosilar y secretar eficazmente rendimientos elevados de péptidos de mamífero recombinantes en el medio, haciendo el aislamiento del péptido relativamente fácil. Además, el modelo de glicosilación en los péptidos expresados es más similar al de los péptidos humanos que los péptidos expresados en otros sistemas. Sin embargo, sigue existiendo diferencias en las estructuras de glicanos en los péptidos expresados a partir de estas células. Por ejemplo, los restos de ácido siálico de los extremos son importantes para la función terapéutica de un péptido en un sistema de mamífero, debido a que la presencia de estos restos al extremo de la estructura de glicano impide el aclaramiento peptídico a partir del torrente sanguíneo de mamífero. El mecanismo que retrasa el aumento de la vida media biológica de las moléculas sialiladas se cree que está basado en su reconocimiento disminuido por las lecitinas (Drickamer, 1988, J. Biol. Chem. 263: 9557-9560). Sin embargo, en general, las células fúngicas no añaden restos de ácido siálico de los extremos a los glicanos en los péptidos, y los péptidos sintetizados en las células fúngicas son por tanto asiálicos. De acuerdo con la presente invención, se puede remediar esta deficiencia utilizando los procedimientos de remodelación del glicano *in vitro* de la invención descritos en detalle en otra parte en el presente documento.

Las especies de *Trichoderma* útiles como hospedadores para la producción de péptidos que se van a remodelar incluyen *T. reesei*, tal como QM6a, ALKO2442 o CBS383.78 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, PO Box 273, 3740 AG Baarn, Países bajos, o, ATCC13631 (American Type Culture Collection, Manassas VA, 10852, USA, tipo); *T. viride* (tal como CBS189.79 (det. W. Gams); *T. longibrachiatum*, tal como CBS816.68 (tipo); *T. pseudokoningii* (tal como MUCL19358; Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain); *T. satumisporum* CBS330.70 (tipo); *T. harzianum* CBS316.31 (det. W. Gams); *T. virgatum* (*T. pseudokoningii*) ATCC24961. Lo más preferible, el hospedador es *T. reesei* y de forma más preferible, son las cepas QM9414 de *T. reesei* (ATCC 26921), RUT-C-30 (ATCC 56765), y mutantes muy productivos tales como VTT-D-79125, que se deriva de QM9414 (Nevalainen, Technical Research Centre of Finland Publications 26, (1985), Espoo, Finlandia).

La transformación de *Trichoderma* con ADN se lleva a cabo utilizando cualquier técnica conocida en la materia, que incluye la que se enseña en la patente europea N° EP0244234, Harkki (1989, Bio/Technology 7: 596-601) y Uusitalo (1991, J. Biotech. 17: 35-50). El cultivo de *Trichoderma* está respaldado por una extensa experiencia previa en técnicas de fermentación a escala industrial; por ejemplo, véase Finkelstein, 1992, Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Products, Butterworth-Heinemann, editores, Stoneham, Mass.

5. *Kluyveromyces*

Las levaduras pertenecen al género *Kluyveromyces* se han utilizado como organismos hospedadores para la producción de péptidos recombinantes. Los péptidos producidos por este género de levadura son, en concreto, quimosina (Patente Europea 96 430), taumatina (Patente Europea 96 910), albúmina, interleuquina-1 β , TPA, TIMP (Patente Europea 361 991) y derivados de albúmina que tienen una función terapéutica (Patente Europea 413 622). Las especies de particular interés en el género *Kluyveromyces* incluyen *k. lactis*.

Los procedimientos para expresar péptidos recombinantes en *Kluyveromyces* spp, son bien conocidos en la técnica. Los vectores para la expresión y la secreción de péptidos recombinantes humanos en *Kluyveromyces* son conocidos en la técnica (Yeh, J. Cell. Biochem. Suppl. 14C:68, Abst. H402; Fleer, 1990, Yeast 6 (Volumen Especial):S449) que

son procedimientos para la transformación y la expresión de péptidos recombinantes (Ito y col., 1983, J. Bacteriol. 153:163-168; van den Berg, 1990, Bio/Technology 8: 135-139; Patente de los Estados Unidos N° 5.633.146, Documentos WO8304050A1, EP0096910, EP0241435, EP0301670, EP0361991, todos ellos incorporados por referencia en su totalidad en el presente documento). Para una revisión de la manipulación génica del ADN lineal de *Kluyveromyces lactis* mediante referenciación genética e intercambio plásmido véase Schaffarth y col. (FEMS Microbiol Lett. 178(2):201-210, 1999).

6. *Chrysosporium*

El género fúngico *Chrysosporium* se ha utilizado recientemente para la expresión de péptidos recombinantes extraños. Una descripción de los procedimientos por los cuales el experto en la técnica puede usar *Chrysosporium* se puede utilizar para péptidos extraños se encuentra en el documento WO 00/20555). Las especies particularmente adecuadas para el sistema de expresión incluyen, pero sin limitación, *C. botryoides*, *C. carmichaelii*, *C. crassitunicatum*, *C. europae*, *C. evoluceannui*, *F. fastidium*, *C. filiforme*, *C. gerogiae*, *C. globiferum*, *C. globiferum* var. *articulatum*, *C. globiferum* var. *niveum*, *C. hirundo*, *C. hispanicum*, *C. holmii*, *C. indicum*, *C. inops*, *C. keratinophilum*, *C. kreiselii*, *C. kuzurovianum*, *C. lignorum*, *C. lobatum*, *C. lucknowense*, *C. lucknowense* Garg 27K, *C. medium*, *C. medium* var. *spissescens*, *C. mephiticum*, *C. merdarium*, *C. merdarium* var. *roseum*, *C. minor*, *C. pannicola*, *C. parvum*, *C. parvum* var. *crescens*, *C. pilosum*, *C. peodomerderium*, *C. pyriformis*, *C. queenslandicum*, *C. sigleri*, *C. sulfureum*, *C. synchronum*, *C. tropicum*, *C. undulatum*, *C. vallenarense*, *C. vespertilium*, y *C. zonatum*.

7. Otros

En la Patente Europea 394 538 se dan a conocer procedimientos para transformar *Schwanniomyces*. Los procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum* se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 5.162.228. Se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.486.533 los procedimientos para transformar *Neurospora*. Se conoce también un sistema de expresión específico de *Schizosaccharomyces pombe* (Patente europea N° 385 391) Los procedimientos generales para expresar péptidos en la levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe* se pueden encontrar en Giga-Hama y Kumagai (1997, Foreign gene expression in fission yeast: *Schizosaccharomyces pombe*, Springer, Berlín).

C. Sistemas de mamífero

Como se menciona anteriormente, las células de mamífero producen normalmente una mezcla heterogénea de estructuras de N-glicano que varían con respecto al número y la disposición de azúcares adicionales unidos al núcleo de trimanosilo. Normalmente, las células de mamífero producen péptidos que tienen una estructura de glicano compleja, Tal como la que se muestra en la Figura 4, lado de la derecha. Utilizando los procedimientos de la presente invención, un péptido producido en una célula de mamífero puede remodelarse *in vitro* para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada identificando en primer lugar la estructura de glicano y determinando a continuación qué azúcares deben eliminarse con el fin de remodelar la estructura de glicano. Tal como se ha discutido en el presente documento, los azúcares que se van a eliminar determinarán qué enzimas de escisión se utilizarán y de esta manera, las etapas precisas del procedimiento de remodelación variarán dependiendo de la estructura de glicano primaria utilizada como el sustrato inicial. En la Figura 3 se muestra un esquema de ejemplo para remodelar una estructura de glicano comúnmente producida en células de mamífero. Se ha caracterizado bien la ruta biosintética de N-glicano en células de mamífero (revisado en Moremen, 1994, Glycobiology 4:113-125). Se han identificado muchas de las enzimas necesarias para la síntesis de glicano, y se han aislado líneas de células mutantes defectivas en esta ruta enzimática que incluyen las líneas de células de ovario de hámster chino (CHO) Lec23 (defectivas en alfa-glucosidasa I) y Lec18 (GlcNAc-TVIII novedosa). El modelo de glicosilación de los péptidos producidos por estas células mutantes está alterado con respecto a las células CHO normales. Tal como se discute en el presente documento, los defectos de la glicosilación en estas y otras células mutantes pueden aprovecharse con el fin de producir un péptido que carece de una estructura compleja de glicano. Por ejemplo, los péptidos producidos por células Lec23 carecen de restos de ácido siálico, y por tanto requieren menos manipulación enzimática con el fin de reducir la estructura de glicano a un núcleo de trimanosilo elemental o a Man3GlcNAc4. De esta manera, los péptidos producidos en estas células pueden servir como sustratos preferidos para la remodelación del glicano. Una persona normalmente experta en la técnica podría aislar o identificar otras líneas de células defectivas para la glicosilación basándose en procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento descrito en Stanley y col., 1990, Somatic Cell Mol. Genet., 16: 211-223. El uso de líneas de células defectivas para la glicosilación, unas identificadas y otras todavía sin identificar, se incluye en la invención a fin de generar sustratos peptídicos preferidos para los procedimientos de remodelación descritos en el presente documento.

Son numerosos los vectores de expresión útiles para expresar péptidos exógenos en células de mamíferos, y son bien conocidos de los expertos en la técnica. Muchos vectores de expresión de mamíferos están ahora comercialmente disponibles de compañías, incluyendo Novagen, Inc (Madison, WI), Gene Therapy Systems (San Diego, CA), Promega (Madison, WI), ClonTech Inc. (Palo Alto, CA), y Stratagene (La Jolla, CA), entre otras.

Existen algunas líneas de células de mamíferos que son particularmente adecuadas para expresar péptidos exógenos. Normalmente, las líneas de células de mamíferos originadas a partir de células tumorales que se han llegado a inmortalizar, es decir, que se pueden replicar en cultivo esencialmente de forma indefinida. Estas líneas de

células incluyen, pero sin limitación, CHO (Ovario de hámster chino, por ejemplo, CHO-K1, ATCC N°. CCL 61) y sus variantes, NS0 (mieloma de ratón), BNK, BHK 570 (ATCC N° CRL 10314), BHK (ATCC N° CRL 1632), Per.C6™ (células humanas inmortalizadas, Crucell N.V., Leiden, Países Bajos), COS-1 (ATCC N° CRL 1650), COS-7 (ATCC N° CRL 1651), HEK 293, células L de ratón, Líneas celulares de linfocitos T, células BW5147 y MDCK (riñón canino Madin-Darby), HeLa (ser humano), A549 (carcinoma de pulmón humano), 293 (ATCC N° CRL 1573; Graham y col., 1977, Gen. Virol. 36 :59-72), BGMK (riñón de mono verde Buffalo), Hep-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana), LLC-MK2 (Riñón de Mono Verde Africano), McCoy, NCI-H292 (carcinoma tubular mucoepidermoide pulmonar humano), RD (rhabdomiosarcoma), Vero (riñón de Mono verde Africano), HEL (pulmón embrionario humano), Pulmón Fetal Humano-Chang, MRC5 (pulmón embrionario humano), MRHF (prepucio humano), y WI-38 (pulmón embrionario humano, y WI-38 (pulmón embrionario humano). En algunos casos, las células en las que se expresa el péptido terapéutico pueden ser células derivadas del paciente que se va a tratar, o pueden derivar de otro mamífero relacionado o no relacionado. Por ejemplo, se pueden aislar células de fibroblastos procedentes de tejido de la piel de un mamífero, y cultivarse y transformarse *in vitro*. Esta tecnología está comercialmente disponible de Transkaryotic Therapies, Inc. (Cambridge, MA). Casi todas las líneas celulares actualmente utilizadas están disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y BioWhittaker (Walkersville, Maryland).

Las células de mamífero pueden transformarse con ADN utilizando cualquiera de las diversas técnicas que son bien conocidas en la materia. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación, transformación con fosfato de calcio (Chen y Okayama, 1988 ; Graham Y van der Eb, 1973; Corsaro y Pearson, 1981, Somatic Cell Genetics 7:603), transfección con dextrano-dietilaminoetilo (DEAE) (Fujita y col., 1986; Lopata y col., 1984; Selden y col., 1986), electroporación (Neumann y col., 1982, ; Potter, 1988, ; Potter y col., 1984, ; Wong y Neuman, 1982), transfección de reactivo lípido catiónico (Elroy-Stein y Moss, 1990; Feigner y col., 1987; Rose y col., 1991; Whitt y col., 1990; Hawley-Nelson y col., 1993, Focus 15: 73; Ciccarone y col., 1993, Focus 15: 80), retroviral (Cepko y col., 1984; Miller y Baltimore, 1986; Pear y col., 1993; Austin y Cepko, 1990; Bodine y col., 1991; Fekete y Cepko, 1993; Lemischka y col., 1986; Turner y col., 1990; Williams y col., 1984; Miller y Rosman, 1989, BioTechniques 7: 980-90; Wang y Finer, 1996, Nature Med. 2:714-6), polibreno (Chaney y col, 1986; Kawai y Nishizawa, 1984), microinyección (Capecchi, 1980), y fusión de protoplastos (Rassoulzadegan y col., 1982; Sandri-Goldin y col., 1981; Schaffer, 1980), entre otros. En general, véase Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) y Ausubel y col. (2002, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York) para las técnicas de transformación

Recientemente, el sistema de baculovirus, popular para la transformación de células de insecto, se ha adaptado para la transformación estable de células de mamífero (véase, para la revisión, Koat y Condreay, 2002, Trends Biotechnol. 20: 173-180, y las referencias citadas en el anterior). Se da a conocer la producción de péptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas, por ejemplo, en las Patentes de los estados unidos N°s 4.713.339, 4.784.950; 4.579.821; y 4.656.134. Varias compañías ofrecen servicios de transformación y cultivo de células de mamíferos, incluyendo Cell Trends, Inc., (Middletown, MD). Las técnicas para el cultivo de células de mamífero son bien conocidas en la técnica, y también se pueden encontrar en la publicación de Hauser y col. (Mammalian Cell Biotechnology, Walter de Gruyter, Inc., Hawthorne, NY 1997) y Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, así como las referencias citadas en el presente documento.

D. Insecto

Las células de insecto, y en particular, las células de insecto cultivadas, expresan péptidos que tienen estructuras de glicano unidas a N que se sialilan raramente y comprenden normalmente residuos de manosa que pueden tener o no restos de fucosa adicionales unidos a los anteriores. En la Figura 7 se muestran ejemplos de tipos de estructuras de glicano presentes en péptidos producidas en células de insecto cultivadas y glicanos de manosa de los mismos.

Ha llegado a establecerse particularmente bien la expresión mediada por baculovirus en células de insecto para la producción de péptidos recombinantes (Altmann y col., 1999, Glycoconjugate J. 16: 109-123). Con respecto al plegado del péptido y al procesamiento posterior a la traducción, las células de insecto son solo secundarias a las líneas celulares de mamíferos. Sin embargo, tal como se ha señalado anteriormente, la N-glicosilación de los péptidos en células de insecto difiere en muchos aspectos de la N-glicosilación en células de mamífero particularmente en que las células de insecto generan con frecuencia estructuras de glicano truncadas que comprenden oligosacáridos que contienen exactamente tres o algunas veces solo dos restos de manosa. Estas estructuras pueden sustituirse adicionalmente con restos de fucosa.

De acuerdo con la presente invención, un péptido producido en una célula de insecto se puede remodelar *in vitro* para generar un péptido con la glicosilación deseada eliminando opcionalmente en primer lugar cualquier resto de fucosa sustituido utilizando una enzima fucosidasa adecuada. En los casos en los que el péptido comprende una estructura elemental de núcleo de trimanosilo tras la eliminación de los restos de fucosa, todo lo que se requiere a continuación es la adición *in vitro* de los azúcares adecuados a la estructura del núcleo de trimanosilo para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada. En los casos donde el péptido puede contener solo dos restos de manosa en la estructura de glicano tras la eliminación de cualquier resto de fucosa, se puede añadir un tercer resto de manosa utilizando una enzima manosiltransferasa y una molécula donante adecuada tal como GDP-manosa, y posteriormente se añaden los restos adecuados para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada.

Son bien conocidos en la técnica los protocolos para el uso de baculovirus para transformar células de insecto. Se han publicado algunos libros que proporcionan los procedimientos para el uso del sistema de baculovirus para expresar péptidos en células de insecto. Estos libros incluyen, pero no se limitan a, Richardson (Baculovirus Expression Protocols, 1998, Methods in Molecular Biology, Vol 39, Humana Pr), O'Reilly y co. (1994, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford Univ Press), y King y Possee (1992, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman & Hall). Además, existen también publicaciones tales como Lucklow (1993, Curr. Opin. Biotechnol. 4:564-572) y Miller (1993, Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 97-101).

Se han presentado también muchas patentes relacionadas con los sistemas de expresión en baculovirus de proteínas extrañas. Estas patentes incluyen, pero sin limitación, la patente de los Estados Unidos Nº. 6.210.966 (Culture medium for insect cells lacking glutamine an contains ammonium salt [Medio de cultivo para células de insecto que carece de glutamina y contiene sal de amonio]), Patente de los Estados Unidos Nº 6.090.584 ((Use of BVACs (BaculoVirus Artificial Chromosomes) to produce recombinant peptides [Uso de BVAC (Cromosomas Artificiales de BaculoVirus) para producir péptidos recombinantes]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.871.986 ((Use of a baculovirus to express a recombinant nucleic acid in a mammalian cell [Uso de un baculovirus para expresar un ácido nucleico recombinante en una célula de mamífero]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.759.809 (Methods of expressing peptides in insect cells and methods of killing insects [Procedimientos para expresar péptidos en células de insecto y procedimientos para matar insectos]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.753.220 (Cysteine protease gene defective baculovirus, process for its production, and process for the production of economic peptide by using the same [Baculovirus defectivo en el gen de la cisteína proteasa, procedimiento para su producción, y procedimiento para la producción económica de péptidos utilizando los mismos]), Patente de los Estados Unidos. 5.750.383 (Baculovirus cloning system [Sistema de clonación de baculovirus]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.731.182 (Non-mammalian DNA virus to express a recombinant nucleic acid in a mammalian cell [Virus de ADN no de mamífero para expresar un ácido nucleico recombinante en una célula de mamífero]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.728.580 (Methods and culture media for inducing single cell suspension in insect cell lines [Procedimientos y medios de cultivo para inducir una suspensión de células individuales en líneas celulares de insecto]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.583.023 (Modified baculovirus, its preparation process and its application as a gene expression vector [Baculovirus modificados, su procedimiento de preparación y su aplicación como un vector de expresión génica]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.571.709 (Modified baculovirus and baculovirus expression vectors [Baculovirus modificados y vectores de expresión de baculovirus]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.521.299 (Oligonucleotides for detection of baculovirus infection [Oligonucleótidos para la detección de la infección por baculovirus]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.516.657 ((Baculovirus vectors for expression of secretory and membranebound peptides [Vectores de baculovirus para la expresión de péptidos secretores y unidos a membrana]), Patente de los Estados Unidos 5.475.090 (Gene encoding a peptide which enhances virus infection of host insects [Gen que codifica un péptido que potencia la infección por virus de insectos hospedadores]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.472.858 (Production of recombinant peptides in insect larvae [Producción de péptidos recombinantes en larvas de insectos]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.348.886 (Method of producing recombinant eukaryotic viruses in bacteria [Procedimiento para producir virus eucariotas recombinantes en bacterias]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.322.774 (Prokaryotic leader sequence in recombinant baculovirus expression system [Secuencia líder procariota en un sistema de expresión de baculovirus recombinante]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.278.050 (Method to improve the efficiency of processing and secretion of recombinant genes in insect systems [Procedimiento para mejorar la eficacia de procesamiento y la secreción de genes recombinantes en sistemas de insectos]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.244.805 (Baculovirus expression vectors [Vectores de expresión de baculovirus]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.229.293 (Recombinant baculovirus [Baculovirus recombinante]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.194.376 (Baculovirus expression system capable of producing recombinant peptides at high levels [Sistema de expresión de baculovirus capaz de producir péptidos recombinantes a altos niveles]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.179.007 (Method and vector for the purification of recombinant peptides [Procedimiento y vector para la purificación de péptidos recombinantes]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.169.784 (Baculovirus dual promoter expression vector [Vector de expresión del promotor doble de baculovirus]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.162.222 (Use of baculovirus early promoters for expression of recombinant nucleic acids in stably transformed insect cells or recombinant baculoviruses [Uso de promotores tempranos de baculovirus en la expresión de ácidos nucleicos recombinantes en células de insecto transformadas de forma estable o baculovirus recombinantes]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.155.037 (Insect signal sequences useful to improve the efficiency of processing and secretion of recombinant nucleic acids in insect systems [Secuencias señal de insectos útiles para mejorar la eficacia del procesamiento y la secreción de ácidos nucleicos recombinantes en sistemas de insectos]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.147.788 (Baculovirus vectors and methods of use [Vectores de baculovirus y procedimientos de uso]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.110.729 (Method of producing peptides using baculovirus vectors in cultured cells [Procedimiento para la producción de péptidos utilizando vectores de baculovirus en células cultivadas]), Patente de los Estados Unidos Nº. 5.077.214 ((Use of baculovirus early promoters for expression of recombinant genes in stably transformed insect cells [Uso de promotores tempranos de baculovirus para la expresión de genes recombinantes en células de insecto transformadas de manera estable]), Patente de los Estados Unidos Nº 5.023.328 (Lepidopteran AKH signal sequence [Secuencia señal de AKH de Lepidópteros]), y Patentes de los Estados Unidos Nºs 4.879.236 y 4.745.051 (Method for producing a recombinant baculovirus expression vector [Procedimiento para producir un vector de expresión de baculovirus recombinante]).

Se están usando en la actualidad varias líneas celulares procedentes de insectos de varias especies diferentes para la expresión de péptidos, y estas líneas son bien conocidas de los expertos en la técnica. Las líneas celulares de insecto de interés incluyen, pero no se limitan a, células de insecto de dípteros y lepidópteros en general, Sf9 y sus variantes (palomilla del maíz de *Spodoptera frugiperda*), *Estigmene acrea*, *Trichoplusia ni*, *Bombyx mori*, *Malacosoma disstri*, líneas kc1 y SL2 de *Drosophila* entre otras, y mosquito.

E. Plantas

Las células vegetales como productoras de péptidos presentan un conjunto diferente de características. Mientras que los glicanos unidos a N producidos en plantas comprenden una estructura de núcleo de trimanosilo, esta estructura de pentasacárido puede comprender algunos azúcares diferentes adicionales tal como se muestra en Figura 6. Por ejemplo, en un caso, la estructura de núcleo de trimanosilo está sustituida por un resto de xilosa unido a β 1,2 y un resto de fucosa unido a α 1,3. Además, las células vegetales pueden producir también una estructura Man5GlcNAc2. Los péptidos producidos en células vegetales son frecuentemente muy antigénicos como resultado de la presencia del núcleo de α 1,3 fucosa y xilosa en la estructura de glicano y se aclaran rápidamente a partir del torrente sanguíneo cuando se introducen en un mamífero debido a la ausencia de restos de ácido siálico de los extremos. Por tanto, a no ser que estos péptidos se remodelen utilizando los procedimientos proporcionados en el presente documento, se consideran por lo general inadecuados como agentes terapéuticos en mamíferos. Aunque se ha encontrado que algunos anticuerpos monoclonales expresados en células vegetales no son inmunógenos en ratones, es probable que las cadenas de glicano no sean inmunógenas debido a que se pueden soterrar en la región Fc en estos anticuerpos (Chargelegue y col., 2000, Transgenic Res. 9(3): 187-194).

Siguiendo las directrices proporcionadas en el presente documento, es ahora posible generar un péptido producido en una célula vegetal en el que un número creciente de estructuras de glicano presentes en el anterior comprenden una estructura elemental de núcleo de trimanosilo, o una estructura Man3GlcNAc4. Esto se lleva a cabo escindiendo cualquier azúcar adicional *in vitro* utilizando una combinación de Glicosidasas adecuadas, que incluyen fucosidasas, hasta que se llega a la estructura elemental de núcleo de trimanosilo o a la estructura de Man3GlcNAc4. Estas reacciones de escisión deben incluir también la eliminación de cualquier resto de fucosa o xilosa de las estructuras a fin de disminuir la antigenicidad del péptido final cuando se introduce en un mamífero. Se conocen en la técnica células vegetales que tienen mutaciones que inhiben la adición de restos de fucosa y xilosa a la estructura del núcleo de trimanosilo (von Schaeuwen y col., 1993, Plant Physiology 102: 1109-1118). Se contempla por la invención el uso de estas células para producir péptidos que tienen glicanos que carecen de fucosa y xilosa. Tras la producción del núcleo elemental de trimanosilo o de la estructura de Man3GlcNAc4, se pueden añadir a continuación azúcares adicionales al anterior hasta llegar a un péptido que tenga la glicosilación deseada que sea por tanto adecuado para el uso terapéutico en un mamífero.

Las plantas transgénicas son consideradas por muchos autores que son el sistema de expresión de elección para péptidos farmacéuticos. Potencialmente, las plantas pueden proporcionar una fuente más barata de péptidos recombinantes. Se ha estimado que los costes de producción de los péptidos recombinantes en plantas podrían ser entre 10 y 50 veces inferiores que los de los mismos péptidos en *E. coli*. Aunque existen ligeras diferencias en la utilización de codones en vegetales en comparación con animales, estas se pueden compensar ajustando las secuencias de ADN recombinante (véanse, Kusnadi y col., 1997, Biotechnol. Bioeng. 56: 473-484; Khoudi y col., 1999, Biotechnol. Bioeng. 135-143; Hood y col., 1999, Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127-147). Además, la síntesis de péptidos, la secreción y la modificación posteriores a la traducción son muy similares en plantas y animales, con solo pequeñas diferencias en la glicosilación en plantas (véase, Fischer y col., 2000, J. Biol. Regul. Homest. Agents 14: 83-92). A continuación, los productos procedentes de plantas transgénicas es menos probable que resulten contaminados por patógenos animales, toxinas microbianas y secuencias oncogénicas.

Es bien conocida en la técnica la expresión de péptidos recombinantes en células vegetales. Además de las plantas transgénicas, los péptidos se pueden producir también en cultivos celulares de plantas transgénicas (Lee y col., 1997, Mol. Cell. 7: 783-787), y plantas no transgénicas inoculadas con virus vegetales recombinantes. Se han publicado algunos libros que describen protocolos para la transformación genética de células vegetales: Potrykus (1995, Gene transfer to plants, Springer, Nueva York), Nickoloff (1995, Plant cell electroporation and electrofusion protocols, Humana Press, Totowa, Nueva York) y Draper (1988, Plant genetic transformation, Oxford Press, Boston).

Se utilizan en la actualidad varios procedimientos para transformar de manera estable células vegetales con material genético recombinante. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, transformación en *Agrobacterium* Bechtold y Pelletier, 1998; Escudero y Hohn, 1997; Hansen y Chilton, 1999; Touraev y col., 1997), biolísticos (microproyectiles) (Finer y col., 1999; Hansen y Chilton, 1999; Shilito, 1999), electroporación de protoplastos (Fromm y col., 1985, Ou-Lee y col., 1986; Rhodes y col., 1988; Saunders y col., 1989; Trick y col., 1997), tratamiento con polietilenglicol (Shilito, 1999; Trick y col., 1997), microinyección en plantas (Leduc y col., 1996; Zhou y col., 1983), inhibición de semillas (Trick y col., 1997), haz de láser (1996), y limaduras de carburo de silicio (Thompson y col., 1995; Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº. 20020100077).

Muchos tipos de plantas son adecuados para la transformación y expresión de péptidos exógenos. Las plantas de particular interés para expresar los péptidos que se van a usar en el procedimiento de remodelación de la invención incluyen, pero sin limitación, *Arabidopsis thaliana*, colza (*Brassica* spp.; Ruiz y Blumwald, 2002, Planta 214: 965-

969)), soja (*Glycine max*), girasol (*Helianthus unnuus*), aceite de palma (*Elaeis guineensis*), maní (cacahuete, *Arachis hypogaea*; Deng y col., 2001, Cell. Res. 11:156-160), coco (*Cocos nucifera*), ricino (*Ricinus communis*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), mostaza (*Brassica* spp. y *Sinapis alba*), coriandro, (*Coriandrum sativum*), calabaza (*Cucurbita maxima*; Spencer y Snow, 2001, Heredity 86(Pt 6):694-702), lino/linaza (*Linum usitatissimum*; Lamblin y col., 2001, Physiol Plant 112:223-232), nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), jojoba (*Simmondsia chinensis*), maíz (*Zea mays*; Hood y col., 1999, Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147; Hood y col., 1997, Mol. Breed. 3: 291-306; Petolino y col., 2000, Transgenic Research 9:1-9), alfalfa (Khoudi y col., 1999, Biotechnol. Bioeng. 64: 135-143), tabaco (*Nicotiana tabacum*; Wright y col., Transgenic Res. 10:177-181; Frigerio y col., 2000, Plant Physiol. 123: 1483-1493; Cramer y col., 1996, Ann. New York Acad. Sci. 792:62-8-71; Cabanes-Macheteau y col., 1999, Glycobiology 9:365-372; Ruggiero y col., 2000, FEBS Lett. 469: 132-136), canola (Bai y col., 2001, Biotechnol. Prog. 17: 168-174; Zhang y col., 2000, J. Anim. Sci. 78: 2868-2878)), patata (Tacket y col., 1998, J. Infect. Dis. 182: 302-305; Richter y col., 2000, Nat. Biotechnol. 18: 1167-1171; Chong y col., 2000, Transgenic Res. 9:71-78), alfalfa (Wigdorovitz y col., 1999, Virology 255: 347-353), Guisante (*Pisum sativum*; Perrin y col., 2000, Mol. Breed. 6: 345-352), arroz (*Oryza sativa*; Stoger y col., 2000, Plant Mol. Biol. 42:583-590), algodón (*Gossypium hirsutum*; Korniyev y col., 2001, Physiol Plant 113: 323-331), cebada (Hordeum vulgare; Petersen y col., 2002, Plant Mol Biol 49:45-58); trigo (*Triticum* spp.; Pellegrineschi y col., 2002, Genome 45:421-430) y judía (*Vicia* spp.; Saalbach y col., 1994, Mol Gen Genet 242: 226-236).

Si se desea la expresión del ácido nucleico recombinante en una planta completa en lugar de en células cultivadas, las células vegetales se transforman en primer lugar con el ADN que codifica el péptido, tras lo cual, la planta se regenera. Esto implica procedimientos de cultivo de tejidos que se optimizan normalmente para cada especie de planta. Se conocen bien ya en la técnica para muchas especies los protocolos para regenerar plantas. Además, un experto en la técnica puede desarrollar protocolos para otras especies utilizando la experimentación rutinaria. Están disponibles numerosos manuales de laboratorio que describen procedimientos para la regeneración de plantas, incluyendo, pero sin limitación, Smith (2000, Plant tissue culture: techniques and experiments, Academic Press, San Diego), Bhojwani y Razdan (1996, Plant tissue culture: theory and practice, Elsevier Science Pub., Amsterdam), Islam (1996, Plant tissue culture, Oxford & IBH Pub. Co., New Delhi, India), Dodds y Roberts (1995, Experiments in plant tissue culture, Nueva York: Cambridge University Press, Cambridge Inglaterra), Bhojwani (Plant tissue culture: applications and limitations, Elsevier, Amsterdam, 1990), Trigiano y Gray (2000, Plant tissue culture concepts and laboratory exercises, CRC Press, Boca Raton, Fla), y Lindsey (1991, Plant tissue culture manual: fundamentals and applications, Kluwer Academic, Boston).

Aunque la purificación de péptidos recombinantes a partir de plantas puede ser potencialmente costosa, se han desarrollado algunos sistemas que minimizan estos costes. Un procedimiento dirige el péptido sintetizado al endospermo de la semilla desde el cual este puede extraerse fácilmente (Wright y col., 2001, Transgenic Res. 10:177-181, Guda y col., 2000, Plant Cell Res. 19: 257-262; y la Patente de los Estados Unidos N° 5.767.379). Una solución alternativa es la extracción simultánea del péptido recombinante con productos vegetales convencionales tales como almidón, harina o aceite. En el aceite de colza, un péptido de fusión de oleosina-hurudina cuando se expresa en la planta, se une al cuerpo oleoso de la semilla, y se puede extraer de la semilla de la planta junto con el aceite (Parmenter, 1995, Plant Mol. Biol. 29: 1167-1180; Patentes de los Estados Unidos N°s. 5.650.554, 5.792.922, 5.948.682 y 6.288.304, y la Solicitud de los Estados Unidos 2002/0037303). En una variación sobre esta solución, la oleosina se fusiona a un péptido para la expresión simultánea exógena del péptido de interés (Patente de los Estados Unidos N° 5.856.452).

La expresión de péptidos recombinantes en plástidos vegetales, tales como el cloroplasto, genera péptidos que no tienen estructuras de glicano unidas a los anteriores, de manera similar a lo que sucede en los procariotas. Sin embargo, el rendimiento de dichos péptidos es muy grande cuando se expresa en estos orgánulos de las células vegetales, y de esta manera, este tipo de sistema de expresión puede tener ventajas sobre otros sistemas. Para una revisión general de la tecnología de expresión de plástidos de péptidos exógenos en plantas superiores, véase Hager y Beck (2000, Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 302-310, y las referencias citadas en los anteriores. La expresión de plástidos ha sido particularmente satisfactoria en tabaco (véase, por ejemplo, Staub y col., 2000, Nat. Biotechnol. 18: 333-338).

F. Animales transgénicos

Se puede llevar a cabo la introducción de un ADN recombinante en el huevo fertilizado de un animal (por ejemplo, un mamífero) utilizando cualquier tipo de técnica normalizada en la tecnología de animales transgénicos. Véase, por ejemplo, Hogan y col., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986; y Patente de los Estados Unidos N° 5.811.634, que se incorporan por referencia en su totalidad en el presente documento. De forma más común, el ADN recombinante se introduce en el embrión por medio de una inyección pronuclear (Gordon y col., 1980, PNAS 77: 7380-7384; Gordon y Ruddle, 1981, Science 214: 1244-1246; Brinster y col., 1981, Cell 27: 223-231; Costantini y Lacy, 1981, Nature 294: 92-94). La microinyección tiene la ventaja de ser aplicable a una amplia variedad de especies. Se puede transformar también el preimplante de embriones con retrovirus (Jaenisch y Mintz, 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 1250-1254; Jaenisch y col., 1976, Hamatol Bluttransfus. 19: 341-356; Stuhlmann y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 7151-7155). La transformación mediada por retrovirus tiene la ventaja de añadir copias individuales del ácido nucleico recombinante a la célula, pero produce un grado elevado de mosaicismo. De forma más reciente, se han

utilizado técnicas mediadas por embriocitoblastos (Gossler y col., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 9065-9069), transferencia de segmentos cromosómicos completos (Lavitrano y col., 1989, Cell 57: 717-723), y transfección de gametos junto con fertilización *in vitro* (Lavitrano y col., 1989, Cell 57: 717-723). Se han publicado algunos manuales de procedimientos de laboratorio que dan a conocer estas técnicas Cid-Arregui y García-Carrancá (1998, Microinjection and Transgenesis: Strategies and Protocols, Springer, Berlín), Clarke (2002, Transgenesis Techniques: Principles and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ), y Pinkert (1994, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press, San Diego).

Una vez que se introduce el ADN recombinante en el huevo, el huevo se incuba durante un corto periodo de tiempo y a continuación se transfiere a un animal pseudoembarazado de la misma especie a partir de la cual se obtuvo el huevo (Hogan y col., más arriba). En el caso de mamíferos, se inyectan normalmente 125 huevos por experimento, aproximadamente dos tercios de los cuales sobrevivirán al procedimiento. Se transfieren veinte huevos viables a un mamífero pseudoembarazado, cuatro de diez de los cuales se desarrollarán en progenie viva. Normalmente, 10-30% de la progenie (en el caso de ratones) transporta el ADN recombinante.

Aunque se puede utilizar el animal completo como un sistema de expresión para los péptidos de la invención, en una realización preferida, el péptido exógeno se acumula en productos del animal, a partir de los cuales se puede cosechar, sin lesionar al animal. En las realizaciones preferidas, el péptido exógeno se acumula en leche, huevos, pelo, sangre y orina.

Si el péptido recombinante está previsto para su acumulación en la leche del animal, los mamíferos adecuados son rumiantes, ungulados, mamíferos domesticados, y animales de granja. Los animales particularmente preferidos son cabras, ovejas, camellos, vacas, cerdos, caballos, bueyes, y llamas. Son bien conocidos los procedimientos para generar vacas transgénicas que acumulan un péptido recombinante en su leche; véanse Newton (1999, J. Immunol. Methods 231: 159-167), Ebert y col. (1991, Biotechnology 9: 835-838), y Patentes de los Estados Unidos N^{os} 6.210.736, 5.849.992, 5.843.705, 5.827.690, 6.222.094. La generación de animales transgénicos que producen un péptido recombinante deseado se encuentra comercialmente disponible de GTC Biotherapeutics, Framingham, MA.

Si el péptido recombinante se ha de acumular en huevos, entre las aves apropiadas se incluyen, pero sin limitación, pollos, gansos y pavos. Otros animales de interés incluyen, pero sin limitación, otras especies de aves, peces, reptiles y anfibios. La introducción de ADN recombinante en pollos mediante transformación retroviral es bien conocida en la técnica: Thoraval y col. (Transgenic Research 4: 369-376, 1995) Bosselman (Science 234: 533-535, 1989), Petropoulos y col. (J. Virol. 66: 3391-3397, 1992), Patente US N^o 5.162,251, incorporados por referencia en su totalidad en el presente documento. También se ha conseguido la transformación exitosa de pollos con ADN recombinante, en la cual se introduce ADN en células blastodermas y las células blastodermas son introducidas en embriones: Brazolot y col. (Mol Reprod. Dev. 30: 304-312, 1991), Fraser y col. (Int. J. Dev. Biol. 37:381-385, 1993) y Petite y col. (Development 108:185-189, 1990) Se ha desarrollado tecnología de alto rendimiento para evaluar si los pollos transgénicos expresan el péptido deseado (Harvey y col., Poult Sci. 81:202-212, 2002, Patente US n. 6,423,488). Usando transformación retroviral de gallinas con ADN recombinante, se acumuló beta-lactamasa exógena en clara de huevos de gallina (Harvey y col. 2002, Nat. Biotechnol 20(4):396-399, 2002). La producción de gallinas productoras de péptidos exógenos en huevos está comercialmente disponible en AviGenics, Inc. Athens, Ga.

G. Bacterias

Los péptidos expresados de forma recombinante producidos en bacterias no están generalmente glicosilados. Sin embargo, son cada vez más evidentes los sistemas de bacterias capaces de glucosilar péptidos, y por tanto, es probable que se puedan producir péptidos recombinantes glicosilados en bacterias en el futuro.

Se conocen en la técnica numerosos sistemas de expresión bacteriana. Las especies bacterianas preferidas incluyen, pero sin limitación, *E. coli* y especies de *Bacillus*.

Es bien conocida en la técnica la expresión de péptidos recombinantes en *E. coli*. Se encuentran protocolos de sistemas de expresión basados en *E. coli* en la Solicitud de los Estados Unidos N^o 20020064835, las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 6.245.539, 5.606.031, 5.420.027, 5.151.511, y el documento RE33.653, entre otros. Los procedimientos para transformar bacterias incluyen, pero sin limitación, cloruro de calcio (Cohen y col., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 2110-2114; Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166:557-580; Mandel y Higa, 1970, J. Mol. Biol. 53: 159-162) y electroporación (Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), y aquellos descritos en Sambrook y col., 2001 (más arriba). Para una revisión de los protocolos de laboratorio sobre transformación microbiana y sistemas de expresión, véase Saunders y Saunders (1987, Microbial Genetics Applied to Biotechnology : Principles and Techniques of Gene Transfer and Manipulation, Croom Helm, London), Pühler (1993, Genetic Engineering of Microorganisms, Weinheim, Nueva York), Lee y co., (1999, Metabolic Engineering, Marcel Dekker, Nueva York), Adolph (1996, Microbial Genome Methods, CRC Press, Boca Raton), y Birren y Lai (1996, Nonmammalian Genomic Analysis : A Practical Guide, Academic Press, San Diego),

Para una revisión general sobre la bibliografía de la expresión de péptidos en *E. coli*, véase (2001, Mol. Biotechnol. 19: 251-267). Algunas compañías ofrecen ahora cepas bacterianas seleccionadas para la expresión de péptidos de

mamíferos, tales como las cepas Rosetta™ de *E. coli* (Novagen, inc., Madison, WI; con un aumento de expresión de codones eucariotas no utilizados normalmente en células bacterianas, y una potenciación en la formación del enlace disulfuro

H. Genomanipulación celular

5 Será evidente a partir de la presente divulgación que cuánto más uniforme sea el material de partida producido por una célula, más eficaz será la generación *in vitro* de grandes cantidades de péptidos que tengan la glicosilación deseada. De esta manera, la genomanipulación de las células hospedadoras para producir péptidos uniformemente glicosilados como material de partida de las reacciones enzimáticas *in vitro* dadas a conocer en el presente documento proporciona una significativa ventaja sobre el uso de un material de partida de péptidos que tengan un conjunto heterogéneo de estructuras de glicano unidas al anterior. Un material de partida de péptido preferido para uso en la presente invención es un péptido que tiene principalmente moléculas de glicano que consisten únicamente en una estructura elemental de núcleo de trimanosilo. Otro material de partida preferido es Man3GlcNAc4. Tras el procedimiento de remodelación, los péptidos preferidos proporcionarán un aumento de la cantidad mayor de péptidos que tengan la glicosilación deseada, y de esta manera, una eficacia clínica mejorada. Sin embargo, otro material de partida de glicano es también adecuado para el uso en los procedimientos descritos en el presente documento, en que por ejemplo, se puede reducir fácilmente, *in vitro*, un alto contenido de glicanos de manosa a estructuras elementales de núcleos de trimanosilo utilizando una serie de manosidasas. Tal como se describe en otra parte en el presente documento, también se puede usar otro material de partida de glicano, con la condición de que sea posible escindir todos los restos de azúcar extraños de tal manera que se genera una estructura elemental de núcleo de trimanosilo o Man3GlcNAc4. De esta manera, el fin de usar células genomanipuladas para la producción de los péptidos de la presente invención es generar péptidos que tengan una estructura de glicano tan uniforme como sea posible unida a la anterior, en la que la estructura de glicano se puede remodelar *in vitro* para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada. Esto dará como resultado una drástica reducción en los costes de producción de estos péptidos. Debido a que los glicopéptidos producidos utilizando esta metodología tendrán predominantemente la misma estructura de glicano unida a N, el protocolo de modificación posterior a la producción puede normalizarse y optimizarse para producir una mayor consistencia entre los lotes del producto final. Como resultado, los productos finales de la cadena completados pueden ser menos heterogéneos que aquellos que se encuentran actualmente disponibles. Los productos tendrán una vida media biológica y bioactividad aumentadas en comparación con los productos de la técnica anterior. De forma alternativa, si se desea, se puede utilizar la invención para introducir una heterogeneidad limitada y específica, por ejemplo, seleccionando las condiciones de reacción que dan como resultado la adición diferencial de restos de azúcares.

De forma preferible, aunque no como requerimiento rígido, la célula genomanipulada es aquella que produce péptidos que tienen estructuras de glicano comprendidas principalmente por una estructura elemental de núcleo de trimanosilo o Man3GlcNAc4. Como mínimo, la proporción de estas estructuras preferidas producidas por la célula genomanipulada debe ser suficiente para dar como resultado un péptido que tenga una glicosilación deseada tras el protocolo de remodelación.

En general, se puede modificar cualquier tipo de célula eucariota para que se convierta en una célula hospedadora de la presente invención. En primer lugar, se determina el modelo de glicosilación de los glicopéptidos endógenos y recombinantes producidos por el organismo con el fin de identificar adiciones/eliminaciones adecuadas de actividades enzimáticas que den como resultado la producción de glicopéptidos elementales de núcleos de trimanosilo o glicopéptidos de Man3GlcNAc4. Esto implicará normalmente actividades de eliminación que utilizan glicopéptidos de trimanosilo como sustratos para la reacción de la glicosiltransferasa y actividades enzimáticas de inserción que degradan los glicanos unidos a N más complejos para producir cadenas más cortas. Además, las células genomanipuladas pueden producir altas contenidos de glicanos de manosa, que pueden escindirse mediante la manosidasa para producir las estructuras de glicano de partida deseadas. La manosidasa puede ser activa *in vivo* en la célula (es decir, la célula puede modificar con ingeniería genética para producirla), o se puede utilizar en las reacciones producción posteriores *in vitro*.

Son bien conocidas las técnicas para modificar genéticamente las células hospedadoras para alterar el perfil de glicosilación de los péptidos expresados. Véanse, por ejemplo, Altmann y col. (1999, Glycoconjugate J. 16: 109-123), Ailor y col. (2000, Glycobiology 10(8): 837-847), Jarvis y col., (Conferencia *In vitro* gen, marzo de, 1999, resumen), Hollister y Jarvis, (2001, Glycobiology 11(1): 1-9), y Palacpac y col., (1999, PNAS USA 96: 4697), Jarvis y col., (1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 528-533), Gemgross (Publicación de Patente de los Estados Unidos Nº. 20020137134), todos los cuales dan a conocer las técnicas para "asimilar a sistemas de expresión de mamíferos" sistemas de expresión de células de insecto o vegetales transfectando células de insecto o vegetales con genes de la glicosiltransferasa.

Existen también técnicas para alterar genéticamente el perfil de la glicosilación de los péptidos expresados en *E. coli*. *E. coli* se ha genomanipulado con diversas glicosiltransferasas procedentes de la bacteria *Miseria meningitidis* y *Azorhizobium* para producir oligosacáridos *in vivo* (Bettler y col., 1999, Glycoconj. J. 16: 205-212). Una *E. coli* que se ha genomanipulado para expresar en exceso el gen *IgtA* de la β 1,3 N acetil glucoaminiltransferasa de *Miseria meningitidis* glucosilará eficazmente la lactosa exógena (Priem y col., 2002, Glycobiology 12: 235-240).

También se han genomanipulado células de hongos para producir glicosiltransferasas exógenas (Yoshida y col., 1999, *Glycobiology*, 9(1):53-58; Kalsner y col., 1995, *Glycoconj. J.* 12:360-370; Schwientek y Ernst, 1994, *Gene* 145 (2):299-303; Chiba y col., 1995, *Biochem J.* 308:405-409).

De esta manera, en un aspecto, la presente invención proporciona una célula que glucosila una población de glicopéptidos de tal manera que una proporción de los glucopéptidos producidos de esta forma tiene un núcleo elemental de trimanosilo o una estructura Man3GlcNAc4. De forma preferible, la célula produce un péptido que tiene una estructura de glicano comprendida únicamente por un núcleo elemental de trimanosilo. Como mínimo, la proporción de péptidos que tienen un núcleo elemental de trimanosilo o una estructura Man3GlcNAc4 es suficiente para dar como resultado péptidos que tengan una glicosilación deseada tras el procedimiento de remodelación. La célula ha introducido en sí misma una o más unidades de expresión de ácidos nucleicos heterólogos, cada una de las cuales puede comprender uno o más glicanos complejos unidos a N o puede ser simplemente un glicano con un alto contenido de manosa.

La célula puede ser cualquier tipo de célula y es preferiblemente una célula eucariota. La célula puede ser una célula de mamífero tal como de ser humano, ratón, rata, conejo, hámster u otro tipo de célula de mamífero. Cuando la célula es una célula de mamífero, la célula de mamífero puede derivar o estar incluida en un mamífero transgénico no humano en el que la célula en el mamífero codifica el glicopéptido deseado y una variedad de enzimas glucosilantes y glucosidasa según sea necesario para la producción de las moléculas de glicopéptido deseadas. Además, la célula puede ser una célula de hongo, preferiblemente, una célula de levadura, o la célula puede ser una célula de insecto o de planta. De forma similar, cuando la célula es una célula vegetal, la célula vegetal puede derivar de, o estar incluida en, una planta transgénica, en la que la planta codifica el glicopéptido deseado y una variedad de enzimas glucosilantes y glucosidasa, según sea necesario para la producción de las moléculas de glicopéptido deseadas.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora puede ser una célula eucariota que expresa una o más enzimas glicosiltransferasa heterólogas y/o una o más enzimas Glicosidasas heterólogas, en las que la expresión de un glicopéptido recombinante en la célula hospedadora da como resultado la producción de un glicopéptido recombinante que tienen una estructura elemental de trimanosilo como la estructura primaria de glicano unida al anterior

En algunas realizaciones, la enzima glicosiltransferasa heteróloga útil en la célula se puede seleccionar de un grupo que consiste en cualquier enzima glicosiltransferasa conocida incluida por ejemplo, en la lista de familias de glicosiltransferasas disponible en Taniguchi y col. (2002, *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, Springer, Nueva York).

En otras realizaciones, se puede seleccionar la enzima glucosilasa heteróloga de un grupo que consiste en manosidasa 1, manosidasa 2, manosidasa 3, y otras manosidasa, que incluyen, pero no se limitan a, manosidasas microbianas. Se proporciona en otra parte en el presente documento una divulgación adicional con respecto a las enzimas útiles en la presente invención.

En otras realizaciones adicionales, la célula hospedadora puede ser una célula eucariota en la que se han activado una o más enzimas de glicosilación endógenas y una o más enzimas glucosidasa endógenas de tal manera que la expresión de un glicopéptido recombinante en la célula hospedadora da como resultado la producción de un glicopéptido recombinante que tiene una estructura elemental de trimanosilo como la estructura primaria de glicano unida al anterior.

En las realizaciones adicionales, la célula hospedadora puede expresar enzimas glicosiltransferasa heterólogas y/o enzimas glucosidasa aunque, al mismo tiempo, una o más enzimas glicosiltransferasa endógenas y/o enzimas glucosidasa estén inactivadas. Las enzimas glicosiltransferasa endógenas y/o las enzimas glucosidasa pueden inactivarse utilizando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitarse a, técnicas de sentido contrario y técnicas que implican la inserción de ácidos nucleicos en el genoma de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, se pueden seleccionar las enzimas endógenas de un grupo que consiste en GnT-I, una selección de manosidasas, xilosiltransferasa, núcleo de α 1,3 fucosiltransferasa, y serina/treonina O-manosiltransferasas.

De forma alternativa, se puede aprovechar un sistema de expresión que glucosila naturalmente péptidos de tal manera que los glicanos unidos a N son predominantemente de tipo núcleo de trimanosilo, o del tipo Man3GlcNAc4. Un ejemplo de un tipo de célula que produce núcleos de trimanosilo es el de las células Sf9. Se pueden identificar otros de tales sistemas de expresión analizando glicopéptidos que se expresan de forma natural o recombinante en células y seleccionando aquellos que presentan características de glicosilación deseadas. La invención debe construirse para incluir cualquiera y todas las mencionadas células para la producción de los péptidos de la presente invención.

V. Purificación de péptidos glicoconjugados y/o remodelados con glicano

Si la glicoproteína modificada se produce intracelularmente o se secreta, como primera etapa, los residuos de material particulado, ya sean las células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan por ejemplo mediante

centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, la proteína se puede concentrar con un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, seguido por la separación de la variante del péptido de otras impurezas mediante una o más etapas seleccionadas entre cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (por ejemplo, en dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo). Cromatografía en Blue-Sefarosa, CN Blue-Sefarosa, MONO-Q, MONO-S, lentil lectina-Sefarosa, WGA-Sefarosa, Con A-Sefarosa, Éter Toyopearl, Butil Toyopearl, fenil Toyopearl, o proteína A Sefarosa, Cromatografía en SDS-PAGE, cromatografía en gel de sílice, cromatofocalización, HPLC en fase inversa (RP-HPLC), filtración en gel utilizando, *por ejemplo*, un tamiz molecular de Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en columnas que se unen selectivamente al péptido, y etanol, pH o precipitación con sulfato de amonio, filtración en membrana y diversas técnicas.

Los péptidos modificados producidos en el cultivo se aíslan normalmente mediante extracción inicial de células, enzimas, etc., seguida por una o más concentraciones, desalación, intercambio iónico en disolución acuosa, o etapas de cromatografía de exclusión por tamaño. Adicionalmente, la glicoproteína modificada puede purificarse mediante cromatografía de afinidad. A continuación, se puede emplear HPLC para las etapas finales de la purificación.

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

En otra realización, los sobrenadantes del sistema que producen el péptido modificado de la invención se concentran en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender un ligando para el péptido, una lectina o una molécula de anticuerpo unida a un soporte adecuado. De forma alternativa, se puede emplear 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 comúnmente empleados en la purificación de proteínas. De forma alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren particularmente grupos sulfopropilo.

A continuación, se puede utilizar una o más etapas de RP-HPLC que emplean medios de RP-HPLC hidrófobos, *por ejemplo*, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes para purificar adicionalmente una composición de un péptido variante. Se pueden emplear alguna o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una glicoproteína modificada homogénea.

El péptido modificado de la invención resultante de una fermentación a gran escala se puede purificar mediante procedimientos análogos a los dados a conocer por Urdal y col., J Chromatog. 296: 171 (1984). Esta referencia describe dos etapas de RP-HPLC secuenciales para la purificación de la IL-2 humana recombinante en una columna de HPLC preparativa. De forma alternativa, se pueden utilizar técnicas tales como la cromatografía de afinidad para purificar la glicoproteína modificada

VI. Péptidos preferidos y ácidos nucleicos que codifican los péptidos preferidos

La presente divulgación incluye ácidos nucleicos aislados que codifican diversos péptidos y proteínas, y moléculas similares o sus fragmentos. Dichos péptidos incluyen, pero sin limitación, el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el interferón alfa humano (IFN-alfa), el interferón beta humano (IFN-beta), el Factor VII humano (Factor VII), el Factor IX humano (Factor IX), la hormona estimuladora del folículo humana (FSH), la eritropoyetina humana (EPO), el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), el interferón gamma humano (IFN-gamma), el inhibidor de la proteasa alfa-1 humana (conocido también como alfa-1-antitripsina o inhibidor de la alfa-1-tripsina; A-1-PI), la glucocerebrosidasa, el activador de tipo tisular humano (TPA), la interleuquina-2 humana (IL-2), Factor VIII humano (Factor VIII), un receptor del factor de necrosis tumoral de 75 kDa fusionado a una porción Fc de la inmunoglobulina IgG humana, conocida comercialmente como ENBREL™ o ETANERCEPT™ (TNFR quimérico), la uroquinasa humana (uroquinasa), un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal quimérico humano/de ratón que se une de forma específica a la glicoproteína IIb/IIIa y el receptor alfa_v beta₃ de la vitronectina, conocido comercialmente como REOPRO™ o ABCIXIMAB (anticigoproteína IIb/IIIa quimérica) un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón/ser humano que se une de forma específica a HER2, conocido comercialmente como HERCEPTIN™ (dirigido contra HER-2 quimérico), un anticuerpo quimérico humano/de ratón que se une de forma específica al sitio antigénico A o a la proteína F o al virus sincitial respiratorio comercialmente conocido como SYNAGIS™ o PALIVIZUMAB (dirigido contra RSV quimérico) un anticuerpo monoclonal humano/de ratón quimérico que se une de forma específica a las células CD20 o a los linfocitos B humanos, comercialmente conocido RITUXAN™ o RITUXAMAB (dirigido contra CD20 quimérico), una ADNasa recombinante humana (ADNasa), un anticuerpo monoclonal humano/de ratón quimérico que se une de forma específica al factor de necrosis tumoral humano, comercialmente conocido como REMICADE™ o INFlixIMAB (dirigido contra TNF quimérico), insulina humana, el antígeno superficial de un virus de la hepatitis B (subtipo adw; HBsAg), la hormona del crecimiento humana (HGH) y similares.

El ácido nucleico aislado de la invención debe construirse de forma que incluya una secuencia de ARN o una secuencia de ADN que codifica cualquiera de los anteriores péptidos identificados de la invención, y cualquiera de sus formas modificadas, incluyendo las modificaciones químicas del ADN o del ARN que convierten la secuencia de nucleótidos en más estable cuando está exenta de células o cuando está asociada a una célula. Como ejemplo no limitante, se sabe que los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato confieren al oligonucleótido una resistencia mejorada a las nucleasas. Los ejemplos específicos de oligonucleótidos modificados incluyen aquellos que contienen fosforotioato, fosfotriéster, metil fosfonato, enlaces entre alquil azúcares o cicloalquil azúcares de cadena corta, o enlaces entre azúcares heteroaromáticos o heterocíclicos de cadena corta ("estructura"). Además, se pueden utilizar también oligonucleótidos que tengan estructuras de esqueleto de morfolino (Patente de los Estados Unidos N° 5.034.506) o estructuras de esqueleto de poliamida (Nielsen y col., 1991, Science 254: 1497).

Se pueden usar también modificaciones químicas de nucleótidos para aumentar la eficacia con la que una secuencia de nucleótido es capturada por una célula o la eficacia con la que se expresa en una célula. Se contemplan cualquiera y todas las combinaciones de modificaciones de las secuencias de nucleótidos en la presente invención.

La presente divulgación no debe considerarse como limitada únicamente a las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos dadas a conocer en el presente documento. Tal como se describe con más detalle en otra parte en el presente documento, una vez provistos con la presente invención, será fácilmente evidente para un experto en la técnica que se pueden obtener otros ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la presente invención siguiendo los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, mutagénesis dirigida al emplazamiento, mutaciones de cambio de marco y similares), y procedimientos que son bien conocidos en la técnica.

Se incluyen también ácidos nucleicos aislados que codifican fragmentos de péptidos en los que los fragmentos de péptidos retienen la actividad biológica deseada del péptido. Además, aunque se dan a conocer en el presente documento los ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican los péptidos preferidos en relación con las SEC ID N°s específicas, la invención no debe considerarse en forma alguna como limitada a cualquier ácido nucleico específico dado a conocer en el presente documento. En su lugar, debe considerarse que la invención incluye todas y cada una de las moléculas de ácido nucleico que tengan un porcentaje de identidad suficiente con las secuencias dadas a conocer en el presente documento de tal manera que estos ácidos nucleicos codifican también un péptido que tiene la actividad biológica deseada dada a conocer en el presente documento. Se contemplan también los ácidos nucleicos aislados que sean más cortos que los ácidos nucleicos de longitud completa, en los que se retiene embargo la actividad biológica del péptido codificado. Los procedimientos para determinar el porcentaje de identidad entre un ácido nucleico y otro se dan a conocer en otra parte en el presente documento dado que son ensayos para la determinación de la actividad biológica de cualquier péptido preferido específico.

También se da a conocer en otra parte del presente documento cualquier otro tipo de procedimientos que se pueden utilizar para la generación de derivados, mutantes, o formas variantes de los péptidos de la presente invención que utilizan la metodología de ADN recombinante bien conocida en la técnica tal como, por ejemplo, la descrita en Sambrook y col. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y Ausubel y col. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, Nueva York). Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para la introducción de cambios de aminoácidos en el péptido o el polipéptido alterando la secuencia de ADN que codifica el péptido, y se describen también en Sambrook y col. (1989, supra); Ausubel y col. (1997, más arriba).

La divulgación incluye un ácido nucleico que codifica un G-CSF, IFN-alfa, IFN-beta, Factor VII, Factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN-gamma, A-1-PI, glucocerebrosidasa, TPA, IL-2, Factor VIII, TNFR quimérico, uroquinasa, antiglicoproteína IIb/IIIa quimérica, anticuerpo quimérico dirigido contra HER2, anticuerpo quimérico dirigido contra RSV, anticuerpo quimérico dirigido contra CD20, ADNasa, anticuerpo quimérico dirigido contra TNF, insulina humana, HBsAg, y HGH, en el que un ácido nucleico que codifica un péptido etiqueta se une de forma covalente al anterior. Esto es, la invención abarca un ácido nucleico quimérico en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido etiqueta se une de forma covalente al ácido nucleico que codifica un péptido de la presente invención. Dichos péptidos etiqueta son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP), myc, myc-piruvato quinasa (myc-PK), His6, proteína de unión a maltosa (MBP), y polipéptido etiqueta de la hemaglutinina del virus de la gripe, un polipéptido con la etiqueta flag (FLAG) y un polipéptido etiqueta de la glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, la etiqueta no debe considerarse en forma alguna limitada a los ácidos nucleicos que codifican los péptidos etiqueta anteriormente relacionados. En su lugar, cualquier secuencia que codifica un péptido que puede funcionar de una manera sustancialmente similar a estos péptidos etiqueta se debe considerar como incluida en la presente invención.

El ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido etiqueta se puede utilizar para localizar un péptido de la presente invención en una célula, un tejido, y/o un organismo completo (por ejemplo, un embrión de mamífero), detectar un péptido de la presente invención secretado a partir de una célula, y estudiar el(los) papel(es) del péptido en una célula. Además, la adición de un péptido etiqueta facilita el aislamiento y la purificación del péptido "etiquetado" de tal manera que se pueden producir los péptidos de la invención y purificarse fácilmente.

La divulgación incluye los siguientes péptidos aislados preferidos: G-CSF, IFN-alfa, IFN-beta, Factor VII, Factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN-gamma, A-1-PI, glucocerebrosidasa, TPA, IL-2, Factor VIII, TNFR quimérico, uroquinasa, quimérica anticuerpo dirigido contra la glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo quimérico dirigido contra HER2, anticuerpo quimérico dirigido contra RSV, anticuerpo quimérico dirigido contra CD20, ADNasa, anticuerpo quimérico dirigido contra TNF, insulina humana, HBsAg, y HGH.

Se debe considerar también que la presente divulgación abarca “derivados”, “mutantes”, y “variantes” de los péptidos de la invención (o del ADN que codifica los mismos) cuyos derivados, mutantes, y variantes son péptidos que están alterados en uno o más aminoácidos (o, cuando se hace referencia a la secuencia de nucleótidos que codifica los mismos, están alterados en uno o más pares de bases) de tal manera que el péptido resultante (o ADN) no es idéntico a las secuencias enumeradas en el presente documento, pero tiene la misma propiedad biológica que los péptidos dados a conocer en el presente documento, en que el péptido tiene las propiedades biológicas/bioquímicas de G-CSF, IFN-alfa, IFN-beta, Factor VII, Factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN-gamma, A-1-PI, glucocerebrosidasa, TPA, IL-2, Factor VIII, TNFR quimérico, uroquinasa, anticuerpo quimérico dirigido contra la glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo quimérico dirigido contra HER2, anticuerpo quimérico dirigido contra RSV, anticuerpo quimérico dirigido contra CD20, ADNasa, anticuerpo quimérico dirigido contra TNF, insulina humana, HBsAg, y HGH.

Se incluyen además fragmentos de péptidos que retienen la actividad biológica deseada del péptido sin tener en cuenta la longitud del péptido. Se encuentra comprendido en el conocimiento del experto en la técnica el cómo aislar formas de longitud inferiores a la completa a partir de cualquiera de los péptidos útiles en la invención, y para determinar, utilizando los ensayos proporcionados en el presente documento, qué fragmentos aislados retienen una actividad biológica deseada y son por tanto péptidos útiles en la invención.

Debe considerarse que una propiedad biológica de una proteína de la presente invención incluye, pero sin limitación, la capacidad del péptido para funcionar en el ensayo biológico y en los entornos descritos en el presente documento, tales como la reducción de la inflamación, la estimulación de una respuesta inmune, la coagulación de la sangre, aumento de la salida hematopoyética, inhibición de la proteasa, modulación del sistema inmune, unión a un antígeno, crecimiento, alivio del tratamiento de una enfermedad, escisión del ADN y similares.

E. FSH

La presente invención se refiere a un procedimiento para remodelar y/o modificar la FSH. La función reproductora humana está controlada en parte por una familia de hormonas heterodiméricas de glicoproteína humana que tienen una subunidad alfa de la glicoproteína de 92 aminoácidos común, pero que difieren en sus subunidades beta específicas de hormona. La familia incluye la hormona estimuladora del folículo (FSH), la hormona luteneizante (LH), la hormona estimuladora del tiroides o tirotropina (TSH), y la gonadotropina coriónica humana (hCG). La FSH y la LH humanas se utilizan de forma terapéutica para regular diversos aspectos del metabolismo pertinentes para la reproducción en el individuo femenino humano. Por ejemplo, la FSH parcialmente purificada a partir de orina se utiliza clínicamente para estimular la maduración folicular en la mujer anovulatoria con síndrome anovulatorio o deficiencia en fase lútea. La hormona luteneizante (LH) y la FSH se utilizan en combinación para estimular el desarrollo de folículos en el ovario para la fertilización *in vitro*. El papel de la FSH en el ciclo reproductor es suficientemente bien conocido para permitir el uso terapéutico, pero ha encontrado dificultades debido, en parte, a la heterogeneidad y a la impureza de la preparación procedente de fuentes naturales. La heterogeneidad es debida a las variaciones en el modelo de glicosilación.

La FSH es una herramienta valiosa en la fertilización *in vitro* y a la estimulación de la fertilización *in vivo*, pero tal como se ha indicado anteriormente se ha impedido su eficacia clínica por la inconsistencia en la glicosilación de la proteína. Por tanto, parece evidente que un procedimiento para remodelar la FSH será de gran beneficio para las ciencias reproductivas.

FSH se ha clonado y secuenciado, cuyas secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos se presentan en el presente documento como SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, respectivamente (subunidad alfa) y SEC ID N°: 13 y SEC ID N°: 14, respectivamente (subunidad beta) (Figuras 57A y 57B, respectivamente). El experto en la materia observará fácilmente que la presente invención no está limitada a las secuencias representadas en el presente documento, ya que las variantes de FSH son bien conocidas en la técnica. Como un ejemplo no limitante, la Patente de Estados Unidos N° 5.639.640 describe la subunidad beta que comprende dos secuencias diferentes de aminoácidos y la Patente de Estados Unidos N° 5.338.835 describe una subunidad beta que comprende una secuencia adicional de aminoácidos de aproximadamente veintisiete aminoácidos derivados de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana. Por lo tanto, la presente invención comprende variantes de FSH, tanto naturales como diseñadas por la mano humana, y bien conocidas en la técnica.

Los procedimientos para expresar FSH en las células, tanto procariotas como eucariotas, son bien conocidos en la técnica y se describen en numerosas ocasiones en la bibliografía (Patentes de Estados Unidos N° 4.840.896, N° 4.923.805, N° 5.156.957). Además, los procedimientos para evaluar la actividad biológica de una molécula de FSH remodelada de la presente invención son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.589.402, en la que se describen procedimientos para determinar el efecto de FSH en la

fertilidad, producción de huevos, y tasas de embarazo tanto en primates no humanos como en seres humanos.

S. Anticuerpos

También se desvela un procedimiento para la remodelación de diversas preparaciones de anticuerpos quiméricos, que incluyen, TNFR quimérico, anti-glicoproteína IIb/IIIa quimérica, anti-HER2 quimérico, anti-RSV quimérico, anti-CD20 quimérico, y anti-TNF quimérico. Las preparaciones de anticuerpos quiméricos comprenden una porción de Fc humano a partir de un anticuerpo IgG y las regiones variables de un anticuerpo monoclonal específico para un antígeno. Otras preparaciones comprenden un receptor, por ejemplo el receptor de TNF de 75 kDa, condensado con una porción de Fc de IgG humano. Estas moléculas incluyen adicionalmente fragmentos de Fab que comprenden cadenas ligeras y pesadas de seres humanos y de ratones. Un TNFR quimérico es útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide. La anti-glicoproteína IIb/IIIa quimérica es útil en el tratamiento de anomalías cardíacas, coagulación de la sangre, y alteraciones de la función plaquetaria. Un anticuerpo quimérico anti-HER2 es útil como un tratamiento para el cáncer de mama, anti-RSV quimérico es útil para el tratamiento del virus respiratorio sincitial, anti-CD20 quimérico es útil para el tratamiento del linfoma no Hodgkin, y se usa anti-TNF quimérico para el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

Mientras que estos anticuerpos quiméricos han demostrado ser útiles en el tratamiento de diversas enfermedades, la administración tiene que ser bastante frecuente y en dosis bastante elevadas debido a la vida media relativamente corta de una proteína recombinante producida en células de roedores. Si bien la mayoría del anticuerpo quimérico es humano, y por lo tanto, se considera como "auto" por el sistema inmune, se degradan y se destruyen debido a los patrones de glicosilación no nativos. La presente invención propone solucionar este problema, aumentando en gran medida la eficacia de estos nuevos medicamentos.

Anticuerpos y Procedimientos para su Generación

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a un epítipo específico en un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos de la presente invención pueden existir en una diversidad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos de cadena única y anticuerpos humanizados (Harlow y col., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow y col., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston y col., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos de América 85: 5879-5883; Bird y col., 1988, Science 242: 423-426).

Por el término "anticuerpo sintético" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago como se describe en el presente documento. Se debería interpretar que el término se refiere a un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa un péptido de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en el que se ha obtenido la secuencia de ADN o de aminoácidos usando tecnología de ADN sintético o de secuencia de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la longitud completa o fragmentos peptídicos de un péptido o péptidos se pueden preparar usando cualquier procedimiento de preparación de anticuerpos monoclonales bien conocido, tales como los que se describen, por ejemplo, en Harlow y col. (1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY) y en Tuszynski y col. (1988, Blood, 72: 109-115). Las cantidades del péptido deseado también se pueden sintetizar usando tecnología de síntesis química. Como alternativa, el ADN que codifica el péptido deseado se puede clonar y expresar a partir de una secuencia promotora apropiada en células adecuadas para la generación de grandes cantidades de péptido. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido se generan a partir de ratones inmunizados con el péptido usando procedimientos convencionales como se hace referencia en el presente documento.

El ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal obtenido usando los procedimientos descritos en el presente documento se puede clonar y secuenciar usando la tecnología que está disponible en la técnica, y se describe, por ejemplo, en Wright y col. (1992, Critical Rev. in Immunol. 12 (3, 4): 125-168) y en las referencias citadas en el mismo. Además, el anticuerpo de la invención se puede "humanizar" usando la tecnología descrita en Wright y col., (*anteriormente*) y en las referencias citadas en el mismo, y en Gu y col. (1997, Thrombosis and Hematocyst 77 (4): 755-759).

Para generar una biblioteca de anticuerpos de fagos, se obtiene primero una biblioteca de DNAC a partir de ARNm que se aísla de las células, por ejemplo, el hibridoma, que expresa el péptido deseado a expresar en la superficie del fago, por ejemplo, el anticuerpo deseado. Las copias de ADNc del ARNm se producen usando la transcriptasa inversa. El ADNc que especifica los fragmentos de inmunoglobulina se obtiene por PCR y el ADN resultante se clona en un vector bacteriófago adecuado para generar una biblioteca de bacteriófagos que comprende los genes de la

inmunoglobulina que especifican el ADN. Los procedimientos para preparar una biblioteca de bacteriófagos que comprende ADN heterólogo son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY).

Los bacteriófagos que codifican el anticuerpo deseado, se pueden diseñar de tal manera que el péptido se muestra en la superficie del mismo de tal manera que esté disponible para la unión a su correspondiente péptido de unión, por ejemplo, el antígeno contra el que se dirige el anticuerpo. De este modo, cuando el bacteriófago que expresa un anticuerpo específico se incuba en presencia de una célula que expresa el antígeno correspondiente, el bacteriófago se unirá a la célula. Los bacteriófagos que no expresan el anticuerpo no se unirán a la célula. Dichas técnicas de tomas panorámicas son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Wright y col., (anterior).

Procedimientos tales como los que se han descrito anteriormente, se han desarrollado para la producción de anticuerpos humanos que usan bacteriófagos de presentación de M13 (Burton y col., 1994, Adv. Immunol. 57: 191-280). Básicamente, se genera una biblioteca de ADNc a partir del ARNm obtenido de una población de células que producen anticuerpos. El ARNm codifica genes reorganizados de inmunoglobulina y, por tanto, el ADNc codifica lo mismo. El ADNc amplificado se clona en vectores de expresión de M13 creando una biblioteca de fagos que expresan fragmentos de anticuerpos humanos en su superficie. Los fagos que presentan el anticuerpo de interés se seleccionan mediante la unión al antígeno y se propagan en bacterias para producir inmunoglobulina humana soluble. De este modo, a diferencia de la síntesis convencional de anticuerpos monoclonales, este procedimiento inmortaliza el ADN que codifica la inmunoglobulina humana en lugar de las células que expresan la inmunoglobulina humana.

Glicanos de remodelación de moléculas de anticuerpos

La glicosilación específica de una clase de péptidos, es decir, las inmunoglobulinas, tiene un efecto particularmente importante sobre la actividad biológica de estos péptidos. No se debería interpretar la invención como limitada exclusivamente a las inmunoglobulinas de la clase IgG, sino que también se debería interpretar que incluye las inmunoglobulinas de las clases de anticuerpos IgA, IgE e IgM.

Adicionalmente, no se debería interpretar que la invención se limita exclusivamente a cualquier tipo de estructura tradicional de anticuerpos. Más bien, se debería interpretar que la invención incluye todos los tipos de moléculas de anticuerpos, que incluyen, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, etc.

Una molécula de inmunoglobulina típica comprende una porción efectora y una porción de unión a antígeno. Para una revisión de las inmunoglobulinas, véase Harlow y col., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Harlow y col., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. La porción efectora de la molécula de inmunoglobulina reside en la porción Fc de la molécula y es responsable, en parte, de una unión eficaz de la inmunoglobulina a su receptor celular afín. La glicosilación inadecuada de moléculas de inmunoglobulina particularmente en el dominio CH2 de la porción Fc de la molécula, afecta a la actividad biológica de la inmunoglobulina.

Más específicamente con respecto a la inmunoglobulina IgG, la función efectora de IgG está regulada en gran parte por si o no la IgG contiene un resto de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unido en la posición 4-O de la manosa ramificada del núcleo de trimanosilo del N-glicano en la Asparagina 297 (Asn) en el dominio CH2 de la molécula de IgG. Este resto se conoce como una "GlcNAc bisectriz." El fin de añadir GlcNAc bisectriz a las cadenas de N-glicano de una molécula de IgG natural o recombinante o a un constructo quimérico que contiene IgG-Fc es optimizar la función efectora inmune de Fc de la porción Fc de la molécula. Dichas funciones efectoras pueden incluir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y otros efectos biológicos que necesitan una unión eficaz a los receptores FcγR, y la unión al componente C 1 del complemento. Se ha descrito la importancia de la GlcNAc bisectriz para conseguir una función efectora inmune máxima de las moléculas de IgG (Lifely y col., 1995, Glycobiology 5 (8): 813-822; Jeffris y col., 1990, Biochem. J. 268 (3): 529-537).

Los glicanos encontrados en el sitio de N-glicosilación en Asn 297 en el dominio CH2 de las moléculas de IgG se han caracterizado estructuralmente para las moléculas de IgG encontradas circulando en el plasma de sangre humana y animal, la IgG producida por células de mieloma, células de hibridoma, y una diversidad de líneas celulares de mamíferos y de insectos inmortalizadas transfectadas. En todos los casos el N-glicano es una cadena de alta manosa o una cadena biantenaria completa (Man3, GlcNAc4, GAL2, NeuAc2, Fuc1) o incompleta de forma variable o sin GlcNAc bisectriz (Raju y col., 2000, Glycobiology 10 (5): 477-486; Jeffris y col., 1998, Immunological. Rev. 163L59-76; Lerouge y col., 1998, Plant Mol. Biol. 38: 31-48; James y col., 1995, Biotechnology 13: 592-596).

La presente invención proporciona una molécula de inmunoglobulina glucosilada adaptada *in vitro*. La molécula de inmunoglobulina puede ser cualquier molécula de inmunoglobulina, que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo sintético, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y similar. Los procedimientos específicos para la generación de moléculas de anticuerpo y su caracterización se desvelan en cualquier parte en el presente documento. Preferentemente, la inmunoglobulina es IgG, y más preferentemente, la IgG es una IgG humanizada o humana, lo más preferentemente, IgG1.

La presente invención contempla específicamente el uso de β 1,4-manosil-glicopéptido β 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa, GnT-III: EC2.4.1.144 como un reactivo *in vitro* para unir glucosídicamente la N-acetilglucosamina (GlcNAc) en la posición 4-O de la manosa ramificada del núcleo de trimanosilo del N-glicano en Asn 297 en el dominio CH2 de una molécula de IgG. Sin embargo, como se observará a partir de la divulgación que se proporciona en el presente documento, no se debería interpretar que la invención incluye únicamente el uso de esta enzima para proporcionar una GlcNAc bisectriz a una molécula de inmunoglobulina. Más bien, se ha descubierto que es posible modular el patrón de glicosilación de una molécula de anticuerpo de modo que la molécula de anticuerpo presenta actividad biológica potenciada, es decir, función efectora, además de la mejora potencial de otras propiedades, por ejemplo, estabilidad y similar.

En la presente invención se proporciona un procedimiento general para la eliminación de moléculas de fucosa del glicano unido al N de la Asn(297) con el fin de potenciar la unión a Fc-gammaRIIIA, y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos potenciada (véase, Shields y col., 2002, J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). El procedimiento implica poner en contacto la molécula de anticuerpo con una fucosidasa apropiada para la unión de la molécula o moléculas de fucosa en el glicano o glicanos del anticuerpo. Como alternativa, el anticuerpo recombinante se puede expresar en células que expresan fucosiltransferasas, tal como la variante Lec 13 de las células CHO. La eliminación de fucosa a partir del glicano o glicanos del anticuerpo se puede hacer solo, o en conjunto con otros procedimientos para remodelar los glicanos, tal como añadir una GlcNAc bisectriz. La expresión de anticuerpos en células que carecen de GnT-I también puede dar como resultado glicanos de Fc que carecen de núcleo de fucosa, que se pueden modificar adicionalmente mediante la presente invención.

En la presente invención se proporciona un procedimiento general para introducir una GlcNAc bisectriz con el fin de potenciar la función efectora inmune de Fc en cualquier preparación de moléculas de IgG que contienen oligosacáridos unidos a N en el dominio CH2, típicamente en Asn 297. El procedimiento requiere que la población de moléculas de IgG se lleve a un estado de glicosilación de tal manera que la cadena del glicano sea un aceptor de GnT-III. Esto se consigue en una cualquiera de tres maneras: 1) mediante selección o manipulación genética de un sistema de expresión del huésped que secreta la IgG con cadenas de N-glicanos que son sustratos para GnT-III; 2) mediante tratamiento de una población de glicoformas de IgG con exoGlicosidasas de tal manera que la estructura o las estructuras del glicano restante después del tratamiento con exoglicosidasa sea un aceptor de GnT-III, 3) alguna combinación de la selección de huésped y tratamiento con exoglicosidasa como en 1) y 2) mencionados anteriormente, más sucesivas adiciones de GlcNAc mediante GnT-I y GnT-II para crear un aceptor para GnT-III.

Por ejemplo, la IgG obtenida a partir de plasma de pollo contiene principalmente cadenas de alta manosa y requeriría digestión con una o más α -manosidasas para crear un sustrato para la adición de GlcNAc a la rama α 1,3 Manosa del núcleo de trimanosilo mediante GnT-I. Este sustrato podría ser el núcleo de trimanosilo fundamental, Man3GlcNAc2. El tratamiento de esta estructura de núcleo secuencialmente con GnT-I seguido de GnT-II seguido de GnT-III usando UDP-GlcNAc como un donador de azúcar crearía Man3GlcNAc5 como se muestra en la Figura 2. Opcionalmente, esta estructura después se puede extender mediante el tratamiento con β 1,4 galactosiltransferasa. Si fuera necesario, el oligosacárido galactosilado se puede ampliar adicionalmente usando α 2,3- o α 2,6-sialiltransferasa para conseguir una estructura biantenaria completada. Usando este procedimiento se pueden remodelar las cadenas biantenarias de glicano según sea necesario para la función efectora inmune de Fc óptima de cualquier IgG terapéutica en fase de desarrollo (Figura 4).

Como alternativa, las moléculas de IgG que se encuentran en el plasma de la mayoría de los animales o la IgG que se secreta como un producto recombinante por la mayoría de las células animales o por animales transgénicos incluyen típicamente un espectro de glicoformas biantenarias que incluye formas completas (NeuAc2, GAL2, GlcNAc4, Man3, $\pm$ Fuc1) (Figura 4) y variablemente incompletas, con o sin GlcNAc bisectriz (Raju y col., 2000, Glycobiology 10 (5): 477-486; Jeffris y col., 1998, Immunological Rev. 163: 59-76). Para asegurar que el GlcNAc bisectriz está presente en toda la población de moléculas de inmunoglobulina producidas de esta manera, la mezcla de moléculas se puede tratar con las siguientes exoGlicosidasas, sucesivamente o en una mezcla: neuraminidasa, β -galactosidasa, β -glucosaminidasa, α -fucosidasa. El núcleo de trimanosilo resultante se puede remodelar después usando glicosiltransferasas como se ha indicado anteriormente.

Además, se ha caracterizado la IgG secretada por animales transgénicos o almacenada como "planticuerpos" mediante plantas transgénicas. Una molécula de IgG producida en una planta transgénica que tiene N-glicanos que contienen xilosa unida a β 1,2 y/o fucosa unida a α 1,3 se puede tratar con exoGlicosidasas para eliminar esos restos, además de las exoGlicosidasas que se han descrito anteriormente para crear el núcleo de trimanosilo o una estructura de Man3GlcNAc4, y después se tratan con glicosiltransferasas para remodelar el N-glicano como se ha descrito anteriormente.

El nuevo aspecto primario de la presente invención es la aplicación de las glicosiltransferasas apropiadas, con o sin tratamiento previo con exoglicosidasa, aplicadas en la secuencia correcta para optimizar la función efectora del anticuerpo. En una realización ejemplar, una GlcNAc bisectriz se introduce en los glicanos de las moléculas de IgG o de otros constructos quiméricos de IgG-Fc en los que se necesita GlcNAc bisectriz. En otra realización ejemplar, se retira la fucosa núcleo a partir de los glicanos de moléculas de IgG o de otros constructos quiméricos de IgG-Fc.

Receptor de TNF-proteína de fusión de IgG Fc

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del receptor de TNF humano de 75 kDa se exponen en el presente documento como SEC ID N°: 31 y SEC ID N°: 32, respectivamente (Figuras 71A y 71B, respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables ligera y pesada del anti-HER2 quimérico se exponen como SEC ID N°: 35 y SEC ID N°: 36, respectivamente (Figuras 72A y 72B, respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables ligera y pesada del anti-VRS quimérico se describen como SEC ID N°: 38 y SEC ID N°: 37, respectivamente (Figuras 73A y 73B, respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables no humanas de anti-TNF se exponen en el presente documento como SEC ID N°: 41 y SEC ID N°: 42, respectivamente (Figuras 74A y 74B, respectivamente). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la porción Fc de la IgG humana se exponen como SEC ID N°: 49 y SEC ID N°: 50 (Figuras 75A y 75B, respectivamente).

MAB anti-glicoproteína IIb/IIIa

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de anticuerpos murinos de anti-glicoproteína IIb/IIIa se exponen en la SEC ID N°: 52 (cadena ligera variable madura murina, Figura 76) y SEC ID N°: 54 (cadena pesada variable madura murina, Figura 77). Estas secuencias murinas se pueden combinar con las secuencias de aminoácidos de IgG humana SEC ID N°: 51 (cadena ligera variable madura humana, Figura 78), SEC ID N°: 53 (cadena pesada variable madura humana, Figura 79), SEC ID N°: 55 (cadena ligera humana, Figura 80) y SEC ID N°: 56 (cadena pesada humana, Figura 81) de acuerdo con los procedimientos encontrados en la Patente de Estados Unidos N° 5.777.085 para crear un anticuerpo murino humanizado quimérico de anti-glicoproteína IIb/IIIa. Otros anticuerpos humanizados de anti-glicoproteína IIb/IIIa se encuentran en la Patente de Estados Unidos N° 5.877.006. Una línea celular que expresa la anti-glicoproteína IIb/IIIa MAB 7E3 se puede obtener en el mercado en la ATCC (Manassas, VA) con número de referencia HB-8832.

MAB anti-CD20

Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD20 quimérico se describen en la SEC ID N°: 59 (secuencia de ácidos nucleicos de cadena ligera de la región variable murina, Figura 82A), SEC ID N°: 60 (secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera murina, Figura 82B), SEC ID N°: 61 (secuencia de ácidos nucleicos de cadena pesada variable murina, Figura 83A) y SEC ID N°: 62 (secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la región variable murina, Figura 83B). Para humanizar un anticuerpo murino, se puede usar convenientemente el TCAE 8 (SEC ID N°: 57, Figuras 84A - 84E), que contiene los dominios continuos de la IgG humana pesada y ligera. Mediante la clonación del ADN que codifica la región variable murina anterior en el vector TCAE 8 de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en la Patente de Estados Unidos N° 5.736.137, se crea un vector (SEC ID N°: 58, Figuras 85A - 85E) que cuando se transforma en una línea celular de mamíferos, expresa un anticuerpo anti-CD20 quimérico. Otros anticuerpos anti-CD20 humanizados se encuentran en la Patente de Estados Unidos N° 6.120.767. Una línea celular que expresa el AcM C273 anti-CD20 se puede obtener comercialmente de la ATCC (Manassas, VA) con número de referencia HB-9303.

El experto en la materia observará fácilmente que las secuencias expuestas en el presente documento no son exhaustivas, sino que más bien son ejemplos de las regiones variables, receptores, y otros restos de unión de anticuerpos quiméricos. Además, los procedimientos para construir anticuerpos quiméricos o "humanizados" son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.329.511 y en la Patente de Estados Unidos N° 6.210.671. Junto con la presente divulgación y los procedimientos bien conocidos a lo largo de la técnica, el experto en la materia observará que la presente invención no se limita a las secuencias desveladas en el presente documento.

La expresión de un anticuerpo quimérico es bien conocida en la técnica, y se describe en detalle, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.329.511. Los sistemas de expresión pueden ser procariotas, eucariotas y similar. Además, la expresión de anticuerpos quiméricos células de insectos que usan un sistema de expresión de baculovirus se describen en Putlitz y col. (1990, Bio/Technology 8: 651-654). Adicionalmente, son bien conocidos en la técnica los procedimientos de expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión o quimérica, y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y en Ausubel y col. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, Nueva York).

La determinación de la función y la actividad biológica del anticuerpo quimérico producido de acuerdo con los procedimientos de la presente invención es una operación básica de forma similar para un experto en la materia. Los procedimientos para determinar la afinidad de un anticuerpo mediante ensayos de competición se detallan en Berzofsky (J. A. Berzofsky e I. J. Berkower, 1984, en Fundamental Immunology (ed. W. E. Paul), Raven Press (Nueva York), 595). En resumen, la afinidad del anticuerpo quimérico se compara con la del anticuerpo monoclonal a partir del que se derivó usando un anticuerpo monoclonal radio-yodado.

VII. Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. La composición farmacéutica incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un polímero, resto terapéutico o biomolécula soluble en agua de origen no natural y un péptido glucosilado o sin glucosilar. El polímero, resto terapéutico o biomolécula se conjuga con el péptido mediante un grupo de unión a glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente tanto al péptido como al polímero, resto terapéutico o biomolécula.

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

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

Comúnmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, *por ejemplo*, por vía intravenosa. De este modo, la invención proporciona composiciones para su administración parenteral que comprenden el compuesto disuelto o suspendido en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso, *por ejemplo*, agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como el ajuste del pH y agentes de tamponamiento, agentes para el ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similar.

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 liofilizadas, siendo la preparación liofilizada combinada con un vehículo acuoso estéril antes de su administración. El pH de las preparaciones típicamente estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9 y lo más preferentemente entre 7 y 8.

En algunas realizaciones, los péptidos de la invención se pueden incorporar en liposomas formados a partir de lípidos convencionales formadores de vesículas. Una diversidad de procedimientos está disponible para preparar liposomas, 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 que usan una diversidad de agentes de direccionamiento (*por ejemplo*, los galactósidos de sialilo de la invención) es bien conocida 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 direccionamiento a liposomas. Estos procedimientos generalmente implican la incorporación en liposomas de componentes lipídicos, tales como fosfatidiletanolamina, que se pueden activar para la unión de agentes de direccionamiento, o compuestos lipofílicos derivatizados, tales como los péptidos derivatizados con lípidos de la invención.

Los mecanismos de direccionamiento generalmente necesitan que los agentes de direccionamiento se puedan colocar en la superficie del liposoma de tal manera que los restos diana estén disponibles para la interacción con la diana, *por ejemplo*, un receptor de superficie celular. Los hidratos de carbono de la invención 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 tal manera que una porción del conector se incorpora primero en la membrana en el momento de la formación de la membrana. La porción del conector debe tener una porción lipofílica, que está firmemente embebida y anclada en la membrana. También debe tener una porción reactiva, que está químicamente disponible en la superficie acuosa del liposoma. La porción reactiva está seleccionada de modo que será químicamente adecuada para formar un enlace químico estable con un agente de direccionamiento o con un hidrato de carbono, que se añade posteriormente. En algunos casos, es posible unir el agente dirigido a la molécula del conector directamente, pero en la mayoría de los casos es más adecuado usar una tercera molécula que actúe como un puente químico, uniendo de este modo la molécula conectora que está en la membrana con el agente dirigido o con el hidrato de carbono que está extendido, tridimensionalmente, fuera de la superficie de la vesícula. Los intervalos de dosificación para la administración de los péptidos de la invención son aquellos lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado en los que los síntomas de la respuesta inmune muestran algún grado de inhibición. La dosificación no debería ser demasiado elevada como para causar efectos secundarios. Generalmente, la dosificación variará con la

edad, condición, sexo y extensión de la enfermedad en el animal y lo puede determinar alguien experto en la materia. La dosificación la puede ajustar el médico individual en el caso de cualquier contraindicación.

Se pueden usar procedimientos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción. Las preparaciones de liberación controlada se pueden conseguir mediante el uso de polímeros para conjugar, formar complejos o adsorber el péptido. La administración controlada se puede ejercer mediante la selección de macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, poliamino carboximetilcelulosa, y sulfato de protamina) y mediante la concentración de macromoléculas así como los procedimientos de incorporación para controlar la liberación. Otro procedimiento posible para controlar la duración de la acción mediante preparaciones de liberación controlada es incorporar el péptido en partículas de un material polimérico tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli(ácido láctico) o copolímeros de vinilacetato de etileno.

Para proteger los péptidos de la unión con proteínas plasmáticas, es preferente que los péptidos estén atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, o en sistemas coloidales de administración de fármacos, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas o en macroemulsiones. Dichas enseñanzas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences (16ª Ed., A. Oslo, ed., Mack, Easton, Pa., 1980).

Los péptidos de la invención son muy adecuados para su uso en sistemas de administración de fármacos dirigibles tales como polímeros sintéticos o naturales en forma de complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, o perlas, y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, liposomas, y eritrocitos liberados. Estos sistemas se conocen colectivamente como sistemas coloidales de administración de fármacos. Típicamente, dichas partículas coloidales que contienen los péptidos dispersos tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm-2 µm. El tamaño de las partículas coloidales les permite su administración por vía intravenosa tal como por inyección, o en forma de un aerosol. Los materiales usados en la preparación de sistemas coloidales son típicamente esterilizables mediante esterilización por filtración, no tóxicos, y biodegradables, por ejemplo albúmina, etilcelulosa, caseína, gelatina, lecitina, fosfolípidos, y aceite de soja. Los sistemas coloidales poliméricos se preparan mediante un procedimiento similar a la coacervación de microencapsulación.

En una realización ejemplar, los péptidos son componentes de un liposoma, usado como un sistema de administración dirigida. Cuando los fosfolípidos se dispersan suavemente en medios acuosos, se hinchan, se hidratan, y forman espontáneamente vesículas multilaminares de bicapas concéntricas con fases de medios acuosos que separan la bicapa lipídica. Dichos sistemas normalmente se denominan liposomas multilaminares o vesículas multilaminares (MLV) y tienen diámetros que varían de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 4 µm. Cuando se sonicen las MLV, se forman pequeñas vesículas unilaminares (SUVs) con diámetros en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nm, que contienen una solución acuosa en el núcleo de la SUV.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, y fosfatidiletanolamina. Son particularmente útiles los diacilfosfatidilgliceroles, en los que el resto lipídico contiene 14-18 átomos de carbono, particularmente 16-18 átomos de carbono, y están saturados. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y distearoilfosfatidilcolina de huevo.

En la preparación de liposomas que contienen los péptidos de la invención, se deberían considerar variables tales como la eficacia de encapsulación del péptido, labilidad del péptido, homogeneidad y tamaño de la población resultante de liposomas, relación de péptido a lípido, inestabilidad a la permeabilidad de la preparación, y aceptabilidad farmacéutica de la formulación. Szoka, y col, Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 9: 467 (1980); Deamer, y col., en LIPOSOMES, Marcel Dekker, Nueva York, 1983, 27: Hope, y col., Chem. Phys. Lipids, 40: 89 (1986)).

El sistema de administración dirigida que contiene los péptidos de la invención se puede administrar a un huésped en una diversidad de formas, particularmente a un huésped mamífero, tal como por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravascular, por vía tópica, por vía intracavitaria, por vía transdérmica, por vía intranasal, y por inhalación. La concentración de los péptidos variará con la aplicación en particular, la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración, o similares. El péptido de sistema encapsulado para su administración dirigida se puede proporcionar en una formulación que comprende otros compuestos apropiados y un medio acuoso fisiológicamente aceptable, por ejemplo, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, o similares.

Los compuestos preparados mediante los procedimientos de la invención también pueden encontrar uso como reactivos para diagnóstico. Por ejemplo, se pueden usar compuestos marcados para localizar zonas de inflamación o metástasis tumoral en un paciente sospechoso de padecer una inflamación. Para este uso, los compuestos se pueden marcar con ¹²⁵I, ¹⁴C, o tritio.

Ejemplos Experimentales

La divulgación se describe ahora con referencia a los siguientes Ejemplos. Estos Ejemplos se proporcionan solamente con fines de ilustración y la invención no se debería interpretar de ninguna manera como limitada a estos Ejemplos, sino que más bien se debería interpretar que incluye cualquiera y todas las variaciones que sean evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

A. Glicosilación

Los materiales y los procedimientos usados en los experimentos presentados en este Ejemplo se describen a continuación.

1. Sialilación y Fucosilación de TP10

Este ejemplo expone la preparación de TP10 con restos de sialil Lewis X y el análisis de la actividad biológica potenciada.

La interrupción del flujo sanguíneo al cerebro, incluso durante un breve periodo de tiempo, puede desencadenar episodios inflamatorios dentro de la microvasculatura cerebral que puede empeorar el daño tisular cerebral. El daño al tejido que se acumula se amplifica mediante la activación de las cascadas tanto de inflamación como de coagulación. En un modelo murino de apoplejía, el aumento de la expresión de P-selectina e ICAM-1 promueve el reclutamiento de leucocitos. sCR1 es una forma recombinante del dominio extracelular del Receptor 1 del Complemento (CR-1). sCR-1 es un potente inhibidor de la activación del complemento. sCR1sLe^x (CD20) es una forma alternativamente glucosilada de sCR1 que se glucosila alternativamente para mostrar antígeno de Lewis^x sialilado. Anteriormente, se encontró que sCR-1sLe^x, que se expresó y se glucosiló *in vivo* en células CHO Lec11 sometidas a ingeniería genética, localizaba correctamente los microvasos cerebrales isquémicos y las neuronas que expresan C1q, inhibiendo de este modo los neutrófilos y la acumulación de plaquetas y reduciendo los volúmenes del infarto cerebral (Huang y col., 1999, Science 285: 595-599). En Este ejemplo, sCR1sLe^x que se preparó *in vitro* mediante la remodelación de glicanos, exhibió actividad biológica potenciada similar a la de sCRsLe^x glucosilado *in vivo*.

El péptido TP10 se expresó en células CHO DUK B11. Esta línea celular CHO produce el péptido TP10 con la glicosilación típica de las células CHO, con muchos, pero no todos los glicanos protegidos con ácido siálico.

Sialilación de 66 mg de TP10. TP10 (2,5 mg/ml), CMPSA (5 mM), y ST3Gal3 (0,1 U/ml) se incubaron a 32 °C en Tris 50 mM, NaCl 0,15M, azida sódica al 0,05%, pH 7,2 durante 48 horas. El ácido siálico CMP radiomarcado se añadió a una pequeña alícuota para controlar la incorporación. TP10 se separó a partir de azúcar de nucleótidos por HPLC SEC. Las muestras analizadas a las 24 horas y 48 horas demostraron que la reacción se completó después de 24 horas. La mezcla de reacción se congeló después. Los productos de reacción se sometieron a análisis por Electroforesis de Hidratos de Carbono Asistida por Fluoróforos (FACE[®]; Glyko, Inc, Novato CA) (Figura 86).

Estudios farmacocinéticos. Se adquirieron ratas con una cánula en la vena yugular. Se administraron 10 mg/kg de péptido TP 10 de sialilación previa o de sialilación posterior mediante una inyección en la vena de la cola a tres ratas para cada tratamiento (n = 3). Se tomaron catorce muestras de sangre de 0 a 50 horas. La concentración en la sangre del péptido TP10 de sialilación posterior fue mayor que la que la del TP10 de sialilación previa en cada punto temporal pasadas 0 horas (Figura 87). La adición de ácido siálico duplicó el área bajo la curva de concentración de plasma-tiempo (AUC) de la curva farmacocinética en comparación con el material de partida (Figura 88).

Fucosilación de TP10 sialilado. 10 ml (25 mg de TP10) de la mezcla de sialilación anterior se descongelaron, y se añadió GDP-fucosa a 5 mM, MnCl₂ a 5 mM, y FTVI (fucosiltransferasa VI) a 0,05 U/ml. La reacción se incubó a 32 °C durante 48 horas. Los productos de reacción se sometieron a análisis por Electroforesis de Hidratos de Carbono Asistida por Fluoróforos (FACE[®]; Glyko, Inc, Novato CA) (Figura 89). A una pequeña alícuota, se añadió GDP-fucosa radiomarcada para controlar la incorporación. TP10 se separó a partir de azúcar de nucleótidos por HPLC SEC. Las muestras analizadas a las 24 horas y 48 horas demostraron que la reacción se completó a las 24 horas. Un ensayo *in vitro* que mide la unión a E-selectina indica que la adición de fucosa puede producir un ligando de E-selectina biológicamente activo (Figura 90).

2. Sialilación de Glicoproteína s Recombinantes

Este ejemplo expone la preparación de formas sialiladas de varios péptidos recombinantes.

Sialilación de Glicoproteína s Recombinantes Usando ST3Gal III. Se examinó la capacidad de varias glicoproteína s para ser sialiladas mediante ST3Gal III recombinante de rata. Para cada una de estas glicoproteína s, la sialilación será una etapa valiosa del procedimiento en el desarrollo de las respectivas glicoproteína s como productos comerciales.

Condiciones de Reacción. Las condiciones de reacción fueron como se resumen en la Tabla 9. Las reacciones de sialiltransferasa se realizaron durante 24 horas a una temperatura entre temperatura ambiente y 37 °C. Se estableció

el grado de sialilación mediante la determinación de la cantidad de ^{14}C -NeuAc incorporada en los oligosacáridos unidos a glicoproteína. Véase la Tabla 9 para las condiciones de reacción para cada proteína.

Tabla 9. Condiciones de reacción.

Proteína	Fuente	Proteína Total (mg)	Conc. Proteína (mg/ml)	ST (mU/ml)	ST/Proteína (mU/mg)	CMP-NeuAc de "ciclo" ¹
ATIII	Genzima Transgenics	8,6	4,3	210	48	ciclo
ATIII	Genzima Transgenics	860	403	53	12	ciclo
Asialo-fetuína	Sigma	0,4	105	20	13	10 mM
asialo-AAAT	PPL	0,4	0,5	20	20	20 mM

¹ "Ciclo" se refiere a la generación de CMP-NeuAc "in situ" que usa enzimáticamente condiciones convencionales como se describe en la memoria descriptiva (NeuAc 20 mM y CMP2 mM). El tampón fue HEPES 0,1 M, pH 7,5.

Los resultados presentados en la Tabla 10 demuestran que se consiguió un grado notable de sialilación en cada caso, a pesar de los bajos niveles de enzima usada. Básicamente, se obtuvo la sialilación completa, en base a la estimación de la galactosa terminal disponible. La Tabla 10 muestra los resultados de las reacciones de sialilación. La cantidad de enzima usada por cada mg de proteína (mU/mg) como una base de comparación para los diversos estudios. En varios de los ejemplos que se muestran, solamente se necesitaron 7-13 mU de ST3Gal III por cada mg de proteína para dar básicamente la sialilación completa después de 24 horas.

Tabla 10. Resultados analíticos

Proteína	Fuente	Gal Terminal ¹ mol/mol	NeuAc Incorp. ² mol/mol	% de Rxn ³	Otra caracterización
ATIII ⁴	Genzima Transgenics	102	104	117	Ninguna
ATIII ⁴	Genzima Transgenics	102	1.3	108	SDS-geles: pureza de la proteína FAC: glicoformas de hidratos de carbono
Asialo-fetuína	Sigma	802	905	116	Ninguna
asialo-AAAT ⁵	PPL	7	7,0	100	SDS-geles: pureza de la proteína

¹ Contenido de Gal (expuesto) terminal en los oligosacáridos unidos a N determinado por el proveedor, o a partir de los valores de las bibliografías (fetuína, asialo-AAAT).

² NeuAc incorporada determinada mediante la incorporación de ^{14}C -NeuAc después de la separación a partir de precursores libres radiomarcados por filtración en gel.

³ El % de Rxn se refiere a un % de finalización de la reacción en base al contenido de Gal terminal como un máximo teórico.

⁴ Antitrombina III.

⁵ α 1 Antitripsina.

Estos resultados están en marcado contraste con los indicados en estudios detallados con ST6Gal I bovina en los que menos de 50 mU/mg de proteína dieran menos de un 50% de sialilación, y 1070 mU/mg de proteína dieron aproximadamente un 85-90% de sialilación en 24 horas. Paulson y col. (1977) J. Biol. Chem. 252: 2363-2371; Paulson y col. (1978) J. Biol. Chem. 253: 5617-5624. Un estudio de sialiltransferasas α 2,3 y α 2,6 de rata por otro grupo reveló que la sialilación completa de asialo-AGP necesitaba concentraciones de enzima de 150-250 mU/mg de proteína (Weinstein y col. (1982) J. Biol. Chem. 257: 13845-13853). Estos estudios anteriores tomados en conjunto sugieren que la sialiltransferasa ST6Gal I necesita una cantidad mayor que 50 mU/mg y hasta 150 mU/mg para conseguir la sialilación completa.

Este ejemplo demuestra que la sialilación de las glicoproteínas recombinantes que usan sialiltransferasa ST3 Gal III necesita mucha menos enzima de lo esperado. Para una reacción a escala de un kilogramo, se necesitarían aproximadamente 7.000 unidades de sialiltransferasa ST3Gal III, en lugar de las 100.000-150.000 unidades que indicaban los estudios anteriores. La purificación de estas enzimas a partir de fuentes naturales es prohibitiva, con rendimientos de sólo 1-10 unidades para una preparación a gran escala después de 1-2 meses de trabajo. Suponiendo que las sialiltransferasas tanto ST6Gal I como ST3Gal III se producen como sialil-transferasas

recombinantes, consiguiendo los mismos niveles de expresión de las dos enzimas, se necesitaría una escala de fermentación 14-21 veces mayor (o superior) para la sialiltransferasa ST6Gal I con respecto a la sialiltransferasa ST3Gal III. Para la sialiltransferasa ST6Gal I, se han indicado niveles de expresión de 0,3 U/l en levaduras (Borsig y col. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 210: 14-20). Se han conseguido niveles de expresión de 1000 U/litro de sialiltransferasa ST3 Gal III en *Aspergillus niger*. A los niveles actuales de expresión se necesitarían 300-450.000 litros de fermentación de levadura para producir suficiente enzima para la sialilación de 1 kg de la glicoproteína usando la sialiltransferasa ST6Gal I. En cambio, se necesitarían menos de 10 litros de fermentación de *Aspergillus niger* para la sialilación de 1 kg de glicoproteína usando la sialiltransferasa ST3Gal III. Por lo tanto, la capacidad de fermentación necesaria para producir la sialiltransferasa ST3Gal III para una reacción de sialilación a gran escala sería 10-100 veces menor que la necesaria para producir la ST6Gal I; el coste de producción de la sialiltransferasa se reduciría proporcionalmente.

3. Fucosilación para crear Sialil Lewis X

Este ejemplo expone la preparación de Activador del Plasminógeno de tipo Tisular (TPA) con antígeno de sialil Lewis X unido a N.

Sialilación. El TPA expresado en células de mamíferos a menudo contiene una mayoría de los glicanos que terminan en ácido siálico, pero para asegurar la sialilación completa, sería beneficioso realizar primero una sialilación *in vitro*. Se incubaba TPA en un tampón adecuado (más preferentemente a pH entre 5,5 y 9, por ejemplo solución salina tamponada con Tris, pH 7,2) con ácido CMP siálico y sialiltransferasa durante un tiempo suficiente para convertir cualquier glicano que carece de ácido siálico en las especies sialiladas. Las condiciones típicas serían 1 mg/ml de TPA, ácido CMP siálico 3 mM, 0,02 U/ml de ST3Gal3, 32 °C durante 24 horas. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o mediante la inclusión de azida sódica al 0,02%. La concentración de TPA está más preferentemente en el intervalo de 0,1 mg/ml hasta el límite de solubilidad del péptido. La concentración de CMP-AS debería ser suficiente para que haya exceso sobre los sitios disponibles, y puede variar de 50 µM hasta 50 mM, y la temperatura de 2 °C hasta 40 °C. El tiempo necesario para completar la reacción dependerá de la temperatura, las cantidades relativas de enzima a sustrato aceptor, la concentración de sustrato donador, y el pH. Otras sialiltransferasas que pueden ser capaces de añadir ácido siálico en la unión 2,3 incluyen ST3Gal4; también se podrían usar transferasas microbianas.

Fucosilación. Las condiciones típicas para la fucosilación serían 1 mg/ml de TPA, GDP-fucosa 3 mM, 0,02 U/ml de FTVI, MnCl₂ 5 mM, 32 °C durante 24 h en solución salina tamponada con Tris. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o mediante la inclusión de azida sódica al 0,02%. La concentración de TPA está más preferentemente en el intervalo de 0,1 mg/ml hasta el límite de solubilidad del péptido. La concentración de GDP-fucosa debería ser suficiente para que haya exceso en los sitios disponibles, y podría variar desde 50 µM hasta 50 mM, y la temperatura de 2 °C hasta 40 °C. El tiempo necesario para completar la reacción dependerá de la temperatura, las cantidades relativas de enzima a sustrato aceptor, la concentración de sustrato donador, y el pH. Otras fucosiltransferasas que pueden ser capaces de preparar sialil Lewis x incluyen FTVII, FTV, FTIII, así como que también se podrían usar transferasas microbianas.

4. Reducción de la estructura del núcleo de alta manosa a tri-manosa: Activador del plasminógeno de tipo Tisular producido en CHO

Este ejemplo expone la preparación de Activador del Plasminógeno de tipo Tejido con un núcleo de trimanosa por reducción a partir de un glicano de alta manosa.

El activador del plasminógeno de tipo tejido (TPA) se produce actualmente en células de ovario de hámster chino (CHO) y contiene una baja cantidad de oligosacárido unido a N de alta manosa. Las manosas se pueden reducir usando una diversidad de manosidasas específicas. La primera etapa es generar Man5GlcNAc2(Fuc0-1) a partir de Man9GlcNAc2(Fuc0-1). Esto se puede hacer usando manosidasa I. Después se usa GlcNAcT1 (GlcNAc transferasa I) para preparar GlcNAc1Man5GlcNAc2(Fuc0-1) o se usa Manosidasa III para preparar Man3GlcNAc2(Fuc0-1). A partir de Man3GlcNAc2(Fuc0-1), se puede producir GlcNAc1Man3-GlcNAc2(Fuc0-1) usando GlcNAcT1 o a partir de GlcNAc1Man5GlcNAc2(Fuc0-1), se puede producir GlcNAc1Man3GlcNAc2 (Fuc0-1) usando Manosidasa II. Después, GlcNAc1Man3GlcNAc2(Fuc0-1) se convierte en GlcNAc2Man-3GlcNAc2(Fuc0-1) usando GlcNAcTransferasa II (GlcNAcTII). Los dos restos de GlcNAc terminal después se galactosilan usando GalTI y después se sialilan con AS-PEG usando ST3GalIII.

A la inversa, se puede producir TPA en sistemas de levaduras o fúngicos. Se necesitaría un procesamiento similar para el material derivado de hongos.

5. Adición de GlcNAc a EPO

Este ejemplo expone la adición de un resto de GlcNAc sobre un núcleo de tri-manosilo.

Adición de GlcNAc a EPO. EPO se expresó en células de insecto SF-9 y se purificó (Protein Sciences, Meriden, CT). La conversión de un 100% a partir de la glicoforma de tri-manosilo de Epo al "núcleo de tri-manosilo + 2 GlcNAc" (Pico 1, P1 en la Figura 91) se consiguió en 24 horas de incubación a 32 °C con 100 mU/ml de GlcNAcT-I y

100 mU/ml de GlcNAcT-II en las siguientes concentraciones finales de reacción:

MES 100 mM a pH 6,5, o Tris 100 mM a pH 7,5

UDP-GlcNAc 5 mM

MnCl₂ 20 mM

5 100 mU/ml de GlcNAcT-I

100 mU/ml de GlcNAcT-II

1 mg/ml de EPO (purificada, expresada en células Sf9, adquirida en Protein Sciences).

Análisis de glicoformas . El presente ensayo es una ligera modificación en K-R Anumula y ST Dume, Glycobiology 8 (1998) 685-69. N-glicanos liberados por N-glicanasa (PNGasa) se marcaron reductoramente con ácido antranílico. Los N-glicanos aminorados reductoramente se inyectaron en una amino columna Shodex Asahipak NH2P-50 4D (4,6 mm x 150 mm). Se usaron dos disolventes para la separación: A) ácido acético al 5% (v/v), tetrahidrofurano al 1%, y trietilamina al 3% en agua, y B) ácido acético al 2% y tetrahidrofurano al 1% en acetonitrilo. La columna después se eluyó isocráticamente con B al 70% durante 2,5 minutos, seguido de un gradiente lineal durante un periodo de 97,5 minutos yendo de B del 70 al 5% y una elución isocrática final con B al 5% durante 15 minutos. Los picos eluidos se detectaron usando detección por fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 230 nm y de emisión de 420 nm.

En estas condiciones, el núcleo de trimanosilo presentaba un tiempo de retención de 22,3 minutos, y el producto de la reacción de GnT presenta un tiempo de retención de 26,3 minutos. El material de partida fue exclusivamente núcleo de trimanosilo con núcleo de GlcNAc (Figura 91).

20 6. Remodelación de N-glicanos de alta manosa para hibridar y formar complejos de N-glicanos: RNasa pancreática bovina

Este ejemplo expone la preparación de RNasa de páncreas bovino con N-glicanos híbridos o complejos. Los glicanos de alta manosa unidos a la RNasa se digieren enzimáticamente y se elaboran para crear glicanos híbridos unidos a N. Adicionalmente, los glicanos unidos a N de alta manosa de la RNasa se digieren enzimáticamente y se elaboran con más detalle para crear glicanos complejos unidos a N.

Las estructuras de alta manosa de oligosacáridos unidos a N en glicopéptidos se pueden modificar a formas híbridas o complejas usando la combinación de α -manosidasas y glicosiltransferasas. Este ejemplo resume los resultados de dichos esfuerzos usando un N-Glicano sencillo como un sustrato modelo.

La ribonucleasa B (RNasa B) purificada a partir de páncreas bovino (Sigma) es un glicopéptido que consiste en 124 restos de aminoácido. Tiene un único sitio de N-glicosilación potencial modificado con estructuras de alta manosa. Debido a su simplicidad y su bajo peso molecular (13,7 kDa a 15,5 kDa), la ribonucleasa B es un buen candidato para demostrar la viabilidad de la remodelación de N-Glicano a partir de estructuras de alta manosa para hibridar para formar complejos de oligosacáridos unidos a N. El espectro de MALDI-TOF de la RNasaB y el perfil por HPLC para los oligosacáridos escindidos a partir de RNasaB mediante N-Glicanasa (Figura 92) indicaron que, aparte de una pequeña porción del péptido no modificada, la mayoría de los sitios de N-glicosilación del péptido se modifican con oligosacáridos de alta manosa que consisten en 5 a 9 restos de manosa.

Conversión de N-Glicanos de alta manosa en N-Glicanos híbridos. N-Glicanos de alta manosa se convirtieron en N-Glicanos híbridos usando la combinación de α 1,2-manosidasa, GlcNAcT-I (β 1,2-N-acetil glucosaminil transferasa), GalT-I (β 1,4-galactosiltransferasa) y α 2,3-sialiltransferasa/o α 2,6-sialiltransferasa como se muestra en la Figura 93.

Como un ejemplo, las estructuras de alta manosa en la RNasaB se convirtieron satisfactoriamente en estructuras híbridas.

Man₅GlcNAc₂-R se obtuvo a partir de Man_{5,9}GlcNAc₂-R catalizada mediante una sola α 1,2-manosidasa clonada a partir de *Trichoderma reesei* (Figura 94). La RNasa B (1 g, aproximadamente 67 μ mol) se incubó a 30 °C durante 45 h con 15 mU de la α 1,2-manosidasa de *T. reesei* recombinante en tampón MES (50 mM, pH 6,5) en un volumen total de 10 ml. Las estructuras Man_{6,9}GlcNAc₂-proteína se han convertido satisfactoriamente en Man₅GlcNAc₂-proteína con alta eficacia mediante la manosidasa recombinante.

Como alternativa, Man₅GlcNAc₂-R se obtuvo a partir de Man_{5,9}GlcNAc₂-R catalizada mediante una sola α 1,2-manosidasa purificada a partir de *Aspergillus saitoi* (Figura 95). RNasa B (40 μ g, aproximadamente 2,7 nmol) se incubó a 37 °C durante 42,5 h con 25 μ U de la α 1,2-manosidasa de *A. saitoi* comercial (Glyko o CalBioChem) en tampón NaOAc (100 mM, pH 5,0) en un volumen total de 20 μ l. Las estructuras de Man_{6,9}GlcNAc₂-proteína se convirtieron satisfactoriamente en Man₅GlcNAc₂-proteína mediante la manosidasa disponible en el mercado. Sin embargo, un nuevo pico que corresponde con la GlcNAc-proteína aparece en el espectro, indicando la posible contaminación de la endoglucosidasa H en la preparación. Aunque se necesitaron varias alfa-manosidasas de mamífero para conseguir esta etapa, la α 1,2-manosidasa fúngica fue muy eficaz para retirar todos los restos de manosa unidos en α 1,2.

A continuación, GlcNAcT-I añadió un resto de GlcNAc a la $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-R}$ (Figura 96). La mezcla de reacción después de la reacción de la $\alpha 1,2$ -manosidasa de *T. reesei* que contenía RNasa B (600 μg , aproximadamente 40 nmol) se incubó con GlcNAcT-I recombinante no purificada (34 mU) en tampón MES (50 mM, pH 6,5) que contenía MnCl_2 (20 mM) y UDP-GlcNAc (5 mM) en un volumen total de 400 μl . a 37 °C durante 42 h. Un resto de GlcNAc se

añadió cuantitativamente a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -proteína mediante la GlcNAcT-I recombinante. Después se añadió en resto de Gal usando GalT 1 (Figura 97). La mezcla de reacción después de la reacción de GnT-I que contenía RNasa B (120 μg , aproximadamente 8 nmol) se incubó a 37 °C durante 20 h con 3,3 mU de la GalT-1 recombinante en tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7,3) que contenía UDP-Gal (7,5 mM) y MnCl_2 (20 mM) en un volumen total de 100 μl . Se añadió un resto de Gal a aproximadamente un 98% de la GlcNAc- $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -proteína mediante la GalT 1 recombinante.

La siguiente etapa fue la adición de un ácido siálico usando una $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa o una $\alpha 2,6$ -sialiltransferasa (Figura 98). Como un ejemplo, se usó ST3Gal III, una $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa. La mezcla de reacción después de la reacción de la GalT-1 que contenía RNasa B (13 μg , aproximadamente 0,87 nmol) se incubó a 37 °C durante 16 h con 8,9 mU de ST3Gal III recombinante en tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7,3) que contenía CMP-Ácido siálico (5 mM) y MnCl_2 (20 mM) en un volumen total de 20 μl . Se añadió un resto de ácido siálico a aproximadamente un 90% de la Gal-GlcNAc- $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -proteína mediante ST3Gal III recombinante usando CMP-AS como el donador. El rendimiento se puede mejorar adicionalmente ajustando las condiciones de reacción.

Por conveniencia, no fue necesaria etapa de purificación o de diálisis después de cada reacción que se ha descrito anteriormente. De forma más interesante, GalT 1 y ST3Gal III se pueden combinar en una reacción en un solo recipiente. Se obtuvieron rendimientos similares en comparación con las reacciones separadas. La mezcla de reacción después de la reacción de GlcNAcT-I que contenía RNasa B (60 μg , aproximadamente 4 nmol) se incubó a 37 °C durante 20 h con 1,7 mU de GalT 1 recombinante, 9,8 mU de ST3Gal III recombinante en tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7,3) que contenía UDP-Gal (7,5 mM), CMP-ácido siálico (5 mM) y MnCl_2 (20 mM) en un volumen total de 60 μl .

Como se muestra en la Figura 99, AS-PEG (10 kDa) se añadió satisfactoriamente a la RNasa B. La mezcla de reacción después de la reacción de GalT-1 que contenía RNasa B (6,7 μg , aproximadamente 0,45 nmol) se dializó frente a H_2O durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubó a 37 °C durante 15,5 horas con 55 mU de la ST3Gal III recombinante en tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,3) que contenía CMP-AS-PEG (10 kDa) (0,25 mM) y MnCl_2 (20 mM) en un volumen total de 20 μl . Los restos de ácido siálico modificado con PEG se añadieron satisfactoriamente al Gal-GlcNAc- $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -péptido mediante la ST3Gal III recombinante. El rendimiento se puede mejorar adicionalmente ajustando las condiciones de reacción.

Conversión de N-Glicanos de alta manosa en N-Glicanos complejos. Para conseguir esta conversión, se obtiene un compuesto intermedio de $\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -péptido. Como se muestra en la Figura 100, existen al menos cuatro rutas factibles para realizar la reacción a partir de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -péptido hasta este compuesto intermedio:

Ruta I: El $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -péptido producido mediante la $\alpha 1,2$ manosidasa fúngica es un sustrato de GlcNAc transferasa I (GlcNAcT-I, enzima 2) que añade una GlcNAc. Los restos de manosa terminal unidos a $\alpha 1,3$ - y $\alpha 1,6$ - del $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ -péptido se retiran mediante α -manosidasa II de Golgi (ManII, enzima 5). Esta ruta es una parte de la secuencia natural para el procesamiento de oligosacáridos unidos a N realizada en organismos superiores.

Ruta II: Dos restos de manosa se retiran primero mediante una α -manosidasa (enzima 6), después se añade una GlcNAc mediante GlcNAcT-1 (enzima 2). Aparte de su aceptor natural $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-R}$, GlcNAcT-I también puede reconocer a $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-R}$ como su sustrato y añadir una GlcNAc a la estructura del núcleo de manosa para formar $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ -péptido.

Ruta III: La manosa unida a $\alpha 1,6$ se retira mediante una $\alpha 1,6$ -manosidasa, seguido de la adición de GlcNAc mediante GlcNAcT-1 y retirada de la manosa terminal unida a $\alpha 1,3$ mediante una $\alpha 1,3$ -manosidasa. A partir de los datos experimentales obtenidos, GlcNAcT-I puede reconocer este $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ -péptido como aceptor y añadir un resto de GlcNAc para formar $\text{GlcNAcMan}_4\text{GlcNAc}_2$ -péptido.

Ruta IV: De forma similar a la Ruta III, la manosa unida a $\alpha 1,3$ se retira mediante una $\alpha 1,3$ -manosidasa, seguido de reacción de GlcNAcT-I. Después la manosa terminal unida a $\alpha 1,6$ se puede retirar mediante una $\alpha 1,6$ -manosidasa.

Después de la función de GlcNAcT-I (responsable de la adición de la GlcNAc unida a $\beta 1,2$ a la $\alpha 1,3$ -manosa en el núcleo de manosa) y GlcNAcT-II (responsable de la adición de una segunda GlcNAc unida a $\beta 1,2$ a la $\alpha 1,6$ -manosa en el núcleo de manosa), el $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -péptido se puede procesar mediante GalT 1 y sialiltransferasa para formar N-Glicanos biantenarios complejos. Otras GlcNAc transferasas tales como GlcNAcT-IV, GlcNAcT-V, y/o GlcNAcT-VI (Figura 100 y Figura 101) también pueden glucosilar el $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -péptido. La glicosilación adicional mediante GalT 1 y sialiltransferasas formarán N-glicanos poliantenarios complejos. La enzima GlcNAcT-III cataliza la inserción de una GlcNAc bisectriz, previniendo de este modo las acciones de ManII, GlcNAcT-II, GlcNAcT-IV y GlcNAcT-V.

7. Preparación de EPO con glicanos complejos poliantenarios.

Este ejemplo expone la preparación de EPO biantenaria, PEGilada, y EPO sialilada, triantenaria a partir de EPO expresada en células de insectos.

La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) a partir del sistema de expresión de baculovirus/Sf9 (Protein Sciences Corp., Meriden, CT) se sometió a análisis de glicanos y los glicanos resultantes mostraron que eran el núcleo principal de trimanosilo con núcleo de fucosa, con un pequeño porcentaje de glicanos que también tenían una única GlcNAc (EPO 1).

Adición de N-acetilglucosamina con GnT-I y GnT-II. Dos lotes de rhEPO (1 mg/ml) se incubaron con GnT-I y GnT-II, UDP-glcNAc 5 mM; $MnCl_2$ 20 mM, y azida sódica al 0,02% en MES 100 mM a pH 6,5 a 32 °C durante 24h. El lote A contenía 20 mg de EPO, y 100 mU/ml de GnT-I y 60 mU/ml de GnT-II. El lote B contenía 41 mg de EPO, y 41 mU/ml de GnT-I + 50 mU/ml de GnT-II. Después de la reacción, la muestra se desaló mediante filtración con gel (columnas PD 10, Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ).

Glicanos de EPO analizados mediante establecimiento de perfiles por 2-AA HPLC. Este ensayo es una ligera modificación en Anumula y Dhume, Glycobiology 8 (1998) 685-69. Los N-glicanos aaminados reductoramente se inyectaron en una amino columna Shodex Asahipak NH2P-50 4D (4,6 mm x 150 mm). Se usaron dos disolventes para la separación, A) ácido acético al 5% (v/v), tetrahidrofurano al 1%, y trietilamina al 3% en agua y B) ácido acético al 2% y tetrahidrofurano al 1% en acetonitrilo. La columna después se eluyó isocráticamente con B al 70% durante 2,5 min, seguido de un gradiente lineal durante un periodo de 100 min yendo del 70 al 5% de B, y una elución isocrática final con B al 5% durante 20 min. Se detectaron los picos eluidos usando detección por fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 230 nm y de emisión de 420 nm. Los glicanos unidos a N no-sialilados entran en el intervalo de LC de 23-34 min, monosialilados de 34-42 min, disialilados de 42-52 min, trisialilados de 55-65 min y tetrasialilados de 68 -78 min.

El establecimiento de perfiles de glicanos por 2AA HPLC reveló que el lote A se convirtió en un 92% en una estructura biantenaria con dos GlcNAc (el equilibrio tenía un único GlcNAc. El lote B mostró un 97% de conversión al producto deseado (Figuras 102A y 102B).

Introducción de una tercera rama antenaria con GnT-V. EPO (1 mg/ml del lote B) a partir del producto de las reacciones de GnT-I y GnT-II, después de desalar en columnas PD-10 y posterior concentración, se incubó con 10 mU/ml de GnT-V y UDP-GlcNAc 5 mM en MES 100 mM a pH 6,5 que contenía $MnCl_2$ 5 mM y azida sódica al 0,02% a 32 °C durante 24 h. El análisis por 2AA HPLC demostró que la conversión se produjo con una eficacia de un 92% (Figura 103).

Después de desalar (PD-10) y concentrar, se añadió galactosa con rGalTI: EPO (1 mg/ml) se incubó con 0,1 U/ml de GalT1, UDP-galactosa 5 mM, $MnCl_2$ 5 mM a 32 °C durante 24 h.

Análisis MALDI de N-glicanos aaminados reductoramente a partir de EPO. Una pequeña alícuota de los N-glicanos liberados por PNGasa a partir de EPO que se había marcado reductoramente con ácido antranílico Se dializó durante 45 min en un filtro de membrana MF-Millipore (0,025 μ m de poro, 47 mm de diámetro), que estaba flotando en agua. La alícuota dializada se secó en una concentradora speedvac, se volvió a disolver en una pequeña cantidad de agua, y se mezcló con una solución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (10 g/l) disuelto en agua/acetonitrilo (50:50). La mezcla se secó sobre el objetivo y se analizó usando un espectrómetro de masas DE-Pro MALDI-TOF de Applied Biosystems funcionando en modo lineal/ion negativo. Los oligosacáridos se asignaron en base a la relación de masa a carga observada y en la bibliografía precedente.

El análisis de los glicanos liberados por MALDI mostró que la galactosa se añadió cuantitativamente a todos los sitios disponibles (Figura 104). La EPO galactosilada a partir de lo anterior se purificó después mediante filtración en gel en una columna Superdex 1,6/60 en Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 6.

Sialilación. Después de concentración y desalación (PD-10), 10 mg de EPO galactosilada (1 mg/ml) se incubó con ST3Gal3 (0,05 U/ml), y CMP-AS (3 mM) en Tris50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2 que contenía azida sódica al 0,02%. Una alícuota separada contenía CMP-AS radiomarcado. La marca resultante incorporada y la marca libre se separaron por cromatografía de exclusión por tamaño isocrática/HPLC a 0,5 ml/min en MeOH al 45%, TFA al 0,1% (columna de 7,8 mm x 30 cm, tamaño de partícula de 5 μ m, TSK G2000SW_{XL}, Toso Haas, Ansys Technologies Lake Forest, CA). Usando este procedimiento, se incorporaron un 12% de las cuentas (360 micromolar, a EPO 33 micromolar, o aproximadamente 10,9 moles/mol). Incorporación teórica (3 sitios unidos a N, tri-antenario) es aproximadamente 9 moles/mol. Estos tienen correspondencia dentro de los límites del procedimiento. En una reacción idéntica con ST6Gal1 en lugar de ST3Gal3, se incorporó un 5,7% de la radiomarca en la EPO galactosilada, o aproximadamente un 48% en comparación con ST3Gal3.

B. GlucoPEGilación

8. Preparación de CMP-AS-PEG

Este ejemplo expone la preparación de CMP-AS-PEG.

Preparación de 2-(benciloxicarboxamido)-glicilamida-2-desoxi-D-manopiranososa. Se añadió éster de N-benciloxicarbonil-glicil-N-hidroxisuccinimida (3,125 g, 10,2 mmol) a una solución que contenía D-manosamina-HCl (2 g, 9,3 mmol) y trietilamina (1,42 ml, 10,2 mmol) disuelta en MeOH (10 ml) y H₂O (6 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y se concentró usando evaporación rotatoria. La cromatografía (sílice, MeOH/CH₂Cl₂ al 10%) produjo 1,71 g (rendimiento de un 50%) de producto en forma de un sólido de color blanco: R_f = 0,62 (sílice; CHCl₃:MeOH:H₂O, 6/4/1); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ 3,24-3,27 (m, 2H), 3,44 (t, 1H), 3,55 (t, 1H), 3,63-3,66 (m, 1H), 3,76-3,90 (m, 6H), 3,91 (s, 2H), 4,0 (dd, 2H), 4,28 (d, 1H, J = 4,4), 4,41 (d, 1H, J = 3,2), 5,03 (s, 1H), 5,10 (m, 3H), 7,29-7,38 (m, 10H).

Preparación de 5-(N-benciloxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato. 2-(N-Benciloxicarboxamido)glicilamida-2-desoxi-D-manopiranososa (1,59 g, 4,3 mmol) se disolvió en una solución de HEPES 0,1 M (12 ml, pH 7,5) y piruvato sódico (4,73 g, 43 mmol). Ácido neuramínico aldolasa (540 U de enzima en 45 ml de solución tamponada con fosfato 10 mM que contenía NaCl 0,1 M a pH 6,9) y la mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 24 h. La mezcla de reacción después se centrifugó y el sobrenadante se cromatografió (sílice C18, gradiente de H₂O (100%) a MeOH al 30%/agua). Las fracciones apropiadas se combinaron, se concentraron y el residuo se cromatografió (sílice, gradiente de MeOH al 10%/CH₂Cl₂ a CH₂Cl₂/MeOH/H₂O a 6/4/1). Las fracciones apropiadas se recogieron, se concentraron y el residuo se volvió a suspender en agua. Después de liofilización, se obtuvo el producto (1,67 g, rendimiento de un 87%) en forma de un sólido de color blanco: R_f = 0,26 (sílice, CHCl₃/MeOH/H₂O a 6/4/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,82 (t, 1H), 2,20 (m, 1H), 3,49 (d, 1H), 3,59 (dd, 1H), 3,67-3,86 (m, 2H), 3,87 (s, 2H), 8,89-4,05 (m, 3H), 5,16 (s, 2H), 7,45 (m, 5H).

Preparación de 5-glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato. 5-(N-Benciloxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (1,66 g, 3,6 mmol) se disolvió en 20 ml de agua/metanol al 50%. El matraz se evacuó repetidamente y se colocó en atmósfera de argón y después se añadió Pd al 10%/C (0,225 g). Tras la evacuación repetida, después se añadió hidrógeno (aproximadamente 1 atm) al matraz y la mezcla de reacción se agitó durante 18 h. La mezcla de reacción se filtró a través de celite, se concentró por evaporación rotatoria y se liofilizó para producir 1,24 g (rendimiento de un 100%) de producto en forma de un sólido de color blanco: R_f = 0,25 (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,83 (t, 1H, J = 9,9), 2,23 (dd, 1H, J = 12,9, 4,69), 3,51-3,70 (m, 2H), 3,61 (s, 2H), 3,75-3,84 (m, 2H), 3,95-4,06 (m, 3H).

Preparación de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-fluorenilmetoxi-carboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Una solución que contiene 5-glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (0,55 g, 1,70 mmol) disuelto en 20 ml de H₂O se añadió a una solución de Tris (1,38 g, 11,4 mmol), MgCl₂ 1 M (1,1 ml) y BSA (55 mg). El pH de la solución se ajustó a 8,8 con NaOH 1 M (2 ml) y se añadió CTP-2Na⁺ (2,23 g, 4,2 mmol). El pH de la mezcla de reacción se controló con un controlador de pH que administraba NaOH 1 M según la necesidad para mantener un pH 8,8. La proteína de fusión (sialiltransferasa/CMP-ácido neuramínico sintetasa) se añadió a la solución y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 días, se añadió una cantidad adicional de proteína de fusión y la reacción se agitó un periodo adicional de 40 horas. La mezcla de reacción se precipitó en EtOH y el precipitado se lavó 5 veces con EtOH frío para producir 2,3 gramos de un sólido de color blanco. Aproximadamente 1,0 g del producto en bruto se disolvió en 1,4 dioxano (4 ml), H₂O (4 ml) y NaHCO₃ saturado (3 ml) y se añadió gota a gota una solución de FMOC-Cl (308 mg, 1,2 mmol) disuelta en 2 ml de dioxano. Después de agitar durante 16 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 6 ml por evaporación rotatoria y se purificó usando cromatografía (sílice C18, gradiente de H₂O al 100% a MeOH al 30%/H₂O). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron. El residuo se disolvió en agua y liofilizó para producir 253 mg de un sólido de color blanco: R_f = 0,50 (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,64 (dt, 1H, J = 12,0, 6,0), 2,50 (dd, 1H, J = 13,2, 4,9), 3,38 (d, J = 9,67, 1H), 3,60 (dd, J = 11,65, 6,64, 1H), 3,79 (d, J = 4,11, 1H), 3,87 (dd, J = 12,24, 1,0, 1H), 3,97 (m, 2H), 4,07 (td, J = 10,75, 4,84, 1H), 4,17 (dd, J = 10,68, 1,0, 1H), 4,25 (s, 2H), 4,32 (t, J = 4,4, 1H), 4,37 (t, J = 5,8, 1H), 4,6-4,7 (m, oscurecido por el pico de disolvente), 5,95 (d, J = 4, 1H), 6,03 (d, J = 7,4, 1H), 7,43-7,53 (m, 3H), 7,74 (m, 2H), 7,94 (c, J = 7, 3H). MS (ES); calc. Para C₃₅H₄₂N₅O₁₈P ([M-H]⁻), 851,7; encontrado 850,0.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato). Se añadió diisopropilamina (83 uL, 0,587 μmol) a una solución de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-fluorenil-metoxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato] (100 mg, 0,117 mmol) disuelto en agua (3 ml) y metanol (1 ml). La mezcla de reacción se agitó 16 h a temperatura ambiente y el metanol de la reacción se retiró de la mezcla de reacción por evaporación rotatoria. La mezcla de reacción en bruto se filtró a través de una columna de gel de sílice C 18 usando agua y el eluyente se recogió y se liofilizó para producir (87 mg, 100%) de producto en forma de un sólido de color blanco: R_f = 0,21 (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H, J = 5,3), 2,50 (dd, 1H, J = 13,2, 4,6), 3,43 (d, J = 9,58, 1H), 3,63 (dd, J = 11,9, 6,44, 1H), 3,88 (dd, J = 11,8, 1,0, 1H), 3,95 (td, J = 9,0, 2,3, 1H), 4,10 (t, J = 10,42, 1H), 4,12 (td, J = 10,34,

4,66, 1H), 4,18 (d, J = 10,36, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,31 (t, J = 4,64, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J = 4,37, 1H), 6,13 (d, J = 7,71, 1H), 7,98 (d, J = 7,64, 1H). MS (ES); calc. para $C_{21}H_{32}N_5O_{11}P$ ([M-H]⁻), 629,47; encontrado 627,9.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-metoxi-polioxietileno-(1 KDa)-3-oxipropionamido)-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Se añadió hexafluorofosfato de benciltriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfonio (BOP, 21 mg, 48 μmol) a una solución de ácido metoxipolioxietileno-(peso molecular medio de 1 KDa)-3-oxipropiónico (48 mg, 48 μmol) disuelto en DMF anhidra (700 μl) y trietilamina (13 μl, 95 μmol). Después de 30 min, se añadió una solución que contenía citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato) (30 mg, 48 μmol), agua (400 μl) y trietilamina (13 μl, 95 μmol). Esta solución se agitó 20 min a temperatura ambiente y después se cromatografió (sílice C 18, gradiente de metanol/agua). Las fracciones apropiadas se recogieron, se concentraron, el residuo se disolvió en agua y se liofilizó para producir 40 mg (rendimiento de un 50%) de un sólido de color blanco: R_f = 0,36 (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H, J = 5,3), 2,50 (dd, 1H, J = 13,2, 4,6), 2,64 (t, J = 5,99, 3H) 3,43 (d, J = 9,58, 1H), 3,63 (m, 1H), 3,71 (s, 70H), 3,79 (m, oscurecido por un pico a 3,71), 3,82 (t, J = 6,19, 1H) 3,88 (dd, J = 11,8, 1,0, 1H), 3,95 (td, J = 9,0, 2,3, 1H), 3,98 (t, J = 5,06, 1H), 4,12 (td, J = 10,34, 4,66, 1H), 4,18 (d, J = 10,36, 1H), 4,23 (d, J = 4,85, 2H), 4,31 (t, J = 4,64, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J = 4,55, 1H), 6,13 (d, J = 7,56, 1H), 7,98 (d, J = 7,54, 1H). MS (MALDI), observado [M-H]⁻; 1594,5, 1638,5, 1682,4, 1726,4, 1770,3, 1814,4, 1858,2, 1881,5, 1903,5, 1947,3.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-metoxi-polioxietileno-(10 KDa)-oxicarboxamido)-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Se añadió citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato) (2,5 mg, 4 μmol) y agua (180 μl) a una solución de éster de (Metoxipolioxietileno-(10 KDa, peso molecular medio)-oxicarbonil-(N-oxibenzotriazol) (40 mg, 4 μmol) en DMF anhidra (800 μl) que contiene trietilamina (1,1 μl, 8 μmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se diluyó con agua (8 ml) y se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C 18 sílice, gradiente de metanol/agua). Las fracciones apropiadas se combinaron, se concentraron, el residuo se disolvió en agua y se liofilizó produciendo 20 mg (rendimiento de un 46%) de producto en forma de un sólido de color blanco: R_f = 0,35 (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H), 2,50 (dd, 1H), 2,64 (t, 3H) 3,55-3,7 (m, oscurecido por un pico a 3,71), 3,71 (s, 488H), 3,72-4,0 (m, oscurecido por un pico a 3,71), 4,23 (m, 3H), 4,31 (t, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J = 4,77, 1H), 6,12 (d, J = 7,52, 1H), 7,98 (d, J = 7,89, 1H). MS (MALDI), observado [M- CMP+Na]⁺; 10780.

9. GlucoPEGilación de FSH derivada de pituitaria humana

Este ejemplo ilustra el ensamblaje de un conjugado de la invención. La Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) se desialila y después se conjuga con CMP-(ácido siálico)-PEG.

Desialilación de Hormona Estimuladora de los Folículos. Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) (Pituitaria Humana, Calbiochem N° de Cat. 869001), 1 mg, se disolvió en 500 μl de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM. Esta solución, 375 μl, se transfirió a un tubo de plástico pequeño y se le añadieron 263 mU de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*). La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 15 horas a 32 °C. La mezcla de reacción se añadió a un conjugado de ácido N-(p-aminofenil) oxámico-agarosa, 600 μl, equilibrado previamente con Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM y NaN₃ al 0,05% y se hizo girar suavemente durante 6,5 horas a 4 °C. La suspensión se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavaron 5 veces con 0,5 ml del tampón y todos los sobrenadantes se combinaron. La solución enzimática se dializó (7000 MWCO) durante 15 horas a 4 °C con 2 l de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%, y después dos veces durante 4 horas a 4 °C en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución se concentró a 2 μg/μl mediante Speed Vac y se almacenó -20 °C. Las muestras de reacción se analizaron mediante geles de IEF (pH 3-7) (Invitrogen) (Figura 105).

Preparación de AS-FSH derivada de pituitaria humana y PEG-AS-Hormona Estimuladora de los Folículos. FSH desialilada (100 μg, 50 μl) y CMP-ácido siálico o CMP-AS-PEG (1 kDa o 10 kDa) (0,05 μmol) se disolvieron en 13,5 μl de H₂O (ajustado a pH 8 con NaOH) en tubos de plástico de 0,5 ml. Los tubos se agitaron vorticialmente brevemente y se añadieron 40 mU de ST3Gal3 (36,5 μl) (volumen total de 100 μl). Los tubos se agitaron vorticialmente de nuevo y se agitaron suavemente durante 24 horas a 32 °C. Las reacciones se detuvieron por congelación a -80 °C. Las masas de reacción de 15 μg se analizaron por SDS-PAGE (Figura 106), geles de IEF (Figura 107) y MALDI-TOF. También se analizó la FSH nativa por SDS-PAGE (Figura 108).

Análisis de SDS PAGE e IEF en Geles de los Productos de Reacción. Geles de 1 mm de Tris-Glicina al 8-16% de Novex para análisis de SDS PAGE se adquirieron en Invitrogen. 7,5 μl (15 μg) de muestras de reacción de FSH se diluyeron con 5 μl de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tampón NaN₃ al 0,05%, se mezclaron con 15 μl de tampón de carga de muestras y 1 μl de μ-mercaptoetanol 9 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se realizaron según las indicaciones de Invitrogen y se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Invitrogen).

Muestras de FSH (15 μg) se diluyeron con 5 μl de tampón Tris y se mezclaron con 15 μl de tampón de carga de muestras (Figura 105). Después las muestras se aplicaron a Geles de Enfoque Isoeléctrico (pH 3-7) (Invitrogen) (Figura 108). Los geles se realizaron y se fijaron según las indicaciones de Invitrogen y después se tiñeron con Tinte

Azul Coloidal.

10. GlucoPEGilación de FSH recombinante producida recombinantemente en células CHO

Este ejemplo ilustra el ensamblaje de un conjugado de la invención. La FSH desialilada se conjugó con CMP-(ácido siálico)-PEG.

- 5 **Preparación de Asialo-Hormona Estimuladora de los Folículos recombinante.** La Hormona Estimuladora de los Folículos recombinante (rFSH) producida a partir de CHO se usó en estos estudios. Las 7.500 IU de Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) se disolvieron en 8 ml de agua. La solución de FSH se dializó en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM y se concentró a 500 µl en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. Una porción de esta solución (400 µl) (~ 0,8 mg de FSH) se transfirió a un tubo de plástico pequeño y se le añadieron 275 mU de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*). La
- 10 mezcla de reacción se mezcló durante 16 horas a 32 °C. La mezcla de reacción se añadió a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa lavado previamente (800 µl) y se hizo girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavaron 3 veces con 0,6 ml de tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinaron. El sobrenadante se dializó a 4 °C frente a 2 l de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, Na₂SO₄ al 0,05% y después dos veces más frente a Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, Na₂SO₄ al 0,05%. La solución dializada se concentró después a 420 µl en un filtro centrífugo Centricon Plus 20 y se almacenó a -20 °C.

- Las muestras de rFSH nativa y desialilada se analizaron por SDS-PAGE e IEF (Figura 109). Los geles de 1 mm de Tris-Glicina al 8-16% de Novex se adquirieron en Invitrogen. Las muestras (7,5 µl, 15 µg) se diluyeron con 5 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tampón Na₂SO₄ al 0,05%, se mezclaron con 15 µl de tampón de carga de
- 20 muestras y 1 µl de β-mercaptoetanol 9 M y calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se realizaron según las indicaciones de Invitrogen y se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Invitrogen). Los Geles de Enfoque Isoeléctrico (pH 3-7) se adquirieron en Invitrogen. Las muestras (7,5 µl, 15 µg) se diluyeron con 5 µl de tampón Tris y se mezclaron con 15 µl tampón de carga de muestras. Los geles se cargaron, se desarrollaron y se fijaron según las indicaciones de Invitrogen. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal. Las muestras de FSH nativa y desialilada también se
- 25 dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF.

- Sialil-PEGilación de Hormona Estimuladora de los Folículos recombinante.** FSH desialilada (100 µg, 54 µl) y CMP-AS-PEG (1 kDa o 10 kDa) (0,05 µmol) se disolvieron en 28 µl Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, Na₂SO₄ al 0,05%, pH 7,2 en tubos de plástico de 0,5 ml. Los tubos se agitaron vorticialmente brevemente y se añadieron 20 mU de ST3Gal3 (volumen total de 100 µl). Los tubos se agitaron vorticialmente de nuevo, se mezcló suavemente durante
- 30 24 horas a 32 °C y las reacciones se detuvieron por congelación a -80 °C. Las muestras de esta reacción se analizaron como se ha descrito anteriormente por geles de SDS-PAGE (Figura 110), geles de IEF (Figura 111) y MALDI-TOF MS.

- También se realizó MALDI en la rFSH PEGilada. Durante la ionización, AS-PEG se elimina partir de la estructura del N-glicano de la glicoproteína. La FSH nativa dio un pico a 13928; AS-rFSH (13282); r-FSH resialilada (13332); PEG100-rFSH (13515; 14960 (1); 16455 (2); 17796 (3); 19321 (4)); y PEG 10000 (23560 (1); 24790 (2); 45670 (3); y 56760 (4)).
- 35

11. Estudio Farmacocinético de FSH GlucoPEGilada

- Este ejemplo expone el ensayo de las propiedades farmacocinéticas de la Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) glucoPEGilada preparada de acuerdo con los procedimientos de la invención en comparación con la FSH no
- 40 PEGilada.

- FSH, FSH-AS-PEG (1 kDa) y FSH-AS-PEG (10 kDa) se radioionizaron usando condiciones convencionales (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) y se formularon en solución salina tamponada con fosfato que contenía BSA al 0,1%. Después de dilución en tampón de fosfato hasta la concentración apropiada, cada una de las proteínas FSH del ensayo (0,4 µg, cada una) se inyectó por vía intravenosa en ratas hembra de Sprague Dawley (250-300 g de peso corporal) y se extrajo sangre en los puntos temporales de 0 a 80 horas. Se analizó la radiactividad en las muestras de sangre usando un contador gamma y se analizó la farmacocinética usando procedimientos convencionales (Figura 112). FSH se aclaró a partir de la sangre mucho más rápidamente que FSH-PEG (1 kDa), que a su vez era transparente en cierto modo más rápidamente que FSH-PEG (10 kDa).
- 45

12. Bioensayo para péptidos de FSH

- Este ejemplo expone un bioensayo para la actividad de la Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) en base a células de Sertoli cultivadas. Este ensayo es útil para determinar la bioactividad de FSH después de la remodelación de glicanos, incluyendo la glicoconjugación.
- 50

- Este bioensayo se basa en la relación dosis-respuesta que existe entre la cantidad de estradiol producido cuando la FSH, pero no la hormona luteinizante (LH), se añade a células de Sertoli cultivadas obtenidas a partir de ratas viejas inmaduras. La testosterona exógena se convierte en 17β-estradiol en presencia de FSH.
- 55

Ratas Sprague-Dawley con siete a 10 días se usaron para obtener células de Sertoli. Después de sacrificarlas, los testículos se desencapsularon y el tejido se dispersó por incubación en collagenasa (1 mg/ml), tripsina (1 mg/ml), hialuronidasa (1 mg/ml) y DNasas (5 µg/ml) durante 5 a 10 min. Los fragmentos de túbulos se asentaron en el fondo del matraz y se lavaron en PBS (1x). Los fragmentos de túbulos se volvieron a incubar durante 20 min con un medio que contenía las mismas enzimas: collagenasa (1 mg/ml), tripsina (1 mg/ml), hialuronidasa (1 mg/ml) y DNasas (5 µg/ml).

Los fragmentos de túbulos se homogeneizaron y se sembraron en una placa de 24 pocillos en un medio sin suero. Se dispersaron 5×10^5 células por pocillo. Después de 48 h de incubación a 37 °C y CO₂ al 5%, se añadió medio recién preparado a las células. Composición del medio sin suero: DMEM (1 vol), mezcla de nutrientes F10 de Ham (1 vol), insulina 1 µg/ml, Transferrina 5 µg/ml, EGF 10 ng/ml, T4 20 pg/ml, Hidrocortisona 10^{-8} M, Ácido retinoico 10^{-6} M.

El experimento de estimulación consiste en una incubación de 24 horas con FSH convencional o con muestras a 37 °C y CO₂ al 5%. El coeficiente de variación medio dentro de los ensayos es de un 9% y el coeficiente de variación media entre los ensayos es de un 11%.

El Kit DE2000 para calcular 17B-estradiol por Elisa (R&D Systems, Minneapolis, MN) se usó para cuantificar el nivel de estradiol después de incubación con FSH, FSH-AS-PEG (1 kDa) y FSH-AS-PEG (10 kDa).

El procedimiento fue como sigue a continuación: 100 µl de Estradiol Convencional (proporcionado con el kit y preparado según las instrucciones con el kit) o una muestra se pipeteó en pocillos de la placa o las placas para Elisa para 17B-estradiol; se añadieron a cada pocillo 50 µl de Conjugado de 17B-estradiol (proporcionado con el kit, preparado según las instrucciones con el kit); se añadieron a cada pocillo 50 µl de solución de Anticuerpos de 17B-estradiol (proporcionada con el kit, preparado según las instrucciones con el kit); las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente a 200 rpm; el líquido se aspiró de cada pocillo; los pocillos se lavaron 4 veces usando la solución de lavado; todo el líquido se retiró de los pocillos; 200 µl de sustrato de pNPP (proporcionado con el kit, preparado según las instrucciones con el kit) se añadieron a todos los pocillos y se incubó durante 45 min; se añadieron 50 µl de solución de Parada (proporcionada con el kit, preparado según las instrucciones con el kit) y las placas se leyeron a 405 nm (Figura 113). Mientras que FSH-PEG (10 kDa) presentaba una estimulación discreta de las células de Sertoli, a 1 µg/ml, FSH-PEG (1 kDa) estimuló las células de Sertoli hasta un 50% más que la FSH sin PEGilar.

13. GlucoPEGilación de Transferrina

Este ejemplo expone la preparación de asialotransferrina y su sialilación con PEG-CMP-ácido siálico.

Preparación de Asialo-transferrina. Holo-Transferrina derivada de ser humano, (10 mg) se disolvió en 500 µl de NaOAc 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 5,5. A esta solución se añadieron 500 mU de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) y la mezcla de reacción se agitó suavemente durante 20,5 horas a 37 °C. La mezcla de reacción se añadió al conjugado lavado previamente de ácido N-(p-aminofenil) oxámico-agarosa (600 µl) y las perlas lavadas se hicieron girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. La mezcla de reacción se ajustó a EDTA 5 mM mediante la adición de 100 µl de EDTA 30 mM a las perlas lavadas, que se hicieron girar suavemente durante 20 horas a 4 °C. La suspensión se centrifugó Durante 2 minutos a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavaron 5 veces con 0,35 ml de NaOAc 50 mM, CaCl₂ 5 mM, EDTA 5 mM, pH 5,5 y todos los sobrenadantes se combinaron. La solución enzimática y dializó dos veces a 4 °C en Tris-HCl 15 mM, NaCl 1 M, pH 7,4. Se retiraron 0,3 ml de la solución de transferrina (3,3 ml en total) y se dializó dos veces frente a agua. El resto se dializó dos veces más a 4 °C frente a solución salina tamponada con fosfato. La solución dializada se almacenó a -20 °C. Las muestras de proteínas se analizaron por IEF Electroforesis. Las muestras (9 µl, 25 µg) se diluyeron con 16 µl de tampón Tris y se mezclaron con 25 µl del tampón de carga de muestras y se aplicó a Geles de Enfoque Isoeléctrico (pH 3-7). Los geles se desarrollaron y se fijaron usando procedimientos convencionales. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal.

Sialil-PEGilación de asialo-Transferrina. Transferrina desialilada (250 µg) y CMP-ácido siálico o CMP-AS-PEG (1 kDa o 10 kDa) (0,05 µmol) se disolvieron en 69 µl de Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2 en tubos de plástico de 1,5 ml. Los tubos se agitaron vorticialmente brevemente y se añadieron 100 mU de ST3Gal3 (90 µl) (volumen total de 250 µl). Los tubos se agitaron vorticialmente de nuevo y se mezcló suavemente durante 24 horas a 32 °C. Las reacciones se detuvieron por congelación a -80 °C. Se usaron geles de 1 mm de Tris-Glicina al 8-16% de Novex para el análisis SDS PAGE (Figura 114). Las muestras (25 µl, 25 µg) se mezclaron con 25 µl de tampón de carga de muestras y 0,4 µl de β-mercaptoetanol y se calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se desarrollaron usando condiciones convencionales y se tiñeron con Tinte Azul Coloidal. Los geles para IEF también se realizaron como se ha descrito anteriormente (Figura 115). Las muestras también se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF.

Resultados. También se realizó MALDI. Transferrina nativa (78729); asialotransferrina (78197); transferrina resialilada (79626/80703); con AS-PEG 1k (79037 (1); 80961 (2); 82535 (3); 84778 (4)); con AS-PEG 5k (90003 (2); 96117 (3); 96117 (4)); con AS-PEG 10k (100336 (2); 111421 (3); 122510(4)).

14. GlucoPEGilación de Factor VIIa Recombinante producido en células BHK

Este ejemplo expone la PEGilación del Factor VIIa recombinante producida en células CHO.

Preparación de Asialo-Factor VIIa. El Factor VIIa recombinante se produjo en células BHK (células renales de cría de hámster). El Factor VIIa (14,2 mg) se disolvió a 1 mg/ml en solución tampón (pH 7,4, Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 0,001 M, NaN₃ al 0,05%) y se incubó con 300 mU/ml de conjugado de sialidasa (*Vibrio cholera*)-agarosa durante 3 días a 32 °C. Para controlar la reacción, se diluyó una pequeña alícuota de la reacción con el tampón apropiado y se realizó un gel para IEF de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen (Figura 116). La mezcla se centrifugó a 3.500 rpm y se recogió el sobrenadante. La resina se lavó tres veces (3 x 2 ml) con la solución tampón anterior (pH 7,4, Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%) y los lavados combinados se concentraron en un Centricon-Plus-20. La solución restante se cambió de tampón con Tris 0,05 M (pH 7,4), NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05% hasta un volumen final de 14,4 ml.

Preparación de Factor VIIa-AS-PEG (1 KDa y 10 KDa). La solución de desialilación del rFactor VIIa se dividió en dos muestras iguales de 7,2 ml. A cada muestra se añadió CMP-AS-5-PEG (1 KDa) (7,4 mg) o CMP-AS-5-PEG (10 KDa) (7,4 mg). Se añadió ST3Ga13 (1,58 U) a ambos tubos y las mezclas de reacción se incubaron a 32 °C durante 96 h. La reacción se controló por gel para SDS-PAGE usando los reactivos y las condiciones descritos por Invitrogen. Cuando la reacción se completó, la mezcla de reacción se purificó usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. Las fracciones combinadas que contenían el producto se concentraron a 4 °C en filtros centrífugos Centricon-Plus-20 (Millipore, Bedford, MA) y la solución concentrada se volvió a formular para producir 1,97 mg (ensayo de proteínas del ácido bicinonínico, ensayo BCA, Sigma-Aldrich, St. Louis MO) de Factor VIIa-PEG. El producto de la reacción se analizó usando análisis de SDS-PAGE y de IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos suministrados por Invitrogen. Las muestras se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF. La Figura 117 muestra los resultados por MALDI para el Factor VIIa nativo. La Figura 118 contiene los resultados por MALDI para el Factor VIIa PEGilado con PEG de 1 KDa en los que el Factor VIIa PEGilado con PEG de 1 KDa es evidente. La Figura 119 contiene los resultados por MALDI para el Factor VIIa PEGilado con PEG de 10 KDa en los que es evidente un pico para el Factor VIIa PEGilado con PEG de 10 KDa. La Figura 120 representa el análisis de SDS-PAGE de todos los productos de reacción, en el que es evidente una banda para el Factor VIII-AS-PEG (10-KDa).

15. GlucoPEGilación del Factor IX producido en células CHO

Este ejemplo expone la preparación de asialoFactor IX y su sialilación con PEG-CMP-ácido siálico.

Desialilación del rFactor IX. Una forma recombinante del Factor IX de Coagulación (rFactor IX) se preparó en células CHO. 6000 IU de rFactor IX se disolvieron en un total de 12 ml de USP H₂O. Esta solución se transfirió a un filtro centrífugo PL-10, Centricon Plus 20, con otros 6 ml de USP H₂O. La solución se concentró a 2 ml y después se diluyó con 15 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05% y después se volvió a concentrar. La dilución/concentración se repitió 4 veces para cambiar eficazmente el tampón hasta un volumen final de 3,0 ml. De esta solución, se transfirieron 2,9 ml (aproximadamente 29 mg de rFactor IX) a un tubo de plástico pequeño y se le añadieron 530 mU de conjugado de α 2-3,6,8-Neuraminidasa-agarosa (*Vibrio cholerae*, Calbiochem, 450 μ l). La mezcla de reacción se hizo girar suavemente durante 26,5 horas a 32 °C. La mezcla se centrifugó 2 minutos a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas de agarosa (que contenían neuraminidasa) se lavaron 6 veces con 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,12, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. Los lavados y los sobrenadantes combinados se centrifugaron de nuevo durante 2 minutos a 10.000 rpm para retirar cualquier resina de agarosa residual. La solución de proteínas desialilada, combinada se diluyó a 19 ml con el mismo tampón y se concentró por debajo de ~ 2 ml en un filtro centrífugo PL-10 Centricon Plus 20. La solución se diluyó dos veces con 15 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05% y se volvió a concentrar hasta 2 ml. La solución final de rFactor IX desialilado se diluyó hasta un volumen final de 3 ml (~10 mg/ml) con el Tampón Tris. Las muestras de rFactor IX nativo y desialilado se analizaron por IEF-Electroforesis. Los Geles de Enfoque Isoeléctrico (pH 3-7) se desarrollaron usando muestras de 1,5 μ l (15 μ g) diluidas primero con 10 μ l de tampón Tris y mezcladas con 12 μ l de tampón de carga de muestras. Los geles se cargaron, se desarrollaron y se fijaron usando procedimientos convencionales. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Figura 121), mostrando una banda para el Factor IX desialilado.

Preparación de PEG (1 kDa y 10 kDa)-AS-Factor IX. rFactor-IX desialilado (29 mg, 3 ml) se dividió en dos muestras de 1,5 ml (14,5 mg) en dos tubos para centrifuga de 15 ml. Cada solución se diluyó con 12,67 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05% y se añadió CMP-AS-PEG-1k o 10k (7,25 μ mol). Los tubos se invirtieron suavemente para mezclar y se añadieron 2,9 U de ST3Ga13 (326 μ l) (volumen total 14,5 ml). Los tubos se invirtieron de nuevo y se hicieron girar suavemente durante 65 horas a 32 °C. Las reacciones se detuvieron por congelación a -20 °C. Se analizaron muestras de 10 μ g de las reacciones por SDS-PAGE. Las proteínas PEGiladas se purificaron en una columna Toso Haas Biosep G3000SW (21,5 x 30 cm, 13 μ m) para HPLC con Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco, pH 7,1 (Gibco), 6 ml/min. La reacción y la purificación se controlaron usando SDS Page y geles para IEF. Se cargaron geles de 1 mm de Tris-Glicina al 4-20% de Novex con 10 μ l (10 μ g) de muestras después de dilución con 2 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tampón NaN₃ al 0,05% y se mezcló con 12 μ l de tampón de carga de muestras y 1 μ l de DTT 0,5 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los

geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Figura 122) mostrando una banda para PEG (1 kDa y 10 kDa)-AS-Factor IX.

16. Sialil-GlucoPEGilación Directa de Factor-IX

Este ejemplo expone la preparación de sialil-glucoPEGilación de péptidos sin tratamiento anterior con sialidasa. Aquí, el Factor-IX es el péptido ejemplar.

Sialil-PEGilación Directa (10 KDa) de Factor-IX. Se disolvió Factor IX (1100 IU) en 5 ml de histidina 20 mM, tampón de glicina 520 mM que contenía sacarosa al 2%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ al 0,05%, y polisorbato 80 al 0,01%, pH 5,0. El CMP-AS-PEG (10 KDa) (27,8 mg, 3,5 μmol) se añadió después a esta solución, la mezcla de reacción se invirtió suavemente para mezclar y se añadieron 1,4 U de ST3Ga13. La mezcla de reacción se hizo girar suavemente durante 19 horas a 32 °C y la reacción se detuvo por congelación. La mezcla de reacción se analizó por geles para SDS-PAGE usando las condiciones de desarrollo y tinción (Azul Coloidal) descritas por Invitrogen. Brevemente, se mezclaron muestras (10 μl) con 12 μl de tampón de carga de muestras y 2 μl de DTT 0,5 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C (Figura 123, líneas 8, 9 y 10). El producto se purificó en una columna 10/20 Superdex 200 (Amersham, Uppsala, Suecia) con Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco, pH 7,1 (Gibco), 6 ml/min. Figura (Figura 123 contiene una banda (línea 5) del Factor-IX PEGilado purificado por HPLC.

17. Protección con ácido siálico de Factor IX GlucoPEGilado

Este ejemplo expone el procedimiento para la protección con ácido siálico de péptidos sialil-glucoPEGilados. Aquí, el Factor-IX es el péptido ejemplar.

Protección con ácido siálico de Glicanos de Factor-IX-AS-PEG (10 KDa) unidos a N y unidos a O. Se concentró r-Factor-IX-PEG purificado (10 KDa) (2,4 mg) en un filtro centrífugo PL-10 Centricon® Plus 20 (Millipore Corp., Bedford, MA) y el tampón se cambió por Tris-HCl 50 mM a pH 7,2, NaCl 0,15 M, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ al 0,05% hasta un volumen final de 1,85 ml. La solución de proteínas se diluyó con 372 μl del mismo tampón Tris y se añadieron 7,4 mg de CMP-AS (12 μmol) en forma de un sólido. La solución se invirtió suavemente para mezclar y se añadieron 0,1 U de ST3Gal1 y 0,1 U de ST3Gal3. La mezcla de reacción se hizo girar suavemente durante 42 horas a 32 °C.

Una muestra de 10 μg de la reacción se analizó por SDS-PAGE. Se desarrollaron geles de 1 mm de Tris-Glicina al 4-12% de Novex y se tiñeron usando Azul Coloidal tal como lo describe Invitrogen. En resumen, muestras de 10 μl (10 μg), se mezclaron con 12 μl de tampón de carga de muestras y 1 μl de DTT 0,5 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C (Figura 123, línea 4).

18. GlucoPEGilación de Proteínas expresadas en Sistemas de Mamíferos o de Insectos: EPO, Interferón α e Interferón β

Este ejemplo expone la preparación de péptidos PEGilados que se expresan en sistemas de mamíferos y de insectos.

Preparación de aceptor a partir de sistemas de expresión en mamíferos. Los péptidos a glucoPEGilar usando CMP-ácido siálico PEG necesitan tener glicanos que terminen en galactosa. La mayoría de péptidos procedentes de sistemas de expresión en mamíferos tendrán ácido siálico terminal que primero necesita ser retirado.

Digestión con sialidasa. El péptido se desialida usando una sialidasa. Un procedimiento típico implica la incubación de una solución de 1 mg/ml del péptido en solución salina tamponada con Tris, pH 7,2, con CaCl_2 5 mM añadido, con 0,2 U/ml de sialidasa inmovilizada a partir de *Vibrio cholera* (Calbiochem) a 32 °C durante 24 horas. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o por la inclusión de azida sódica al 0,02%. La resina después se retira por centrifugación o por filtración, y después se lava para recuperar el péptido atrapado. En este punto, se puede añadir EDTA a la solución para inhibir cualquier sialidasa que se haya lixiviado a partir de la resina.

Preparación a partir de sistemas de expresión en insectos. EPO, interferón-alfa, e interferón-beta también se pueden expresar en sistemas no mamíferos tales como levadura, plantas, o células de insectos. Los péptidos a glucoPEGilar usando CMP-ácido siálico PEG necesitan tener glicanos que terminen en galactosa. La mayoría de los N-glicanos en péptidos expresados en células de insectos, por ejemplo, son el núcleo de trimanosilo. Estos glicanos se construyen primero en glicanos que terminan en galactosa antes de que sean aceptores para la sialiltransferasa.

Construcción de glicanos aceptores a partir de núcleo de trimanosilo. Péptido (1 mg/ml) en solución salina tamponada con Tris, pH 7,2, que contiene MnCl_2 5 mM, UDP-glcNAc 5 mM, 0,05 U/ml de GLCNACT I, 0,05 U/ml de GLCNACT II, se incubó a 32 °C durante 24 horas o hasta que la reacción está básicamente completa. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o por la inclusión de azida sódica al 0,02%. Después de intercambio de tampón para retirar UDP y otras moléculas pequeñas, cada uno de UDP-galactosa y MnCl_2 se añaden a 5 mM, galactosiltransferasa se añade a 0,05 U/ml, y se incubó a 32 °C durante 24 h o hasta que la reacción esté básicamente completa. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o por la inclusión de azida sódica al 0,02%. Los péptidos entonces están listos para la glucoPEGilación.

Construcción de glicanos unidos a O. Una estrategia similar se puede usar para que el interferón alfa produzca enzimáticamente el O-glicano Gal-GalNAc deseado. Si fuera necesario, GalNAc unida a serina o a treonina se puede añadir al péptido usando péptido GalNAc transferasas adecuadas (por ejemplo, GalNAc T1, GalNAc T2, T3, T4, etc.) y UDP-GalNAc. Además, si fuera necesario, se puede añadir galactosa usando galactosiltransferasa y UDP-galactosa.

GlucoPEGilación usando sialiltransferasa. Los glicopéptidos (1 mg/ml) que soportan galactosa terminal en solución salina tamponada con Tris + azida sódica al 0,02% se incuban con CMP-AS-PEG (0,75 mM) y 0,4 U/ml de sialiltransferasa (ST3Gal3 o ST3Gal4 para N-glicanos en EPO e interferón beta; ST3Gal4, o ST3Gal1 para O-glicanos en interferón alfa) a 32 °C durante 24 horas. Otras transferasas que pueden funcionar incluyen la 2,6 sialiltransferasa a partir de *Photobacterium damsella*. La concentración del péptido aceptor está más preferentemente en el intervalo de 0,1 mg/ml hasta el límite de solubilidad del péptido. La concentración de CMP-AS-PEG debería ser suficiente para que hubiera un exceso sobre los sitios disponibles, pero no tan alto como para causar problemas de solubilidad del péptido debido al PEG, y puede variar de 50 pM hasta 5 mM, y la temperatura puede variar de 2 °C hasta 40 °C. El tiempo requerido para completar la reacción dependerá de la temperatura, las cantidades relativas de enzima a sustrato aceptor, la concentración de sustrato donador, y el pH.

19. GlucoPEGilación de EPO producida en células de insectos

Este ejemplo expone la preparación de EPO biantenaria PEGilada a partir de EPO expresada en células de insecto.

La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) a partir del sistema de expresión de baculovirus/Sf9 (Protein Sciences Corp., Meriden, CT) se sometió a análisis de glicanos y los glicanos resultantes mostraron ser principalmente núcleo de trimanosilo con núcleo de fucosa, con un pequeño porcentaje de glicanos que también presentan una única GlcNAc (Figura 124).

Adición de N-acetilglucosamina con GnT-I y GnT-II. Dos lotes de rhEPO (1 mg/ml) se incubaron con GnT-I y GnT-II, UDP-glcNAc 5 mM, MnCl₂ 20 mM, y azida sódica al 0,02% en MES 100 mM a pH 6,5 a 32 °C durante 24 h. El lote A contenía 20 mg de EPO, y 100 mU/ml de GnT-I y 60 mU/ml de GnT-II. El lote B contenía 41 mg de EPO, y 41 mU/ml de GnT-I + 50 mU/ml de GnT-II. Después de la reacción, la muestra se desaló por filtración en gel (columnas PD10, Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ).

El establecimiento de perfiles de glicanos por 2AA HPLC reveló que el lote A se convirtió en un 92% en una estructura biantenaria con dos GlcNAc (el equilibrio tiene una única glcNAc. El lote B mostró una conversión de un 97% en el producto deseado (Figuras 102A y 102B).

Galactosilación del lote A de EPO. EPO (~16 mg del lote A) se trató con GnTII para completar la adición de GlcNAc. La reacción se realizó en Tris 50 mM a pH 7,2 que contenía NaCl 150 mM, EPO mg/ml, UDP-GlcNAc 1 mM, MnCl₂ 5 mM, azida sódica al 0,02% y 0,02 U/ml de GnTII a 32 °C durante 4 h. Después se efectuó la galactosilación de EPO mediante la adición de UDP-galactosa a 3 mM y GalT1 a 0,5 U/ml y la incubación continuó a 32 °C durante 48 h.

La EPO galactosilada después se purificó por filtración en gel en una columna Superdex 1,6/60 en Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 6. El pico que contiene EPO se analizó después por 2AA HPLC. En base a los datos por HPLC ~85% de los glicanos contiene dos galactosas y ~15% de los glicanos no presenta ninguna galactosa después de la reacción de galactosilación.

Sialilación de EPO galactosilada. La sialilación de EPO galactosilada se realizó en Tris 100 mM a pH que contenía NaCl 150 mM, 0,5 mg/ml de EPO, 200 mU/ml de ST3Ga13 y CMP-NAN 0,5 mM o CMP-NAN-PEG (1 KDa) o CMP-NAN-PEG (10 KDa) durante 48 horas a 32 °C. Casi todos los glicanos que tienen dos restos de galactosa se sialilaron totalmente (2 ácidos siálicos / glicano) después de la reacción de sialilación con CMP-NAN. El análisis por MALDI-TOF confirmó los datos por HPLC.

PEGilación de EPO galactosilada. Para las reacciones de PEGilación que usan CMP-NAN-PEG (1 KDa) y CMP-NAN-PEG (10 KDa), se analizó una alícuota de la mezcla de reacción por SDS-PAGE (Figura 125). El peso molecular del péptido de EPO aumentó con la adición de cada azúcar, y aumentó más radicalmente en el peso molecular después de las reacciones de PEGilación.

Bioensayo de EPO *in vitro*. El bioensayo de EPO *in vitro* (adaptado a partir de Hammerling y col, 1996, J. Pharm. Biomed. Anal. 14: 1455-1469) se basa en la respuesta de la línea celular TF-1 a niveles múltiples de EPO. Las células TF-1 proporcionan un buen sistema para investigar la proliferación y la diferenciación de células progenitoras mieloides. Esta línea celular fue establecida por T. Kitamura y col. en Octubre de 1987 a partir de la muestra de aspiración de médula ósea heparinizada a partir de un varón Japonés de 35 años con pancitopenia grave. Estas células son totalmente dependientes de la Interleuquina 3 o del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

La línea celular TF-1 (ATCC, N° de Cat. CRL-2003) se cultivó en RPMI + FBS al 10% + GM-CSF (12 ng/ml) y se incubó a 37 °C con CO₂ al 5%. Las células estuvieron en suspensión a una concentración de 5000 células/ml de

medios, y se dispensaron 200 μ l en una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron con diversas concentraciones de EPO (de 0,1 μ g/ml a 10 μ g/ml) durante 48 horas. Un Ensayo de Viabilidad de MTT se realizó mediante la adición de 25 μ l de MTT a 5 mg/ml (SIGMA M5655), incubando la placa a 37 °C durante 20 min a 4 horas, añadiendo 100 μ l de solución de isopropanol/HCl (100 ml de isopropanol + 333 μ l de HCl 6 N), leyendo la DO a 570 nm, y a 630 nm o a 690 nm, y restando las lecturas a 630 nm o a 690 nm a partir de las lecturas a 570 nm.

La Figura 126 contiene los resultados obtenidos cuando EPO sialilada, y EPO glucoPEGilada con PEG de 1 KDa o 10 KDa se sometió a un ensayo de bioactividad de EPO *in vitro*. La EPO glucoPEGilada con PEG de 1 KDa presentaba casi la misma actividad que la EPO sin glucoPEGilar cuando ambas estaban a una concentración de aproximadamente 5 μ g/ml. La EPO glucoPEGilada con PEG de 10 KDa presentaba aproximadamente la mitad de la actividad de la EPO sin glucoPEGilar cuando ambas estaban a una concentración de aproximadamente 5 μ g/ml.

20. GlucoPEGilación de Interferón α producido en células CHO

Preparación de Asialo-Interferón α . El interferón alfa producido a partir de células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl_2 5 mM y se concentra a 500 μ l en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. La solución se incuba con 300 mU/ml de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, se diluye una pequeña alícuota de la reacción con el tampón apropiado y una realización en gel para IEF. La mezcla de reacción se añade después a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa lavado previamente (800 μ l/ml de volumen de reacción) y las perlas lavadas se hicieron girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinaron. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN_3 al 0,05% y después dos veces más frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN_3 al 0,05%. La solución dializada se concentra después usando un filtro centrífugo Plus 20 Centricon y se almacena -20 °C. Las condiciones para el gel para IEF se desarrollan de acuerdo con los procedimientos y reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y desializado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Interferón-alfa-(alfa2,3)-Sialil-PEG. Interferón-alfa desializado se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN_3 al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal1 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de Interferón-alfa nativo y desializado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Interferón-alfa-(alfa2,8)-Sialil-PEG. El Interferón-alfa producido en CHO, que contiene un glicano unido a O alfa2,3-sialilado, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN_3 al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de CST-II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presenta CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de Interferón-alfa nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Interferón-alfa-(alfa2,6)-Sialil-PEG. Interferón-alfa, que contiene solamente GalNAc unida a O, se disolvió a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN_3 al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST6GalNAc o II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis de SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de Interferón-alfa nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

21. GlucoPEGilación de G-CSF producido en células CHO

Preparación de Asialo-Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF). G-CSF producido en células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM y se concentra a 500 µl en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. La solución se incuba con 300 mU/ml de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y se desarrolla un gel para IEF. La mezcla de reacción se añade después a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa lavado previamente (800 µl/ml de volumen de reacción) y las perlas lavadas se hacen girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinan. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05% y después dos veces más frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución dializada se concentra después usando un filtro centrífugo Centricon Plus 20 y se almacena a -20 °C. las condiciones para el gel para IEF se desarrollaron de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y desializado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de G-CSF-(alfa2,3)-Sialil-PEG. G-CSF desializado se disolvió a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incubaba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal1 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de G-CSF-(alfa2,8)-Sialil-PEG. G-CSF producido en células CHO, que contienen un glicano unido a O alfa2,3-sialilado, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incubaba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de CST-II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presenta CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de G-CSF-(alfa2,6)-Sialil-PEG. G-CSF, que contiene solamente GalNAc unida a O, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incubaba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST6GalNAcII a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presenta CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando Análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

22. GlucoPEGilación Glicanos de EPO unidos a O producidos en Células CHO

Preparación de EPO-AS-PEG unido a O (10 KDa). Asialo-EPO, producida originalmente en células CHO, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incubaba con CMP-AS 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico en los glicanos unidos a N, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-¹⁴C añadido; el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G2000SW usando metanol, agua y el producto detectado usando un detector de radiación. Cuando la reacción es completa, la solución se concentra usando un filtro Centricon-20. Se intercambia el tampón en la solución restante con Tris 0,05 M (pH 7,2), NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05% hasta un volumen final de 7,2 ml hasta que el CMP-AS ya no se puede detectar. El retenido después se vuelve a suspender en Tris 0,05 M (pH 7,2), NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05% a 2,5 mg/ml de proteína. La solución se incubaba con CMP-AS-PEG 1 mM (10 KDa) y ST3Gal1, para glucosilar el sitio unido a O, a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción se separa por filtración en gel usando una columna analítica Toso Haas TSK-gel-3000 eluyendo con PBS a pH 7,0 y analizando por detección de UV. Cuando la reacción se completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-gel-

3000 usando tampón de PBS (pH 7,0) recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

23. GlucoPEGilación de un anticuerpo

- 5 Este ejemplo expone los procedimientos para PEGilar los glicanos unidos a O de una molécula de anticuerpo. Aquí, se usa Enbrel™ como un ejemplo, sin embargo un experto en la materia observará que este procedimiento se puede usar con muchas moléculas de anticuerpos.

10 **Preparación de Enbrel™-AS-PEG (10 KDa).** Enbrel™ (TNF-receptor-IgG₁-quimera), con los glicanos unidos a O sialilados antes de la PEGilación o no, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con UDP-galactosa 5 mM y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días para proteger los glicanos de la región Fc con galactosa. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando de ¹⁴C-galactosa-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G2000SW en metanol y agua. La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

15 Cuando la reacción se completa, la solución se incuba con CMP-ácido siálico-engarce-PEG 1 mM (10 KDa) y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-engarce-PEG, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). Cuando la reacción está completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. Las fracciones que contienen el producto se combinan, se concentran, se intercambia el tampón y después se liofilizan. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

24. GlucoPEGilación de anticuerpo Remicade™

- 25 Este ejemplo expone el procedimiento para glucoPEGilar una molécula de anticuerpo recombinante mediante la introducción de moléculas de PEG a los glicanos de la región Fc. Aquí, Remicade™, una proteína de fusión de la región Fc con TNF-R:IgG, es el péptido ejemplar.

30 **Preparación de Remicade™-Gal-PEG (10 KDa).** Remicade™ se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con UDP-galactosa-PEG 1 mM (10 KDa) y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días para introducir el PEG en los glicanos de la región Fc. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando ¹⁴C-galactosa-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

35 Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. Las fracciones que contienen el producto se combinan, se concentran, se intercambia el tampón y después se liofilizan. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

40 25. Generación y PEGilación de estructuras de GlcNAc-Asn: TPA producido en Levaduras

Este ejemplo expone la preparación de estructuras de GlcNAc-Asn PEGilada en un péptido tal como TPA expresado en levaduras.

45 Se espera que la expresión en levaduras de como resultado un TPA que contiene una única estructura de tipo manano unida a N. Esta glicoproteína recombinante se trata primero con endoglucosidasa H para generar estructuras de GlcNAc en los restos de asparagina (Asn) en el péptido.

50 Las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína se modifican después con galactosa o galactosa-PEG usando UDP-galactosa o UDP-galactosa-6-PEG, respectivamente, y una galactosiltransferasa tal como GalT1. En un caso, la galactosa-PEG es el resto terminal. En el segundo caso, la galactosa se modifica adicionalmente con AS-PEG usando un donador de CMP-AS-PEG y una sialiltransferasa tal como ST3Ga1III. En otra realización, las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína pueden estar galactosiladas y sialiladas como se ha descrito anteriormente, y después sialiladas adicionalmente usando CMP-AS-PEG y una α2,8-sialiltransferasa, tal como la enzima codificada por el gen cst-II de *Campylobacter jejuni*.

26. Generación y PEGilación de Estructuras de GlcNAc-Asn: GM-CSF producidas en *Saccharomyces*

Este ejemplo expone la preparación de Activador del tipo Tejido con estructuras PEGiladas de GlcNAc-Asn.

Se espera que GM-CSF recombinante expresado en levaduras contenga 2 glicanos unidos a N y 2 glicanos unidos a O. Los glicanos unidos a N deberían ser del tipo manano ramificado. Esta glicoproteína recombinante se trata con una endoglucosidasa a partir del grupo que consiste en endoglucosidasa H, endoglucosidasa-F1, endoglucosidasa-F2, endoglucosidasa-F3, endoglucosidasa-M solas o en combinación con las manosidasas I, II y III para generar núcleos de GlcNAc en los restos de asparagina (Asn) en la cadena principal de péptido/proteína.

Las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína se modifican después con galactosa o galactosa-PEG usando UDP-galactosa o UDP-galactosa-6-PEG, respectivamente, y una galactosiltransferasa tal como GalT1. En un caso, la galactosa-PEG es el resto terminal. En el segundo caso, la galactosa se modifica adicionalmente con AS-PEG usando un donador de CMP-AS-PEG y una sialiltransferasa tal como ST3GalIII. En otra realización las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína pueden estar galactosiladas y sialiladas como se ha descrito anteriormente, y después sialiladas adicionalmente usando CMP-AS-PEG y una α 2,8-sialiltransferasa tal como la enzima codificada por el gen *cst-II* de *Campylobacter jejuni*.

C. Gluco-Conjugación de Moléculas Pequeñas

27. Síntesis de CMP-AS-Levulinato

Este ejemplo expone el procedimiento para la síntesis de CMP-AS-levulinato.

Preparación de 2-levulinamido-2-desoxi-D-manopiranososa. Cloroformiato de isobutilo (100 μ l, 0,77 mmol) se añadió gota a gota a una solución de ácido levulínico (86 μ l, 0,84 mmol), THF anhidro (3 ml) y trietilamina (127 μ l, 0,91 mmol). Esta solución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se añadió después gota a gota a una solución que contenía hidrócloruro de D-manosamina (151 mg, 0,7 mmol), trietilamina (127 μ l, 0,91 mmol), THF (2 ml) y agua (2 ml). La mezcla de reacción se agitó 15 horas y después se concentró a sequedad por evaporación rotatoria. Se usó cromatografía (sílice, gradiente de la etapa de MeOH/CH₂Cl₂ al 5-15%) para aislar el producto produciendo 0,156 g (rendimiento de un 73%) de un sólido de color blanco: R_f = 0,41 (sílice, CHCl₃/MeOH/agua a 6/4/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 2,23 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,57 (td, J = 6,54, 3,68, 2H), 2,63 (t, J = 6,71, 2H), 2,86-2,90 (m, 4H), 3,42 (m, 1H), 3,53 (t, J = 9,76, 1H), 3,64 (t, J = 9,43, 1H), 3,80-3,91 (m, 4H), 4,04 (dd, J = 9,79, 4,71, 1H), 4,31 (dd, J = 4,63, 1,14, 1H), 4,45 (dd, J = 4,16, 1,13, 1H), 5,02 (d, J = 1,29, 1H), 5,11 (s, J = 1,30, 1H), MS (ES); calculado para C₁₁H₁₉NO₇, 277,27; encontrado [M+1] 277,9.

Preparación de 5-levulinamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato. Se añadieron piruvato sódico (0,616 g, 5,6 mmol) y ácido N-acetilneuramínico aldolasa (50 U) a una solución de 2-levulinamido-2-desoxi-D-manopiranososa (0,156 g, 0,56 mmol) en HEPES 0,1 M (pH 7,5). La mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 20 horas y después se congeló. La mezcla de reacción se filtró después a través de sílice C 18, se congeló y se liofilizó. El sólido en bruto se purificó usando cromatografía ultrarrápida (sílice, usando primero MeOH/CH₂Cl₂ al 10-40% y después CH₂Cl₂/Me-OH/H₂O a 6/4/0,5). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron produciendo 45 mg (rendimiento de un 80%) de un sólido de color blanco: R_f = 0,15 (sílice, CHCl₃/MeOH/agua a 6/4/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,82 (t, J = 11,9, 1H), 2,21 (dd, J = 13,76, 4,84, 1H), 2,23 (s, 3H), 2,57 (c aparente, J = 6,6, 2H), 2,86-2,95 (m, 2H), 3,15-3,18 (m, 1H), 3,28-3,61 (complejo, 1H), 3,60 (dd, J = 11,91, 6,66, 1H), 3,75 (td, J = 6,65, 2,62, 1H), 3,84 (dd, J = 11,89, 2,65, 1H), 3,88-4,01 (complejo, 2H), 4,04 (td, J = 11,18, 4,67, 1H), MS (ES); calculado para C₁₄H₂₃NO₁₀, 365,33; encontrado ([M-1]⁻), 363,97.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-(5-levulinamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato). Se disolvió 5-Levulinamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (50 mg, 137 μ mol) en 2 ml de tampón HEPES 100 mM a pH 7,5 y se añadió MnCl₂ 1 M (300 μ l, 300 μ mol). Se disolvió CTP-2Na⁺ (79 mg, 1,5 μ mol) en 5 ml de tampón HEPES y se añadió al azúcar. Se añadió la enzima de fusión de sialiltransferasa/CMP-ácido neuramínico sintetasa (11 U) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro MWCO 10.000 y el filtrado, que contenía el producto de la reacción, se usó directamente sin purificación adicional: R_f = 0,35 (sílice, IPA/agua/NH₄OH a 7/2/1).

28. Glucocerebrosidasa-manosa-6-fosfato producida en células CHO

Este ejemplo expone el procedimiento para glucoconjugar manosa-6-fosfato a un péptido producido en células CHO tal como glucocerebrosidasa.

Preparación de asialo-glucoceramidasa. La glucocerebrosidasa producida en células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, y se incuba con 300 mU/ml de conjugado de sialidasa-agarosa durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y un gel para IEF y se realiza SDS-PAGE de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y el sobrenadante se recoge. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA, y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA. Todos los sobrenadantes se combinan. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05% y después dos veces más frente a Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución dializada después se concentra usando un filtro centrífugo Centricon Plus 20. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Glucocerebrosidasa-AS-engarce-Manosa-6-fosfato (procedimiento 1). Asialo-glucocerebrosidasa a partir de lo mencionado anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN_3 al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-engarce-Man-6-fosfato 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-engarce-Man-6-fosfato, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-SA-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de una marca libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Glucocerebrosidasa-SA-engarce-Manosa-6-fosfato (procedimiento 2). La glucocerebrosidasa, producida en CHO pero sialilada de forma incompleta, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN_3 al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-engarce-Man-6-fosfato 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-engarce-Man-6-fosfato, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-SA-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de una marca libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

29. Glicoconjugación de mitramicina a un anticuerpo

Este ejemplo expone los procedimientos para glucoconjugar una molécula pequeña, tal como mitramicina a glicanos de la región Fc de una molécula de anticuerpo producida en células de mamífero. Aquí, se usa el anticuerpo Herceptin™, pero un experto en la materia observará que el procedimiento se puede usar con otros muchos anticuerpos.

Preparación de Herceptin™-Gal-engarce-mitramicina. Herceptin™ se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, 5 mM MnCl_2 , NaN_3 al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con UDP-galactosa-engarce-mitramicina 1 mM y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días para introducir la mitramicina en los glicanos de la región Fc. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando de ^{14}C -galactosa-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. Las fracciones que contienen el producto se combinan, se concentran, se intercambia el tampón y después se liofilizan. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

30. Glicoconjugación de geldanamicina a un anticuerpo

Este ejemplo expone la glicoconjugación de una molécula pequeña, tal como geldanamicina, a los glicanos de la región Fc de un anticuerpo producido en células CHO, tal como Rituxan™. Aquí, se usa el anticuerpo Rituxan™, pero un experto en la materia observará que el procedimiento se puede usar con otros muchos anticuerpos.

Preparación de Rituxan™-Gal-engarce-geldanamicina. Rituxan™ se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl_2 5 mM, NaN_3 al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con UDP-galactosa-engarce-geldanamicina 1 mM y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días para introducir la geldanamicina en los glicanos de la región Fc. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando ^{14}C -galactosa-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. Las fracciones que contienen el producto se combinan, se concentran, se intercambia el tampón y después se liofilizan. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

D. Glicoconjugación de péptidos31. Transferrina-GDNF

Este ejemplo expone los procedimientos para la glicoconjugación de proteínas, y en particular, la transferrina se glucoconjug a GDNF. Transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP se prepara a partir de transferrina. El resto de galactosa se retira a partir de glicanos de GDNF, y Transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP se conjuga a glicanos de GDNF usando una galactosil-transferasa.

Preparación de agalacto-GDNF. GDNF producido en células NSO (células de mieloma murino NSO) se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, y se incuba con 300 mU/ml de conjugado de beta-galactosidasa-agarosa durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y se realiza un gel para IEF de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y el sobrenadante se recoge. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05% y después dos veces más frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución dializada después se concentra usando un filtro centrífugo Centricon Plus 20 y se almacena a -20 °C. Las condiciones para el gel para IEF se desarrollan de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP. Asialo-transferrina se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-engarce-Gal-UDP (cantidad molar para añadir 1 equivalente molar de azúcar de nucleótido a transferrina) y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando de ¹⁴C-AS-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

La solución se incuba con CMP-ácido siálico 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 (para proteger cualquier glicano de transferrina sin reaccionar) a 32 °C durante 2 días. La incorporación en el péptido se cuantifica usando un detector de UV en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Transferrina-AS-Engarce-Gal-GDNF. La transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP preparada como se ha descrito anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con 2,5 mg/ml de agalacto-GDNF y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando de ¹⁴C-galactosa-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

Cuando la reacción es completa, la solución se incuba con UDP-Gal 5 mM y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa (para proteger cualquier glicano de transferrina sin reaccionar) a 32 °C durante 2 días seguido de la adición de CMP-AS 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13. Después de 2 días adicionales, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

32. Glucocerebrosidasa-transferrina

Este ejemplo expone los procedimientos para la glicoconjugación de proteínas, y en particular, la transferrina se glucoconjug a glucocerebrosidasa. Las estructuras de GlcNAc-ASN se crean en glucoceraminidasa, y Transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP se conjuga a estructuras de GlcNAc-ASN de GDNF usando galactosiltransferasa.

Preparación de GlcNAc-glucocerebrosidasa (Cerezyme™). Cerezyme™ (glucocerebrosidasa) producida en células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, y se incuba con 300 mU/ml de conjugado de Endo-H-agarosa durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y un gel para IEF y se realiza SDS-PAGE de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y el sobrenadante se recoge. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris -EDTA y todos los sobrenadantes se combinan. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05% y después dos veces más frente a Tris -HCl 50 mM al pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución dializada se concentra después usando a filtro centrífugo Centricon Plus 20. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Transferrina-AS-Engarce-Gal-glucocerebrosidasa. Transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP a partir de lo mencionado anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con 2,5 mg/ml de GlcNAc-glucocerebrosidasa y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de glucocerebrosidasa, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y el producto se detecta por absorción de UV. La mezcla de reacción después se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) recogiendo fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

33. EPO-Transferrina

Este ejemplo expone los procedimientos para la glicoconjugación de proteínas a glicanos unidos a O, y en particular, la transferrina se glucoconjugua a EPO. El resto de ácido siálico se retira a partir de glicano de EPO unido a O, y se prepara EPO-AS-engarce-AS-CMP. EPO-AS-engarce-AS-CMP se glucoconjugua a asialotransferrina con ST3Ga13.

Preparación de asialo-EPO unida a O. EPO (eritropoyetina) producida en células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, y se incuba con 300 mU/ml de conjugado de sialidasa (*Vibrio cholera*)-agarosa durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y un gel para IEF desarrollado de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y el sobrenadante se recoge. El sobrenadante se concentra a una concentración de EPO de aproximadamente 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de EPO-AS-engarce-AS-CMP. Los 2,5 mg/ml de asialo-EPO unida a O en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-engarce-AS-CMP 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal1 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-engarce-AS-CMP, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1).

Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Transferrina-AS-Engarce-AS-EPO. EPO-AS-Engarce-AS-CMP a partir de lo mencionado anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con 2,5 mg/ml de asialo-transferrina y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de transferrina, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y el producto se detecta por absorción de UV. Cuando la reacción es completa, la solución se incuba con CMP-AS 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 (para proteger cualquier glicano de transferrina sin reaccionar) a 32 °C durante 2 días. La mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

34. EPO-GDNF

Este ejemplo expone los procedimientos para la glicoconjugación de proteínas, y en particular, la preparación de EPO-AS-Engarce-AS-GDNF.

Preparación de EPO-AS-Engarce-AS-GDNF. EPO-AS-Engarce-AS-CMP a partir de lo mencionado anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con 2,5 mg/ml de GDNF (producida en NSO) y 0,1 U/ml de ST3Gal3 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de GDNF, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y el producto se detecta por absorción de UV. Cuando la reacción es completa, la solución se incuba con CMP-AS 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 (para proteger cualquier glicano de GDNF sin reaccionar) a 32 °C durante 2 días. La mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por

Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Novo Nordisk A/S DeFrees Shawn Zopf David Bayer Robert Bowe Caryn Hakes
10	David Chen, Xi
	<120> REMODELACIÓN Y GLICOCONJUGACIÓN DE PÉPTIDOS
15	<130> FB22470/B
	<150> US 60/328.523 <151> 10-10-2001
20	<150> US 60/344.692 <151> 19-10-2001
	<150> US 60/334.233 <151> 08-11-2001
25	<150> US 60/334,301 <151> 08-11-2001
30	<150> US 60/387,292 <151> 2002-06-07
	<150> US 60/391.777 <151> 26-06-2002
35	<150> US 60/396.594 <151> 17-07-2002
	<150> US 60/404.249 <151> 16-08-2002
40	<150> US 60/407.527 <151> 28-8-2002
	<160> 62
45	<170> PatentIn versión 3.1 <210> 1 <211> 525 <212> ADN <213> Homo sapiens
50	<400> 1

ES 2 538 342 T3

```

acccccctgg gccctgccag ctccctgccc cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa      60
gtgaggaaga tccagggcga tggcgagcg ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag     120
ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc     180

ctgagcagct gccccagcca ggccctgcag ctggcaggct gcttgagcca actccatagc     240
ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt     300
cccaccttgg acacactgca gctggacgct gcgactttg ccaccacat ctggcagcag     360
atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg cagccccccc aggggtgcat gcgggccttc     420
gcctctgctt tccagcgccg ggcaggaggg gtcttggttg cctcccatct gcagagcttc     480
ctggaggtgt cgtaccgctg tctacgccac cttgcccagc cctga                        525

```

<210> 2
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 2

5

ES 2 538 342 T3

Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys
1				5					10					15	
Cys	Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln
			20					25					30		
Glu	Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val
		35					40					45			
Leu	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Cys
	50					55					60				
Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser
65					70					75					80
Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser
				85					90					95	
Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp
			100					105					110		
Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro
		115					120					125			
Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Phe	Ala	Ser	Ala	Phe
	130					135					140				
Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser	Phe
145						150				155					160
Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Gln	Pro		
				165					170						

<210> 3
 <211> 1733
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3

gcgcctctta tgtaccacaca aaaatctatt ttcaaaaaag ttgctcttaag aatatagtta 60
tcaagttaag taaaatgtca atagcctttt aatttaattt ttaactgttt tatcattctt 120
tgcaataata aaacattaac ttatactttt ttaatttaaat gtatagaata gagatataca 180
taggatatgt aaatagatac acagtgtata tgtgattaaa atataaattggg agattcaatc 240
agaaaaaagt ttctaaaaag gctctggggg aaaagaggaa ggaaacsata atgaaaaaaa 300
tgtggtgaga aaaacagctg aaaacccatg taaagagtgt ataaagsaag caaaaagaga 360
agtagaaagt aacacagggg catttgaaa atgtaaacga gtatgttccc tatttaaggc 420
taggcacaaa gcaagggtctt cagagaacct ggagcctaag gtttaggctc acccatttca 480
accagtctag cagcatctgc aacatctaca atggccttga ccttctgttt actggtggcc 540
ctcctgggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc tctgtgggct gtgacttggc tcaaaccac 600
agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc 660
tcctgcttga aggacagaca tgactttgga ttccccagg aggggtttgg caaccagtcc 720
caaaaggctg aaaccatccc tgtcctccat gagatgatcc agcagattct caatctcttc 780
agcacaaaagg actcatctgc tgcttgggat gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa 840
ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc tgtgtgatac aggggggtgg ggtgacagag 900
actcccctga tgaaggagga ctccattctg gctgtgagga aatacttcca aagaatcact 960
ctctatctga aagagaagaa atacagccct tgtgcctggg aggttgatcag agcagaaatc 1020
atgagatctt tttctttgtc acaaaacttg caagaaagtt taagaagtta ggaatgaaaa 1080
ctggttcaac atggaaatga ttttcattga ttogtatgcc agctcaactt tttatgatct 1140
gccatttcaa agactcatgt ttctgctatg accatgacac gatctcaatc ttttcaaagt 1200
tttttaggag tattaatcaa cattgtattc agctcttaag gcaactagtcc cttacagagg 1260
accatgctga ctgatccatt atctatttaa atatttttaa aatatttatt atttaactat 1320
ttataaaaca acttattttt gttcatatta tgtcatgtgc acctttgcac agtgggttaat 1380
gtaataaaat gtgttctttg tatttggtta atttattttg tgttgttcat tgaacttttg 1440
ctatggaaact tttgtacttg tttattcttt aaaatgaaat tccaagccta attgtgcaac 1500
ctgattacag aataactggg acacttcatt tgtocatcaa tattatattc aagatataag 1560
taaaaataaa ctttctgtaa accaagttgt atgttggtact caagataaca ggggtgaacct 1620
aaciaatata attctgctct cttgtgtatt tgatttttgt atgaaaaaaa ctaaaaatgg 1680
taatcatact taattatcag ttatggtaaa tggatatgaag agaagaagga acg 1733

<210> 4
<211> 188
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 538 342 T3

<400> 4

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
20 25 30

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
35 40 45

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
50 55 60

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
65 70 75 80

Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
85 90 95

Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
100 105 110

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
115 120 125

Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
130 135 140

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
145 150 155 160

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
165 170 175

Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
180 185

5 <210> 5
<211> 757
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 5

ES 2 538 342 T3

```

atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgtt gcttctccac tacagctctt    60
tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag    120
ctcctgtggc aattgaatgg gaggcctgaa tattgcctca aggacaggat gaactttgac    180
atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc    240
tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg    300
aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag    360
acagtcctgg aagaaaaact ggagaaagaa gattttacca ggggaaaact catgagcagt    420
ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt    480
cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga    540
cttacagggt acctccgaaa ctgaagatct cctagcctgt ccctctggga ctggacaatt    600
gcttcaagca ttcttcaacc agcagatgct gtttaagtga ctgatggcta atgtactgca    660
aatgaaagga cactagaaga ttttgaaatt tttattaaat tatgagttat ttttatttat    720
ttaaatttta ttttgaaaaa taaattattt ttggtgc                                757

```

<210> 6
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 6

```

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1           5           10           15

```

ES 2 538 342 T3

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20 25 30
 Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35 40 45
 Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50 55 60
 Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 100 105 110
 Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115 120 125
 Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 130 135 140
 Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160
 His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175
 Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 180 185

<210> 7
 <211> 1332
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7

atgggtctccc aggcctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60
 gcagtcttcg taaccacagga ggaagccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120
 gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180
 tccttcgagg aggcctggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctccctgcaag 300
gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420
agtgaccaca cgggcaccaa gcgcctcctgt cgggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480
gacgggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540
aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaagggtgtg ccccaaaggg 600
gagtgtccat ggcaggctct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660
atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720
aacctgatcg cgggtgctggg cgagcacgac ctacgcgagc acgacgggga tgagcagagc 780
cggcggtgtg cgcaggctcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840
atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtctcactg accatgtggt gcccctctgc 900
ctgcccgaac ggacgtttct tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt gctcaacgtg 1020
ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080
atcacggagt acatgtttct tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140
gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgct 1200
agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260
tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gccaggagt cctcctgcga 1320
gccccatttc cc 1332

<210> 8
<211> 444
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15
Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30
Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35 40 45

ES 2 538 342 T3

Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu			
	50					55					60							
Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile			
65					70					75					80			
Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly			
				85					90					95				
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro			
			100					105					110					
Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile			
		115					120					125						
Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr			
	130					135					140							
Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala			
145					150					155					160			
Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile			
				165					170					175				
Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val			
		180						185					190					
Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu			
		195					200					205						
Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile			
	210					215					220							
Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg			
225					230					235					240			
Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly			
				245					250					255				
Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr			
			260					265					270					

ES 2 538 342 T3

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
435 440

<210> 9
<211> 1437
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaagcc tcatcaccat ctgcctttta 60
ggatatctac tcagtgtga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120
ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttggtca agggaaacctt 180

gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaac cacgagaagt ttttgaaaac 240
 actgaaaaga caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300
 ccatgtttta atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc 360
 tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420
 tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaagggtg tttgctcctg tactgagggga 480
 tategacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540
 gtttctgttt cacaaaacttc taagctcacc cgtgctgagg ctgtttttcc tgatgtggac 600
 tatgtaaatc ctactgaagc tgaaaccatt ttggataaca tcaactcaagg cacccaatca 660
 tttaatgact tcaactcgggt tgttggtgga gaagatgcc aaccagggtca attcccttgg 720
 cagggttgtt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780
 tggattgtaa ctgctgcccc ctgtgttgaa actgggtgta aaattacagt tgcgcagggt 840
 gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgagcaatt 900
 attcctcacc acaactacaa tgcagctatt aataagtaca accatgacat tgccttctg 960
 gaactggacg aacccttagt gctaaacagc tacgttacac ctatttgcac tgctgacaag 1020
 gaatacacga acatcttctc caaatgtgga tctggctatg taagtggctg ggcaagagtc 1080
 ttccacaaag ggagatcagc tttagttctt cagtacctta gagttccact tgttgaccga 1140
 gccacatgtc ttgatctac aaagttcacc atctataaca acatgttctg tgctggcttc 1200
 catgaaggag gtagagattc atgtcaagga gatagtggg gaccccatgt tactgaagtg 1260
 gaagggacca gtttcttaac tggaattatt agctggggtg aagagtgtgc aatgaaaggc 1320
 aaatatggaa tatataccaa ggtatcccgg tatgtcaact ggattaagga aaaaacaaag 1380
 ctcacttaat gaaagatgga ttccaaggt taattcattg gaattgaaaa ttaacag 1437

<210> 10
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Ser Leu Ile Thr
 1 5 10 15
 Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
 20 25 30

5

10

Asp	His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asn
	35					40					45				
Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys
	50					55					60				
Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Pro	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn
65					70					75					80
Thr	Glu	Lys	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln
				85					90					95	
Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile
			100					105					110		
Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys
		115					120					125			
Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe
	130					135					140				
Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly
145					150					155					160
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe
				165					170					175	
Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala
			180					185					190		
Glu	Ala	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Pro	Thr	Glu	Ala	Glu
		195					200					205			
Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Gly	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe
	210					215					220				
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp
225					230					235					240
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile
				245					250					255	

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ala Ile Ile Pro His His
290 295 300

Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu
305 310 315 320

Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys
325 330 335

Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly
340 345 350

Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu
355 360 365

Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu
370 375 380

Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe
385 390 395 400

His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His
405 410 415

Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp
420 425 430

Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val
435 440 445

Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
450 455 460

<210> 11
<211> 603
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 538 342 T3

```

atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctgggtca cattgtcggg gtttctgcat    60
gtttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca    120
ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattgg gctgctgctt ctctagagca    180
tatcccactc cactaagggtc caagaagacg atgttggtcc aaaagaacgt cacctcagag    240
tccacttgct gtgtagctaa atcatataac aggggtcacag taatggggggg tttcaaagtg    300
gagaaccaca cggcgtgccca ctgcagtact tggttattatc acaaatttta aatgtttttac    360
caagtgtctgt cttgatgact gctgattttc tggaatggaa aattaagttg tttagtgttt    420
atggcctttgt gagataaaaac tctccttttc cttaccatac cactttgaca cgcttcaagg    480
atatactgca gctttactgc ctctcctctt atctacagc acaatcagca gtctagttct    540
tttcatttgg aatgaataca gcattaagct tggtccactg caaataaagc cttttaaatc    600
atc                                                                    603

```

<210> 12
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

```

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
1          5          10          15

Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
          20          25          30

Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
          35          40          45

Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
50          55          60

Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
65          70          75          80

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
          85          90          95

Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
          100          105          110

Tyr His Lys Ser
          115

```

<210> 13

ES 2 538 342 T3

<211> 390
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5 <400> 13

```

atgaagacac tccagttttt cttccttttc tgttgotgga aagcaatctg ctgcaatagc      60
tgtgagctga ccaacatcac cattgcaata gagaaagaag aatgtcgttt ctgcataagc      120
atcaacacca cttggtgtgc tggtactgac tacaccaggg atctggtgta taaggaccca      180
gccaggccca aaatccagaa aacatgtacc ttcaaggaac tggatatatga aacagtgaga      240
gtgccccggt gtgctcacca tgcagattcc ttgtatacat acccagtggc caccagtgt      300
cactgtggca agtgtgacag cgacagcact gattgtactg tgcgaggcct ggggcccagc      360
tactgtcctt ttggtgaaat gaaagaataa                                     390

```

<210> 14
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 14

15

```

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
 1              5              10              15

Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys
      20              25              30

Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
      35              40              45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys
      50              55              60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg
65              70              75              80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
      85              90              95

Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
      100             105             110

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys
      115             120             125

Glu

```

ES 2 538 342 T3

<210> 15
 <211> 1342
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15

```

cccggagccg gaccggggcc accgcgcccg ctctgctccg acaccgcgcc ccctggacag      60
ccgccctctc ctccaggccc gtggggctgg ccctgcaccg ccgagcttcc cgggatgagg      120
gcccccggtg tggtcacccg gcgcgccccca ggtcgctgag ggaccccggc caggcgcgga      180
gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgtctcc      240
tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcatc tgtgacagcc gagtccctga      300
gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg      360
cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag      420
gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcgggaagc      480
tgtcctgcgg ggccaggccc tgttgggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct      540
gcatgtggat aaagccgtca gtggccttog cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg      600
agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat      660
cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttctctc ggggaaagct      720
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggacaga tgaccagggtg tgtccacctg      780
ggcatatcca ccacctccct caccaacatt gcttgtgcca caccctcccc cgccactcct      840
gaaccccgtc gaggggctct cagctcagcg ccagcctgtc ccatggacac tccagtgcc      900
gcaatgacat ctgaggggcc agaggaactg tccagagagc aactctgaga tctaaggatg      960
tcacagggcc aacttgaggg ccagagcag gaagcattca gagagcagct ttaaactcag     1020
ggacagagcc atgctgggaa gacgcctgag ctactctggc accctgcaaa atttgatgcc     1080
aggacacgct ttggaggcga ttacctgtt ttgcaccta ccatcaggga caggatgacc     1140
tggaagaactt aggtggcaag ctgtgacttc tccaggtctc acgggcatgg gactccctt     1200
ggtggcaaga gcccccttga caccgggggtg gtgggaacca tgaagacagg atgggggctg     1260
gcctctggct ctcatggggt ccaagttttg tgtattcttc aacctcattg acaagaactg     1320
aaaccaccaa aaaaaaaaaa aa                                             1342
  
```

10

<210> 16
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 16

ES 2 538 342 T3

```

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1           5           10           15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
          20           25           30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
          35           40           45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
          50           55           60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65           70           75           80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
          85           90           95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
          100          105          110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
          115          120          125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Gln Lys Glu
          130          135          140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145           150           155           160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
          165           170           175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
          180          185          190

```

Arg

5

<210> 17
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

ES 2 538 342 T3

```

atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc      60
cgctcgccca gccccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccg      120
cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcatc      180
tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag      240
cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggccctt tgaccatgat ggccagccac      300
tacaagcagc actgccctcc aaccccgaa acttcctgtg caaccagat tatcaccttt      360
gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgta tcccctttga ctgctgggag      420
ccagtccagg agtga                                          435

```

<210> 18
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

```

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1              5              10              15

Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
                20              25              30

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
          35              40              45

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
50              55              60

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
65              70              75              80

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
          85              90              95

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
          100              105              110

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
          115              120              125

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
          130              135              140

```

<210> 19
 <211> 501
 <212> ADN

ES 2 538 342 T3

<213> Homo sapiens

<400> 19

```

atgaaatata caagttatat cttggctttt cagctctgca tcgttttggg ttctottgge      60
tggtactgcc aggaccata tgtaaaagaa gcagaaaacc ttaagaaata ttttaatgca      120
ggtcattcag atgtagcgga taatggaact cttttcttag gcattttgaa gaattggaaa      180
gaggagagtg acagaaaaat aatgcagagc caaattgtct ctttttactt caaacttttt      240
aaaaacttta aagatgacca gagcatccaa aagagtgtgg agaccatcaa ggaagacatg      300
aatgtcaagt ttttcaatag caacaaaaag aaacgagatg acttcgaaaa gctgactaat      360
tattcggtaa ctgacttgaa tgtccaacgc aaagcaatac atgaactcat ccaagtgatg      420
gctgaactgt cgccagcagc taaaacaggg aagcgaaaaa ggagtcagat gctgtttcga      480
ggtcgaagag catcccagta a                                          501

```

5

<210> 20

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 20

```

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
1           5           10           15

```

```

Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu

```

ES 2 538 342 T3

	20		25		30										
Asn	Leu	Lys	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ala	Gly	His	Ser	Asp	Val	Ala	Asp	Asn
	35					40						45			
Gly	Thr	Leu	Phe	Leu	Gly	Ile	Leu	Lys	Asn	Trp	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp
	50					55					60				
Arg	Lys	Ile	Met	Gln	Ser	Gln	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe
65					70					75					80
Lys	Asn	Phe	Lys	Asp	Asp	Gln	Ser	Ile	Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Thr	Ile
				85					90					95	
Lys	Glu	Asp	Met	Asn	Val	Lys	Phe	Phe	Asn	Ser	Asn	Lys	Lys	Lys	Arg
			100					105					110		
Asp	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu	Thr	Asn	Tyr	Ser	Val	Thr	Asp	Leu	Asn	Val
		115					120					125			
Gln	Arg	Lys	Ala	Ile	His	Glu	Leu	Ile	Gln	Val	Met	Ala	Glu	Leu	Ser
	130					135					140				
Pro	Ala	Ala	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Lys	Arg	Ser	Gln	Met	Leu	Phe	Arg
145					150					155					160
Gly	Arg	Arg	Ala	Ser	Gln										
				165											

<210> 21
 <211> 1352
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 21

ctgggacagt	gaatcgacaa	tgccgtcttc	tgtctcgtgg	ggcatcctcc	tgctggcagg	60
cctgtgctgc	ctggtccttg	tctccctggc	tgaggatccc	cagggagatg	ctgcccagaa	120
gacagataca	tcccaccatg	atcaggatca	cccaaccttc	aacaagatca	cccccaacct	180
ggctgagttc	gccttcagcc	tataccgcca	gctggcacac	cagtccaaca	gcaccaatat	240
cttctttctc	ccagttagca	tcgctacagc	ctttgcaatg	ctctccctgg	ggaccaaggc	300
tgacactcac	gatgaaatcc	tggagggcct	gaatttcaac	ctcacggaga	ttccggaggc	360

ES 2 538 342 T3

```

tcagatccat gaaggcttcc aggaactcct ccgtaccctc aaccagccag acagccagct 420
ccagctgacc accggcaatg gcctgttccct cagcgagggc ctgaagctag tggataagtt 480
tttgagggat gttaaaaagt tgtaccactc agaagccttc actgtcaact tcggggacac 540
cgaagaggcc aagaaacaga tcaacgatta cgtggagaag ggtactcaag ggaaaattgt 600
ggatttggtc aaggagcttg acagagacac agtttttgcct ctggtgaatt acatcttctt 660
taaaggcaaa tgggagagac cttttgaagt caaggacacc gaggaagagg acttccacgt 720
ggaccaggtg accaccgtga aggtgcctat gatgaagcgt ttaggcattgt ttaacatcca 780
gcactgtaag aagctgtcca gctgggtgct gctgatgaaa tacctgggca atgccaccgc 840
catcttcttc ctgcctgatg aggggaaact acagcacctg gaaaatgaac tcaccacga 900
tatcatcacc aagttcctgg aaaatgaaga cagaaggctc gccagcttac atttacccaa 960
actgtccatt actggaacct atgatctgaa gagcgtcctg ggtcaactgg gcataactaa 1020
ggtcttcagc aatggggctg acctctccgg ggtcacagag gaggcacccc tgaagctctc 1080
caaggccgtg cataaggctg tgctgaccat cgacgagaaa gggactgaag ctgctggggc 1140
catgttttta gagggccatac ccatgtctat ccccccgag gtcaagttca acaaaccctt 1200
tgtcttetta atgattgaac aaaataccaa gtctccctc ttcattggaa aagtgggtgaa 1260
tcccacccaa aaataactgc ctctcgctcc tcaaccctc ccctccatcc ctggccccct 1320
ccctggatga cattaaagaa ggggttgagct gg 1352

```

<210> 22
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 22

```

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys
1           5           10          15

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala
          20          25          30

Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn
          35          40          45

Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln
          50          55          60

```

ES 2 538 342 T3

Leu	Ala	His	Gln	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Ile	Phe	Phe	Ser	Pro	Val	Ser	
65					70					75					80	
Ile	Ala	Thr	Ala	Phe	Ala	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Ala	Asp	Thr	
				85					90					95		
His	Asp	Glu	Ile	Leu	Glu	Gly	Leu	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Pro	
			100					105					110			
Glu	Ala	Gln	Ile	His	Glu	Gly	Phe	Gln	Glu	Leu	Leu	Arg	Thr	Leu	Asn	
		115					120					125				
Gln	Pro	Asp	Ser	Gln	Leu	Gln	Leu	Thr	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Phe	Leu	
		130				135					140					
Ser	Glu	Gly	Leu	Lys	Leu	Val	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Lys	
145					150					155					160	
Leu	Tyr	His	Ser	Glu	Ala	Phe	Thr	Val	Asn	Phe	Gly	Asp	Thr	Glu	Glu	
				165					170					175		
Ala	Lys	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Tyr	Val	Glu	Lys	Gly	Thr	Gln	Gly	Lys	
			180					185					190			
Ile	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Glu	Leu	Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Phe	Ala	Leu	
		195					200					205				
Val	Asn	Tyr	Ile	Phe	Phe	Lys	Gly	Lys	Trp	Glu	Arg	Pro	Phe	Glu	Val	
	210					215					220					
Lys	Asp	Thr	Glu	Glu	Glu	Asp	Phe	His	Val	Asp	Gln	Val	Thr	Thr	Val	
225					230					235					240	
Lys	Val	Pro	Met	Met	Lys	Arg	Leu	Gly	Met	Phe	Asn	Ile	Gln	His	Cys	
				245					250					255		
Lys	Lys	Leu	Ser	Ser	Trp	Val	Leu	Leu	Met	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asn	Ala	
			260					265					270			
Thr	Ala	Ile	Phe	Phe	Leu	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	Leu	Gln	His	Leu	Glu	
		275					280					285				

ES 2 538 342 T3

Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp
290 295 300

Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr
305 310 315 320

Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe
325 330 335

Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys
340 345 350

Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly
355 360 365

Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile
370 375 380

Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu
385 390 395 400

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr
405 410 415

Gln Lys

<210> 23
<211> 2004
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 23

gctaacctag tgccatagc taaggcaggt acctgcatcc ttgtttttgt ttagtggatc 60
ctctatcctt cagagactct ggaacccttg tggctctctc ttcactaat gaccctgagg 120
ggatggagtt ttcaagtcct tccagagagg aatgtcccaa gcctttgagt agggtaagca 180
tcatggctgg cagcctcaca ggtttgcttc tacttcaggc agtgctgtgg gcatcagggtg 240
cccgcccttg catccctaaa agcttcggct acagctcggg ggtgtgtgtc tgcaatgcca 300
catactgtga ctcttttgac ccccggaact ttctgacct tggtagcttc agccgctatg 360
agagtacacg cagtggggcga cggatggagc tgagtatggg gcccatccag gctaatacaca 420
cgggcacagg cctgctactg accctgcagc cagaacagaa gttccagaaa gtgaagggat 480

ES 2 538 342 T3

```

ttggaggggc catgacagat gctgctgctc tcaacatcct tgccctgtca cccctgccc 540
aaaatttgtc acttaaactc tacttctctg aagaaggaat cggatataac atcatccggg 600
taccatggc cagctgtgac ttctccatcc gcacctacac ctatgcagac acccctgatg 660
atttccagtt gcacaacttc agcctcccag aggaagatac caagctcaag ataccctga 720
ttcaccgagc cctgcagttg gccagcgtc ccgtttcact ccttgccagc ccctggacat 780
caccacttg gctcaagacc aatggagcgg tgaatgggaa ggggtcactc aaggacagc 840
ccggagacat ctaccaccag acctgggcca gatactttgt gaagttcctg gatgcctatg 900
ctgagcacia gttacagttc tgggcagtga cagctgaaa tgagccttct gctgggctgt 960
tgagtggata ccccttccag tgctgggct tcaccctga acatcagcga gacttcattg 1020
cccgtgacct aggtcctacc ctgcacaaca gtactacca caatgtccgc ctactcatgc 1080
tggatgacca acgcttgctg ctgcccact gggcaaagggt ggtactgaca gaccagaag 1140
cagctaaata tgttcatggc attgctgtac attggtacct ggactttctg gctccagcca 1200
aagccacct aggggagaca caccgctgt tcccacac catgctcttt gcctcagagg 1260
cctgtgtggg ctccaagttc tgggagcaga gtgtgcggct aggtcctgg gatcgagga 1320
tgcagtacag ccacagcatc atcacgaacc tcctgtacca tgtggtcggc tggaccgact 1380
ggaaccttg cctgaacccc gaaggaggac ccaattgggt gcgtaacttt gtcgacagtc 1440
ccatcattgt agacatcacc aaggacacgt ttacaaaaca gcccatgttc taccaccttg 1500
gccacttcag caagttcatt cctgagggt cccagagagt ggggctggtt gccagtcaga 1560
agaacgacct ggacgcagtg gactgatgc atcccgatgg ctctgctgtt gtggtcgtgc 1620
taaaccgctc ctctaaggat gtgcctctta ccatcaagga tcctgctgtg ggcttctctg 1680
agacaatctc acctggctac tccattcaca cctacctgtg gcatcgccag tgatggagca 1740
gatactcaag gaggcactgg gctcagcctg ggcattaaag ggacagagtc agctcacacg 1800
ctgtctgtga ctaaagaggg cacagcaggg ccagtgtgag cttacagcga cgtaagccca 1860
ggggcaatgg tttgggtgac tcactttccc ctctaggtgg tgcccagggc tggaggcccc 1920
tagaaaaaga tcagtaagcc ccagtgtccc cccagcccc atgcttatgt gaacatgcgc 1980
tgtgtgctgc ttgctttgga aact 2004

```

<210> 24
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

ES 2 538 342 T3

Met	Glu	Phe	Ser	Ser	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Cys	Pro	Lys	Pro	Leu	Ser	1	5	10	15
Arg	Val	Ser	Ile	Met	Ala	Gly	Ser	Leu	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Gln	20	25	30	
Ala	Val	Ser	Trp	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	Pro	Cys	Ile	Pro	Lys	Ser	Phe	35	40	45	
Gly	Tyr	Ser	Ser	Val	Val	Cys	Val	Cys	Asn	Ala	Thr	Tyr	Cys	Asp	Ser	50	55	60	
Phe	Asp	Pro	Pro	Thr	Phe	Pro	Ala	Leu	Gly	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr	Glu	65	70	75	80
Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Arg	Arg	Met	Glu	Leu	Ser	Met	Gly	Pro	Ile	Gln	85	90	95	
Ala	Asn	His	Thr	Gly	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	100	105	110	
Lys	Phe	Gln	Lys	Val	Lys	Gly	Phe	Gly	Gly	Ala	Met	Thr	Asp	Ala	Ala	115	120	125	
Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Pro	Ala	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	130	135	140	
Lys	Ser	Tyr	Phe	Ser	Glu	Glu	Gly	Ile	Gly	Tyr	Asn	Ile	Ile	Arg	Val	145	150	155	160
Pro	Met	Ala	Ser	Cys	Asp	Phe	Ser	Ile	Arg	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Asp	165	170	175	
Thr	Pro	Asp	Asp	Phe	Gln	Leu	His	Asn	Phe	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Asp	180	185	190	
Thr	Lys	Leu	Lys	Ile	Pro	Leu	Ile	His	Arg	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gln	195	200	205	
Arg	Pro	Val	Ser	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Trp	Leu				

ES 2 538 342 T3

210		215		220
Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro				
225		230	235	240
Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu				
	245		250	255
Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu				
	260		265	270
Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu				
	275	280	285	
Gly Phe Thr Pro Glu His Gln Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly				
290		295	300	
Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu				
305		310	315	320
Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr				
	325		330	335
Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr				
	340		345	350
Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg				
	355	360	365	
Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser				
370		375	380	
Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met				
385		390	395	400
Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly				
	405		410	415
Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp				
	420		425	430
Val Arg Asn Phe Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp				
	435	440	445	

Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys
450 455 460

Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys
465 470 475 480

Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val
485 490 495

Val Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys
500 505 510

Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile
515 520 525

His Thr Tyr Leu Trp His Arg Gln
530 535

<210> 25
<211> 1726
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 25

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccagcc aggaaatcca tgcccgatcc agaagaggag ccagatctta ccaagtgatc 120
tgcagagatg aaaaaacgca gatgatatac cagcaacatc agtcatggct ggcgcctgtg 180
ctcagaagca accgggtgga atattgctgg tgcaacagtg gcagggcaca gtgccactca 240
gtgcctgtca aaagttgcag cgagccaagg tgtttcaacg ggggcacctg ccagcaggcc 300
ctgtacttct cagatttcgt gtgccagtgc cccgaaggat ttgctgggaa gtgctgtgaa 360
atagatacca gggccacgtg ctacgaggac cagggcatca gctacagggg cacgtggagc 420
acagcggaga gtggcgccga gtgcaccaac tggaacagca gcgcgttggc ccagaagccc 480
tacagcgggc ggaggccaga cgccatcagg ctgggcctgg ggaaccacaa ctactgcaga 540
aaccagatc gagactcaaa gccctggtgc tacgtcttta aggcggggaa gtacagctca 600
gagttctgca gcaccctgc ctgctctgag ggaaacagtg actgctactt tgggaatggg 660
tcagcctacc gtggcacgca cagcctcacc gagtcgggtg cctcctgcct ccggtggaat 720
tccatgatcc tgataggcaa ggtttacaca gcacagaacc ccagtgccca ggcactgggc 780

ctgggcaaac ataattactg ccggaatcct gatgggggatg ccaagccctg gtgccacgtg 840
ctgaagaacc gcaggctgac gtgggagtag tgtgatgtgc cctcctgctc cacctgcggc 900
ctgagacagt acagccagcc tcagtttcgc atcaaaggag ggctcttcgc cgacatcgcc 960
tcccaccctt ggcaggetgc catcttttgc aagcacagga ggtcgccggg agagcgggtc 1020
ctgtgcgggg gcataactcat cagctcctgc tggattctct ctgccgcca ctgcttccag 1080
gagaggtttc cccccacca cctgacggtg atcttgggca gaacataccg ggtgggtcct 1140
ggcgaggagg agcagaaatt tgaagtcgaa aaatacattg tccataagga attcgatgat 1200
gacacttacg acaatgacat tgcgtgctg cagctgaaat cggattcgtc ccgctgtgcc 1260
caggagagca gcgtgggtcc cactgtgtgc ctccccccgg cggacctgca gctgcgggac 1320
tggacggagt gtgagctctc cggctacggc aagcatgagg ccttgtctcc tttctattcg 1380
gagcggctga aggaggctca tgtcagactg taccatcca gccgctgcac atcacaacat 1440
ttacttaaca gaacagtcac cgacaacatg ctgtgtgctg gagacactcg gagcggcggg 1500
ccccaggcaa acttgcacga cgcttgccag ggcgattcgg gagggcccct ggtgtgtctg 1560
aacgatggcc gcatgacttt ggtgggcatc atcagctggg gcctgggctg tggacagaag 1620
gatgtcccgg gtgtgtacac caaggttacc aactacctag actggattcg tgacaacatg 1680
cgaccgtgac caggaacacc cgactcctca aaagcaaattg agatcc 1726

<210> 26
<211> 562
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15
Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Gln Glu Ile His Ala Arg Phe Arg Arg
20 25 30
Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met
35 40 45
Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn
50 55 60

ES 2 538 342 T3

Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser
 65 70 75 80
 Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr
 85 90 95
 Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu
 100 105 110
 Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr
 115 120 125
 Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser
 130 135 140
 Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro
 145 150 155 160
 Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His
 165 170 175
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val
 180 185 190
 Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys
 195 200 205
 Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg
 210 215 220
 Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn
 225 230 235 240
 Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala
 245 250 255
 Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly
 260 265 270
 Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp
 275 280 285
 Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr

ES 2 538 342 T3

290		295		300
Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala				
305		310		315 320
Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro				
	325		330	335
Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile				
	340		345	350
Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu				
	355		360	365
Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu				
	370		375	380
Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp				
385		390		395 400
Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser				
	405		410	415
Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro				
	420		425	430
Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly				
	435		440	445
Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys				
	450		455	460
Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His				
465		470		475 480
Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr				
	485		490	495
Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp				
	500		505	510
Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val				
	515		520	525

ES 2 538 342 T3

Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
530 535 540

Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
545 550 555 560

Arg Pro

<210> 27
<211> 825
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 27

```
atcactctct ttaatcacta ctcacattaa cctcaactcc tgccacaatg tacaggatgc      60
aactcctgtc ttgcattgca ctaattcttg cacttgtcac aaacagtgca cctacttcaa      120
gttcgacaaa gaaaacaaag aaaacacagc tacaactgga gcatttactg ctggatttac      180
agatgatttt gaatggaatt aataattaca agaatcccaa actcaccagg atgctcacat      240
ttaagtttta catgcccaag aaggccacag aactgaaaca gcttcagtgt ctagaagaag      300
aactcaaacc tctggaggaa gtgctgaatt tagctcaaag caaaaacttt cacttaagac      360
ccagggactt aatcagcaat atcaacgtaa tagttctgga actaaagggg tctgaaacaa      420
cattcatgtg tgaatatgca gatgagacag caaccattgt agaatttctg aacagatgga      480
ttaccttttg tcaaagcatc atctcaacac taacttgata attaagtgtc tcccacttaa      540
aacatatcag gccttctatt tatttattta aatattttaa ttttatattt attggttgaat      600
gtatggttgc tacctattgt aactattatt cttaatctta aaactataaa tatggatctt      660
ttatgattct ttttgtaagc cctaggggct ctaaaatggg ttaccttatt tatcccaaaa      720
atattttatta ttatgttgaa tgttaaatat agtatctatg tagattgggt agtaaaacta      780
tttaataaat ttgataaata taaaaaaaaa aaacaaaaaa aaaaaa                        825
```

<210> 28
<211> 156
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu

ES 2 538 342 T3

1	5	10	15
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Lys Lys	20	25	30
Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu	35	40	45
Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr	50	55	60
Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln	65	70	75
Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala	85	90	95
Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile	100	105	110
Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys	115	120	125
Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp	130	135	140
Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr	145	150	155

<210> 29
 <211> 7931
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 29

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtagagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggctcta ccatccaggc tgaggtttat	300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt	360

ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
 gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctctg 480
 aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540
 gtggacctgg taaaagactt gaattcaggg ctcattggag cctactagt atgtagagaa 600
 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660
 tttgatgaag ggaaaagttg gcaactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat 720
 gctgcatctg ctggggcctg gcctaaaatg cacacagtca atgggttatgt aaacagggtct 780
 ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc 840
 accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat 900
 cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960
 gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaactga tggcatggaa 1020
 gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
 gaagcgggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggg cagggttgat 1140
 gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tccataaact 1200
 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtctctgcc 1260
 cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320
 aagtacaaaa aagtcgatt tatggcatat acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380
 attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg ggggaagttg agacacactg 1440
 ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
 gatgtccgtc ctttgtatc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560
 ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
 actaaatcag atctcgggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgttaa tatggagaga 1680
 gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740
 agaggaaaac agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgtttctgt atttgatgag 1800
 aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttct tcccaatcc agctggagtg 1860
 cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920
 tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980
 attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
 atgggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100

atggaaaacc	caggctctatg	gattctgggg	tgccacaact	cagactttcg	gaacagagggc	2160
atgaccgcct	tactgaaggt	ttctagttgt	gacaagaaca	ctggtgatta	ttacgaggac	2220
agttatgaag	atatttcagc	atacttgctg	agtaaaaaaca	atgccattga	accaagaagc	2280
ttctcccaga	attcaagaca	ccgtagcact	aggcaaaagc	aatttaatgc	caccacaatt	2340
ccagaaaatg	acatagagaa	gactgaccct	tggtttgcac	acagaacacc	tatgcctaaa	2400
atacaaaatg	tctcctctag	tgatttggtg	atgctcttgc	gacagagtcc	tactccacat	2460
gggctatcct	tatctgatct	ccaagaagcc	aaatatgaga	ctttttctga	tgatccatca	2520
cctggagcaa	tagacagtaa	taacagcctg	tctgaaatga	cacacttcag	gccacagctc	2580
catcacagtg	gggacatggg	atttaccocct	gagtcaggcc	tccaattaag	attaaatgag	2640
aaactgggga	caactgcagc	aacagagttg	aagaaacttg	atttcaaagt	ttctagtaca	2700
tcaaataatc	tgatttcaac	aattccatca	gacaatttgg	cagcagggtac	tgataatata	2760
agttccttag	gacccccaa	tatgccagtt	cattatgata	gtcaattaga	taccactcta	2820
tttggcaaaa	agtcactctc	ccttactgag	tctggtggac	ctctgagctt	gagtgaagaa	2880
aataatgatt	caaagtgtgt	agaatcaggt	ttaatgaata	gccaagaaag	ttcatgggga	2940
aaaaatgtat	cgtcaacaga	gagtggtagg	ttattttaaag	ggaaaagagc	tcattggacct	3000
gctttgttga	ctaaagataa	tgccttattc	aaagttagca	tctctttgtt	aaagacaaac	3060
aaaacttcca	ataattcagc	aactaataga	aagactcaca	ttgatggccc	atcattatta	3120
attgagaata	gtccatcagt	ctggcaaaat	atattagaaa	gtgacactga	gtttaaaaaa	3180
gtgacacctt	tgattcatga	cagaatgctt	atggacaaaa	atgctacagc	tttgaggcta	3240
aatcatatgt	caaataaaac	tacttcatca	aaaaacatgg	aatgggtcca	acagaaaaaa	3300
gagggcccca	ttccaccaga	tgcacaaaat	ccagatatgt	cgttctttta	gatgctattc	3360
ttgccagaat	cagcaagggtg	gatacaaagg	actcatggaa	agaactctct	gaactctggg	3420
caaggcccca	gtccaaagca	attagtatcc	ttaggaccag	aaaaatctgt	ggaagggtcag	3480
aatttcttgt	ctgagaaaaa	caaagtggta	gtaggaaagg	gtgaatttac	aaaggacgta	3540
ggactcaaag	agatgggttt	tccaagcagc	agaaacctat	ttcttactaa	cttggataat	3600
ttacatgaaa	ataatacaca	caatcaagaa	aaaaaaattc	aggaagaaat	agaaaagaag	3660
gaaacattaa	tccaagagaa	tgtagttttg	cctcagatac	atacagtgac	tggcactaag	3720
aatttcatga	agaacctttt	cttactgagc	actaggcaaa	atgtagaagg	ttcatatgac	3780

ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca	3840
aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaaa ggggaggaag aaaacttgga aggcttgggg	3900
aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatata tccataatata	3960
agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaaacaatt cagactccca	4020
ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtgggtcc	4080
aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactacaa tgagaaggag	4140
aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct	4200
caagcaaata gatctccatt acccattgca aaggatatcat catttccatc tattagacct	4260
atatatctga ccagggtcct attccaagac aactcttctc atcttccagc agcatcttat	4320
agaaagaaag attctggggt ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat	4380
aacctttctt tagccattct aaccttgag atgactgggtg atcaaagaga gggttggtcc	4440
ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctcccg	4500
aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat	4560
cagaaggacc tatteoctac ggaaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcgtg	4620
gaaggagacc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct	4680
ggaaaagttc cctttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta	4740
ttggatctc ttgcttgga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa	4800
tccaagaga agtcaccaga aaaaacagct tttaagaaaa aggataccat tttgtccctg	4860
aacgcttggtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccgaa	4920
atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaaccacca	4980
gtcttgaaac gccatcaacg ggaaataact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa	5040
attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat	5100
gaggatgaaa atcagagccc ccgagcttt caaaagaaaa cagcacta ttttattgct	5160
gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaaacagg	5220
gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag aaagttgttt tccaggaatt tactgatggc	5280
tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaatgaac atttgggact cctggggcca	5340
tatataagag cagaagttga agataatata atggtaactt tcagaaatca ggctctcgt	5400
ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa	5460
cctagaaaaa actttgtcaa gctaatagaa accaaaactt acttttgga agtgcaacat	5520

catatggcac	ccactaaaga	tgagtttgac	tgcaaagcct	gggcttattt	ctctgatgtt	5580
gacctggaaa	aagatgtgca	ctcaggcctg	attggacccc	ttctgggtctg	ccacactaac	5640
acactgaacc	ctgctcatgg	gagacaagtg	acagtacagg	aatttgctct	gtttttcacc	5700
atctttgatg	agaccaaag	ctggtacttc	actgaaaata	tggaaagaaa	ctgcagggct	5760
ccctgcaata	tccagatgga	agatcccact	tttaaagaga	attatcgctt	ccatgcaatc	5820
aatggctaca	taatggatac	actacctggc	ttagtaatgg	ctcaggatca	aaggattcga	5880
tggtatctgc	tcagcatggg	cagcaatgaa	aacatccatt	ctattcattt	cagtggacat	5940
gtgttcactg	tacgaaaaaa	agaggagtat	aaaatggcac	tgtacaatct	ctatccaggt	6000
gtttttgaga	cagtggaaat	gttaccatcc	aaagctggaa	tttggcgggt	ggaatgcctt	6060
attggcgagc	atctacatgc	tgggatgagc	acactttttc	tgggtgtacag	caataagtgt	6120
cagactcccc	tgggaatggc	ttctggacac	attagagatt	ttcagattac	agcttcagga	6180
caatatggac	agtgggcccc	aaagctggcc	agacttcatt	attccggatc	aatcaatgcc	6240
tggagcacca	aggagccctt	ttcttggatc	aagggtggatc	tgttggcacc	aatgattatt	6300
cacggcatca	agaccagggg	tgcccgtcag	aagttctcca	gcctctacat	ctctcagttt	6360
atcatcatgt	atagtcttga	tgggaagaag	tggcagactt	atcgaggaaa	ttccactgga	6420
accttaatgg	tcttcttttg	caatgtggat	tcactctggga	taaaacacaa	tatttttaac	6480
cctccaatta	ttgctcgata	catccgtttg	cacccaactc	attatagcat	tcgcagcact	6540
cttcgcatgg	agttgatggg	ctgtgattta	aatagttgca	gcatgccatt	gggaatggag	6600
agtaaagcaa	tatcagatgc	acagattact	gcttcactct	actttaccaa	tatgtttgcc	6660
acctgggtctc	cttcaaaagc	tgcacttcac	ctccaaggga	ggagtaatgc	ctggagacct	6720
caggtgaata	atccaaaaga	gtggctgcaa	gtggacttcc	agaagacaat	gaaagtcaca	6780
ggagtaacta	ctcagggagt	aaaatctctg	cttaccagca	tgtatgtgaa	ggagtctctc	6840
atctccagca	gtcaagatgg	ccatcagtg	actctctttt	ttcagaatgg	caaagtaaag	6900
gtttttcagg	gaaatcaaga	ctccttcaca	cctgtggtga	actctctaga	cccaccgtta	6960
ctgactcgct	accttcgaat	tcacccccag	agttgggtgc	accagattgc	cctgaggatg	7020
gaggttctgg	gctgcgaggc	acaggacctc	tactgagggg	ggccactgea	gcacctgcca	7080
ctgccgtcac	ctctccctcc	tcagctccag	ggcagtgtcc	ctccctgggt	tgccttctac	7140
ctttgtgcta	aatccatagca	gacactgcct	tgaagcctcc	tgaattaact	atcatcagtc	7200

ctgcatttct ttggtggggg gccaggaggg tgcaccaat ttaacttaac tottacctat 7260
 ttctgcagc tgctcccaga ttactccttc cttccaatat aactaggcaa aaagaagtga 7320
 ggagaaacct gcatgaaagc attcttcctt gaaaagttag gcctctcaga gtcaccactt 7380
 cctctgttgt agaaaaacta tgtgatgaaa ctttgaaaaa gatatttatg atgttaacat 7440
 ttcagggttaa gcctcatatg tttaaaataa aactctcagt tgtttattat cctgatcaag 7500
 catggaacaa agcatgtttc aggatcagat caatacaatc ttggagtcaa aaggcaaatc 7560
 atttgacaa tctgcaaat ggagagaata caataactac tacagtaaag tctgtttctg 7620
 cttccttaca catagatata attatgttat ttagtcatta tgaggggcac attcttatct 7680
 ccaaaactag cattcttaaa ctgagaatta tagatggggg tcaagaatcc ctaagtcccc 7740
 tgaaattata taaggcattc tgtataaatg caaatgtgca tttttctgac gagtgtccat 7800
 agatataaag ccatttggtc ttaattctga ccaataaaaa aataagtcag gaggatgcaa 7860
 ttgttgaaag ctttgaaata aaataacaat gtcttcttga aatttgtgat ggccaagaaa 7920
 gaaaatgatg a 7931

<210> 30
 <211> 2351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
 1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
 20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
 35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
 50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
 65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
 85 90 95

ES 2 538 342 T3

Ala	Glu	Val	Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser	100	105	110	
His	Pro	Val	Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser	115	120	125	
Glu	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	130	135	140	
Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu	145	150	155	160
Lys	Glu	Asn	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser	165	170	175	
Tyr	Leu	Ser	His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	180	185	190	
Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	195	200	205	
Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly	210	215	220	
Lys	Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp	225	230	235	240
Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr	245	250	255	
Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val	260	265	270	
Tyr	Trp	His	Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile	275	280	285	
Phe	Leu	Glu	Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser	290	295	300	
Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met	305	310	315	320

Asp	Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His	325	330	335
Asp	Gly	Met	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	340	345	350
Gln	Leu	Arg	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	355	360	365
Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	370	375	380
Pro	Ser	Phe	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	385	390	400
Trp	Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	405	410	415
Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	420	425	430
Asn	Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	435	440	445
Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	450	455	460
Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	465	470	475
Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	485	490	495
His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	500	505	510
Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	515	520	525
Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	530	535	540
Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg			

ES 2 538 342 T3

545		550		555		560									
Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu
				565					570					575	
Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val
			580					585					590		
Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu
		595					600					605			
Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp
	610					615					620				
Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val
625					630					635					640
Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp
				645					650					655	
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe
		660						665					670		
Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr
		675					680					685			
Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro
	690					695					700				
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly
705					710					715					720
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp
				725					730					735	
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys
		740						745					750		
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Arg
		755					760					765			
Ser	Thr	Arg	Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp
	770					775					780				

Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
785 790 795 800

Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
805 810 815

Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
820 825 830

Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
835 840 845

Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
850 855 860

Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
865 870 875 880

Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
885 890 895

Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
900 905 910

Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
915 920 925

Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
930 935 940

Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
945 950 955 960

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
965 970 975

Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe
980 985 990

Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala
995 1000 1005

Leu Phe	Lys Val	Ser Ile	Ser	Leu Leu	Lys Thr	Asn	Lys Thr	Ser
1010			1015			1020		
Asn Asn	Ser Ala	Thr Asn	Arg	Lys Thr	His Ile	Asp	Gly Pro	Ser
1025			1030			1035		
Leu Leu	Ile Glu	Asn Ser	Pro	Ser Val	Trp Gln	Asn	Ile Leu	Glu
1040			1045			1050		
Ser Asp	Thr Glu	Phe Lys	Lys	Val Thr	Pro Leu	Ile	His Asp	Arg
1055			1060			1065		
Met Leu	Met Asp	Lys Asn	Ala	Thr Ala	Leu Arg	Leu	Asn His	Met
1070			1075			1080		
Ser Asn	Lys Thr	Thr Ser	Ser	Lys Asn	Met Glu	Met	Val Gln	Gln
1085			1090			1095		
Lys Lys	Glu Gly	Pro Ile	Pro	Pro Asp	Ala Gln	Asn	Pro Asp	Met
1100			1105			1110		
Ser Phe	Phe Lys	Met Leu	Phe	Leu Pro	Glu Ser	Ala	Arg Trp	Ile
1115			1120			1125		
Gln Arg	Thr His	Gly Lys	Asn	Ser Leu	Asn Ser	Gly	Gln Gly	Pro
1130			1135			1140		
Ser Pro	Lys Gln	Leu Val	Ser	Leu Gly	Pro Glu	Lys	Ser Val	Glu
1145			1150			1155		
Gly Gln	Asn Phe	Leu Ser	Glu	Lys Asn	Lys Val	Val	Val Gly	Lys
1160			1165			1170		
Gly Glu	Phe Thr	Lys Asp	Val	Gly Leu	Lys Glu	Met	Val Phe	Pro
1175			1180			1185		
Ser Ser	Arg Asn	Leu Phe	Leu	Thr Asn	Leu Asp	Asn	Leu His	Glu
1190			1195			1200		
Asn Asn	Thr His	Asn Gln	Glu	Lys Lys	Ile Gln	Glu	Glu Ile	Glu
1205			1210			1215		

Lys	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Leu	Pro	Gln	Ile
1220						1225					1230			
His	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Asn	Phe	Met	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu
1235						1240					1245			
Leu	Ser	Thr	Arg	Gln	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr
1250						1255					1260			
Ala	Pro	Val	Leu	Gln	Asp	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asn
1265						1270					1275			
Arg	Thr	Lys	Lys	His	Thr	Ala	His	Phe	Ser	Lys	Lys	Gly	Glu	Glu
1280						1285					1290			
Glu	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Ile	Val	Glu
1295						1300					1305			
Lys	Tyr	Ala	Cys	Thr	Thr	Arg	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Gln
1310						1315					1320			
Asn	Phe	Val	Thr	Gln	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg
1325						1330					1335			
Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Val	Asp
1340						1345					1350			
Asp	Thr	Ser	Thr	Gln	Trp	Ser	Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Thr	Pro
1355						1360					1365			
Ser	Thr	Leu	Thr	Gln	Ile	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Gly	Ala
1370						1375					1380			
Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Asp	Cys	Leu	Thr	Arg	Ser	His	Ser
1385						1390					1395			
Ile	Pro	Gln	Ala	Asn	Arg	Ser	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Lys	Val	Ser
1400						1405					1410			
Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe
1415						1420					1425			
Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys

ES 2 538 342 T3

1430		1435		1440
Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys				
1445		1450		1455
Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly				
1460		1465		1470
Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser				
1475		1480		1485
Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp				
1490		1495		1500
Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His				
1505		1510		1515
Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser				
1520		1525		1530
Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr				
1535		1540		1545
Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val				
1550		1555		1560
Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser				
1565		1570		1575
Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln				
1580		1585		1590
Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys				
1595		1600		1605
Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys				
1610		1615		1620
Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys				
1625		1630		1635
Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg				
1640		1645		1650

Leu Cys	Ser Gln Asn Pro	Pro Val Leu Lys Arg His	Gln Arg Glu
1655		1660	1665
Ile Thr	Arg Thr Thr Leu Gln	Ser Asp Gln Glu Glu	Ile Asp Tyr
1670		1675	1680
Asp Asp	Thr Ile Ser Val Glu	Met Lys Lys Glu Asp	Phe Asp Ile
1685		1690	1695
Tyr Asp	Glu Asp Glu Asn Gln	Ser Pro Arg Ser Phe	Gln Lys Lys
1700		1705	1710
Thr Arg	His Tyr Phe Ile Ala	Ala Val Glu Arg Leu	Trp Asp Tyr
1715		1720	1725
Gly Met	Ser Ser Ser Pro His	Val Leu Arg Asn Arg	Ala Gln Ser
1730		1735	1740
Gly Ser	Val Pro Gln Phe Lys	Lys Val Val Phe Gln	Glu Phe Thr
1745		1750	1755
Asp Gly	Ser Phe Thr Gln Pro	Leu Tyr Arg Gly Glu	Leu Asn Glu
1760		1765	1770
His Leu	Gly Leu Leu Gly Pro	Tyr Ile Arg Ala Glu	Val Glu Asp
1775		1780	1785
Asn Ile	Met Val Thr Phe Arg	Asn Gln Ala Ser Arg	Pro Tyr Ser
1790		1795	1800
Phe Tyr	Ser Ser Leu Ile Ser	Tyr Glu Glu Asp Gln	Arg Gln Gly
1805		1810	1815
Ala Glu	Pro Arg Lys Asn Phe	Val Lys Pro Asn Glu	Thr Lys Thr
1820		1825	1830
Tyr Phe	Trp Lys Val Gln His	His Met Ala Pro Thr	Lys Asp Glu
1835		1840	1845
Phe Asp	Cys Lys Ala Trp Ala	Tyr Phe Ser Asp Val	Asp Leu Glu
1850		1855	1860

Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His
1865						1870					1875			
Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln
1880						1885					1890			
Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp
1895						1900					1905			
Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn
1910						1915					1920			
Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His
1925						1930					1935			
Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met
1940						1945					1950			
Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser
1955						1960					1965			
Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr
1970						1975					1980			
Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr
1985						1990					1995			
Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly
2000						2005					2010			
Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly
2015						2020					2025			
Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro
2030						2035					2040			
Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala
2045						2050					2055			
Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His
2060						2065					2070			

Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser
2075						2080					2085			
Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile
2090						2095					2100			
Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser
2105						2110					2115			
Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr
2120						2125					2130			
Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn
2135						2140					2145			
Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile
2150						2155					2160			
Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg
2165						2170					2175			
Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys
2180						2185					2190			
Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln
2195						2200					2205			
Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser
2210						2215					2220			
Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp
2225						2230					2235			
Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe
2240						2245					2250			
Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys
2255						2260					2265			
Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser
2270						2275					2280			
Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys

ES 2 538 342 T3

2285		2290		2295
Val Lys	Val Phe Gln Gly Asn	Gln Asp Ser Phe Thr	Pro Val Val	
2300		2305	2310	
Asn Ser	Leu Asp Pro Pro Leu	Leu Thr Arg Tyr Leu	Arg Ile His	
2315		2320	2325	
Pro Gln	Ser Trp Val His Gln	Ile Ala Leu Arg Met	Glu Val Leu	
2330		2335	2340	
Gly Cys	Glu Ala Gln Asp Leu	Tyr		
2345		2350		

<210> 31
 <211> 1471
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 31

```

atggcgcccg tcgcgctctg ggccgcgctg gccgtcggac tggagctctg ggctgcggcg      60
cacgccttgc cgcgccaggt ggcatttaca ccctacgcc cggagcccg gagcacatgc      120
cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaattg ctgcgcggcg      180
caacatgcaa aagtcttctg taaccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac      240
agcacatata ccagctctg gaactgggtt cccgagtgtg tgagctgtgg ctcccgtgt      300
agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc      360
aggcccggtt ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgcgctg      420
cgcaagtgcc gcccggtt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg      480
tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgaatt catccacgga tatttgcagg      540
ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc      600
acgtccacgt ccccccaccc gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg      660
tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaacca gcactgctcc aagcacctcc      720
ttcctgctcc caatgggccc cagcccccca gctgaaggga gcactggcga ctcgctctt      780
ccagttggac tgattgtggg tgtgacagcc ttgggtctac taataatagg agtgggtgaac      840
tgtgtcatca tgaccacaggt gaaaaagaag cccttgtgcc tgcagagaga agccaagggtg      900
cctcacttgc ctgccgataa ggcccggggt acacagggcc ccgagcagca gcacctgctg      960
  
```

```

atcacagcgc cgagctccag cagcagctcc ctggagagct cggccagtgc gttggacaga 1020
agggcgccca ctcggaacca gccacaggca ccaggcgtgg aggccagtgg ggccggggag 1080
ggccggggcca gcaccgggag ctgagattct tcccctggtg gccatgggac ccagggtcaat 1140
gtcacctgca tegtgaacgt ctgtagcagc totgaccaca gctcacagtg ctctcccaa 1200
gccagctcca caatgggaga cacagattcc agcccctcgg agtccccgaa ggacgagcag 1260
gtcccccttct ccaaggagga atgtgccttt cggtcacagc tggagacgcc agagaccctg 1320
ctggggagca ccgaagagaa gccctgccc ottggagtgc ctgatgctgg gatgaagccc 1380
agttaaccag gccggtgtgg gctgtgtcgt agccaaggtg ggctgagccc tggcaggatg 1440
accctgcgaa ggggccctgg tccttcagg c 1471

```

<210> 32
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 32

```

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1          5          10          15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
          20          25          30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
          35          40          45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50          55          60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65          70          75          80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
          85          90          95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
          100          105          110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
          115          120          125

```

ES 2 538 342 T3

Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Cys	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	130	135	140	
Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val	145	150	155	160
Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	165	170	175	
Asp	Ile	Cys	Arg	Pro	His	Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly	180	185	190	
Asn	Ala	Ser	Met	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	195	200	205	
Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Val	His	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser	210	215	220	
Gln	His	Thr	Gln	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	225	230	235	240
Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	245	250	255	
Asp	Phe	Ala	Leu	Pro	Val	Gly	Leu	Ile	Val	Gly	Val	Thr	Ala	Leu	Gly	260	265	270	
Leu	Leu	Ile	Ile	Gly	Val	Val	Asn	Cys	Val	Ile	Met	Thr	Gln	Val	Lys	275	280	285	
Lys	Lys	Pro	Leu	Cys	Leu	Gln	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Pro	His	Leu	Pro	290	295	300	
Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Gly	Thr	Gln	Gly	Pro	Glu	Gln	Gln	His	Leu	Leu	305	310	315	320
Ile	Thr	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	325	330	335	
Ala	Leu	Asp	Arg	Arg	Ala	Pro	Thr	Arg	Asn	Gln	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	340	345	350	

Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
355 360 365

Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
370 375 380

Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
385 390 395 400

Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
405 410 415

Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
420 425 430

Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
435 440 445

Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
450 455 460

<210> 33
<211> 1475
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 33

tccacctgtc cccgcagcgc cggctcgcgc cctcctgccg cagccaccga gccgcctct 60
agcgccccga cctcgccacc atgagagccc tgctggcgcg cctgcttctc tgcgtcctgg 120
tcgtgagcga ctccaaaggc agcaatgaac ttcatacaagt tccatcgaac tgtgactgtc 180
taaattggagg aacatgtgtg tccaacaagt acttctccaa cattcactgg tgcaactgcc 240
caaagaaatt cggagggcag cactgtgaaa tagataagtc aaaaacctgc tatgagggga 300
atggtcactt ttaccgagga aaggccagca ctgacaccat gggccggccc tgcttgcct 360
ggaactctgc cactgtcctt cagcaaactg accatgccca cagatctgat gctcttcagc 420
tgggcctggg gaaacataat tactgcagga acccagacaa cgggaggcga ccctgggtgct 480
atgtgcaggt gggcctaaag cgccttgctc aagagtgcac ggtgcatgac tgcgcagatg 540
gaaaaaagcc ctctctctct ccagaagaat taaaatttca gtgtggccaa aagactctga 600
ggccccgctt taagattatt gggggagaat tcaccaccat cgagaaccag ccctggtttg 660
cgcccatcta caggaggcac cgggggggct ctgtcaccta cgtgtgtgga ggcagcctca 720

ES 2 538 342 T3

```

tcagcccttg ctgggtgatc agcgccacac actgcttcat tgattacca aagaaggagg 780
actacatcgt ctacctgggt cgctcaaggc ttaactccaa caccgaaggg gagatgaagt 840
ttgaggtgga aaacctcatc ctacacaagg actacagcgc tgacacgctt gctcaccaca 900
acgacattgc cttgctgaag atccgttcca aggagggcag gtgtgcgcag ccatcccgga 960
ctatacagac catctgcctg ccctcgatgt ataacgatcc ccagtttggc acaagctgtg 1020
agatcactgg ctttggaataa gagaattcta ccgactatct ctatccggag cagctgaaga 1080
tgactgttgt gaagctgatt tcccaccggg agtgtcagca gcccactac tacggctctg 1140
aagtcaccac caaatgctg tgtgctgctg acccacagtg gaaaacagat tcttgccagg 1200
gagactcagg gggacccctc gtctgttccc tccaaggccg catgactttg actggaattg 1260
tgagctgggg ccgtggatgt gccctgaagg acaagccagg cgtctacacg agagtctcac 1320
acttcttacc ctggatccgc agtcacacca aggaagagaa tggcctggcc ctctgagggg 1380
ccccaggagg gaaacgggca ccaccgctt tcttgctggt tgtcattttt gcagtagagt 1440
catctccatc agctgtaaga agagactggg aagat 1475

```

<210> 34
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34

```

Met Arg Ala Leu Leu Ala Arg Leu Leu Leu Cys Val Leu Val Val Ser
1           5           10           15

Asp Ser Lys Gly Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp
20           25           30

Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile
35           40           45

His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile
50           55           60

Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly
65           70           75           80

Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser
85           90           95

```


Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu
 100 105 110

Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg
 115 120 125

Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln
 130 135 140

Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Arg
 165 170 175

Phe Lys Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp
 180 185 190

Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr Val
 195 200 205

Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr His
 210 215 220

Cys Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu Gly
 225 230 235 240

Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu Val
 245 250 255

Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala His
 260 265 270

His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu Gly Arg Cys
 275 280 285

Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr
 290 295 300

Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys
 305 310 315 320

ES 2 538 342 T3

Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val
325 330 335

Val Lys Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly
340 345 350

Ser Glu Val Thr Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys
355 360 365

Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu
370 375 380

Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys
385 390 395 400

Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu
405 410 415

Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu
420 425 430

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

ES 2 538 342 T3

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36

5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 37

15

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

ES 2 538 342 T3

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

ES 2 538 342 T3

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 39
<211> 1039
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 39

```
tccctgcacag gcagtgccctt gaagtgcctt ttcagagacc tttcttcata gactactttt 60
ttttcttttaa gcagcaaaag gagaaaattg tcatcaaagg atattccaga ttcttgacag 120
cattctcgtc atctctgagg acatcaccat catctcagga tgaggggcat gaagctgctg 180
ggggcgctgc tggcactggc ggccctactg cagggggccg tgtccctgaa gatcgagcc 240
ttcaacatcc agacatttgg ggagaccaag atgtccaatg ccaccctcgt cagctacatt 300
gtgcagatcc tgagccgcta tgacatcgcc ctgggtccagg aggtcagaga cagccacctg 360
actgccgtgg ggaagctgct ggacaacctc aatcaggatg caccagacac ctatcactac 420
gtgggtcagtg agccactggg acggaacagc tataaggagc gctacctgtt cgtgtacagg 480
cctgaccagg tgtctgcggt ggacagctac tactacgatg atggctgcga gccctgcggg 540
aacgacacct tcaaccgaga gccagccatt gtcaggttct tctcccgtt cacagaggtc 600
agggagtttg ccattgttcc cctgcatgcg gccccggggg acgcagtagc cgagatcgac 660
gctctctatg acgtctacct ggatgtccaa gagaaatggg gcttggagga cgtcatgttg 720
atgggcgact tcaatgcggg ctgcagctat gtgagaccct cccagtggtc atccatccgc 780
ctgtggacaa gccccacctt ccagtggctg atccccgaca gcgctgacac cacagctaca 840
cccacgcact gtgcctatga caggatcgtg gttgcagggg tgctgctccg aggcgcggtt 900
gttcccgaact cggctcttcc ctttaacttc caggctgcct atggcctgag tgaccaactg 960
gccaagcca tcagtgacca ctatccagtg gaggtgatgc tgaagtgagc agccccctcc 1020
cacaccagtt gaactgcag 1039
```

10

15 <210> 40
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

ES 2 538 342 T3

1	5	10	15
Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr	20	25	30
Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val	35	40	45
Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp	50	55	60
Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp	65	70	75
Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn	85	90	95
Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser	100	105	110
Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn	115	120	125
Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe	130	135	140
Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly	145	150	155
Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val	165	170	175
Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn	180	185	190
Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu	195	200	205
Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr	210	215	220
Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly	225	230	235
			240

ES 2 538 342 T3

Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn
245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser
260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 41
<211> 678
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 41

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60
ttctcctgca gggccagtcg gttcgttggc tcaagcatcc actggtatca gcaaagaaca 120
aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatgtctgg gatcccttcc 180
aggtttagtg gcagtggatc agggacagat tttactctta gcatcaacac tgtggagttc 240
gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtcatagct ggccattcac gttcggtctg 300
gggacaaatt tggaagtaaa agaagtgaag cttgaggagt ctggaggagg cttggtgcaa 360
cctggaggat ccatgaaact ctctgtgtt gcctctggat tcattttcag taaccactgg 420
atgaactggg tccgccagtc tccagagaag gggcttgagt gggttgctga aattagatca 480
aaatctatta attctgcaac acattatgct gagtctgtga aaggagggtt caccatctca 540
agagatgatt ccaaaagtgc tgtctacctg caaatgaccg acttaagaac tgaagacact 600
ggcgtttatt actgttccag gaattactac ggtagtacct acgactactg gggccaaggc 660
accactctca cagtctcc 678

<210> 42
<211> 226
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser

	20		25		30										
Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
	35						40					45			
Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Met	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Thr	Val	Glu	Ser
65					70					75					80
Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Ser	Trp	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Lys	Leu	Glu
			100					105					110		
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Met	Lys	Leu	Ser
		115					120					125			
Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Asn	His	Trp	Met	Asn	Trp	Val
	130					135					140				
Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Glu	Ile	Arg	Ser
145					150					155					160
Lys	Ser	Ile	Asn	Ser	Ala	Thr	His	Tyr	Ala	Glu	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
				165					170					175	
Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Tyr	Leu	Gln	Met
			180					185					190		
Thr	Asp	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Asn
	195						200					205			
Tyr	Tyr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr
	210					215					220				
Val	Ser														
	225														

<210> 43
 <211> 450
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 43

```

gctgcatcag aagaggccat caagcacatc actgtccttc tgccatggcc ctgtggatgc      60
gcctcctgcc cctgctggcg ctgctggccc tctggggacc tgaccagcc gcagcctttg      120
tgaaccaaca cctgtgcggc tcacacctgg tggaagctct ctacctagtg tgcggggaac      180
gaggcttctt ctacacaccc aagaccgcc gggaggcaga ggacctgcag gtggggcagg      240
tggagctggg cggggggcct ggtgcaggca gcctgcagcc cttggccctg gaggggtccc      300
tgcagaagcg tggcattgtg gaacaatgct gtaccagcat ctgctccctc taccagctgg      360
agaactactg caactagacg cagcccgagc gcagcccccc acccgccgcc tcctgcaccg      420
agagagatgg aataaagccc ttgaaccagc                                     450

```

<210> 44

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1          5          10          15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
          20          25          30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
          35          40          45

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
          50          55          60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
65          70          75          80

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
          85          90          95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
          100          105          110

```

<210> 45

<211> 1203

<212> ADN

<213> Hepatitis B virus

<400> 45

ES 2 538 342 T3

```

atgggaggtt ggtcttccaa acctcgacaa ggcattggga cgaatcttcc tgttcccaat    60
cctctgggat tctttcccca tcaccagttg gacctgctgt tcggagccaa ctcaaacaat    120
ccagattggg acttcaaccc caacaaggat cactggccag aggcaatcaa ggtaggagcg    180
ggagacttct ggcaggggtt caccaccaca caggcggttc ttttggggtg gagccctcag    240
gtcaggggca tattgacaac agtgccagca gcgcctcttc ctgtttccac caatcggcag    300
tcaggaagac agcctactcc catctctcca cctctaagag acagtcattc tcaggccatg    360
cagtgggaact ccacaacatt ccaccaagct ctgctagatc ccagagttag gggcctatat    420
tttctgtctg gtggctccag ttccggaaca gtaaaccctg ttccgactac tgtctcacc    480
atatcgtcaa tcttctcgag gaactggggac cctgcaccga acatggagag cacaacatca    540
ggattcctag gacctctgct cgtgttacag ggggggtttt tcttggtgac aagaatcttc    600
acaataccac agagtctaga ctggtggtg acttctctca attttctagg gggagcacc    660
acgtgtcctg gccaaaattc gcagtcacca acctccaatc actcaccaac ctcttgctct    720
ccaatttgtc ctggttatcg ctggatgtgt ctgcggcggt ttatcatatt cctcttcate    780
ctgctgctat gcctcatctt cttgttggtt cttctggact accaaggtat gttgcccggt    840
tgtctctac ttccaggaac atcaactacc agcacgggac catgcaagac ctgcacgatt    900
cctgtcgaag gaacctctat gtttcctctt tgttgctgta caaaccttc ggacgggaaac    960
tgcacttgta ttcccatccc atcatcctgg gctttcgcaa gattcctatg ggagtgggccc   1020
tcagtcctgt tctcctgggt cagtttacta gtgccatttg ttcagtgggt cgcagggctt   1080
tccccactg tttggctttc agttatatgg atgatgtggt attggggggc aagtctgtac   1140
aacatcttga gtcccttttt acctctatta ccaattttct tttgtctttg ggtatacatt   1200
tga                                                                    1203

```

<210> 46
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> virus de la Hepatitis B
 <400> 46

```

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
 1             5             10             15

```

ES 2 538 342 T3

Ser	Val	Pro	Asn	Pro	Leu	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Gln	Leu	Asp	Pro	20	25	30
Ala	Phe	Gly	Ala	Asn	Ser	Asn	Asn	Pro	Asp	Trp	Asp	Phe	Asn	Pro	Asn	35	40	45
Lys	Asp	His	Trp	Pro	Glu	Ala	Ile	Lys	Val	Gly	Ala	Gly	Asp	Phe	Gly	50	55	60
Pro	Gly	Phe	Thr	Pro	Pro	His	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Trp	Ser	Pro	Gln	65	70	75
Ala	Gln	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	Val	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Pro	Val	Ser	85	90	95
Thr	Asn	Arg	Gln	Ser	Gly	Arg	Gln	Pro	Thr	Pro	Ile	Ser	Pro	Pro	Leu	100	105	110
Arg	Asp	Ser	His	Pro	Gln	Ala	Met	Gln	Trp	Asn	Ser	Thr	Thr	Phe	His	115	120	125
Gln	Ala	Leu	Leu	Asp	Pro	Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Tyr	Phe	Pro	Ala	Gly	130	135	140
Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Thr	Thr	Val	Ser	Pro	145	150	155
Ile	Ser	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Pro	Ala	Pro	Asn	Met	Glu	165	170	175
Ser	Thr	Thr	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Gln	Ala	Gly	180	185	190
Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Ser	195	200	205
Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Thr	Cys	Pro	Gly	210	215	220
Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	His	Ser	Pro	Thr	Ser	Cys	Pro	225	230	235
																240		

ES 2 538 342 T3

Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile
245 250 255

Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu
260 265 270

Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser
275 280 285

Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly
290 295 300

Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn
305 310 315 320

Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu
325 330 335

Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro
340 345 350

Phe Val Gln Trp Phe Ala Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val
355 360 365

Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser
370 375 380

Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
385 390 395 400

<210> 47
<211> 799
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 47

cgaaccactc agggctcctgt ggacagctca cctagctgca atggctacag gctcccgagc 60
gtccctgctc ctggcttttg gcctgctctg cctgccctgg cttcaagagg gcagtgcctt 120
cccaaccatt cccttatcca ggccttttga caacgctatg ctccgcgccc atcgtctgca 180
ccagctggcc ttgacacct accaggagtt tgaagaagcc tataatccaa aggaacagaa 240
gtattcattc ctgcagaacc ccagacctc cctctgtttc tcagagtcta ttccgacacc 300

ES 2 538 342 T3

```

ctccaacagg gaggaaacac aacagaaatc caacctagag ctgctccgca tctccctgct 360
gctcatccag tcgtggctgg agcccgtgca gttcctcagg agtgtcttcg ccaacagcct 420
ggtgtacggc gcctctgaca gcaacgtcta tgacctcta aaggacctag aggaaggcat 480
ccaaacgctg atggggaggc tggaagatgg cagcccccg actgggcaga tcttcaagca 540
gacctacagc aagttcgaca caaactcaca caacgatgac gcactactca agaactacgg 600
gctgctctac tgcttcagga aggacatgga caaggctgag acattcctgc gcacgtgca 660
gtgccgtctt gtggagggca gctgtggctt ctagctgccc ggggtggcatc cctgtgaccc 720
ctccccagtg cctctcctgg ccctggaagt tgccactcca gtgcccacca gccttgcct 780
aataaaatta agttgcac 799

```

<210> 48
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48

```

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1           5           10           15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
          20           25           30

Ser Arg Pro Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
          35           40           45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
50           55           60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65           70           75           80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
          85           90           95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
          100          105          110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
          115          120          125

```

ES 2 538 342 T3

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
210 215

<210> 49
<211> 963
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 49

```
atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacgtcaggc gagggccccc gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc caogccctgc      120
gtcccgggccg agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg gctcctgcgc      180
acgccgcggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc gctgcagccg      240
caggagtcgg tgggcgcggg ggccggcgag gcggcggtcg acaaaactca cacatgccca      300
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc      360
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc      420
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc      480
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc      540
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc      600
ctcccagccc ccacgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag      660
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc      720
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg      780
```

ES 2 538 342 T3

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ttggactcgg acggctcctt cttcctctac 840
 agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 900
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa 960
 tga 963

<210> 50
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Val Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg
 20 25 30
 Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu
 35 40 45
 Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro
 50 55 60
 Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Val Asp Lys Thr
 85 90 95
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 100 105 110
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 115 120 125
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 130 135 140
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 145 150 155 160
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

ES 2 538 342 T3

[illegible]

<210> 51
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

ES 2 538 342 T3

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
100 105

<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ile Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 53
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

ES 2 538 342 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 54

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

ES 2 538 342 T3

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 55
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

ES 2 538 342 T3

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 56
<211> 448
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Phe
115				120				125									
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu		
130				135				140									
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp		
145				150				155				160					
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu		
165				170				175									
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
180				185				190									
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		
195				200				205									
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		
210				215				220									
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro		
225				230				235				240					
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
245				250				255									
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
260				265				270									
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
275				280				285									
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
290				295				300									
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305				310				315				320					
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		
325				330				335									
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr		

ES 2 538 342 T3

	340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	355		360		365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu	370		375		380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	385		390		395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	405		410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	420		425		430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	435		440		445

<210> 57
 <211> 8540
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 57

gacgtcgagg ccgctctagg cctccaaaaa agcctcctca ctacttctgg aatagctcag	60
aggccgaggg ggccctggcc tctgcataaa taaaaaaaat tagtcagcca tgcattggggc	120
ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg gcggagttag gggcgggact	180
atggttgctg actaattgag atgcatgctt tgcatacttc tgcttctgg ggagcctggg	240
gactttccac acctggttgc tgactaattg agatgcatgc tttgcatact tctgcctgct	300
ggggagcctg gggactttcc acaccctaac tgacacacat tccacagaat taattcccct	360
agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc	420
gttacataac ttacggtaaa tggeccgcct ggctgacgc ccaacgaccc cggccattg	480
acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa	540
tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtag atcaagtgt tcatatgcc	600
agtagcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc cctggcatta tgcccagtag	660
atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc	720

atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga	780
tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg	840
gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta	900
cgggtgggagg tctatataag cagagctggg tacgtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc	960
catcacagat ctctcaccat gaggggtccc gctcagctcc tggggctcct gctgctctgg	1020
ctcccagggtg cacgatgtga tggtagcaag gtggaaatca aacgtacggg ggctgcacca	1080
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttctg	1140
tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggagggt ggataacgcc	1200
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac	1260
agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc	1320
tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcaca agagcttcaa caggggagag	1380
tgttgaattc agatccgtta acggttacca actacctaga ctggattcgt gacaacatgc	1440
ggcctgata tctacgtatg atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt	1500
gtttgccct ccccggtgcc ttccttgacc ctggaagggt ccaactccac tgtcctttcc	1560
taataaaatg aggaaattgc atcgatttgt ctgagtaggt gtcattctat tctgggggggt	1620
ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat	1680
gcggtgggct ctatggaacc agctggggt cgacagctat gccaaagtac cccctattg	1740
acgtcaatga cggtaaattg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact	1800
ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcacgctat taccatgggt atgcggtttt	1860
ggcagtacat caatggggt ggatagcgg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc	1920
ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc	1980
gtaacaactc cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata	2040
taagcagagc tgggtacgtc ctcacattca gtgatcagca ctgaacacag acccgctgac	2100
atggggttga gcctcatctt gctcttctt gtcgctgttg ctacgcgtgt cgctagcacc	2160
aaggggccat cgggtcttccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	2220
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca	2280
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac	2340
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgcctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc	2400
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagcagagcc caaatcttgt	2460

ES 2 538 342 T3

gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 2520
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 2580
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 2640
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 2700
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggactacaag 2760
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 2820
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccagg 2880
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag 2940
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc 3000
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 3060
aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 3120
ctctccctgt ctccgggtaa atgaggatcc gttaacggtt accaactacc tagactggat 3180
tcgtgacaac atgcggccgt gatatctacg tatgatcagc ctgactgtg ctttctagtt 3240
gccagccatc tgttgtttgc cctcccccg tgcttctcct gacctggaa ggtgccactc 3300
ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 3360
ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca 3420
ggcatgctgg ggatgcggtg ggctctatgg aaccagctgg ggctcgacag cgtggatct 3480
cccgatcccc agctttgctt ctcaatttct tatttgcata atgagaaaaa aaggaaaatt 3540
aatTTtaaca ccaattcagt agttgattga gcaaatgcgt tgccaaaaag gatgctttag 3600
agacagtgtt ctctgcacag ataaggacaa acattattca gagggagtac ccagagctga 3660
gactcctaag ccagtgagtg gcacagcatt ctagggagaa atatgcttgt catcaccgaa 3720
gcctgattcc gtagagccac accttggtaa gggccaatct gctcacacag gatagagagg 3780
gcaggagcca gggcagagca tataagggtga ggtaggatca gttgctctc acatttgctt 3840
ctgacatagt tgtgttgga gcttgatag cttggacagc tcagggtgc gatttcgcgc 3900
caaaactgac ggcaatccta gcgtgaaggc tggtaggatt ttatccccgc tgccatcatg 3960
gttcgaccat tgaactgcat cgtcgccgtg tcccaaaata tggggattgg caagaacgga 4020
gacctacct ggctccgt caggaacgag ttcaagtact tccaaagaat gaccacaacc 4080
tcttcagtgg aaggtaaaca gaatctggtg attatgggtg ggaaaacctg gttctccatt 4140

cctgagaaca	atcgaccttt	aaaggacaga	attaatatag	ttctcagtag	agaactcaaa	4200
gaaccaccac	gaggagctca	ttttcttgcc	aaaagtttgg	atgatgcctt	aagacttatt	4260
gaacaaccgg	aattggcaag	taaagtagac	atggtttggg	tagtcggagg	cagttctggt	4320
taccaggaag	ccatgaatca	accaggccac	cttagactct	ttgtgacaag	gatcatgcag	4380
gaatttgaaa	gtgacacgtt	tttcccagaa	attgatttgg	ggaaatataa	acttctccca	4440
gaatacccag	gcgtcctctc	tgagggtccag	gaggaaaaag	gcatcaagta	taagtttgaa	4500
gtctacgaga	agaaagacta	acaggaagat	gctttcaagt	tctctgctcc	cctcctaaag	4560
tcatgcattt	ttataagacc	atgggacttt	tgtgtgcttt	agatcagcct	cgactgtgcc	4620
ttctagttgc	cagccatctg	ttgtttgccc	ctcccccggtg	ccttccttga	ccctggaagg	4680
tgccactccc	actgtccttt	cctaataaaa	tgaggaaatt	gcatcgcatt	gtctgagtag	4740
gtgtcattct	attctggggg	gtgggggtggg	gcaggacagc	aagggggagg	attgggaaga	4800
caatagcagg	catgctgggg	atgcggtggg	ctctatggaa	ccagctgggg	ctcgagctac	4860
tagctttgct	tctcaatttc	ttatttgcac	aatgagaaaa	aaaggaaaat	taattttaac	4920
accaattcag	tagttgattg	agcaaagtcg	ttgccaaaaa	ggatgcttta	gagacagtgt	4980
tctctgcaca	gataaggaca	aacattattc	agagggagta	cccagagctg	agactcctaa	5040
gccagtgagt	ggcacagcat	tctagggaga	aatatgcttg	tcacaccga	agcctgattc	5100
cgtagagcca	caccttggtg	agggccaatc	tgctcacaca	ggatagagag	ggcaggagcc	5160
agggcagagc	atataaggtg	aggtaggatc	agttgctcct	cacatttgct	tctgacatag	5220
ttgtgttggg	agcttggtgc	gatcctctat	ggttgaacaa	gatggattgc	acgcagggtc	5280
tccggccgct	tggttgagga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggtg	5340
ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	cgggttcttt	ttgtcaagac	5400
cgacctgtcc	ggtgccttga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	5460
cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgct	actgaagcgg	gaagggactg	5520
gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	5580
gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggtacctg	5640
cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaagccgg	5700
tcttgctgat	caggatgatc	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	5760
cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccgacgg	cgaggatctc	gtcgtgacct	atggcgatgc	5820
ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	5880

gctgggtgtg gcggaaccgt atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga 5940
 gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac ggtatcgccg cttcccgatt 6000
 cgcagcgc at cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctgggggt 6060
 cgaaatgacc gaccaagcga cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc 6120
 cttctatgaa aggttgggct toggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca 6180
 gcgcggggat ctcatgctgg agttcttcgc ccaccccaac ttgtttattg cagcttataa 6240
 tgggtacaaa taaagcaata gcatacaaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca 6300
 ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tctatcttat catgtctgga tcgcggccgc 6360
 gatcccgctc agagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat 6420
 ccgctcaciaa ttccacacia catagcagcc ggagcataaa gtgtaaagcc tgggggtgct 6480
 aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgcttcc cagtcgggaa 6540
 acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta 6600
 ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtcgtg ctccgctcgt cggtgcggc 6660
 gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacgggttat cacagaatca ggggataacg 6720
 caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 6780
 tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 6840
 gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 6900
 cctcgtgctg ctctcctgtt ccgacctgc cgtttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 6960
 cttcgggaag cgtggcgctt tctcaatgct cagcgtgtag gtatctcagt tcggtgtagg 7020
 tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct 7080
 tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag 7140
 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagttcttga 7200
 agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga 7260
 agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaaa accaccgtg 7320
 gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag 7380
 aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag 7440
 ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat 7500
 gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct 7560

taatcagtga	ggcacctatc	tcagcgatct	gtctatttcg	ttcatccata	gttgcoctgac	7620
tccccgtcgt	gtagataact	acgatacggg	agggcttacc	atctggcccc	agtgcctgcaa	7680
tgataccgcg	agacccacgc	tcaccggctc	cagatttatc	agcaataaac	cagccagccg	7740
gaaggggcga	gcgcagaagt	ggctcctgcaa	ctttatccgc	ctccatccag	tctattaatt	7800
gttgccggga	agctagagta	agtagttcgc	cagttaatag	tttgcgcaac	gttggttgcca	7860
ttgctacagg	catcgtgggtg	tcacgctcgt	cgtttggat	ggcttcattc	agctccgggt	7920
cccaacgata	aaggcgagtt	acatgatccc	ccatggtgtg	caaaaaagcg	gttagctcct	7980
tgggtcctcc	gatcgttggtc	agaagtaagt	tggccgcagt	gttatcactc	atgggttatgg	8040
cagcactgca	taattctctt	actgtcatgc	catccgtaag	atgcttttct	gtgactgggtg	8100
agtactcaac	caagtcattc	tgagaatagt	gtatgcggcg	accgagttgc	tcttgcccg	8160
cgtcaatacg	ggataatacc	gcgccacata	gcagaacttt	aaaagtgcctc	atcattggaa	8220
aacgtttctt	ggggcgaaaa	ctctcaagga	tcttaccgct	gttgagatcc	agttcgatgt	8280
aacccactcg	tgcacccaac	tgatcttcag	catcttttac	tttcaccagc	gtttctgggt	8340
gagcaaaaac	aggaaggcaa	aatgccgcaa	aaaagggaat	aaggcgacac	cggaaatgtt	8400
gaatactcat	actcttcctt	tttcaatatt	attgaagcat	ttatcagggt	tattgtctca	8460
tgagcggata	catatttgaa	tgtatttaga	aaaataaaca	aatagggggt	ccgcgcacat	8520
ttccccgaaa	agtgccacct					8540

<210> 58
 <211> 9209
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 <400> 58

gacgtcgcgg	ccgctctagg	cctccaaaaa	agcctcctca	ctacttctgg	aatagctcag	60
agggcgaggc	ggcctcggcc	tctgcataaa	taaaaaaaat	tagtcagcca	tgcattggggc	120
ggagaatggg	cggaaactgg	cggagttagg	ggcgggatgg	gcggagttag	gggagggact	180
atgggttgctg	actaattgag	atgcatgctt	tgcatacttc	tgctgctgg	ggagcctggg	240
gactttccac	acctgggtgc	tgactaattg	agatgcatgc	tttgcatact	tctgctgct	300
ggggagcctg	gggactttcc	acaccctaac	tgacacacat	tccacagaat	taattcccct	360
agttattaat	agtaatcaat	tacgggggtca	ttagttcata	gcccataat	ggagttccgc	420
gttacataac	ttacggtaaa	tggcccgct	ggctgaccgc	ccaacgaccc	ccgcccattg	480

acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa	540
tgggtggact atttacggta aactgccac ttggcagta atcaagtgt tcatatgcc	600
agtaagcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagta	660
atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc	720
atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat accggtttga ctcaagcgga	780
tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg	840
gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgt	900
cggtgggagg tctatataag cagagctggg tacgtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc	960
catcacagat ctctcactat ggattttcag gtgcagatta tcagcttccg gctaactcag	1020
gcttcagtca taatgtccag aggacaaatt gttctctccc agtctccage aatcctgtct	1080
gcctctccag gggagaaggc cacaatgact tgcagggcca gctcaagtgt aagttacatc	1140
cactgggttc agcagaagcc aggatccccc cccaaacct ggatttatgc cacatccaac	1200
ctggcttctg gagtccctgt tcgcttcagt ggcagtgggt ctgggacttc ttactctctc	1260
acaatcagca gagtggaggc tgaagatgct gccacttatt actgccagca gtggactagt	1320
aacccaacca cgttcggagg ggggaccaag ctggaaatca aacgtacggg ggcgtcacca	1380
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg	1440
tgctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaagggt ggataacgcc	1500
ctccaatcgg gtaactcca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac	1560
agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc	1620
tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag	1680
tggtgaattc agatccgtta acggttaaca actacctaga ctggattcgt gacaacatgc	1740
ggcgtgata tctacgtatg atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt	1800
gtttgcccct ccccggtgcc ttcttgacc ctggaagggt ccaactccac tgcctttcc	1860
taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat tctgggggggt	1920
ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat	1980
gcggtgggct ctatggaacc agctggggct cgacagctat gccaaagtac cccctattg	2040
acgtcaatga cggtaaattg cccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttatgggact	2100
ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggt atgcggttt	2160
ggcagtagat caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc	2220

ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaagtgtc 2280
 gtaacaactc egccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata 2340
 taagcagagc tgggtacgtc ctcacattca gtgatcagca ctgaacacag acccgtcgac 2400
 atgggttggg gcctcatctt gctcttcctt gtgctgttg ctacgcgtgt cctgtcccag 2460
 gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc 2520
 tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct 2580
 ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatcccgaa atggtgatac ttctacaaat 2640
 cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 2700
 cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac 2760
 tacggcggtg actggtactt caatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctctgca 2820
 gctagcacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 2880
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 2940
 tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtctca 3000
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 3060
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agcagagccc 3120
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 3180
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 3240
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 3300
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 3360
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 3420
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 3480
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 3540
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 3600
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 3660
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 3720
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 3780
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgaggatccg ttaacggtta ccaactacct 3840
 agactggatt cgtgacaaca tgcggccgtg atatctacgt atgatcagcc togactgtgc 3900

cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccgt gccttccttg accctggaag 3960
 gtgccactcc cactgtcctt tctaataaa atgaggaaat tgcacgcat tgtctgagta 4020
 ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtg ggcaggacag caagggggag gattgggaag 4080
 acaatagcag gcatgctggg gatgcgggtg gctctatgga accagctggg gctcgacagc 4140
 gctggatctc cggatcccca gctttgcttc tcaatttctt atttgcataa tgagaaaaaa 4200
 aggaaaatta attttaacac caattcagta gttgattgag caaatgcgtt gccaaaaagg 4260
 atgctttaga gacagtgttc tctgcacaga taaggacaaa cattattcag agggagtacc 4320
 cagagctgag actcctaagc cagtgagtgg cacagcattc tagggagaaa tatgcttgtc 4380
 atcacgaag cctgattccg tagagccaca ccttggttaag ggccaatctg ctacacagc 4440
 atagagaggg caggagccag ggcagagcat ataaggtgag gtaggatcag ttgctcctca 4500
 catttgcttc tgacatagtt gtgttgggag cttggatagc ttggacagct cagggtgcg 4560
 atttcgccc aaacttgacg gcaatcctag cgtgaaggct ggtaggattt tatccccgt 4620
 gccatcatgg ttcgaccatt gaactgcac gtcgccgtgt cccaaaatat ggggattggc 4680
 aagaacggag acctaccctg gcctccgctc aggaacgagt tcaagtactt ccaaagaatg 4740
 accacaacct cttcagtgga aggtaaacag aatctggtga ttatgggtag gaaaacctgg 4800
 ttctccattc ctgagaagaa tgcaccttta aaggacagaa ttaatatagt tctcagtaga 4860
 gaactcaaag aaccaccacg aggagctcat tttcttgcca aaagtttgga tgatgcctta 4920
 agacttattg aacaaccgga attggcaagt aaagtagaca tggtttggtat agtcggaggc 4980
 agttctgttt accaggaagc catgaatcaa ccaggccacc ttagactctt tgtgacaagg 5040
 atcatgcagg aatttgaaag tgacacgttt ttcccagaaa ttgatttggg gaaatataaa 5100
 cttctcccag aataccaggc cgtcctctct gaggtccagg aggaaaaagg catcaagtat 5160
 aagtttgaag tctacgagaa gaaagactaa caggaagatg ctttcaagtt ctctgctccc 5220
 ctctaaagc tatgcatttt tataagacca tgggactttt gctggcttta gatcagcctc 5280
 gactgtgctt tctagtgtcc agccatctgt tgtttgcccc tccccgtgc cttccttgac 5340
 cctggaaggt gccactccca ctgtccttct ctaataaaat gaggaattg catcgcattg 5400
 tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tgggtgggg caggacagca agggggagga 5460
 ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcgggtggg tctatggaac cagctggggc 5520
 tcgagctact agctttgctt ctcaatttct tatttgcata atgagaaaaa aaggaaaatt 5580
 aattttaaca ccaattcagt agttgattga gcaaatgcgt tgccaaaaag gatgctttag 5640

agacagtgtt ctctgcacag ataaggacaa acattattca gagggagtac ccagagctga 5700
 gactcctaag ccagtgagtg gcacagcatt ctagggagaa atatgcttgt catcacgaa 5760
 gcctgattcc gtagagccac accttggtaa gggccaatct gctcacacag gatagagagg 5820
 gcaggagcca gggcagagca tataagggtga ggtaggatca gttgtcctc acatttgctt 5880
 ctgacatagt tgtgttgga gcttggtatc atcctctatg gttgaacaag atggattgca 5940
 cgcaggttct cgggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac 6000
 aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgccc cggttctttt 6060
 tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc 6120
 gtggctggcc acgacgggcg ttccttgccg agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg 6180
 aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctcaccttgc 6240
 tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc 6300
 ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat 6360
 ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc 6420
 cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgaccca 6480
 tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga 6540
 ctgtggcggg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggtta ccgtgatat 6600
 tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttctc gtgctttacg gtatcgccgc 6660
 tcccgattcg cagcgcatcg cttctatcg cttcttgac gagttcttct gagcgggaact 6720
 ctggggttcg aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga ttctgattcc 6780
 accgccgcct tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg 6840
 atcctccagc ggggggatct catgctggag ttcttcgccc accccaactt gtttattgca 6900
 gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaatt tcacaaataa agcatttttt 6960
 tcaactgcatt ctagtgtggg tttgtccaaa ctcatcaatc tatcttatca tgtctggatc 7020
 gcggccgcga tcccgctcag agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa 7080
 attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct 7140
 ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc 7200
 agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg 7260
 gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttctc cgtcactga ctcgctgcgc tcggctgttc 7320

ggctgcggcg agcgggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag 7380
 gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa 7440
 aggcgcggtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc 7500
 gacgctcaag tcagagggtg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc 7560
 ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttacggga tacctgtccg 7620
 cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt 7680
 cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc 7740
 gctgcgcctt atccggtaac tctcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc 7800
 cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag 7860
 agttcttgaa gtgggtggct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg 7920
 ctctgctgaa gccagttacc ttcgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa 7980
 ccaccgctgg tagcgggtgg tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag 8040
 gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtggt aacgaaaact 8100
 cacgttaagg gatcttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa 8160
 attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt 8220
 accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag 8280
 ttgectgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca 8340
 gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc 8400
 agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgc tccatccagt 8460
 ctattaattg ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg 8520
 ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cagctcgtc gtttggtatg gcttcattca 8580
 gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg 8640
 ttagctcctt cggctcctcg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca 8700
 tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgctttctg 8760
 tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagt tatgcccga ccgagttgct 8820
 cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgcacatag cagaacttta aaagtgtca 8880
 tcattgaaa acgttctctg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca 8940
 gttogatgta accactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg 9000
 tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac 9060
 ggaaatggtg aataactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt 9120
 attgtctcat gagcggatag atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc 9180
 cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacct 9209

<210> 59
<211> 384
<212> ADN
<213> Mus musculus

5

<400> 59

```

atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc      60
agaggggcaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag      120
gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tccactgggt ccagcagaag      180
ccaggatcct cccccaacc ctggatttat gccacatcca acctggtctc tggagtcctt      240
gttcgcttca gtggcagtg gtctgggact tcttactctc tcacaatcag cagagtggag      300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggacta gtaaccacc caggttcgga      360
ggggggacca agctggaaat caaa                                           384

```

10

<210> 60
<211> 128
<212> PRT
<213> Mus musculus

15

<400> 60

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1           5           10           15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
          20           25           30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
          35           40           45

Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
          50           55           60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65           70           75           80

Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
          85           90           95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
          100          105          110

Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          115          120          125

```

ES 2 538 342 T3

<210> 61
<211> 420
<212> ADN
<213> Mus musculus

5

<400> 61

```

atggggttggg gctcatctt gctcttcctt gtcgctgttg ctacgcgtgt cctgtcccag    60
gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc    120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct    180
ggtcgggggccc tggaatggat tggagctatt tatcccgga atggtgatac ttctacaat    240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg    300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac    360
tacggcggtg actggtactt caatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctctgca    420

```

10

<210> 62
<211> 140
<212> PRT
<213> Mus musculus

15

<400> 62

```

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
1           5           10           15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
          20           25           30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35           40           45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
          50           55           60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
65           70           75           80

```

ES 2 538 342 T3

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

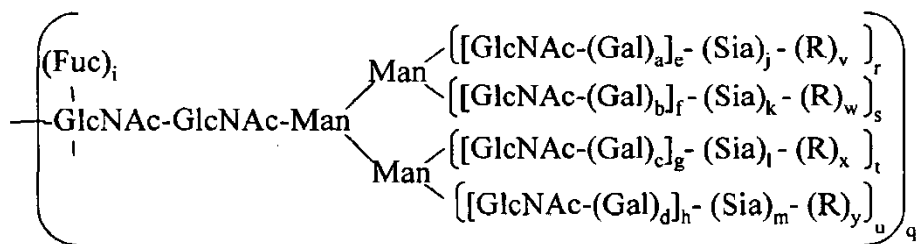
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro*, sin células de formación de un conjugado entre un péptido de la hormona estimuladora del folículo (FSH) y un polímero soluble en agua, en el que el polímero soluble en agua se une covalentemente al péptido de FSH a través de un grupo de unión a glicosilo intacto, estando dicho grupo de unión a glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente tanto al péptido como al polímero soluble en agua, en el que el polímero soluble en agua no es un azúcar de origen natural y está seleccionado del grupo que consiste en óxidos de polialquileno y polipéptidos, comprendiendo el péptido de FSH un resto de glicosilo que tiene la fórmula:



10 en la que

- a, b, c, d, i, q, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1;
e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros entre 0 y 6;
j, k, l y m son miembros independientemente seleccionados de los números enteros entre 0 y 100;
v, w, x e y son 0; y

15 R es un grupo modificador, una manosa o una oligomanosa, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) poner en contacto el péptido de FSH con una glicosiltransferasa y un donante de glicosilo modificado, que comprende un resto de glicosilo que es un sustrato para la glicosiltransferasa unido covalentemente al polímero soluble en agua, en condiciones apropiadas para la formación del grupo de unión a glicosilo intacto.

20 2.-El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho óxido de polialquileno está seleccionado de poli(etilenglicol), preferentemente poli(etilenglicol) lineal o ramificado.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho poli(etilenglicol) tiene un grado de polimerización que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 20.000, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.000 y más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000.

25 4.- El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho grupo de unión a glicosilo intacto se une con un miembro que seleccionado de un resto de carbohidrato de dicho péptido de FSH, un resto de aminoácido de dicho péptido de FSH y combinaciones de los mismos, en el que cuando dicho grupo de unión a glicosilo intacto está unido a un resto de carbohidrato de dicho péptido, dicho resto de carbohidrato es un glicano unido a N o unido a O o una combinación de los mismos, y cuando dicho grupo de unión a glicosilo intacto está unido a un resto de aminoácido de dicho péptido, este está unido a grupos hidroxilo o amino o a combinaciones de los mismos de dicho resto de aminoácido.

35 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho grupo de unión a glicosilo intacto es un resto de glicosilo en el que el monómero sacárido individual que une dicho grupo modificador con dicho péptido de FSH, como se define en la reivindicación 1, no está oxidado, y en el que, preferentemente dicho donante de glicosilo está seleccionado de (i) azúcares de nucleótidos, (ii) azúcares activados y (iii) sacáridos que no son de nucleótidos ni están activados, en el que en dicho donante de glicosilo modificado dicho grupo modificador está unido covalentemente a dicho azúcar de nucleótido, azúcar activado o sacárido, en el que, más preferentemente, dicho azúcar de nucleótido está seleccionado del grupo que consiste en UDP-glucósido, CMP-glucósido y GDP-glucósido y está seleccionado preferentemente del grupo que consiste en UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, UDP-N-acetilgalactosamina, UDP-N-acetilglucosamina, GDP-manosa, GDP-fucosa, CMP-ácido siálico, CMP-NeuAc.

40 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho grupo de unión a glicosilo intacto comprende restos de ácido siálico, galactosa, N-acetilglucosamina y/o N-acetilgalactosamina, en el que, preferentemente, dicho grupo modificador está unido a un resto de ácido siálico en una posición que es un miembro seleccionado de la posición 5- y 9- de dicho ácido siálico.

45 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha glicosiltransferasa está seleccionada del grupo que consiste en sialiltransferasa, galactosiltransferasa, glucosiltransferasa, GalNAc transferasa, GlcNAc transferasa, fucosiltransferasa y manosiltransferasa, en el que, preferentemente, la glicosiltransferasa se produce recombinantemente, en el que, más preferentemente, dicha glicosiltransferasa

producida recombinantemente es una enzima procariota recombinante o una enzima eucariota recombinante.

8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que adicionalmente comprende:

(b) antes de la etapa (a) poner en contacto el péptido de FSH con una sialidasa en condiciones apropiadas para retirar el ácido siálico del péptido de FSH, en el que, preferentemente, la sialidasa es Neuraminidasa II,

5 y/o comprendiendo dicho procedimiento adicionalmente:

(c) poner en contacto el producto de la etapa (a) con una sialiltransferasa y un donante de ácido siálico en condiciones apropiadas para transferir ácido siálico al producto, en el que, preferentemente, la sialiltransferasa es ST3Gal3 y el donante de ácido siálico es CMP-SA o CMP-SA-PEG,

y/o comprendiendo dicho procedimiento adicionalmente:

10 (d) antes de la etapa (a), poner en contacto el péptido de FSH con una galactosidasa en condiciones apropiadas para retirar la galactosa del péptido de FSH,

y/o comprendiendo dicho procedimiento adicionalmente:

(e) antes de la etapa (a) poner en contacto el péptido de FSH con una combinación de una glucosidasa y una sialidasa,

15 y/o comprendiendo adicionalmente dicho procedimiento:

(f) antes de la etapa (a), poner en contacto el péptido de FSH con una galactosil transferasa y un donante de galactosa en condiciones apropiadas para transferir la galactosa al péptido de FSH,

y/o comprendiendo adicionalmente dicho procedimiento:

20 (g) poner en contacto el producto de la etapa (a) con un resto que reacciona con el polímero soluble en agua, mediante lo cual se forma un conjugado entre el grupo de unión a glicosilo intacto y el resto

y/o comprendiendo adicionalmente dicho procedimiento:

(h) antes de la etapa (b), poner en contacto el péptido de FSH con una endoglucanasa en condiciones apropiadas para escindir un resto de glicosilo del péptido FSH, y/o comprendiendo adicionalmente dicho procedimiento:

25 (i) antes de la etapa (a), poner en contacto el péptido de FSH con una N-acetilglucosamina transferasa y un donante de GlcNAc en condiciones apropiadas para transferir GlcNAc al péptido de FSH.

9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que a, b, c, d, i, j, k, l, m, q, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; e, f, g y h son 1; y v, w, x e y son 0,

30 o como alternativa, a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, q, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1;

v, w, x e y son 0,

o como alternativa, a, b, c, d, f, h, j, k, l, m, s, u, v, w, x e y son 0; y e, g, i, q, r y t son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1,

35 o como alternativa a, b, c, d, e, f, g, h, j, k, l y m son 0; i, q, r, s, t, u, v, w, x e y son independientemente seleccionados de 0 y 1; R (ramificado o lineal) es un miembro seleccionado de un grupo modificador, manosa y oligomanosa,

o como alternativa a, b, c, d, e, f, g, h, j, k, l, m, r, s, t, u, v, w e y son 0; i es 0 o 1; y q es 1.

40 10. Un conjugado del péptido de FSH formado por el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. El conjugado del péptido de FSH de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en un procedimiento de fertilización *in vitro* o en un procedimiento de estimulación de fertilización.

12. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado del péptido de FSH de acuerdo con la reivindicación 10 y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

45

12AP1/E5 -- Viventia Biotech	AI-201-Autoimmune
1964-Aventis	AI-301-Autoimmune
hormona del crecimiento 20K - AMUR	Vacuna del SIDA - ANPS, CIBG, Hesed
28P6/E6 - Viventia Biotech	Biomed, Hollis-Eden, Roma, United
3-Hidroxifitaloil-beta-lactoglobulina-	Biomedical, American Home Products,
terapia génica con ligando 4-IBB -	Maxygen
conjugado 64-Cu MAb TETA-1A3 -	ligando de receptores de las vías respiratorias -
Mallinckrodt Institute of Radiology	IC Innovations
conjugado 64-Cu MAb TETA-CT84.66	- AJvW 2 -- Ajinomoto
conjugado 64-Cu Trastuzumab TETA -	AK30NGF-Alkermes
Genentech	Albuferon - Human Genome Sciences
A200-Amgen	albúmina - Biogen, DSM Anti-Infectives,
A10255-EN Liliy	Genzyme Transgenics, PPL Therapeutics,
A1PDX- Hedral Therapeutics	TranXenoGen, Welfide Corp.
A6 -- Angstrom	aldesleukina - Chiron
aaAT-III - Genzyme	alefacept - Biogen
Abciximab - Centocor	Alemtuzumab -
ABI.001 -Atlantic BioPharmaceuticals	Terapia para la alergia - ALK-Abello/Maxygen,
ABT-828-Abbott	ALK-Abello/RP Scherer
Acutina	vacunas de alergia - Allergy Therapeutics
Actinohivina	Alnidofibatida - Aventis Pasteur
activina - Biotech Australia, Human	Alnorine-SRC VB VECTOR
Therapeutics	ALP 242 -- Gruenenthal
activina - Curis	Alfa antitripsina - Arriva/Hyland
AD439-Tanox	Immuno/ProMetic/Protease Sciences
AD519-Tanox	Alfa-1 antitripsina - Cutter, Bayer, PPL
Adalimumab - Cambridge Antibody Tech.	Therapeutics, Profile, ZymoGenetics,
Vacuna de Adenocarcinoma - Biomira - NIS	Arriva
Antagonistas del receptor de Adenosina A2B -	inhibidor de Alfa-1 proteasa - Genzyme
Adenosine Therapeutics	Transgenics, Welfide Corp.
ADP-001 -Axis Genetics	Proteína de fusión alfa-galactosa -
AF 13948-Affymax	Immunomedics
Afelimomab - Knoll	Alfa-galactosidasa A - Research
AFP-SCAN - Immunomedics	Corporation Technologies
AG2195-Corixa	Alfa-glucosidasa- Genzyme, Novazyme
agalsidasa alfa - Transkaryotic Therapies	Alfa-lactoalbúmina
agalsidasa beta - Genzyme	Alfa-L-iduronidasa -- Transkaryotic
AGENT-Antisoma	Therapies, BioMarin
AI 300 - Autoimmune	alteplasa -- Genentech
AI-101-Teva	alvircept sudotox -- NIH
AI-102-Teva	ALX1-11 -sNPS Pharmaceuticals
	terapia génica para Enfermedad de Alzheimer -

FIG. 1A

AM-133-AMRAD	conjugado MAb Anti-B4 -DC1 -- ImmunoGen
conj. inmunoestim Amb a 1 - Dynavax	anticuerpo PRIMATIZADO Anti-B7 - IDEC
AMD 3100 -AnorMED-NIS	MAb Anti-B7-1 16-10A1
AMD 3465-AnorMED-NIS	MAb Anti-B7-11G10
AMD 3465-AnorMED-NIS	MAb Anti-B7-2 GL-1
AMD Fab - Genentech	Anti-B7-2- inmunotoxina gelonina -
Amediplasa - Menarini, Novartis	Antibacterianos/antifúngicos --
AM-F9	Diversa/IntraBiotics
Vacuna de la amebiasis	anticuerpos monoclonales Anti-beta-amiloide -
Anfiregulina - Octogene	Cambridge Antibody Tech., Wyeth-Ayerst
anakinra - Amgen	anticuerpos Anti-BLyS - Cambridge
analgésico - Nobex	Antibody Tech. /Human Genome Sciences
ancestim - Amgen	conjugados anticuerpo-fármaco - Seattle
AnergiX.RA - Corixa, Organon	Genetics/Eos
Angiocidina - InKine	MAb Anti-C5 BB5-1 - Alexion
inhibidores de angiogénesis - ILEX	MAb Anti-C5 N19-8-Alexion
AngioMab - Antisoma	MAb Anti-C8
Angiopoyetinas - Regeneron/Procter &	citoquinas antiCáncer - BioPulse
Gamble	matriz antiCáncer - Telios Integra
angiostatina - EntreMed	Anticuerpos monoclonales antiCáncer - ARIUS,
terapia génica con Angiostatina/endostatina --	Immunex
Genetix Pharmaceuticals	péptidos antiCáncer - Maxygen, Micrologix
angiotensina-II, tópica - Maret	Profármaco antiCáncer Tech. - Alexion
Ántrax - EluSys Therapeutics/US Army	Anticuerpo Technologies
Medical Research Institute	Troy-Bodies antiCáncer -- Affile - Affitech
vacuna del ántrax	vacuna antiCáncer - NIH
Anticuerpos monoclonales Anti-factor de	antiCáncer es -- Epimmune
crecimiento derivado de plaquetas D humano -	MAb de oveja Anti-CCR5/CXCR4 -- KS
CuraGen	Biomedix Holdings
MAb Anti-17-1A 3622W94 --	MAb Anti-CD11a KBA-
GlaxoSmith Kline	MAb Anti-CD11a M17
MAb Anti-2C4 - Genentech	MAb Anti-CD11a TA-3-
anticuerpos monoclonales anti-4-1BB -- Bristol	MAb Anti-CD11a WT.1-
Myers Squibb	MAb Anti-CD11b -- Pharmacia
Plataforma Anti-Adhesión Tech. - Cytovax	MAb Anti-CD11b LM2
MAb Anti-adipocito- Cambridge Anticuerpo	MAb Anti-CD154 --Biogen
Tech./ObeSys	MAb Anti-CD16-anti-CD30 -- Biotest
antialérgicos - Maxygen	MAb Anti-CD18 - Pharmacia
vacuna antialergia -- Acambis	MAb Anti-CD19 B43-
MAb Anti-alfa-4-integrina	conjugado MAb Anti-CD19 -
anticuerpos monoclonales Anti-angiogénesis -	butirato de sodio liposomal
KS Biomedix/Schering AG	

FIG 1B

conjugado MAb Anti-CD19 -saporina -	MAb Anti-CD4 KT6
Anti-CD19-dsFv-PE38-inmunotoxina -	MAb Anti-CD4 OX38
MAb Anti-CD2 12-15-	conjugado MAb Anti-CD4 PAP -- Bristol-
MAb Anti-CD2 B-E2 - Diaclone	Myers Squibb
MAb Anti-CD2 OX34-	MAb Anti-CD4 RIB 5-2
MAb Anti-CD2 OX54-	MAb Anti-CD4 W3/25
MAb Anti-CD2 OX55-	MAb Anti-CD4 YTA 3.1.2
MAb Anti-CD2 RM2-1	MAb Anti-CD4 YTS177-9
MAb Anti-CD2 RM2-2	MAb Anti- ligando CD40 5c8 -- Biogen
MAb Anti-CD2 RM2-4	MAb Anti-CD40
MAb Anti-CD20 BCAB20	MAb Anti-CD40 5D12-Tanox
MAb biespecifico Anti-CD20-anti-Fc alfa RI -	-MAb Anti-CD44 A3D8
Medarex, Tenovus	MAb Anti-CD44 GKWA3
complejo MAb Anti-CD22 -saporina-6 -	MAb Anti-CD44 IM7
inmunotoxina Anti-CD3 -	MAb Anti-CD44 KM81
MAb Anti-CD3 145-2C11 -- Pharming	anticuerpos monoclonales variante MAb Anti-CD44
conjugado MAb Anti-CD3 CD4IgG --	Corixa/Hebrew University
Genentech	MAb Anti-CD45 BC8-I-131
MAb Anti-CD3 humanizado - Protein	MAb Anti-CD45RB
Design, RW Johnson	MAb Anti-CD48 HuLy-m3
MAb Anti-CD3 WT32	MAb Anti-CD48 WM-63
conjugado MAb Anti-CD3 --cadena-A-ricina	MAb Anti-CD5 - Becton Dickinson
conjugado MAb Anti-CD3 -xantina-oxidasa	MAb Anti-CD5 OX19
conjugado	
MAb Anti-CD30 BerH2 -- Medac	MAb Anti-CD6
conjugado MAb Anti-CD30 -saporina	conjugado MAb Anti-CD7 -PAP
Anti-CD30-scFv-ETA'-inmunotoxina	conjugado MAb Anti-CD7 - cadena-A-ricina
MAb Anti-CD38 AT13/5	MAb Anti-CD8 - Amerimmune, Cytodyn,
conjugado MAb Anti-CD38 -saporina	Becton Dickinson
MAb biespecifico Anti-CD3-anti-CD19	MAb Anti-CD8 2-43
MAb Anti-CD3-anti-EGFR	MAb Anti-CD8 OX8
MAb Anti-CD3-anti- receptor de interleuquina-2-	MAb Anti-CD80 P16C10-IDEC
MAb Anti-CD3-anti-MOv18 - Centocor	MAb Anti-CD80 P7C10 - ID Vaccine
MAb biespecifico Anti-CD3-anti-SCLC	conjugado MAb Anti-CD8-idarrubicina
vacuna de idiotipo Anti-CD4	MAb Anti-CEA CE-25
MAb Anti-CD4 - Centocor, IDEC	MAb Anti-CEA MN 14 - Immunomedics
Pharmaceuticals, Xenova Group	conjugado MAb Anti-CEA MN14-PE40 -
MAb Anti-CD4 16H5	Immunomedics
MAb Anti-CD4 4162W94-- GlaxoSmithKline	conjugado MAb Anti-CEA T84.66-interleuquina-2
MAb Anti-CD4 B-F5 - Diaclone	MAb de oveja Anti-CEA -- KS Biomedix
MAb Anti-CD4 GK1-5	Holdings

FIG. 1C

anticuerpos monoclonales Anti-superficie celular -- Cambridge Antibody Tech. /Pharmacia
MAB bifuncional Anti-c-erbB2-anti-CD3 -- Otsuka
MAB Anti-CMV - Scotgen
MAB Anti-CTLA-4
anticuerpo catalítico Anti-EGFR - Hesed Biomed
inmunotoxina anti-EGFR - IVAX
MAB Anti-EGFR -- Abgenix
MAB Anti-EGFR 528
MAB Anti-EGFR KSB 107 - KS Biomedix
conjugado MAB Anti-EGFR -DM1 -- ImmunoGen

MAB Anti-EGFR -LA1 -
MAB de oveja Anti-EGFR - KS Biomedix
MAB Anti-FAP F19-I-131
MAB Anti-Fas IgM CH11
MAB Anti-Fas Jo2
MAB Anti-Fas RK-8

anticuerpos monoclonales Anti-Flt-1 - ImClone
péptidos anti-fúngicos - State University of New York
tripéptidos antifúngicos - BTG
proteína de fusión anticuerpo Anti-gangliósido GD2 -
interleuquina-2 - Lexigen
MAB Anti-GM2 - Kyowa
anticuerpos monoclonales Anti- receptor GM- CSF -- AMRAD
Anti-gp130 --Tosoh
anticuerpos monoclonales Anti-HCA - AltaRex/Epigen
anticuerpos Anti-hCG -- Abgenix/AVI BioPharma
anticuerpos monoclonales humanos Anti-heparanasa - Oxford Glycosciences/Medarex
anticuerpos monoclonales humanos Anti-virus de hepatitis C - XTL Biopharmaceuticals
terapia génica con anticuerpo Anti-HER-2
anticuerpo Anti-herpes - Epicyte

anticuerpo anti-VIH - Epicyte
anticuerpo catalítico anti-VIH -- Hesed Biomed
proteína de fusión anti-VIH - Idun
proteínas anti-VIH - Cangene
MAB Anti-HM1-24 -- Chugai
MAB Anti-hR3
MAB Anti-Antígeno-Carcinoma-Humano - Epicyte
MAB Anti-ICAM-1 - Boehringer Ingelheim
MAB Anti-ICAM-1 1A-29 - Pharmacia
MAB Anti-ICAM-1 HA58
MAB Anti-ICAM-1 YN1/1.7.4
MAB Anti-ICAM-3 ICM3-ICOS
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer mamario 11D10
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer mamario ACA14C5-
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer - ImClone Systems/Merck KGaA ImClone, Viventia Biotech
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer 1A7 - Titan
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer 3H1 - Titan
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer TriAb - Titan
vacuna Anti-idiotipo de *Chlamydia trachomatis*
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer colorrectal -- Novartis

vacuna Anti-idiotipo de Cáncer colorrectal -- Onyvax
vacuna Anti-idiotipo de melanoma -- IDEC Pharmaceuticals
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer de ovario ACA 125
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer de ovario AR54 - AltaRex

vacuna Anti-idiotipo de Cáncer de ovario CA 125 - AltaRex, Biomira
anticuerpo catalítico Anti-IgE - Hesed Biomed
MAB Anti-IgE E26 - Genentech
MAB Anti-IGF-1
anti-inflamatorio - GeneMax
péptido anti-inflamatorio - BTG

FIG. 1D

péptidos anti-integrina - Burnha	MAB Anti-mu - Novartis
MAB Anti-receptor-interferón-alfa 64G12	MAB Anti-MUC-1
Pharma Pacific Management	MAB Anti-Nogo-A IN1
MAB Anti-interferón-gamma - Protein	autoanticuerpos Anti-nucleares -- Procyon
Design Labs	anticuerpos monoclonales Anti-Cáncer ovárico-
anticuerpo policlonal Anti-interferón-	-Dompe
gamma - Advanced Biotherapy	anticuerpos monoclonales Anti-p185
MAB Anti-interleuquina-10 -	MAB Anti-p43
MAB Anti-interleuquina-12 -	Vacunas antiparasitarias
Anticuerpo policlonal Anti-interleuquina-1 -beta	MAB de oveja Anti-PDGF/bFGF - KS
R&D Systems	
MAB Anti-receptor interleuquina-2 2A3	Biomedix
MAB Anti-receptor interleuquina-2 33B3-1 --	anticuerpos monoclonales Anti-properdina -
Immunotech	Abgenix/Gliatech
MAB Anti-receptor interleuquina-2 ART-18	MAB Anti-PSMA J591 - BZL Biologies
MAB Anti-receptor interleuquina-2 LO-Tact-1	terapia génica de MAB Anti-Rev -
MAB Anti-receptor interleuquina-2	anticuerpos Anti-RSV - Epicyte, Intracell
Mikbeta1	anticuerpos monoclonales Anti-RSV -
MAB Anti-receptor interleuquina-2 NDS61	Medarex/MedImmune, Applied Molecular
MAB Anti-interleuquina-4 11B11	Evolution/MedImmune
MAB Anti-interleuquina-5 -- Wallace	MAB Anti-RSV, inhalación -
Laboratories	Alkermes/MedImmune
MAB Anti-interleuquina-6 - Centocor, Diaclone,	terapia génica Anti-RT
Pharmadigm	
MAB Anti-interleuquina-8 -- Xenotech	terapia génica de ARN K-ras Antisentido
MAB Anti-JL1	MAB Anti-SF-25
MAB de oveja Anti-Klebsiella -- KS	anticuerpo Anti-esperma - Epicyte
Biomedix Holdings	conjugado Anti-Tac(Fv)-PE38
conjugado MAB Anti- receptor Laminina -	MAB Anti-TAPA/CD81 AMP1
doxorubicina liposomal	terapia génica Anti-tat
MAB Anti-LCG - Cytoclonal	MAB Anti-TCR-alpha/beta H57-597
MAB Anti-lipololisacárido - VitaResc	MAB Anti-TCR-alpha/beta R73
anticuerpos monoclonales Anti-L-	MAB Anti-tenascina BC-4-1-131
selectina - Protein Design Labs, Abgenix,	anticuerpos monoclonales humanos Anti-TGF-
Stanford University	
anticuerpos monoclonales Anti-MBL -	beta -- Cambridge Antibody Tech., Genzyme
Alexion/Brigham and Women's Hospital	MAB Anti-TGF-beta 2G7 - Genentech
anticuerpos monoclonales Anti-MHC	Antitrombina III - Genzyme Transgenics,
anticuerpo humanizado Anti-MIF - IDEC,	Aventis, Bayer, Behringwerke, CSL,
Cytokine PharmaSciences	Myriad
MAB de oveja Anti-MRSA/VRSA -- KS	MAB Anti-Thy1
Biomedix Holdings	MAB Anti-Thy1.1

FIG. 1E

MAb de oveja Anti-factor tisular/factor VIIA - KS Biomedix	ARGENT sistemas de administración génica - -- ARIAD Arresten
anticuerpos monoclonales Anti-TNF - Centocor, Chiron, Peptech, Pharacia, Serono	ART-123--AsahiKasei
MAb de oveja Anti-TNF - KS Biomedix Holdings	arilsulfatasa B - BioMarin
MAb Anti-TNFalfa - Genzyme	Arilsulfatasa B, Humana recombinante -- BioMarin
MAb Anti-TNFalfa B-C7 - Diaclone	AS1051-Ajinomoto
MAb Anti-caries dental - Planet BioTech.	ASI-BCL - Intracell
ARNasas antitumorales - NIH	ATL-101--Alizyme
MAb Anti-VCAM 2A2--Alexion	péptido natriurético atrial - Pharis
MAb Anti-VCAM 3F4-Alexion	Ácido aurintricarboxílico -alto peso molecular
MAb Anti-VCAM-1	trastornos autoinmunes - GPC Biotech/MorphoSys
MAb Anti-VEC -- ImClone	Trastornos autoinmunes y rechazo de trasplante - Bristol-Myers Squibb/Genzyme Tra
MAb Anti-VEGF -- Genentech	Trastornos autoinmunes/Cáncer - Abgenix/Chiron, /CuraGen
MAb Anti-VEGF 2C3	Autotaxina
MAb de oveja Anti-VEGF - KS Biomedix Holdings	Avicidina - NeoRx
MAb Anti-VLA-4 HP1/2 - Biogen	factor de axogénesis -1 - Boston Life Sciences
MAb Anti-VLA-4 PS/2	Axokine - Regeneron
MAb Anti-VLA-4 R1-2	vacuna de linfoma de células B- Biomira
MAb Anti-VLA-4 TA-2	terapia génica B7-1 - proteínas BABS - Chiron
MAb de oveja Anti-VRE -- KS Biomedix Holdings	BAM-002 - Novelos Therapeutics
ANUP -- TranXenoGen	Bay-16-9996-- Bayer
ANUP-1-Pharis	Bay-39-9437 -- Bayer
AOP-RANTES-Senetek	Bay-50-4798 - Bayer
Apan-CH -- Praecis Pharmaceuticals	BB-10153-British Biotech
APC-8024 - Demegen	BBT-001 - Bolder BioTech,
ApoA-1 - Milano, Pharmacia	BBT-002 - Bolder BioTech.
Apogen - Alexion	BBT-003 - Bolder BioTech.
apolipoproteína A1 - Avanir	BBT-004 - Bolder BioTech.
Apolipoproteína E -- Bio-Tech. General	BBT-005 - Bolder BioTech.
Aplagina - Biogen	BBT-006 - Bolder BioTech.
aprotinina - ProdiGene	BBT-007 - Bolder BioTech.
APT-070C--AdProTech	BCH-2763-Shire
AR177 - Aronex Pharmaceuticals	BCSF -- Millenium Biologix
AR 209 - Aronex Pharmaceuticals,	BDNF - Regeneron - Amgen
Antigenics	
AR545C	

FIG.1F

Becaplermina - Johnson & Johnson, Chiron	BST-3002 - BioStratum
Bectumomab - Immunomedics	BTI322-
terapia génica Receptor Beta-adrenérgico - University of Arkansas	butirilcolinesterasa - Shire
BI 51013 - Behringwerke AG	C 6822 - COR Therapeutics
BIBH 1 - Boehringer Ingelheim	
BIM-23190 - Beaufour-Ipsen	inhibidor de esterasa C1 - Pharming
inmunoterapia de polen de abedul - Pharmacia	adyuvante C3d - AdProTech
proteínas de fusión biespecíficas - NIH	CAB-2.1 - Millennium
MAb biespecífico 2B1 -- Chiron	calcitonina - Inhale Therapeutics Systems, Aventis, Genetronics, TranXenoGen,
Bitistatina	Unigene, Rhone Poulenc Rohrer
BIWA 4 - Boehringer Ingelheim	calcitonina - oral - Nobex, Emisphere, Pharmaceutical Discovery
sustituto de sangre - Northfield, Baxter Intl.	Péptido relacionado con gen de Calcitonina-- Asahi
BLP-25 - Biomira	Kasei - Unigene
BLS-0597 - Boston Life Sciences	calcitonina, humana -- Suntory
BLyS -- Human Genome Sciences	calcitonina, nasal - Novartis, Unigene
BLyS marcado radiactivamente - Human Genome Sciences	calcitonina, Panoderm -- Elan
BM 06021 - Boehringer Mannheim	calcitonina, Peptitol - Shire
BM-202 -- BioMarin	calcitonina, salmón -- Therapicon
BM-301 - BioMarin	calina -- Biopharm
BM-301 -- BioMarin	Calfobindina I
BM-302 -- BioMarin	calfobindina I - Kowa
BMP 2 - Genetics Institute/Medtronic- Sofamor Danek, Genetics Institute/ Colágenoesis, Genetics	calreticulina - NYU
Institute/Yamanouch	Campath-1G
terapia génica BMP 2	Campath-1M
BMP 52 - Aventis Pasteur, Biopharm	terapia para el Cáncer - Cangene
BMP-2 -- Genetics Institute	Vacuna de Cáncer - Axlle, Aventis, Pasteur Center of Molecular Immunology ,
BMS 182248 - Bristol-Myers Squibb	YM BioSciences, Cytos, Genzyme, Transgenics, GlobelImmune, Igeneon,
BMS 202448 - Bristol-Myers Squibb	ImClone, Virogenetics, InterCell, Iomai, Jenner Biotherapies, Memorial Sloan-
factores de crecimiento óseo -- IsoTis	Kettering Cáncer Center, Sydney Kimmel Cáncer Center, Novavax, Protein
BPC-15-Pfizer	Sciences, Argonex, SIGA
péptido natriurético cerebral - Cáncer mamario -- Oxford	Vacuna de Cáncer ALVAC-CEA B7.1 - Aventis Pasteur/Therion Biologies
GlycoSciences/Medarex	Vacuna de Cáncer CEA-TRICOM -- Aventis Pasteur/Therion Biologies
Vacuna de Cáncer mamario - Therion Biologics, Oregon	Terapia génica Vacuna de Cáncer - Cantab Pharmaceuticals
BSSL--PPL Therapeutics	
BST-2001 - BioStratum	

FIG. 1G

Vacuna de Cáncer HER-2/neu -- Corixa	vacuna CETP - Avant
Vacuna de Cáncer THERATOPE - Biomira	Cetorelix
Vacuna de Cáncer, PolyMASC -- Valentis	Cetuximab
Vacuna de Candida - Corixa, Inhibitex	CGH 400 - Novartis
Canstatina -- ILEX	CGP 42934-Novartis
CAP-18-Panorama	CGP 51901-Tanox
terapia génica Cardiovascular - Collateral Therapeutics	CGRP -- Unigene
carperitida - Suntory	CGS 27913--Novartis
Casocidina-1 - Pharis	CGS 32359 -- Novartis
CAT 152 - Cambridge Antibody Tech.	vacuna de enfermedad de Chagas - Corixa
CAT 192 - Cambridge Antibody Tech.	Quimiocinas - Immune Response
CAT 213 - Cambridge Antibody Tech.	CHH 380 - Novartis
Catalasa- Enzon	chitinasa - Genzyme, ICOS
Cat-PAD -- Circassia	vacuna de <i>Chlamydia pneumoniae</i> - Antex Biologies
CB0006-Celltech	vacuna de <i>Chlamydia trachomatis</i> - Antex Biologies
CCK(27-32)-Akzo Nobel	vacuna de <i>Chlamydia</i> - GlaxoSmithKline
CCR2-64I-NIH	vacuna de Cólera CVD 103-HgR - Swiss Serum y Vaccine Institute Berne
CD, Procept - Paligent	vacuna de Cólera CVD 112 - Swiss Serum y Vaccine Institute Berne
terapia génica CD154	vacuna de Cólera inactivada oral - SBL Vaccin
CD39 -- Immunex	Crísalina - Chrysalis BioTech.
CD39-L2 -- Hyseq	CI-782 - Hitachi Kase
CD39-L4-Hyseq	Factor neurotrófico ciliar - Fidia, Roche
toxina de fusión CD4 - Senetek	Proyecto CIM - Active Biotech
CD4 IgG - Genentech	CL 329753 -- Wyeth-Ayerst
antagonistas de receptor CD4 - Pharmacoepia/Progenies	CL22, Cobra -- ML Laboratories
CD4 soluble -- Progenies	Clenoliximab - IDEC
CD4, soluble -- Genzyme Transgenics	anticuerpos de <i>Clostridium difficile</i> -- Epicyte
ligando CD40 - Immunex	factores de coagulación - Octagene
CD4-ricina cadena A - Genentech	CMB 401 - Celltech
terapia génica CD59 - Alexion	CNTF - Sigma-Tau
terapia celular CD8 TIL therapy -- Aventis Pasteur	vacuna de abuso de Cocaína - Cantab, ImmuLogic, Scripps
CD8, soluble - Avidex	vacuna de coccidiomicosis - Arizo
CD95 ligando - Roche	colágeno -- Type I -- Pharming
CDP571-Celltech	inhibidores de formación de colágeno -- Fibrogen
CDP850-Celltech	
CDP870-Celltech	
CDS-1 - Ernest Orlando	
Cedelizumab - Ortho-McNeil	
Cetermin - Insmmed	

FIG. 1H

Colágeno/hidroxiapatita/factor de crecimiento óseo	CY 1747 - Epimmune
Aventis Pasteur, Biopharm, Orquest	CY 1748-Epimmune
colagenasa - BioSpecifics	Cyanovirin-N
Vacuna de Cáncer Colorrectal - Wistar Institute	terapia de fibrosis quística - CBR/IVAX
Componente B, Recombinante - Serono	CYT351
Inhibidores de factores de crecimiento de tejido conectivo	- citocina Traps - Regeneron
FibroGen/Taisho	
Contortostatina	citocinas - Enzon, Cytoclonal
vacuna anticonceptiva -- Zonagen	vacuna de glucoproteína de citomegalovirus
vacuna anticonceptiva hCG	Chiron, Aquila Biopharmaceuticals,
vacuna anticonceptiva reversible masculina--	Aventis Pasteur, Virogenetics
IMMUCON	vacuna viva de Citomegalovirus -- Aventis
vacuna anticonceptiva de la zona pelúcida -	Pasteur
Zonagen	terapia génica con citosina desaminasa
MAB marcado con Cobre 64 TETA-1A3 - NCI	GlaxoSmithKline
Coralina	DA-3003 - Dong-A
Corsevin M	DAB389interleucina-6 - Senetek
análogos del péptido-C-- Schwarz	DAB389interleucina -7
CPI-1500-Consenso	DAMPA - Incyte Genomics
CRF - Neurobiological Tech.	Daniplestim -- Pharmacia
pentaéptido cRGDfV -	darbepoetin alfa - Amgen
CRL1095--CytRx	DBI-3019 - Diabetogen
CRL1336-CytRx	DCC -- Genzyme
CRL1605-CytRx	DDF - Hyseq
CS-560 - Sankyo	decorin - Integra, Telios
CSF -- ZymoGenetics	defensinas -- Large Scale Biology
CSF-G - Hangzhou, Dong-A, Hanmi	DEGR-VIIa
CSF-GM - Cangene, Hunan, LG Chem	anticuerpo desinminuzado 3B6/22 AGEN
CSF-M - Zarix	anticuerpos desinmunizados contra el cáncer -
CT 1579-Merck Frosst	BiovationA/iragen
CT 1786- Merck Frosst	Dendroamida A
CT-112 ^A -BTG	vacuna del Dengue -- Bavarian Nordic, Merck
CTB-134L-Xenova	denileukin difitox -- Ligando
CTC-111-Kaketsuken	DES-1101--Desmos
CTGF - FibroGen	desirudina - Novartis
CTLA4-Ig - Bristol-Myers Squibb	desmopresina - Unigene
CTLA4-Ig terapia génica -	Desmoteplasa - Merck, Schering AG
CTP-37-AVIBioPharma	Destabilasa
	terapia génica para la diabetes - DeveloGen,
terapia natriurética de tipo C- Suntory	Pfizer
CVS 995 -Corvas Intl.	terapia para la diabetes - Crucell
CX397-NikkoKyodo	vacuna de la diabetes de tipo 1 -- Dyamid
	Therapeutics

FIG.11

DiaCIM - YM BioSciences	vacuna EGF-P64k - Center of Molecular Immunology
oligopeptidos dialiticos - Research Corp	EL 246 - LigoCyte
Diamyd - Diamyd Therapeutics	inhibidor de elastasa - Synergen
DiaPep227- Pepgen	elcatonina - Therapicon
DiavaX - Corixa	EMD 72000 - Merck KGaA
vacuna de la difteria-tosferina-hepatitis B -- GlaxoSmithKline	Emdogain - BIORA
DIR therapy -- Solis Therapeutics -	emfilermin - AMRAD
DNase - Genentech	Emoctakin -- Novartis
Dornase alfa - Genentech	proteina de la matriz enamel -- BIORA
Dornase alfa, inhalación - Genentech	Endo III -- NYU
Doxorubicin-anti-CEA MAb conjugado - Immunomedics	endostatina - EntreMed, Pharis
DP-107-Trimeris	Enhancins -- Micrologix
drotrecogin alfa - Eli Lilly	Enlimomab - Isis Pharm.
DTctGMCSF	Enoxaparina sódica- Pharmuka
	terapia de empobrecimiento de nutrientes con anticuerpos ligados a enzimas
vacuna de la polio DTP - Aventis Pasteur	-- KS Biomedix Holdings
DU 257-KM231 anticuerpo conjugado - Kyowa	agente neutralizante derivado de Eosinófilos-
dural graft matrix - Integra	EP-51216-AstaMedica
Dutiplase-Baxter Intl.	EP-51389-AstaMedica
DWP-401 - Daewoong	familia EPH de ligandos - Regeneron
DWP-404 - Daewoong	factor de crecimiento epidérmico - Hitachi Kasei, Johnson & Johnson
DWP-408 - Daewoong	toxina de fusión con factor de crecimiento epidérmico
Ecoli 0157 vacuna de -- NIH	Senetek
E21-R-BresaGen	factor de crecimiento epidérmico -genisteina -
virus del virus de la encefalitis equina oriental	-EPI-HNE-4-Dyax
Equicetina-	EPI-KAL2 - Dyax
Equinibina 1 -	Epoetin-alfa - Amgen, Dragon
Equistatina -- Merck	Pharmaceuticals, Nanjing Huaxin
Equitamina -	Epratuzumab - Immunomedics
EC-SOD - PPL Therapeutics	vacuna del virus de Epstein-Barr
EDF - Ajinomoto	Aviron/SmithKline Beecham, Bioresearch
derivado de EDN - NIH	Eptacog alfa - Novo Nordisk
EDNA-NIH	Eptifibatida -- COR Therapeutics
Edobacomab - XOMA	erb-38-
Edrecolomab - Centocor	Erlizumab - Genentech
EF5077	
Efalizumab - Genentech	
toxina de fusión al EGF - Seragen, Ligando	

FIG.1J

eritropoyetina – Alkermes, ProLease, Dong A, Elanex, Genetics Institute, LG Chem, Protein Sciences, Serono, Snow Brand, SRC VB VECTOR, Transkaryotic Therapies	Fas TR- Human Genome Sciences
eritropoyetina Beta - Hoffman La Roche	Felvizumab - Scotgen
eritropoyetina /Epoetina alfa - Chugai	FFR-VIIa- Novo Nordisk
Vacuna de Escherichia coli - North American	FG-001-F-Gene
Vacuna, SBL Vaccin, Swiss Serum and	FG-002-F-Gene
Vacuna Institute Berne	FG-004 - F-Gene
etanercept - Immunex	FG-005 - F-Gene
examorelina - Mediolanum	FGF + fibrina - Repair
exonuclease VII	Fibrimage - Bio-Tech. General
F 105-Centocor	péptidos de unión a fibrina - ISIS Innovation
F-992 - Fornix	fibrinógeno – PPL Therapeutics, Pharming
Factor IX - Alfa Therapeutics, Wellfide Corp., CSL, enetics Institute/AHP, Pharmacia, PPL Therapeutics	factor de crecimiento se fibroblastos - Chiron, NYU, Ramot, ZymoGenetics
Factor IX terapia génica – Cell Genesys	conjugado de fibrolasa - Schering AG
Factor VII - Novo Nordisk, Bayer, Baxter Intl.	Filgrastim -- Amgen
Factor VIIa – PPL Therapeutics, ZymoGenetics	filgrastim - PDA modified - Xencor
Factor VIII - Bayer Genentech, Beaufour-Ipsen, CLB, Inex, Octagen, Pharmacia, Pharming	ligando FLT-3 - Immunex
Factor VIII - PEGilado – Bayer	FN18CRM9-
fragmentos del Factor VIII - Pharmacia	follistatina - Biotech Australia, Human Therapeutics
Factor VIII terapia génica - Targeted Genetics	follitropin alfa - Alkermes, ProLease, PowderJect, Serono, Akzo Nobel
formulación con sacarosa Factor VIII - Bayer, Genentech	Follitropin Beta - Bayer, Organon
Factor VIII-2--Bayer	FP59
Factor VIII-3 -- Bayer	FSH - Ferring
inhibidores del Factor Xa - Merck, Novo Nordisk, Mochida	FSH + LH -- Ferring
Factor XIII - ZymoGenetics	F-spondina -- CeNeS
Factores VIII y IX terapia génica - GeneticsG-CSF - Amgen, SRC VB VECTOR	sistema de administración de proteína de fusión -- UAB Research Foundation
Institute/Targeted Genetics	ftoxinas de fusión - Boston Life Sciences
Famoxin - Genset	G 5598 - Genentech
proteína Fas (delta) TM - LXR BioTech.	GA-II – Transkaryotic Therapies
	análogos de interferón gamma– SRC VB VECTOR
	lipasa gástrica - Meristem
	Gavilimomab -
	GDF-1--CeNeS
	GDF-5 - Biopharm
	GDNF-- Amgen

FIG. 1K

gelsolin -- Biogen	vacuna H5N1 del virus de la gripe A - Protein Sciences
Gemtuzumab ozogamicin - Celltech	hemoglobina -- Biopure
epoetin-alfa activada por genes- Aventis Pharma -- Transkaryotic Therapies	hemoglobina 3011, Recombinante- Baxter - Healthcare
Terapia génica para la trombostenia de Glanzmann	hemoglobina crosumarilo- Baxter Intl.
Glatiramer acetate - Yeda	hemoglobina estabilizada - Ajinomoto
glial growth factor 2 - CeNeS	hemoglobina, recombinante -- Apex
GLP-1 - Amylin, Suntory, TheraTech, Watson	Respuesta Inmunitaria -- HAF
GLP-1 peptide analogues - Zealand Pharmaceuticals	vacuna Hantavirus
glucagón - Eli Lilly, ZymoGenetics	HB19
péptido 1 similar a glucagon 7-36 amida - Suntory	HBNF - Regeneron
Glucocerebrosidasa - Genzyme	HCC-1-Pharis
glutamato descarboxilasa - Genzyme Transgenics	hCG - Milkhaus
Glucoproteína S3 - Kureha	vacuna hCG - Zonagen
GM-CSF - Immunex	HE-317 - Hollis-Eden Pharmaceuticals
vacuna tumoral GM-CSF - PowderJect	vacunas de proteínas de choque término del cáncer y la gripe
GnRH immunotherapeutic -- Protherics	StressGen
antígeno gp75 - ImClone	vacuna de Helicobacter pylori - Acambis, AstraZeneca/CSL, Chiron, Provalis
gp96 - Antigenics	Helistat-G - GalaGen
GPI0100--Galenica	Hemolink - Hemosol
GR 4991W93 - GlaxoSmithKline	hepapoietin - Snow Brand
factor estimulante de colonias de Granulocitos Dong-A	heparanasa - InSight
Granulocyte colony-stimulating factor conjugado	heparinasa I - Ibex
grass terapia de alergia -- Dynavax	heparinasa III - Ibex
GRF1-44-ICN	vacuna de la Hepatitis A - American Biogenetic Sciences
Factor de crecimiento - Chiron, Atrigel, Atrix, Innogenetics, ZymoGenetics, Novo	vacuna de la Hepatitis A inactivada
péptidos del factor de crecimiento - Biotherapeutics	vacuna de la Hepatitis A Nothav - Chiron
hormona del crecimiento - LG Chem	vacuna de la Hepatitis A-hepatitis B - GlaxoSmithKline
hormona del crecimiento, Humana recombinante -- Serono	Terapia para la hepatitis B - Tripep
GT4086-Gliatech	vacuna de la Hepatitis B - Amgen, Chiron SpA, Meiji Milk, NIS, Prodeva, PowderJect, Rhein Biotech
GW 353430-GlaxoSmithKline	vacuna recombinante de la Hepatitis B - Evans
GW-278884 -- GlaxoSmithKline	Vacunas, Epitex Combiotech, Genentech, MedImmune, Merck Sharp & Dohme, Rhein Biotech, Shantha Biotechnics, Vector, Yeda
H 11-Viventia Biotech	

FIG. 1L

Vacuna recombinante de la Hepatitis B TGP 943 Takeda	Péptidos del VIH – American Home Products
Vacuna de la Hepatitis C Bavarian Nordic, Chiron, Innogenetics Acambis,	Vacuna del VIH – Applied bioTech., Axis Genetics, Biogen, Bristol-Myers Squibb, Genentech, Korea Green Cross, NIS, Oncogen, Protein Sciences Corporation, Terumo, Tonen Corporation, Wyeth- Ayerst, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Advanced BioScience Laboratories, Bavarian Nordic, Bavarian Nordic/Statens
Vacuna de la Hepatitis D - Vacunas Chiron	- Serum Institute, GeneCure, immune
Vacuna recombinante de la Hepatitis E Genelabs/GlaxoSmithKline, Novavax	Respuesta, Progenies, Therion Biologies, United Biomedical, Chiron
Factor de crecimiento de hepatocitos - Panorama, Sosei	Vacuna VIH vCP1433 – Aventis Pasteur
Fragmentos kringle del factor de crecimiento de hepatocitos	Vacuna VIH vCP1452 – Aventis Pasteur
- EntreMed	Vacuna VIH vCP205 – Aventis Pasteur
Péptidos Her-2/Neu - Corixa	HL-9 - American BioScience
Vacuna de ADN de glucoproteína del herpes simple - Merck, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Genentech, GlaxoSmithKline, Chiron, Takeda	HM-9239 - Cytran
Vacuna del herpes simple - Cantab Pharmaceuticals, CEL-SCI, Henderson Morley	HML-103-Hemosol
Vacuna viva del herpes simple – ImClone Systems/Wyeth-Lederle, Aventis Pasteur	HML-104-Hemosol
Derivados de HGF - Dompe	HML-105-Hemosol
Vacuna hIAPP - Crucell	HML-109-Hemosol
Vacuna de la Hepatitis B Hib - Aventis Pasteur HIC1	HML-110-Hemosol
HIP-Altachem	HML-121 - Hemosol
Hirudins - Biopharma, Cangene, Dongkook.HPM 1 - Chugai	hNLP - Pharis
Japan Energy Corporation, Pharmacia Corporation, SIR International, Sanofi- Synthelabo, Sotragene, Rhein Biotech	vacuna del anquilostoma
Vacuna comestible VIH – ProdiGene	Vacunas vector huésped – Henogen
Vacuna gp120 VIH - Chiron, Ajinomoto, GlaxoSmithKline, ID Vacuna de, Progenies, VaxGen	Vacuna HPV -- MediGene
Terapia génica de vacuna gp120 VIH	HSA - Meristem
Vacuna de ADN gp160 VIH - PowderJect, Aventis Pasteur, Oncogen, Hyland	HSF - StressGen
Immuno, Protein Sciences	Veículos HSP - Weizmann, Yeda, Peptor
Vacuna gp41 VIH	HSPPC-70 - Antigenics
Vacuna HGP-30W VIH – CEL-SCI	HSPPC-96 – antígenos derivados de patógenos
Inmunoglobulina VIH - Abbott, Chiron	HSV863-Novartis
	Vacuna de ADN HTLV-I
	Vacuna HTLV-I
	Vacuna HTLV-II Access
	HU901»Tanox
	Hu23F2G-ICOS
	HuHMFGI

FIG. 1M

HumaLYM - Intracell	HuMax-IL15-Genmab
Human krebs statika - Yamanouchi	HYB190-Hybridon
Anticuerpos monoclonales humanos	HYB676-Hybridon
Abgenix/Biogen, Abgenix/ Corixa,	M25MAbA33-Celltech
Abgenix/Immunex, Abgenix/Lexicon,	Ibritumomab tiuxetan - IDEC
Abgenix/ Pfizer, Athersys/Medarex,	IBT-9401 - Ibex
Biogen/MorphoSys, -CAT/Searle,	IBT-9402 - Ibex
Centocor/Medarex, Corixa/Kirin Brewery,	IC14-ICOS
Corixa/Medarex, Eos BioTech./Medarex,	Idarrubicina anti-Ly-2.1 -
Eos/Xenex, Exelixis/Protein Design	IDEC 114--IDEC
Labs, ImmunoGen/ Raven,	IDEC 131 - IDEC
Medarex/B.Twelve,	IDEC 152-IDEC
MorphoSys/ImmunoGen, XTL	IDM 1 - IDM
Biopharmaceuticals/Dyax,	IDPS - Hollis-Eden Pharmaceuticals
Anticuerpos monoclonales humanos	Iduronato-2-sulfatasa - Transkaryotic
Medarex/Northwest Biotherapeutics,	Therapies
Medarex/Seattle Genetics	IGF/IBP-2-13--Pilaris
Neutrino-1 humana - Exelixis	IGN-101 - Igeneon
Anticuerpos contra papilomavirus humano - Epicyte	IK HIR02 - Iketon
Vacuna del papilomavirus humano - Biotech	IL-11 -Genetics Institute/AHP
Australia, IDEC, StressGen	IL-13-PE38 - NeoPharm
Vacuna del papilomavirus humano MEDI501 -	Receptor de IL-17 - Immunex
MedImmune/GlaxoSmithKline	IL-18BP--Yeda
Vacuna del papilomavirus humano MEDI	IL-1Hy1 -Hyseq
503/MEDI 504 -	IL-KI-Celltech
MedImmune/GlaxoSmithKline	Adyuvante IL-1β--Celltech
Vacuna del papilomavirus humano TA-CIN -	IL-2 - Chiron
Cantab Pharmaceuticals	IL-2 + IL-12 - Hoffman La-Roche
Vacuna del papilomavirus humano TA-HPV -	Fusión IL-6/sIL-6R - Hadasit
Cantab Pharmaceuticals	Derivado de IL-6R -Tosoh
Vacuna del papilomavirus humano TH-GW -	Toxina de fusión IL-7-Dap 389 - Ligand
Cantab/GlaxoSmithKline	IM-862 - Cytran
Anticuerpos policlonales humanos - Biosite/Eos	IMC-1C11-ImClone
BioTech./ Medarex	
Anticuerpos antimonoclonales anti factor VIII de tipo II humano	imiglucerasa - Genzyme
- ThromboGenics	
Anticuerpos monoclonales anti-glucoproteína Ib murina humanizados	Inmunoglobulina intravenosa (humana) -
anticuerpos monoclonales - ThromboGenics	Hoffman La Roche
HumaRAD - Intracell	Factor de privilegio inmunitario - Proneuron
HuMaxEGFR-Genmab	Immunocal - Immunotec
HuMax-CD4 - Medarex	Terapia inmunogénica- Briana Bio-Tech
	5-fluorodesoxiuridin-dipalmitato-inmunoliposomal

FIG. 1N

Vacuna inmunosupresora - Aixlie	antagonistas de integrina -- Merck
inmunotoxina - Antisoma, NIH	interferón (Alfa2)—SRC VB VECTOR,
ImmuRAIT-Re-188 - Immunomedics	Viragen, Dong-A, Hoffman La-Roche,
imreg-1 - Imreg	Genentech
infertilidad - Johnson & Johnson, E-TRANS	interferón - BioMedicines, Human Genome
Vacuna del virus de la gripe -- Aventis Pasteur,	Sciences
Protein Sciences	interferón (Alfa-n3)—Interferón Sciences
Inhibina - Biotech Australia, Human	Intl.
Therapeutics	interferón (Alfa), Biphasix -- Helix
Terapia génica con proteína G inhibidora	interferón (Alfa)—Amgen, BioNative,
INKP-2001 -- InKine	Novartis, Genzyme Transgenics,
Inolimomab - Diaclone	Hayashibara, Inhale Therapeutics
insulina - Autoimmune, Altea, Biobras,	Systems, Medusa, Flamel, Dong-A,
BioSante, Bio-Tech. General, Chong Kun	GeneTrol, Nastech, Shantha,
Dang, Emisphere, Flamel, Provalis, Rhein	i Wassemann, LG Chem, Sumitomo,
Biotech, TranXenoGen	Aventis, Behring EGIS, Pepgen, Servier,
insulina (bovina) - Novartis	Rhein Biotech,
Análogo de insulina - Eli Lilly	interferón (Alfa2A)
Insulina Aspart - Novo Nordisk	interferón (Alfa2B) - Enzon, Schering-
insulina detemir - Novo Nordisk	Plough, Biogen, IDEA
insulina glargine - Aventis	interferón (Alfa-N1) - GlaxoSmithKline
insulina inhalada - Inhale Therapeutics	interferón (beta)-Rentschler, GeneTrol,
Systems, Alkermes	Meristem, Rhein Biotech, Toray, Yeda,
insulina oral -- Inovax	Daiichi, Mochida
insulina, AeroDose -- AeroGen	interferón (Beta1A) - Serono, Biogen
insulina, AERx - Aradigm	interferón (beta1A),inhale -- Biogen
insulina, BEODAS - Elan	interferón (B1b)- Chiron
insulina, Biphasix - Helix	interferón (tau)-- Pepgen
insulina, bucal - Genex	Interferón alfacon-1 -- Amgen
insulina, I2R - Flemington	Interferón alfa-2a.
insulina, intranasal - Bentley	Interferón Beta 1b -- Schering/Chiron,
insulina, oral - Nobex, Unigene	InterMune
insulina, Orasome - Endorex	Interferón Gamma - Boehringer Ingelheim,
insulina, ProMaxx - Epic	Sheffield, Rentschler, Hayashibara
insulina, Quadrant - Elan	receptor de interferón, Tipo I - Serono
insulina, recombinante - Aventis	interferón(GammalB) - Genentech
insulina, Spiros - Elan	Interferón-alfa-2b + ribavirina - Biogen,
insulina, Transfersome -- IDEA	ICN
insulina, Zymo, recombinante - Novo Nordisk	terapia génica con interferón-alfa-2b
insulinotropina - Scios	Schering-Plough
Terapia génica con insulinsina-	Terapia génica con interferón-con1

FIG. 10

antagonistas de interleucina-1 - Dompe	IPF - Metabolex
Antagonistas de receptores de interleucina-1 - Abbott	IR-501 - Immune Response
Bioresearch, Pharmacia	ISIS 9125 -- Isis Pharmaceuticals
receptor de interleucina-1 de tipo I -- Immunex	ISURF No. 1554-Millennium
receptor de interleucina-1 de Tipo II - Immunex	ISURF No. 1866 - Iowa State Univer.
Interleucina-10 - DNAX, Schering-Plough	ITF-1697-Italfarmaco
Terapia génica con interleucina-10	IxC 162-Ixion
Interleucina-12 - Genetics Institute, Hoffman J 695 -- La-Roche	Cambridge Antibody Tech., Genetics Inst, Knoll
Interleucina-13 -- Sanofi	Jagged + FGF - Repair
Antagonistas de interleucina -13 -AMRAD	JKC-362 - Phoenix Pharmaceuticals
Interleucina-13-PE38QQR	JTP-2942 - Japan Tobacce
Interleucina-15 -- Immunex	anticuerpos monoclonales Juman - Medarex/Raven
Interleucina-16 - Research Corp	K02 - Axys Pharmaceuticals
Interleucina-18 - GlaxoSmithKline	Keliximab - IDEC
Interleucina-1-alfa - Immunex/Roche	Hemocianina de lapa californiana
Interleucina-2 --SRC VB VECTOR, Ajinomoto, Biomira	KGF - Amgen
Interleucina-3 - Cangene	KM 871-Kyowa
Interleucina-4 - Immunology Ventures, Sanofi Winthrop, Schering-Plough, Immunex/ Sanofi Winthrop, Bayer, Ono	KPI 135-Scios
Interleucina-4 + TNF-Alfa -- NIH	KPI-022-Scios
Agonista de interleucina-4 - Bayer	Kringle 5
Toxina de fusión de interleucina-4 -- Ligando	KSB 304
Receptor de interleucina-4 - Immunex, Immun	KSB-201 - KS Biomedix
Interleucina-6 Ajinomoto, Cangene, Yeda, Genetics Institute, Novartis	L 696418-Merck
Proteína de fusión de interleucina-6	L 703801-Merck
Proteína de fusión de interleucina-6 toxina de fusión de interleucina-6 - Ligand, Serono	L1 - Acorda
Interleucina-7 - IC Innovations	L-761191-Merck
Receptor de interleucina-7 - Immunex	lactoferrina - Meristem, Pharming, Agennix
Agonistas de interleucina-8 - Kyowa Hakko/Millennium/Pfizer	cardiolactoferrina - Pharming
Agonistas de interleucina-9 - Genaera	LAG-3 -- Serono
Interleucinas - Cel-Sci	LAIT-GEMMA
Yoduro 1131 tositumomab - Corixa	Citotoxina de células LAK - Arizona
ior EPOCIM - Center of Molecular Immunology	lameláras - PharmaMar/University of Malaga
lor-P3 -- Center of Molecular Immunology	Péptidos de laminina A - NIH
IP-10--NIH	lanotepiasa - Genetics Institute
	laronidasa - BioMarin
	Vacuna de la fiebre de Lassa
	LCAT-NIH
	LDP 01 - Millennium

FIG. 1P

LDP 02 - Millennium	Vacuna de la enfermedad de Lyme - Aquila
Superóxido dismutasa lecitinizada –	Biopharmaceuticals, Aventis, Pasteur,
Seikagaku	Symbicom, GlaxoSmithKline, Hyland
Adyvante LeIF -- Corixa	Immuno, MedImmune
Vacuna de la leishmaniasis - Corixa	Vacuna del virus linfocítico de la coriomeningitis
lenercept - Hoffman La-Roche	Vacuna de linfoma - Biomira, Genitope
Lenograstim - Aventis, Chugai	LYP18
lepirudina - Aventis	Plasminógeno de lisina recombinante
leptina - Amgen, IC Innovations	Terapia génica de enfermedad de almacenamiento lisosomal
Terapia génica con leptina - Chiron Corporation	Avigen
Leptina, 2ª generación - Amgen	Lisostafina - Nutrition 21
leridistim - Pharmacia	M 23 - Gruenenthal
leuprolida, ProMaxx - Epic	Anticuerpos monoclonales M1 - Acorda
leuprorelin, oral - Unigene	Therapeutics
LeuTech - Papatina	MA16N7C2-CorvasIntl.
LEX 032 - SuperGen	Vacuna de la malaria - GlaxoSmithKline,
LiDEPT - Novartis	AdProTech, Antigenics, Apovia, Aventis
lipasa - Altus Biologies	Pasteur, Axis Genetics, Behringwerke,
Vacuna lipido A - EntreMed	CDCP, Chiron Vaccines, Genzyme
Tecnología de anclaje unida a lípidos Tech. - ICRT,	Transgenics, Hawaii, MedImmune, NIH,
ID	NYU, Oxon, Roche/Saramane, Biotech
Biomedical	Australia, Rx Tech
Tecnología liposoma-CD4 – Sheffield	Vacuna de la malaria CDC/NIIMALVAC-1
Vacuna de Listeria monocitogenes	Vacuna de la malaria, multicomponente
LMB1	mammaglobina - Corixa
LMB7	mammastatina - Biotherapeutics
LMB 9 - Battelle Memorial Institute, NIH	Lecitina de unión a manano - NatlImmu
LM-CD45 - Cantab Pharmaceuticals	manano-MUC1 - Psiron
lovastatina - Merck	MAP 30
LSA-3	Marinovir - Phytera
receptor LT-β -- Biogen	MARstem -- Maret
Vacuna del cáncer de pulmón - Corixa	MB-015 - Mochida
lusupultida - Scios	MBP - ImmuLogic
L-Vax-AVAX	MCI-028 - Mitsubishi-Tokyo
LY355455-Eli Lilly	MCIF - Human Genome Sciences
LY366405-Eli Lilly	MDC - Advanced BioScience - Akzo
LY-355101-Eli Lilly	MDX11-Medarex
Vacuna de ADN de la enfermedad de Lyme - Vical/Aventis Nobel, ICOS	MDX210-Medarex
Pasteur	MDX 22-Medarex
	MDX22

FIG. 1Q

MDX240-Medarex	Terapia génica de metionina liasa
MDX33	AntiCáncer
MDX 44 - Medarex	Met-RANTES - Genexa Biomedical,
MDX447-Medarex	Serono
MDX H210-Medarex	Metreleptina
MDX RA - Houston BioTech., Medarex	MGDF-Kirin
ME-104-Pharmexa	MGV -- Progenies
Vacuna del sarampión	micrina - Endocrine
Mecasemin - Cephalon/Chiron, Chiron	microplasma - ThromboGenics
MEDI488 - MedImmune	MIF - Genetics Institute
MEDI500	Factor inhibidor de migración - NIH
MEDI 507 - BioTransplant	Mim CD4.1 - Xycte Therapies
Hormona concentradora de melanina -	mirostopen - Human Genome Sciences
Neurocrine Biosciences	MK 852 -Merck
melanocortinas - OMRF	Mobenakin - NIS
Anticuerpos monoclonales de melanoma - Viragen	molgramostim - Genetics Institute, Novartis
Vacuna del melanoma - GlaxoSmithKline,	anticuerpos monoclonales - Abgenix/Celltech,
Akzo Nobel, Avant, Aventis Pasteur,	Immusol/ Medarex, Viragen/ Roslin
Bavarian Nordic, Biovector, CancerVax,	Institute, Cambridge Antibody Tech./Elan
Genzyme Molecular Oncology, Humbolt,	MAB 108-
ImClone Systems, Memorial, NYU, Oxxon	MAB 10D5 -
MAB 10D5 -	MAB 14.18-interleucina-2 inmunocitocina-
Vacuna del melanoma de Magevac - Therion	Lexigen
Potenciadores de la memoria - Scios	MAB14G2a-
Vacuna meningocócica B - Chiron	MAB15A10-
Vacuna meningocócica - CAMR	- MAB 170 - Biomira
Conjugado de vacuna meningocócica grupo B	MAB177LuCC49-
- North American Vaccine	MAB 17F9
Vacuna meningocócica grupo B recombinante	MAB1D7
- BioChem Vaccines,	MAB 1F7 - Immune Network
Microscience	conjugado MAB 1H10-doxorubicina
Conjugado Y del grupo de vacuna meningocócica	MAB26-2F
- North American Vaccine	MAB2A11
conjugado de vacuna meningocócica grupos A, B y	MAB 2E1--RW Johnson
C	MAB2F5
- North American Vaccine	MAB 31.1 - International BiImmune
Mepolizumab - GlaxoSmithKline	Systems
Metastatina - EntreMed, Takeda	MAB 32 - Cambridge Antibody Tech.,
Met-CkB7 - Human Genome Sciences	Peptech
met-encefalina - TNI	MAB 323A3 - Centocor
METH-1 - Human Genome Sciences	MAB 3C5
metioninasa - AntiCáncer	

FIG. 1R

MAb 3F12	MAb C242-conjugado con PE
MAb 3F8	MAb c30-6
MAb 42/6	MAb CA208-conjugado con citorhodin-S-
MAb 425--Merck KGaA	Hoechst Japan
MAb 447-52D -- Merck Sharp & Dohme	MAb CC49 -- Enzon
conjugado MAb 45-2D9-- hematoporfirina	MAbch14.18-
	MAb CH14.18-GM-CSF proteína de fusión --
MAb4B4	Lexigen
conjugado MAb 4E3-CPA - BCM Oncologia	j MAb chCE7
conjugado MAb 4E3-daunorubicina	MAbCI-137-AMRAD
MAb 50-6	conjugado MAb - cisplatino
MAb 50-61A - Institut Pasteur	MAb CLB-CD19
MAb 5A8 - Biogen	MAb CLB-CD19V
conjugado MAb 791T/36-metotrexato	MAb CLL-1 - Peregrine
MAb7c11.e8	conjugado MAb - CLL-1-GM-CSF
conjugado MAb 7E11 C5-selenocistamina	conjugado MAb - CLL-1-IL-2 - Peregrine
MAb 93KA9 - Novartis	conjugado MAb - CLN IgG -- doxorubicina
conjugado MAb A5B7-cisplatino	Conjugados MAb - Tanox
Biodynamics Research, Pharmacia	MAb D612
MAbA5B7-I-131	MAb Dal B02
MAbA7	MAbDC101-ImClone
MAbA717-Exocell	MAb EA1 -
conjugado MAb A7-zinostatina	MAb EC708 -- Biovation
MAbABX-RB2 -Abgenix	MAb EP-5C7 - Protein Design Labs
MAbACAU	MAb ERIC-1 - ICRT
MAb AFP-I-131 - Immunomedics	Terapia génica MAb F105
MAbAPI	MAb FC 2.15
MABAZI	MAb G250 -- Centocor
conjugado MAb B3-LysPE40	MAb GA6
MAb B4 - United Biomedical	MAb GA733
conjugado MAb B43 - Genisteína	MAb Gliomab-H - Viventia Biotech
MAb B43.13-Tc-99m - Biomira	MAb conjugado con HB2-saporina
conjugado MAb B43-PAP	MABHD37-
conjugado MAb B4G7-gelonina	conjugado MAb-cadena rica en HD37
conjugado MAb BCM 43-daunorubicina	MABHNK20-Acambis
BCM Oncologia	conjugado MAb - huN901-DM -
MAb BIS-1	ImmunoGen
MAb BMS 181170 - Bristol-Myers Squibb	MAB 1-131 CC49-Corixa
MAB BR55-2	MAB IC025
MAB BW494	MAB conjugado con ICR12-CPG2
conjugado MAb C 242-DM1 - ImmunoGen	MAB ICR-62

FIG.1S

conjugado MAb IRac-ricina A	MAb R-24
MAbK1	MAb R-24 α humana GD3 - Celltech
conjugado MAb KS1-4-metotrexato	conjugado MAb cadena A rica en RFB4
MAb L6 – Bristol-Myers Squibb, Oncogen	conjugado MAb cadena A rica en RFT5
MAb LiC016-88	MAb SC1
MAb LL2-I-131 - Immunomedics	MAbSM-3-ICRT
MAb LL2-Y-90	MAb SMART 1D10 - Protein Design Labs
MAbLS2D617--Hybritech	MAb SMART ABL 364 - Novartis
conjugado MAb LYM-1-gelonina	MAb SN6f
MAbLYM-1-1-131	conjugado MAb cadena A rica en SN6f-
	desglucosilado
MAb LYM-1-Y-90	
MAb LYM-2 - Peregrine	MAb SN6j
MAbM195	conjugado MAb cadena A rica en SN7
conjugado MAb M195-bismuto 213 –	conjugado MAb T101-Y-90 – Hybritech
Protein Design Labs	MAb T-88 - Chiron
conjugado MAb M195-gelonina	MAb TB94 – Cáncer ImmunoBiology
MAb M195-1-131	MAbTEC 11
MAbM195-Y-90	MAbTES-23-Chugai
MAbMA33H1-Sanofi	MAbTM31-Avant
MAbMADH	MAb TNT-1 – Cambridge Antibody Tech.,
MAb MGB2	Peregrine
MAb MINT5	MAbTNT-3
MAb MK2-23	MAb TNT-3 - IL2 proteína de fusión -
conjugado MAb MOC31 - ETA(252-613)	MAbTP3-At-211
MAbMOC-31-In-111	conjugado MAb TP3-PAP
conjugado MAb MOC-31-PE	MAbUJ13A-ICRT
MAbMR6-	MAb UN3
MAb MRK-16 - Aventis Pasteur	conjugado MAb ZME-018-gelonina
MAbMS11G6	MAb-BC2 - GlaxoSmithKline
MAb MX-DTPA BrE-3	conjugado MAb- DM1 – ImmunoGen
MAb MY9	conjugado MAb- ricina cadena A - XOMA
MAbNd2--Tosoh	conjugados MAb-temoporfin
MAb NG-1 - Hygeia	Monopharm C – Viventia Biotech
MAb NM01 - Nissin Food	monteplase -- Eisai
MAb OC125	Hidrato de montirelina - Gruenenthal
conjugado MAb OC 125-CMA	moroctocog alfa - Genetics Institute
MAb OKI-1 -- Ortho-McNeil	Moroctocog-alfa - Pharmacia
MAb OX52 – Bioproducts for Science	MP 4
MAb PMA5	MP-121-Biopharm
MAb PR1	MP-52 - Biopharm
MAbprost30	MRA-Chugai

FIG. 1T

MS 28168 - Mitsui Chemicals, Nihon Schering	Vacuna neuroprotectora -- universidad de Auckland
Toxina de fusión MSH - Ligand	Quimeras neurotróficas - Regeneron
MSI-99 -- Genaera	Factor neurotrófico - NsGene, CereMedix
MT 201 - Micromet	NeuroVax - Immune Response
Vacuna Muc-1 - Corixa	neurturina - Genentech
Tolerancia a mucosa -- Aberdeen	Endopeptidasa neutra - Genentech
Sustrato inhibidor muleriano	Potenciadores de NGF - NeuroSearch
muplestim - Genetics Institute, Novartis,	Vacuna NHL -- Large Scale Biology
DSM Anti-Infectives	NIP45 - Boston Life Sciences
MAb murino - KS Biomedix	NKI-B20
Somatropina mutante - JCR Pharmaceutical	NM 01 - Nissin Food
MV 833 -- Toagosei	NMI-139-NitroMed
Vacuna de Mycoplasma pulmonis	NMMP - Genetics Institute
Mycoprex - XOMA	NN-2211-NovoNordisk
mieloperoxidasa -- Henogen	Noggin - Regeneron
miostatina - Genetics Institute	Nonacog alfa
Nacolomab tafenatox - Pharmacia	Norelin - Biostar
nagrestipen - British Biotech	Vacuna del virus Norwalk
NAP-5 - Corvas Intl.	NRLLMO-NeoRx
NAPc2 - Corvas Intl.	NRLLMOPE-NeoRx
nartograstim -- Kyowa	NT-3 - Regeneron
Natalizumab - Protein Design Labs	NT-4/5 - Genentech
Nateplasa - NIH, Nihon Schering	NU 3056
Nateplasa - Schering AG	NU 3076
NBI-3001 - Neurocrine Biosci.	NX 1838 -Gilead Sciences
NBI-5788 - Neurocrine Biosci.	NYSEO-1/CAG-3 antigen-NIH
NBI-6024 - Neurocrine Biosci.	NYVAC-7 -- Aventis Pasteur
Inhibidores Nef - BRI	NZ-1002-Novazyme
Vacuna de Neisseria gonorrhea - Antex	Terapia contra la obesidad -- Nobex
Biologies	OC10426 -Ontogen
Conjugado de neomicina B-arginina	OC 144093 -- Ontogen
Nerelimomab - Chiron	OCIF - Sankyo
Factor de crecimiento nervioso - Amgen - Chiron,	Oct-43 - Otsuka
Genentech	OK PSA - liposomal
Terapia génica de factor de crecimiento nervioso	OKT3-gamma-1 -ala-ala
nesiritida citrato - Scios	OM991
neurregulina-2 - CeNeS	OM992
neurocan - NYU	Omalizumab -- Genentech
Sistema de administración neuronal - CAMR	oncoimmunina-L - NIH
	Oncolisina B -- ImmunoGen

FIG. 1U

Oncolisina CD6 - ImmunoGen	PAM 4 - Merck
Oncolisina M - ImmunoGen	pamiteplasa - Yamanouchi
Oncolisina S -- ImmunoGen	pancreatina, Minitabs -- Eurand
Oncofago -- Antigenics	Pangen -- Fournier
Oncostatina M - Bristol-Myers Squibb	Pantarina - Selective Genetics
OncoVax-CL -- Jenner Biotherapies	Vacuna del virus paragripal - Pharmacia,
OncoVax-P -- Jenner Biotherapies	Pierre Fabre
onercept - Yeda	paraoxanasa - Esperion
Vacuna de la onicomycosis - Boehringer	Hormona paratiroidea - Abiogen, Korea
Ingelheim	Green Cross
opebecan - XOMA	Hormona paratiroidea (1-34) -
opioides -- Arizona	Chugai/Suntory
Oprelvekin - Genetics Institute	Terapia génica para la enfermedad de Parkinson -- Cel
Org-33408b-Akzo Nobel	Genesys/ Ceregene
Orolip DP -- EpiCept	Vacuna del parvovirus - MedImmune
Orizacistatina	PCP-Scan - Immunomedics
Péptidos OSA - GenSci Regeneration	Cóctel PDGF - Theratechnologies
Caderina GF - osteoblastos - Pharis	Terapia de alergia al cacahuete - Dynavax
Osteocalcin-terapia génica timidina quinasa - osteocalcina PEG anti-ICAM MAb - Boehringer	Ingelheim
Proteína osteogénica - Curis	PEG asparaginasa - Enzon
osteopontina - OraPharma	PEG glucocerebrosidasa
Péptidos de osteoporosis - Integra, Telios	Hirudina PEG - Knoll
osteoprotegerina - Amgen, SnowBrand	PEG interferón-alfa-2a - Roche
Vacunas de la otitis media - Antex Biologies	PEG interferón-alfa-2b + ribavirina -
Cáncer de ovario - University of Alabama	Biogen, Enzon, ICN Pharmaceuticals,
Proteína de fusión OX40-IgG - Cantab, Xenova	Schering-Plough
P 246 -- Diatide	PEGMAbA5B7-
P 30 - Alfacell	Pegacaristim - Amgen - Kirin Brewery -
p1025-- Active Biotech	ZymoGenetics
P-113 ^A -Demegen	Pegaldesleucina - Research Corp
Péptido P-16 - Transition Therapeutics	pegaspargasa -- Enzon
p43 - Ramot	pegfilgrastim - Amgen
Péptido P-50 -- Transition Therapeutics	PEG-interferón Alfa - Viragen
Vacuna p53 + RAS - NIH, NCI	PEG-interferón Alfa 2A - Hoffman La-
Análogo PACAP(1-27)	Roche
Vacunas pediátricas - Chiron	PEG-interferón Alfa 2B - Schering-
Pafase -- ICOS	Plough
ADN plasmidico PAGE-4-IDEC	PEG-r-hirudin - Abbott
PAI-2 - Biotech Australia, Human	PEG-uricasa - Mountain View
Therapeutics	Pegvisomant - Genentech
Palivizumab - MedImmune	

FIG. 1V

Proteínas PEGiladas, PolyMASC - Valentis	Pharmaprojects No. 5947 – StressGen
Leptina humana nativa recombinante PEGilada	n Pharmaprojects No. 5961 –
- Roche	Theratechnologies
Pemtumomab	Pharmaprojects No. 5962 – NIH
Penetratina - Cyclacel	Pharmaprojects No. 5966 – NIH
Pepscan - Antisoma	Pharmaprojects No. 5994 – Pharming
Péptido G - Peptech, ICRT	Pharmaprojects No. 5995 – Pharming
Vacuna peptídica - NIH, NCI	Pharmaprojects No. 6023 – IMMUCON
Pexelizumab	Pharmaprojects No. 6063 – Cytoclonal
pexiganan acetato - Genaera	Pharmaprojects No. 6073 – SIDDICO
Pharmaprojects No. 3179 – NYU	Pharmaprojects No. 6115 – Genzyme
Pharmaprojects No. 3390 – Ernest Orlando	Pharmaprojects No. 6227 – NIH
Pharmaprojects No. 3417 – Sumitomo	Pharmaprojects No. 6230 – NIH
Pharmaprojects No. 3777 – Acambis	Pharmaprojects No. 6236 – NIH
Pharmaprojects No. 4209 – XOMA	Pharmaprojects No. 6243 – NIH
Pharmaprojects No. 4349 – Baxter. Intl.	Pharmaprojects No. 6244 – NIH
Pharmaprojects No. 4651	Pharmaprojects No. 6281 – Senetek
Pharmaprojects No. 4915 – Avanir	Pharmaprojects No. 6365 – NIH
Pharmaprojects No. 5156 – Rhizogenics	Pharmaprojects No. 6368 – NIH
Pharmaprojects No. 5200 – Pfizer	Pharmaprojects No. 6373 – NIH
Pharmaprojects No. 5215 – Origene	Pharmaprojects No. 6408 – Pan Pacific
Pharmaprojects No. 5216 – Origene	Pharmaprojects No. 6410 – Athersys
Pharmaprojects No. 5218 – Origene	Pharmaprojects No. 6421 – Oxford
Pharmaprojects No. 5267 – ML	GlycoSciences
Laboratories	Pharmaprojects No. 6522 – Maxygen
Pharmaprojects No. 5373 – MorphoSys	Pharmaprojects No. 6523 – Pharis
Pharmaprojects No. 5493 – Metabolex	Pharmaprojects No. 6538 – Maxygen
Pharmaprojects No. 5707 – Genentech	Pharmaprojects No. 6554 – APALEXO
Pharmaprojects No. 5728 – Autogen	Pharmaprojects No. 6560 – Ardana
Pharmaprojects No. 5733 – BioMarin	Pharmaprojects No. 6562 – Bayer
Pharmaprojects No. 5757 – NIH	Pharmaprojects No. 6569 – Eos
Pharmaprojects No. 5765 – Gryphon	Phenoxazine
Pharmaprojects No. 5830 – AntiCáncer	Phenylase - Ibex
Pharmaprojects No. 5839 – Dyax	Factor derivado de epitelio pigmentoso - inhibidor-
Pharmaprojects No. 5849 – Johnson &	1 activador de plasminógeno, recombinante –
Johnson	DuPont Pharmaceuticals
Pharmaprojects No. 5860 – Mitsubishi-	
Tokyo	
Pharmaprojects No. 5869 – Oxford	
GlycoSciences	
Pharmaprojects No. 5883 – Asahi Brewer	

FIG. 1W

Activadores de plasminógeno - Abbott Laboratories, American Home Products, Boehringer Mannheim, Chiron Corporation, DuPont Pharmaceuticals, Eli Lilly, Shionogi, Genentech, Genetics Institute, GlaxoSmithKline, Hemisphere Biopharma, Merck & Co, Novartis, Pharmacia Corporation, Wakamoto, Yeda	Antígeno específico de próstata - EntreMed
Péptidos relacionados con plasminógeno - Bio-Tech. General/MGH	Proteína A - RepliGen
Factor 4 plaquetario - RepliGen	Adhesivos de proteína - Enzon
Factor de crecimiento derivado de plaquetas - Amgen - ZymoGenetics	Proteína C - Baxter Intl., PPL Therapeutics, ZymoGenetics
plusonemin- Hayashibara	Activador de proteína C - Gilead Sciences
PMD-2850 -- Protherics	Antagonistas de proteína quinasa R - NIH
Vacuna neumocócica - Antex Biologies, Aventis Pasteur	protirelin - Takeda
Vacuna neumocócica intranasal - BioChem Vaccines/Biovector	protocadherina 2 - Caprion
PR1A3	Pro-uroquinasa - Abbott, Bristol-Myers
PR-39	Squibb, Dainippon, Tosoh - Welfide
pralmorelin - Kaken	Ligando-1 de glucoproteína P-selectina - Genetics Institute
Pretarget-Lymphoma - NeoRx	Infecciones por pseudomonas - InterMune
Priliximab - Centocor	Vacuna de pseudomonas - Cytovax
PR0140 - Progenies	PSGL-Ig -- American Home Products
PRO 2000 - Procept	PSP-94 -- Procyon
PRO 367 - Progenies	PTH1-34--Nobex
PRO 542 -- Progenies	Quilimmune-M - Antigenics
pro-Apo A-I - Esperion	R101933
prolactina - Genzyme	R125224 -Sankyo
Prosaptida TX14(A) - Bio-Tech. General	RA therapy - Cardion
Anticuerpos del cáncer de próstata - Immunex, UroCor	Vacuna recombinante de la rabia -- Aventis Pasteur, BioChem Vaccines, Kaketsuken Pharmaceuticals
Terapia con anticuerpos del cáncer de próstata - Genentech/UroGenesys, Genotherapeutics	RadioTheraCIM - YM BioSciences
Inmunoterapéutica del cáncer de próstata - The PSMA Development Company	Ramot project No. 1315 - Ramot
Vacuna del cáncer de próstata -- Aventis Pasteur	Ramot project No. K-734A - Ramot
Zonagen, Corixa, Dendreon, Jenner	Ramot project No. K-734B - Ramot
Biotherapies, Therion Biologies	RANK - Immunex
	ranpirnasa - Alfacell
	MAb ranpirnasa-anti-CD22 - Alfacell
	Inhibidor de RANTES -Milan
	Sistemas de administración de fármacos RAPID - ARIAD
	rasburicasa -- Sanofi
	rBPI-21, tópica --XOMA
	RC 529 - Corixa
	rCFTR - Genzyme Transgenics
	RD 62198
	rDnasa -- Genentech
	RDP-58 -- SangStat

FIG. 1X

RecepTox-Fce - Keryx	Terapia génica con ribozimas -- Genset
RecepTox-GnRH - Keryx, MTR	Vacuna recombinante Rickettsial
Technologies	RIGScan CR - Neoprobe
RecepTox-MBP - Keryx, MTR	RIP-3-Rigel
Technologies	RK-0202-RxKinetix
recFSH - Akzo Nobel, Organon	Péptido RLT - Esperion
REGA3G12	rM/NEI - IVAX
Regavirumab - Teijin	rmCRP -- Immtech
relaxina - Connetics, Corp	RN-1001 - Renovo
Vacuna del cáncer renal - MacroPharm	RN-3 -- Renovo
repifemina - Human Genome Sciences	Conjugado de RNAsa - Immunomedics
Vacuna PFP-2 del virus sincital respiratorio -	-RO 631908-Roche
Wyeth-Lederle	Vacuna de Rotavirus - Merck
Vacuna del virus sincital respiratorio	RP 431 - DuPont Pharmaceuticals
GlaxoSmithKiine, Pharmacia, Pierre Fabre	RP-128 - Resolution
Vacuna inactivada del virus sincital respiratorio	Terapia génica RPE65 -
	RPR 110173 - Aventis Pasteur
Vacuna del virus paragripal-virus sincital respiratorio	RPR 115135 -Aventis Pasteur
- Aventis Pasteur,	RPR 116258A - Aventis Pasteur
Pharmacia	rPSGL-Ig - American Home Products
Retepase - Boehringer Mannheim,	Tensioactivo r-SPC - Byk Gulden
Hoffman La-Roche	rV-HER-2/neu - Therion Biologies
Retropep - Retroscreen	SA1042-Sankyo
RFB4(dsFv)PE38	sacrosidasa - Orphan Medical
RFI641 - American Home Products	Sant7
RFTS - UAB Research Foundation	Sargramostim - Immunex
RG 12986-Aventis Pasteur	saruplasa - Gruenenthal
RG 83852 - Aventis Pasteur	Satumomab - Cytogen
RG-1059-RepliGen	SB 1 - COR Therapeutics
rGCR-NIH	SB 207448 - GlaxoSmithKiine
rGLP-1 -- Restoragen	SB 208651 - GlaxoSmithKiine
rGRF - Restoragen	SB 240683 - GlaxoSmithKiine
rh Insulin - Eli Lilly	SB 249415-GlaxoSmithKiine
péptidos RHAMM diana - Cangene	SB 249417-GlaxoSmithKiine
rHbU-Baxter Intl.	SB 6 - COR Therapeutics
rhCCIO - Claragen	SB RA 31012-
rhCG - Serono	SC 56929 - Pharmacia
Terapia génica para artritis reumatoide	Proteínas de unión a SCA - Curis, Enzon
Vacuna para artritis reumatoide - Veterans	scFv(14E1)-ETA Berlex Laboratories,
Affairs Medical Center	Schering AG
rhLH- Serono	ScFv(FRP5)-ETA-

FIG. 1Y

ScFv6C6-PE40-	somatomedin-1 - GroPep, Mitsubishi-
SCH 55700-Celltech	Tokyo, NIH
Vacuna de la esquistosomiasis - Glaxo	Proteína transportadora somatomedina-1 - Insmed
Wellcome/Medeva, Brazil	somatostatina - Ferring
SCPF -- Advanced Tissue Sciences	Somatotropina/
complejo scuPA-suPAR - Hadasit	Homona del crecimiento humano - Bio-Tech.
SD-9427 - Pharmacia	General, Eli Lilly
SDF-1--Ono	somatropina - Bio-Tech. General, Alkermes,
SDZ 215918--Novartis	ProLeasa, Aventis Behring, Biovector,
SDZ 280125-Novartis	Cangene, Dong-A, Eli Lilly, Emisphere,
SDZ 89104--Novartis	Enact, Genentech, Genzyme Transgenics,
SDZ ABL 364-Novartis	Grandis/InfiMed, CSL, InfiMed, MacroMed,
SDZ MMA 383-Novartis	Novartis, Novo Nordisk, Pharmacia
Inhibidores de serina proteasa - Pharis	Serono, TranXenoGen
sermorelin acetato - Serono	Derivado de somatropin - Schering AG
SERP-1-Viron	somatropina, AIR-Eli Lilly
sertenef - Dainippon	Somatropina, inhaled - Eli Lilly/Alkermes
Albúmina de suero, recombinante humana -	somatropina, Kabi - Pharmacia
Aventis Behring	somatropina, Orasome - Novo Nordisk
Factor derivado de suero - Hadasit	Sonermina - Dainippon Pharmaceutical
Sevirumab - Novartis	SP(V5.2)C-Supertek
SGN 14 - Seattle Genetics	SPf66
SGN 15-Seattle Genetics	esfingomielinasa - Genzyme
SGN 17/19 - Seattle Genetics	SR 29001-Sanofi
SGN 30 - Seattle Genetics	SR 41476-Sanofi
SGN-10 - Seattle Genetics	SR-29001 - Sanofi
SGN-11-Seattle Genetics	SS1(dsFV)-PE38--NeoPharm
SH 306 - DuPont Pharmaceuticals	β 2 microglobulina - Avidex
Shanvac-B - Shantha	proteínas de fusión β 2-microglobulina - NIH
Vacuna de Shigella flexneri - Avant, Acambis, péptidos β amiloideos -- CeNeS	
Novavax	β -defensina - Pharis
Vacuna de Shigella sonnei -	Infecciones por Staphylococcus aureus -
sICAM-1 - Boehringer Ingelheim	Inhibitex/ZLB
Silteplase - Genzyme	Conjugado de vacuna de Staphylococcus aureus
Vacuna SIV - Endocon, Institut Pasteur	Nabi
SK 896 - Sanwa Kagaku Kenkyusho	Terapia para Staphylococcus -- Tripep
SK-827 - Sanwa Kagaku Kenkyusho	Estafiloquinasa - Biovation, Prothera,
Skeletex - CellFactors	Thrombogenetics
SKF 106160 - GlaxoSmithKline	Vacuna A estreptocócica -- M6
S-nitroso-AR545C-	Pharmaceuticals, North American Vaccine
SNTP-Active Biotech	Vacuna B estreptocócica -- Microscience

FIG. 1Z

Vacuna recombinante B estreptocócica -	TFPI - EntreMed
Vacunas Biochem	tgD-IL-2--Takeda
Vacuna de Streptococcus piogenes	TGF-Alfa - ZymoGenetics
STRL-33 -- NIH	TGF- β -Kolon
Subalin-SRC VB VECTOR	TGF- β 2 -- Insmed
SUIS -- United Biomedical	TGF- β 3--OSI
SUIS-LHRH - United Biomedical	terapia génica Talasémica - Crucell
SUN-E3001 - Suntory	TheraCIM-h-R3 - Center of Molecular
Anticuerpos monoclonales de super alta afinidad -	- Immunology, YM BioSciences
YM BioSciences	Theradigm-HBV - Epimmune
Superóxido dismutasa - Chiron, Enzon,	Theradigm-HPV -- Epimmune
Ube Industries, Bio-Tech, Yeda	Theradigm-malaria - Epimmune
Superóxido dismutasa-2 - OXIS	Theradigm-melanoma - Epimmune
suppresina - UAB Research Foundation	TheraFab - Antisoma
SY-161-P5 -ThromboGenics	ThGRF 1-29 - Theratechnologies
SY-162-ThromboGenics	ThGRF 1-44 -- Theratechnologies
Vacuna del lupus eritematoso sistémico -	trombomodulina - Iowa, Novocastra
MedClone/VivoRx	Trombopoietina - Dragon Pharmaceuticals,
Vacuna peptídica de receptores de linfocitos T	Genentech
Liposomas T4N5 - AGI Dermatics	trombopoyetina, Pliva -- Recepton
TACI, soluble - ZymoGenetics	Trombospondina 2 -
Apoptosis dirigida - Antisoma	trombostatina -- Thromgen
tasonemina - Boehringer Ingelheim	timalfasina -- SciClone
TASP	timocartina - Gedeon Richter
TASP-V	timosin Alfal - NIH
Análogos peptídicos Tat - NIH	Hormona estimuladora de tiroides - Genzyme
TBPI-Yeda	tlCAM-1 - Bayer
TBPII	Péptido anticoagulante Tick - Merck
TBV25H - NIH	TIF-Xoma
Tc 99m ior ceal - Center of Molecular	Tifacogin - Chiron, NIS, Pharmacia
Immunology	Factor tisular -- Genentech
Tc 99m P 748 - Diatide	Inhibidor de la ruta del factor tisular
Tc 99m votumumab - Intracell	TJN-135--Tsumura
Tc-99m rh-Anexina V - Theseus Imaging	TM27-Avant
teceleuquina - Biogen	TM29-Avant
tenecteplasa - Genentech	TMC-151 -Tanabe Seiyaku
Teriparatida - Armour Pharmaceuticals,	Factor de necrosis tumoral TNF - Asahi Kasei
Asahi Kasei, Eli Lilly	TNF Alfa - CytImmune
terlipresina - Ferring	Anticuerpo TNF -- Johnson & Johnson
testisina-AMRAD	Proteína de unión a TNF - Amgen
Tetrafibricina - Roche	Producto de degradación de TNF - Oncotech

FIG. 1AA

Receptor del TNF - Immunex	TXU-PAP
Receptor 1 del TNF, soluble - Amgen	TY-10721-TOAEiyo
Factor alfa de necrosis tumoral TNF - Asahi	Vacuna de la diabetes de tipo I - Research Corp
Kasei, Genetech, Mochida	Vacuna tifoidea CVD 908
Inhibidor del TNF-alfa - Tripep	U 143677 - Pharmacia
Terapia génica TNFR:Fc - Targeted Genetics	U 81749 - Pharmacia
TNF-SAM2	UA1248--Arizona
Tolerimab- Innogenetics	UGIF--Sheffield
Vacuna del Toxoplasma gondii -	UIC2
GlaxoSmithKline	UK 101
TP 9201 -- Telios	UK-279276 - Corvas Intl.
TP10--Avant	urodilatina - Pharis
TP20--Avant	urofilitrofina - Serono
tPA - Centocor	uteroferrina- Pepgen
trafermin - Scios	V20-GLYCODesign
TRAIL/Apo2L - Immunex	Vacunas para terapia génica de receptores de vasopresina V2
Proteínas de unión a transferrina - CAMR	vaccines - Active Biotech
Factor beta-1 de crecimiento transformante -	Vacuna de glucoproteína de la Varicela zoster -
Genentech	Research Corporation Technologies
Proteínas de transporte - Genesis	Vacuna viva del virus de la Varicela zoster - Cantab
TRH - Ferring	Pharmaceuticals
Triabin - Schering AG	Factor de crecimiento endotelial vascular -
Triconal	Genentech, University of California
Triflavina	Factor de crecimiento endotelial vascular - R&D
troponina I - Boston Life Sciences	Systems
TRP-2 ^A -NIH	Agentes de direccionamiento vascular - Peregrine
Inhibidor de tripsina - Mochida	Agentes de potenciación de la permeabilización de los vasos -
Terapia génica TSP-1 -	Peregrine
TT-232	vasostatina - NIH
TTS-CD2-Active Biotech	VCL - Bio-Tech. General
Vacuna de la tuberculosis - Aventis Pasteur,	VEGF - Genentech, Scios
Genesis	Inhibidor VEGF - Chugai
Superantígenos dirigidos a tumores - Active	VEGF-2 - Human Genome Sciences
Biotech - Pharmacia	VEGF-Trap -- Regeneron
Vacunas tumorales - PhotoCure	viscumin, recombinante - Madaus
Conjugados de anticuerpo profarmacológico activado	Vitaxina
por tumor	Vitraxa - ISTA Pharmaceuticals
conjugados - Millennium/ImmunoGen	Vacuna del virus del Nilo oriental - Bavarian Nordic
tumstatina - ILEX	WP652
Tuvirumab - Novartis	Vacuna WT1 -- Corixa
TV-4710-Teva	WX-293-WilexBioTech.
Receptor TWEAK - Immunex	

FIG.1BB

WX-360-WilexBioTech.	YM 207 - Yamanouchi
WX-UK 1-WilexBioTech.	YM 337 - Protein Design Labs
XMP-500--XOMA	biotina marcada con Itrio-90
XomaZyme-791 - XOMA	anti-CEA MAb T84.66 - marcado con Itrio-90
XTL 001 - XTL Biopharmaceuticals	ZD0490-AstraZeneca
XTL 002 - XTL Biopharmaceuticals	ziconotida - Elan
sistema de administración de levaduras -	ZK 157138 - Berlex Laboratories
GlobelImmune	
vacuna de Yersinia pestis	Zolimomab aritox
YIGSR-Stealth -- Johnson & Johnson	Zorcell -- Immune Response
Yissum Project No. D-0460 - Yissum	Péptidos ZRXL - Novartis

FIG.1CC

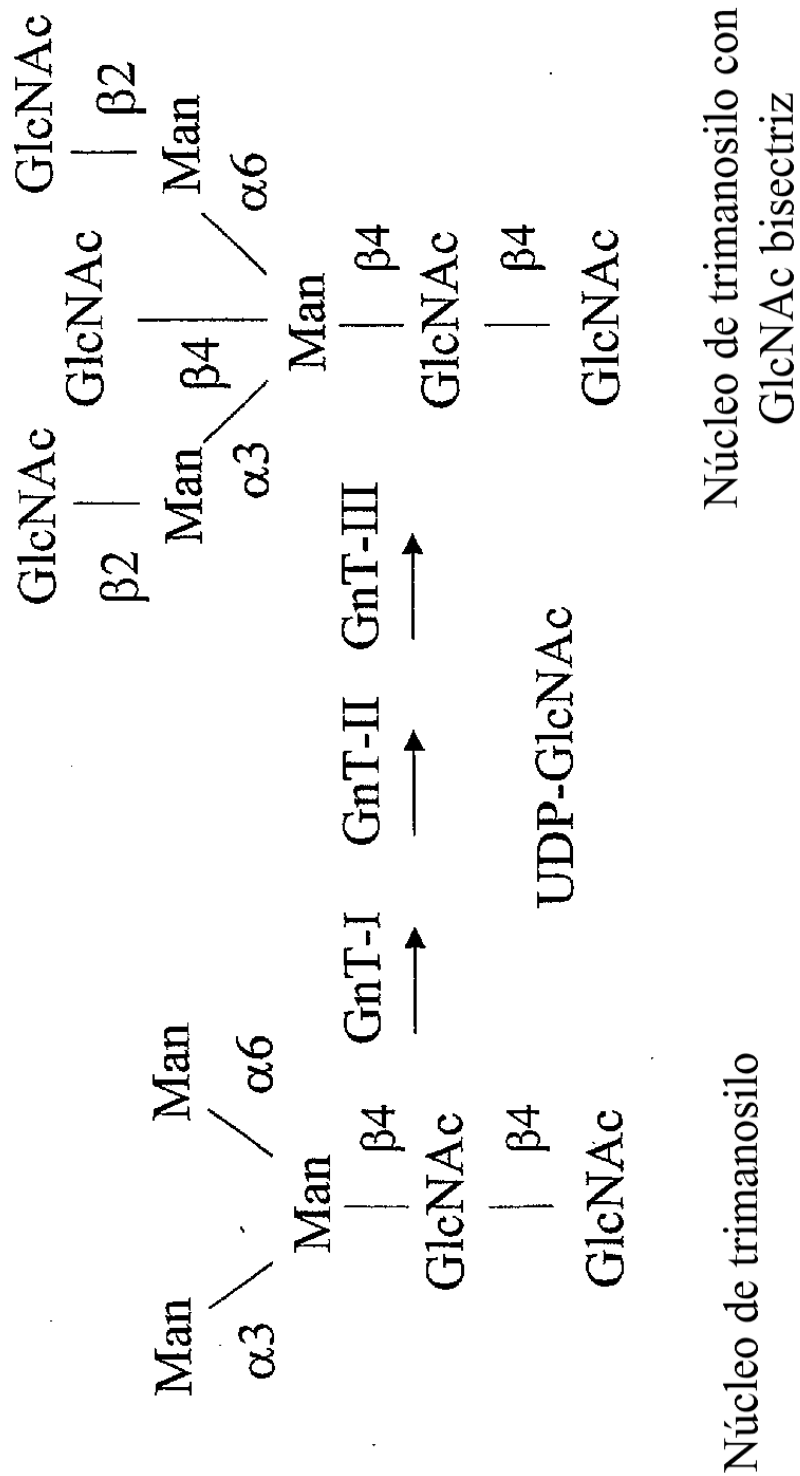


FIG. 2



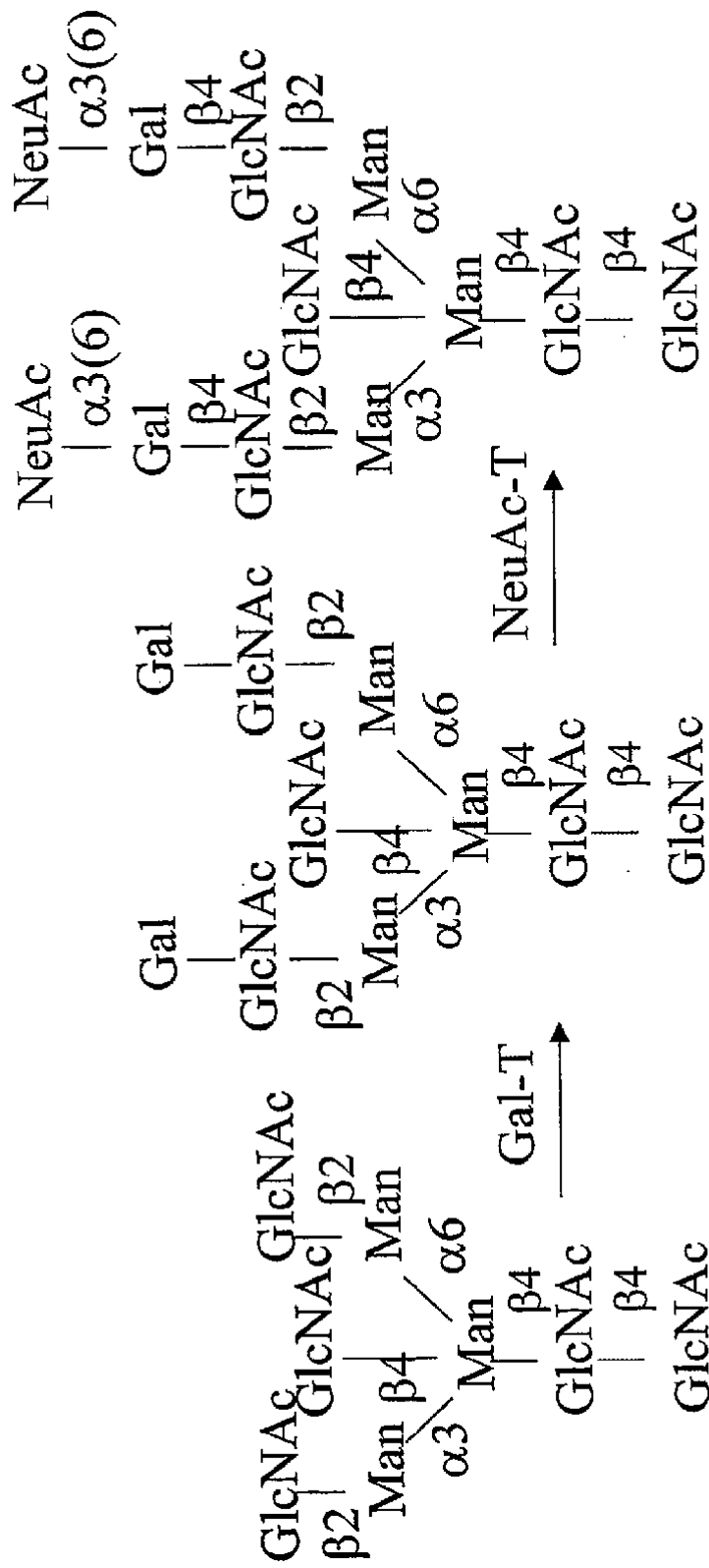


FIG. 4

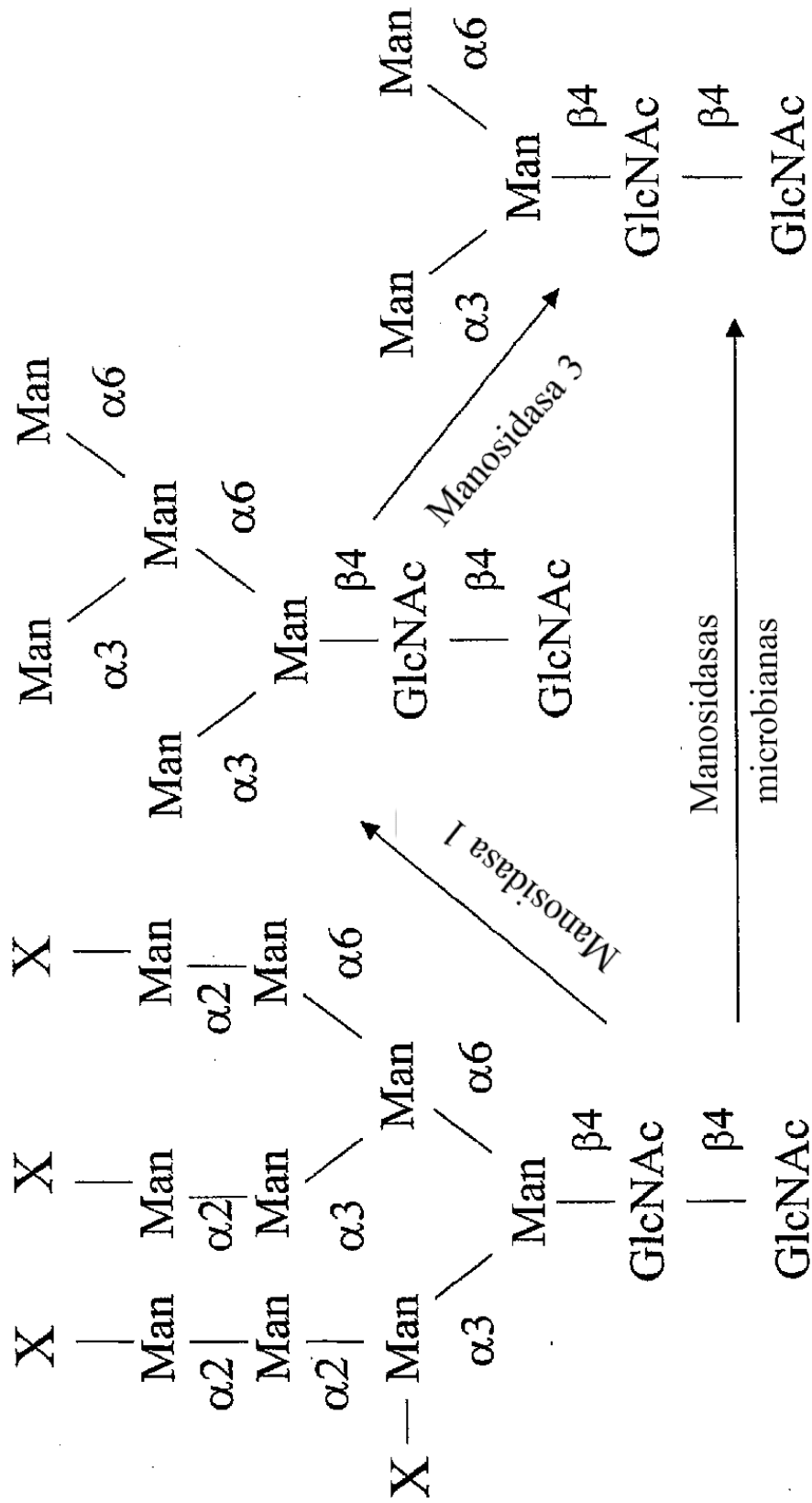


FIG. 5

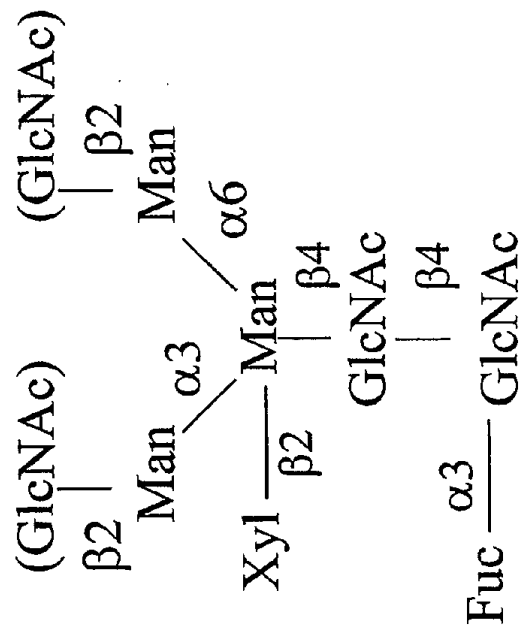


FIG. 6

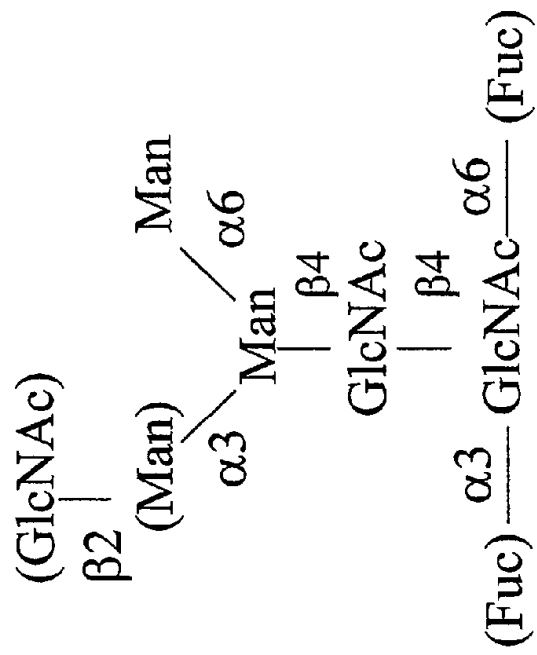
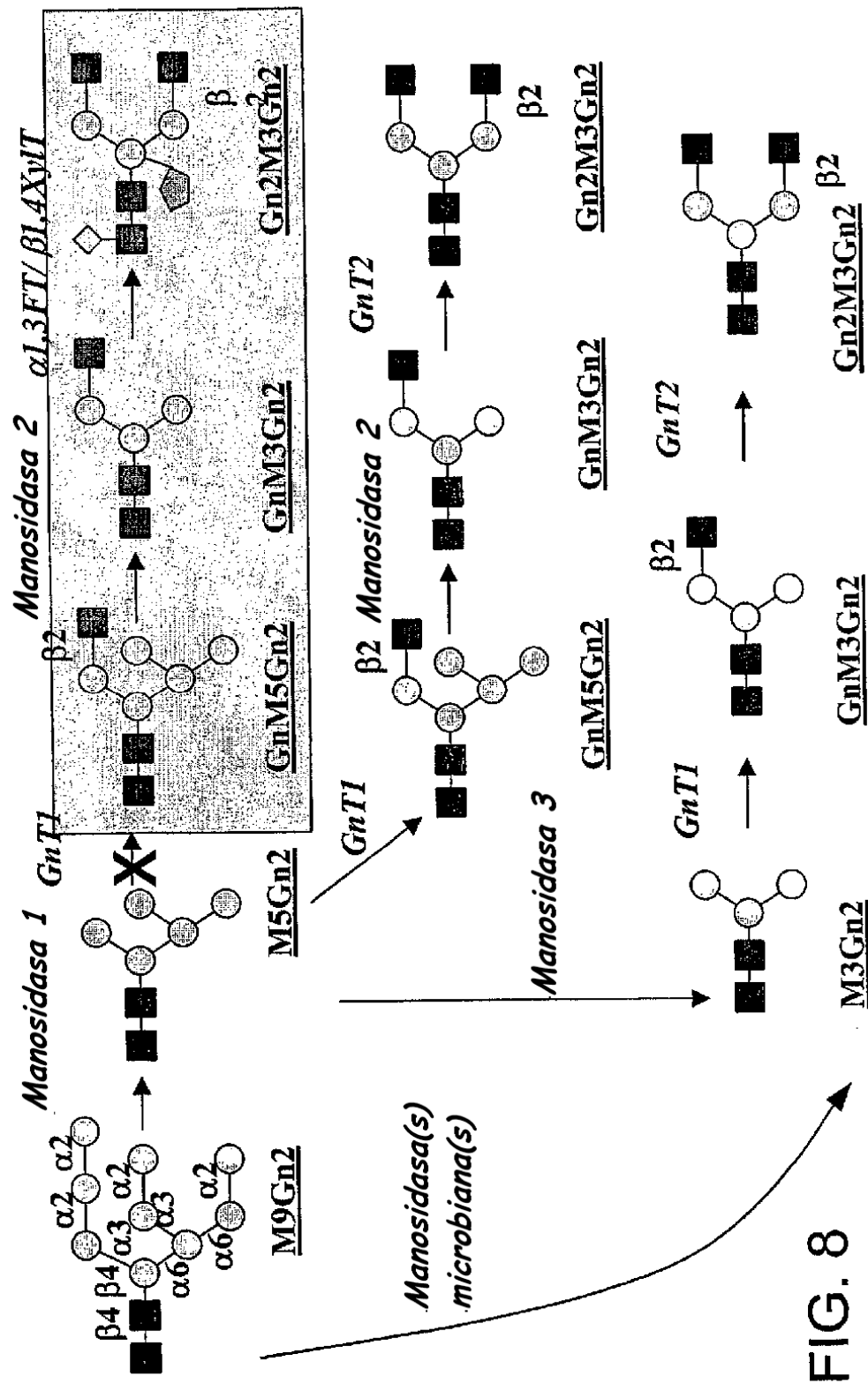


FIG. 7



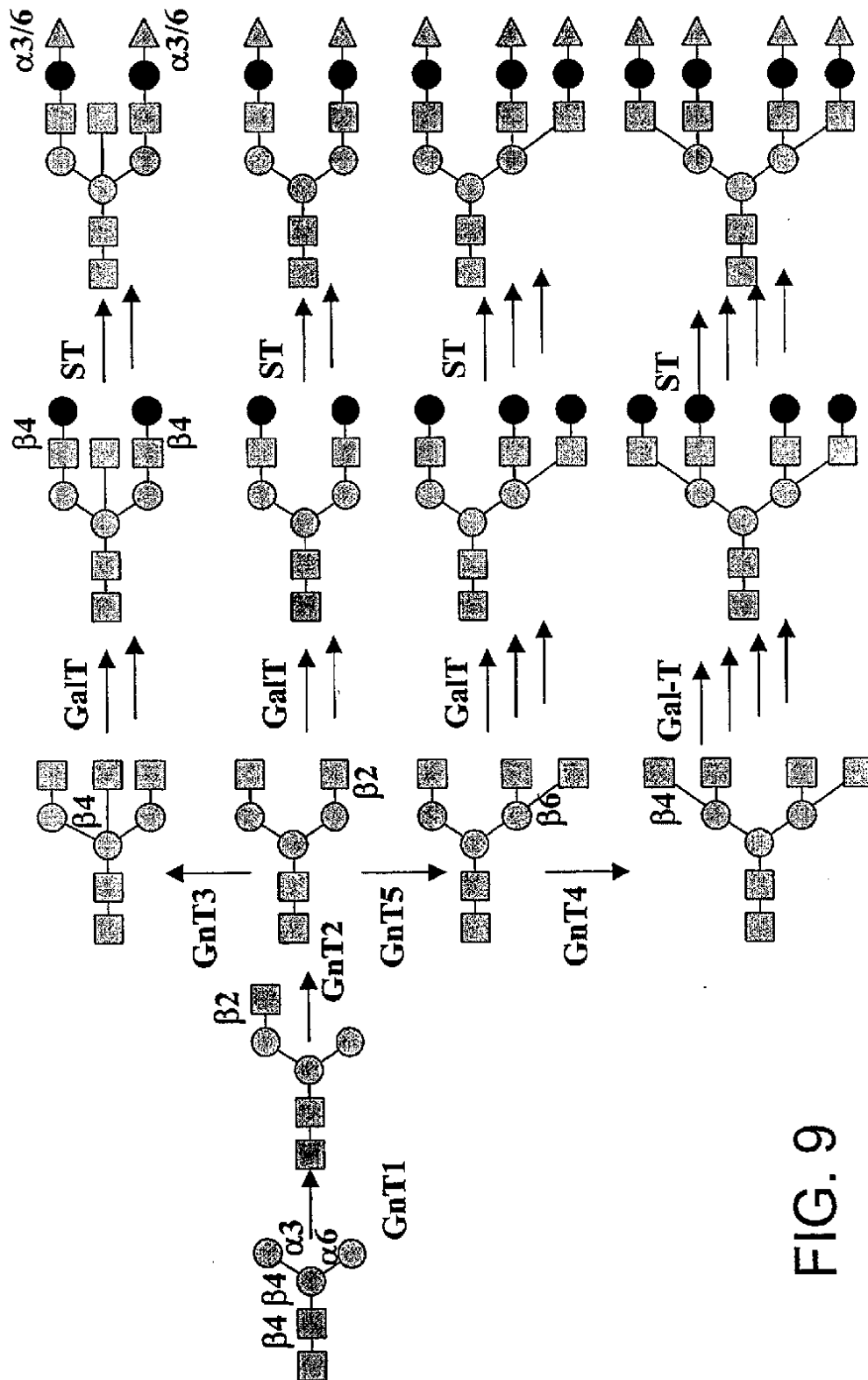


FIG. 9

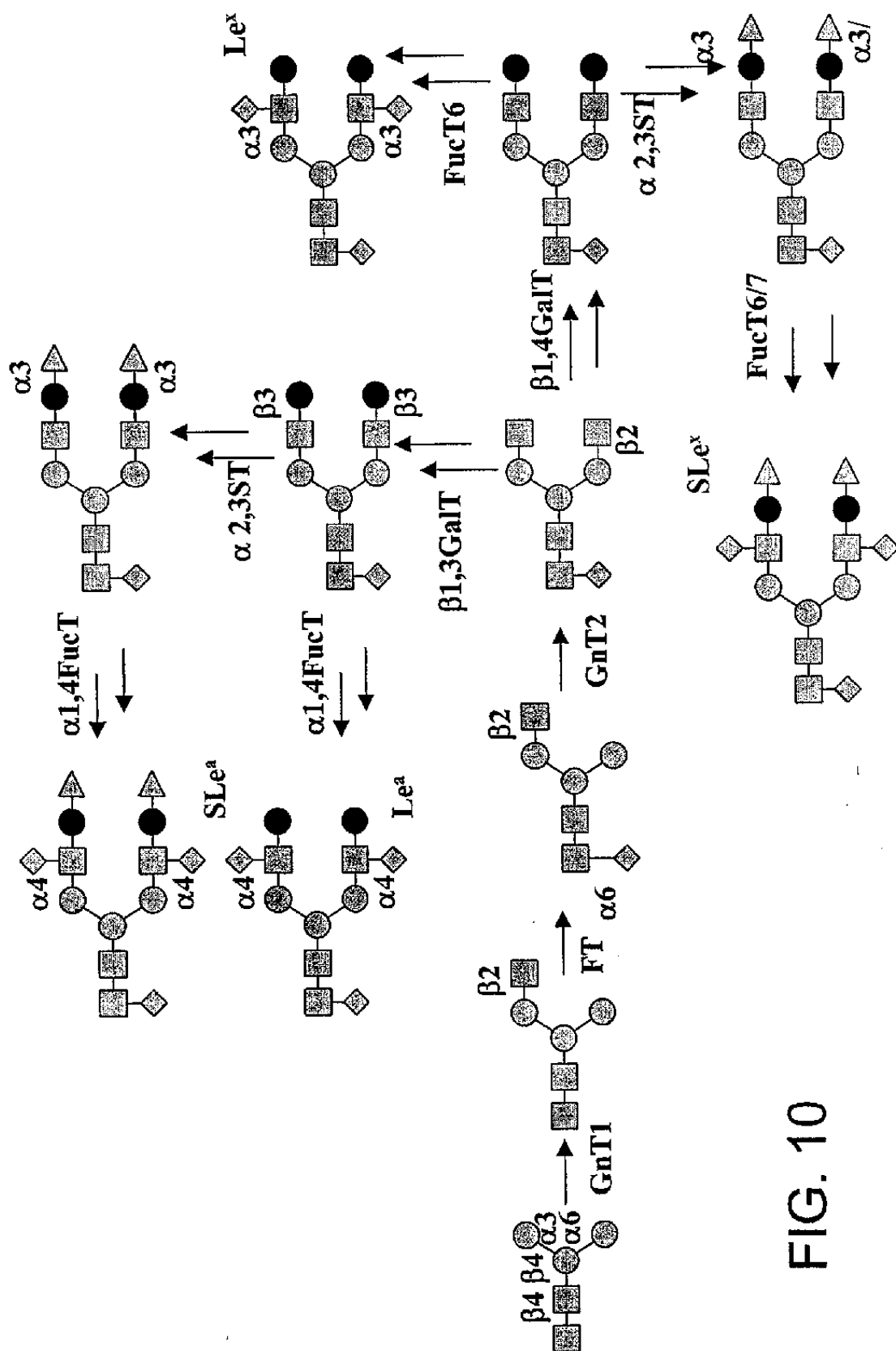


FIG. 10

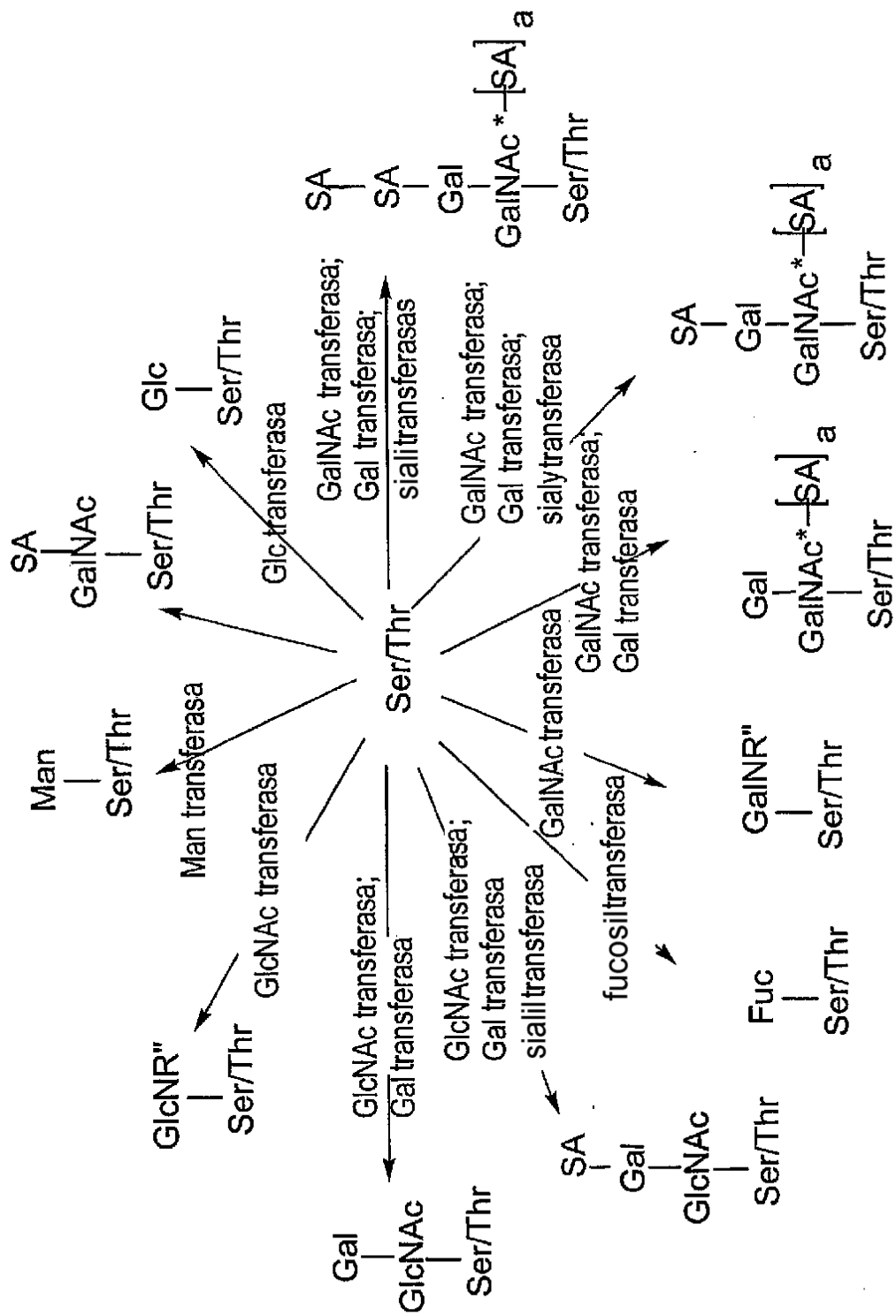
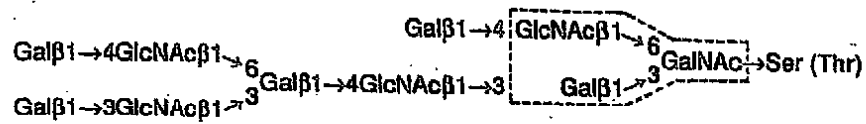
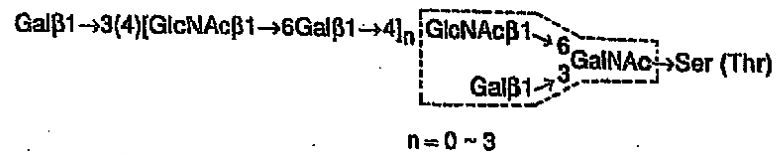
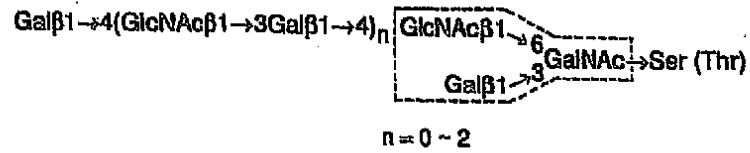


FIG. 11

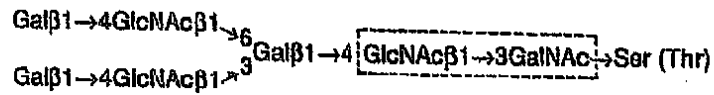
Núcleo 1



Núcleo 2



Núcleo 3



Núcleo 4

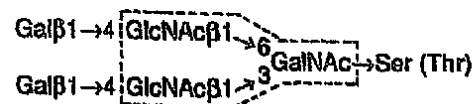
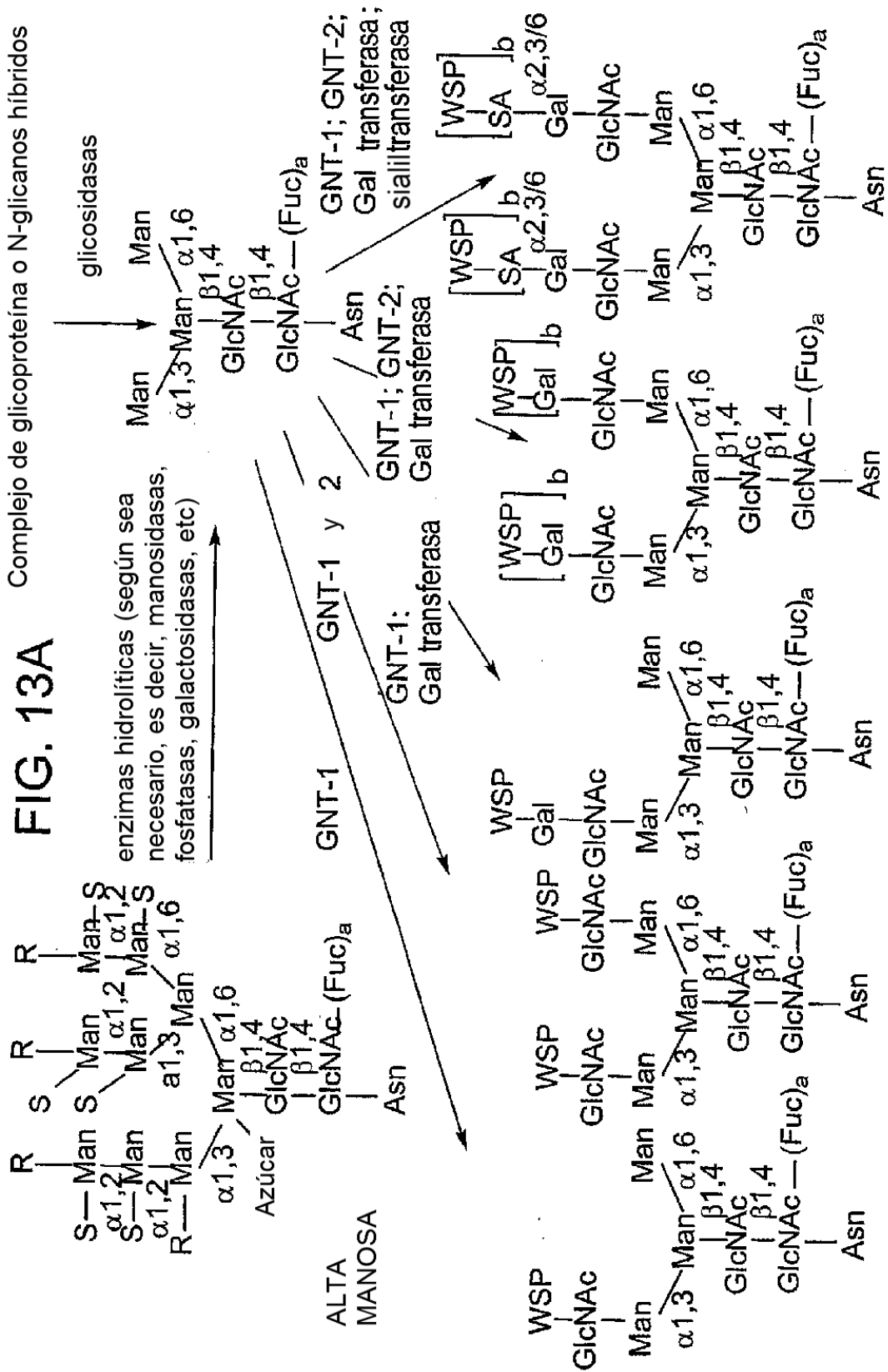


FIG. 12

FIG. 13A
Complejo de glicoproteína o N-glicanos híbridos



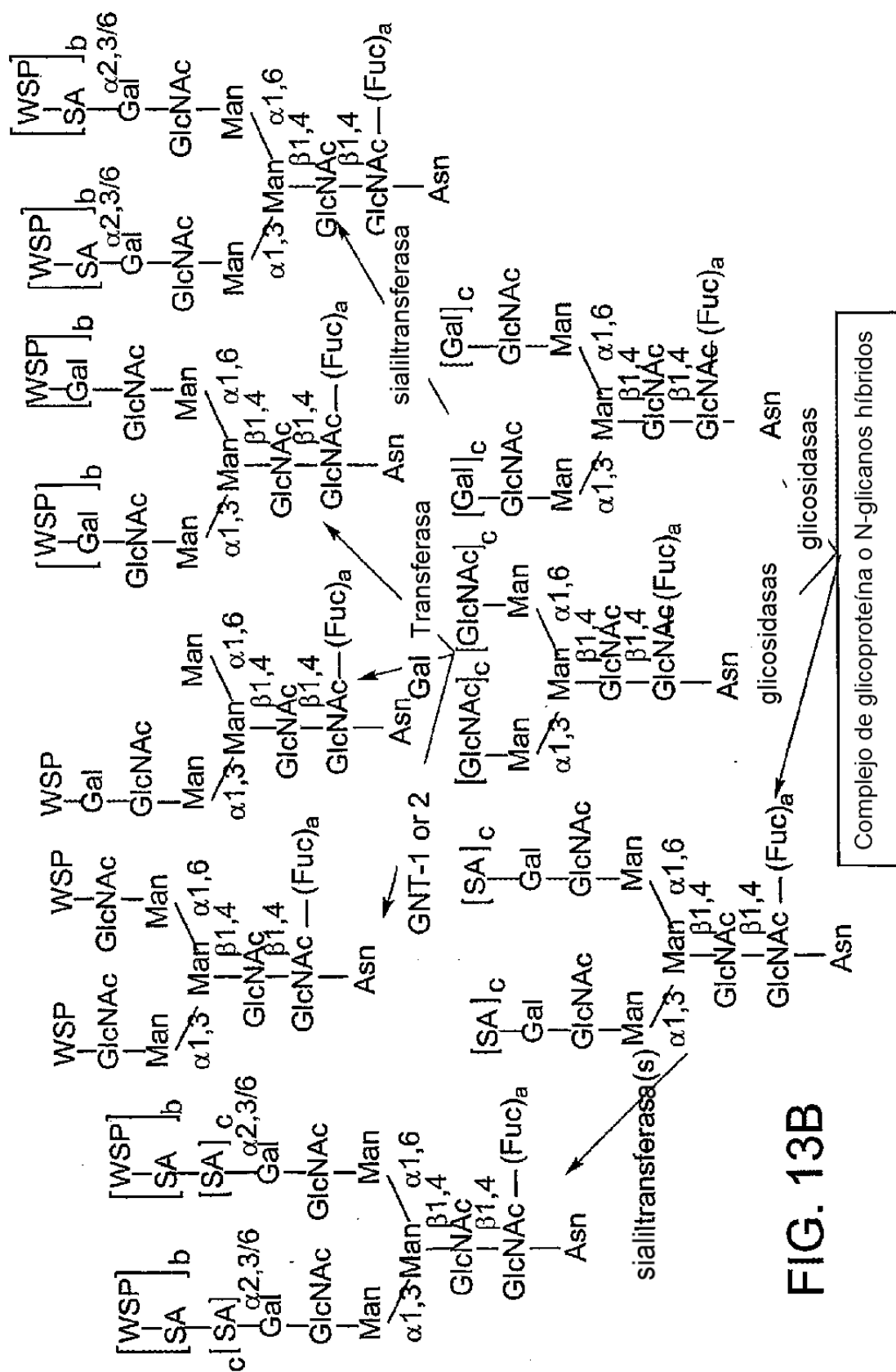


FIG. 13B

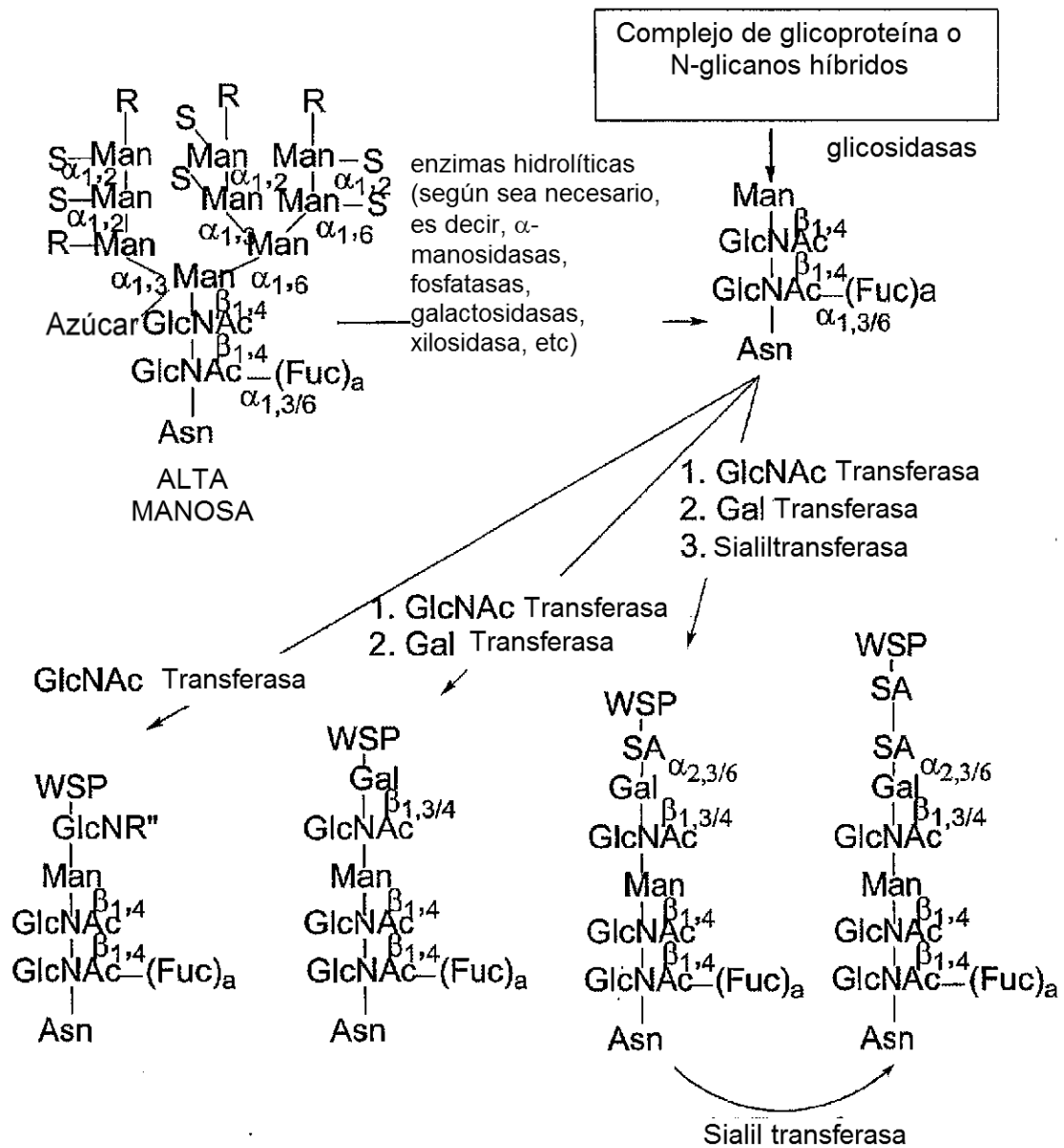


FIG. 14

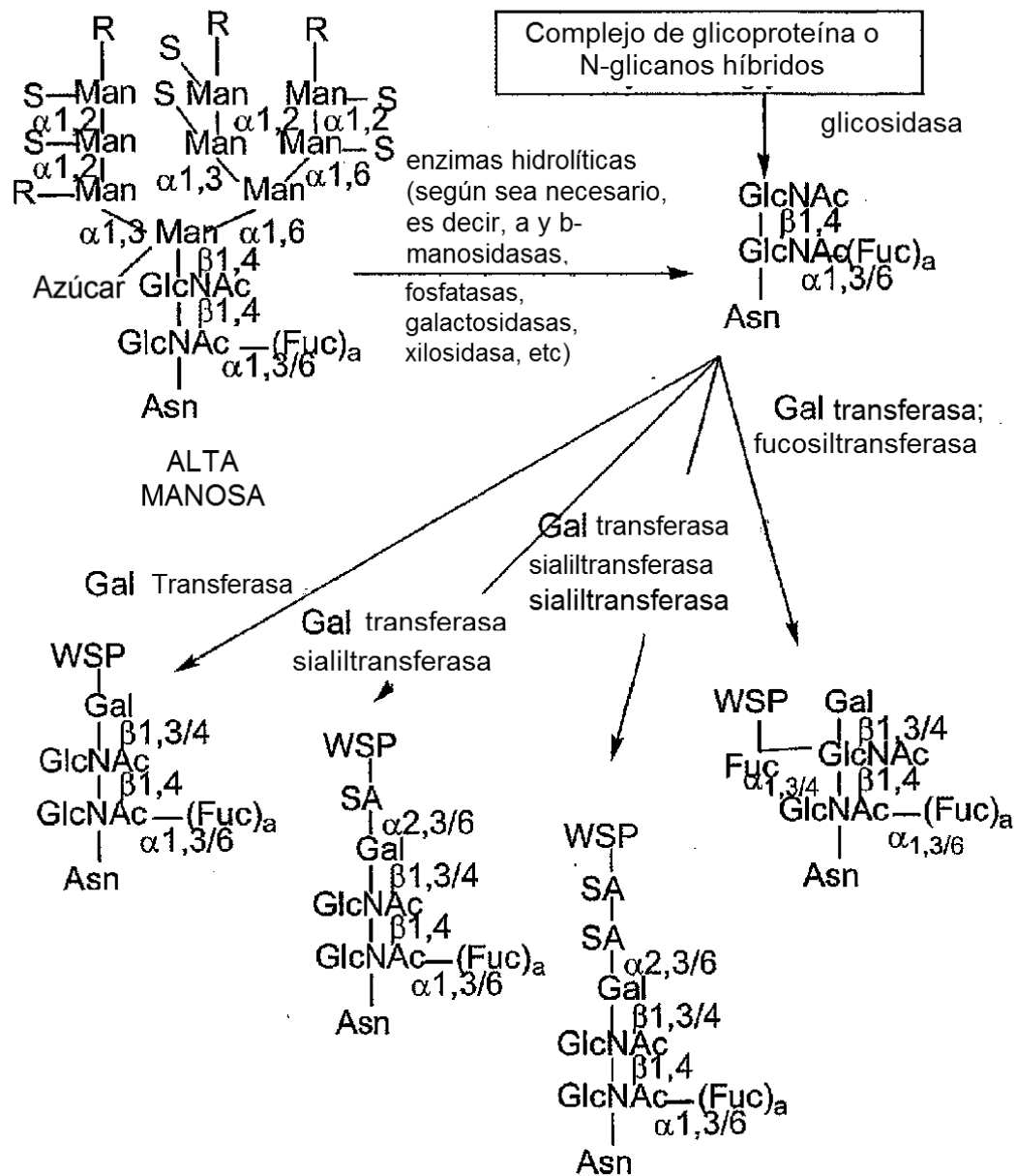


FIG. 15

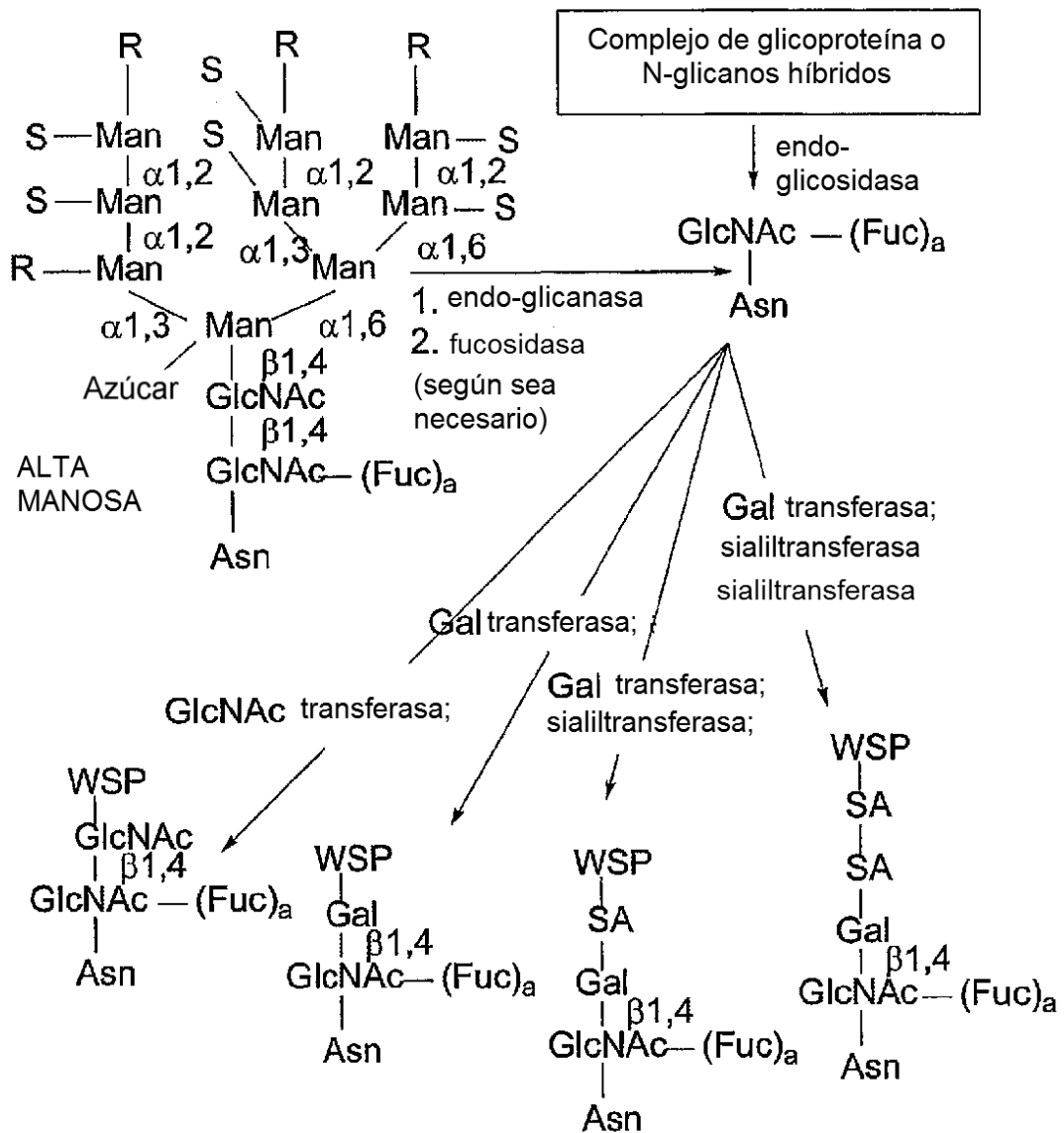


FIG. 16

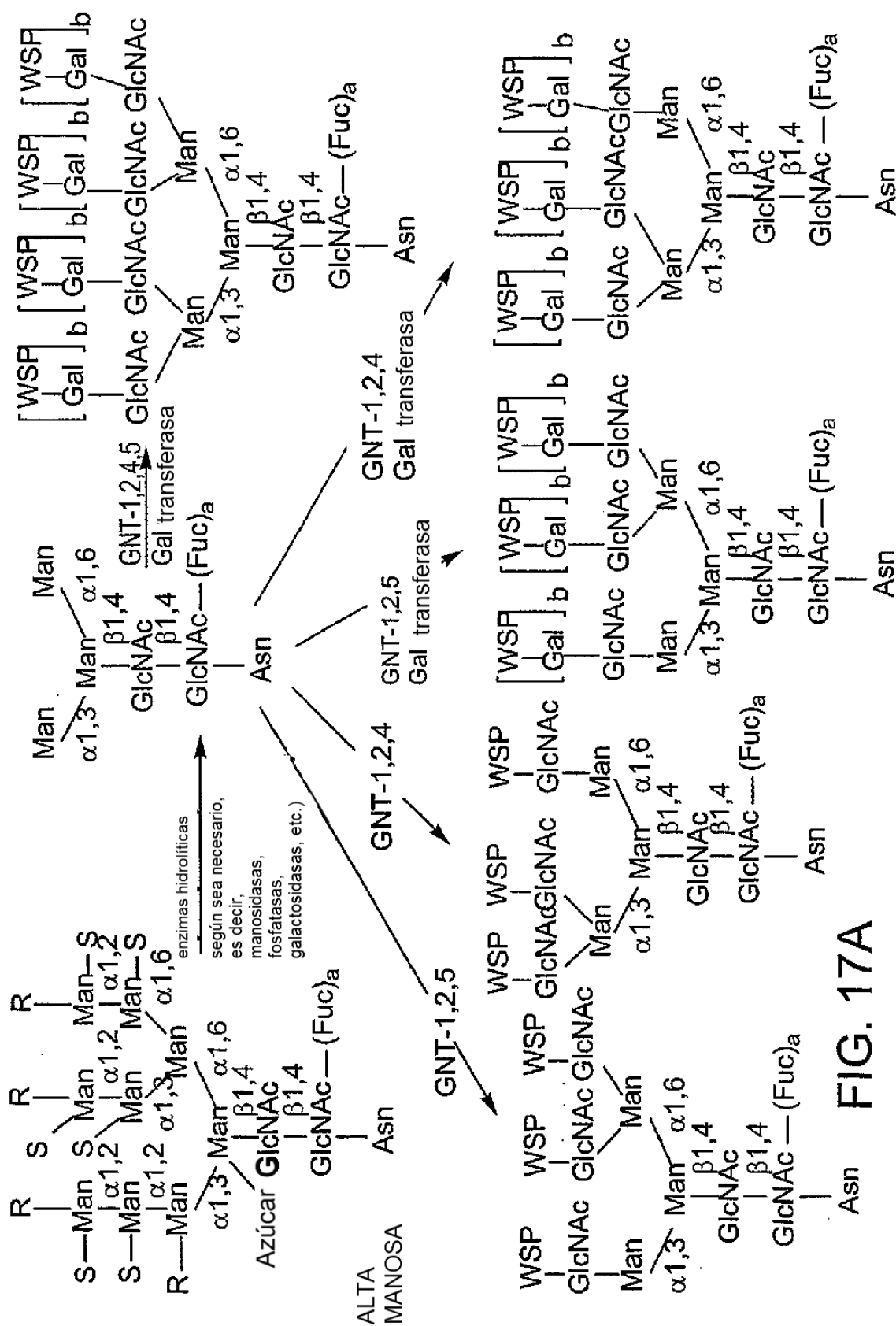


FIG. 17A

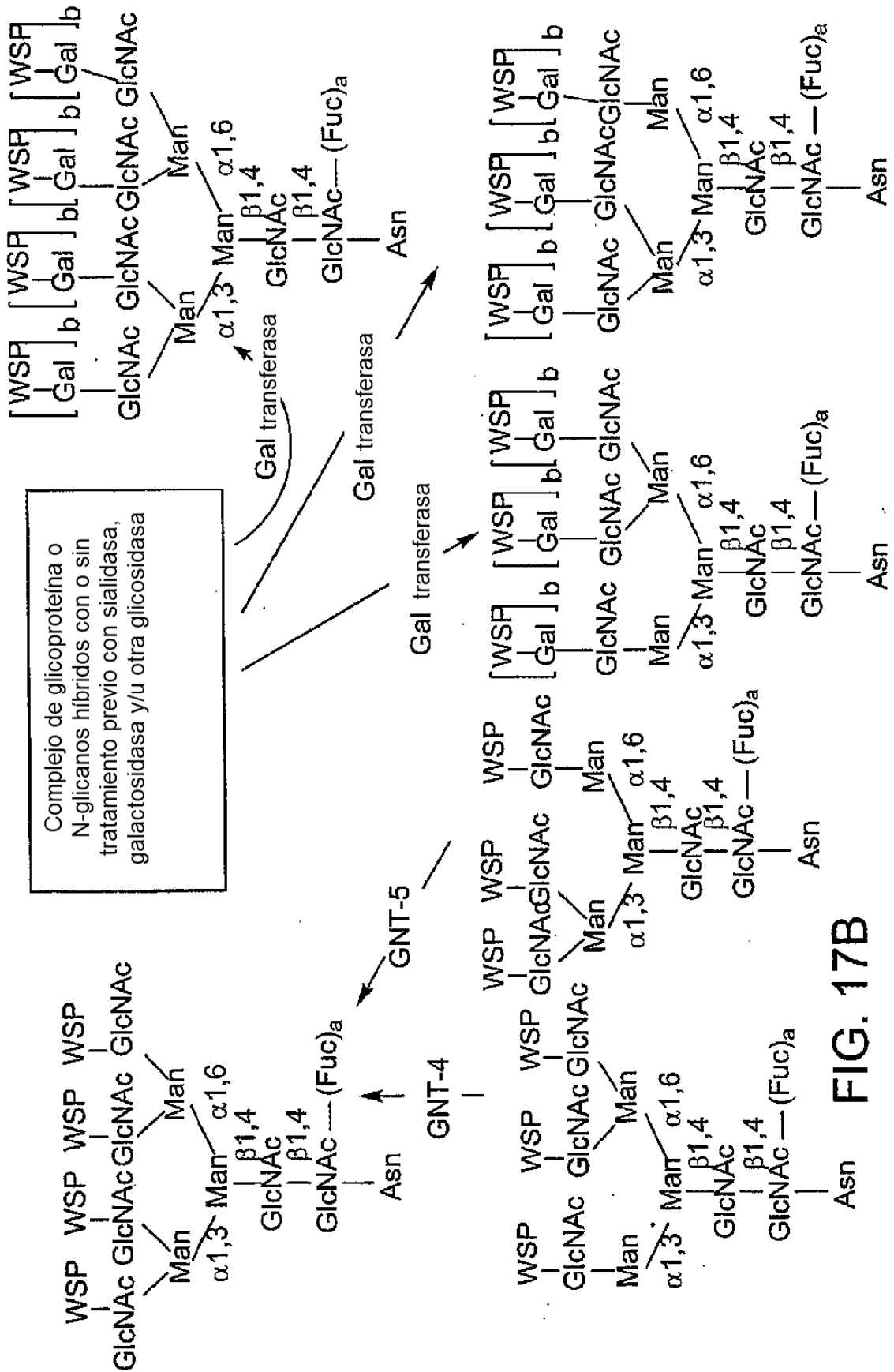
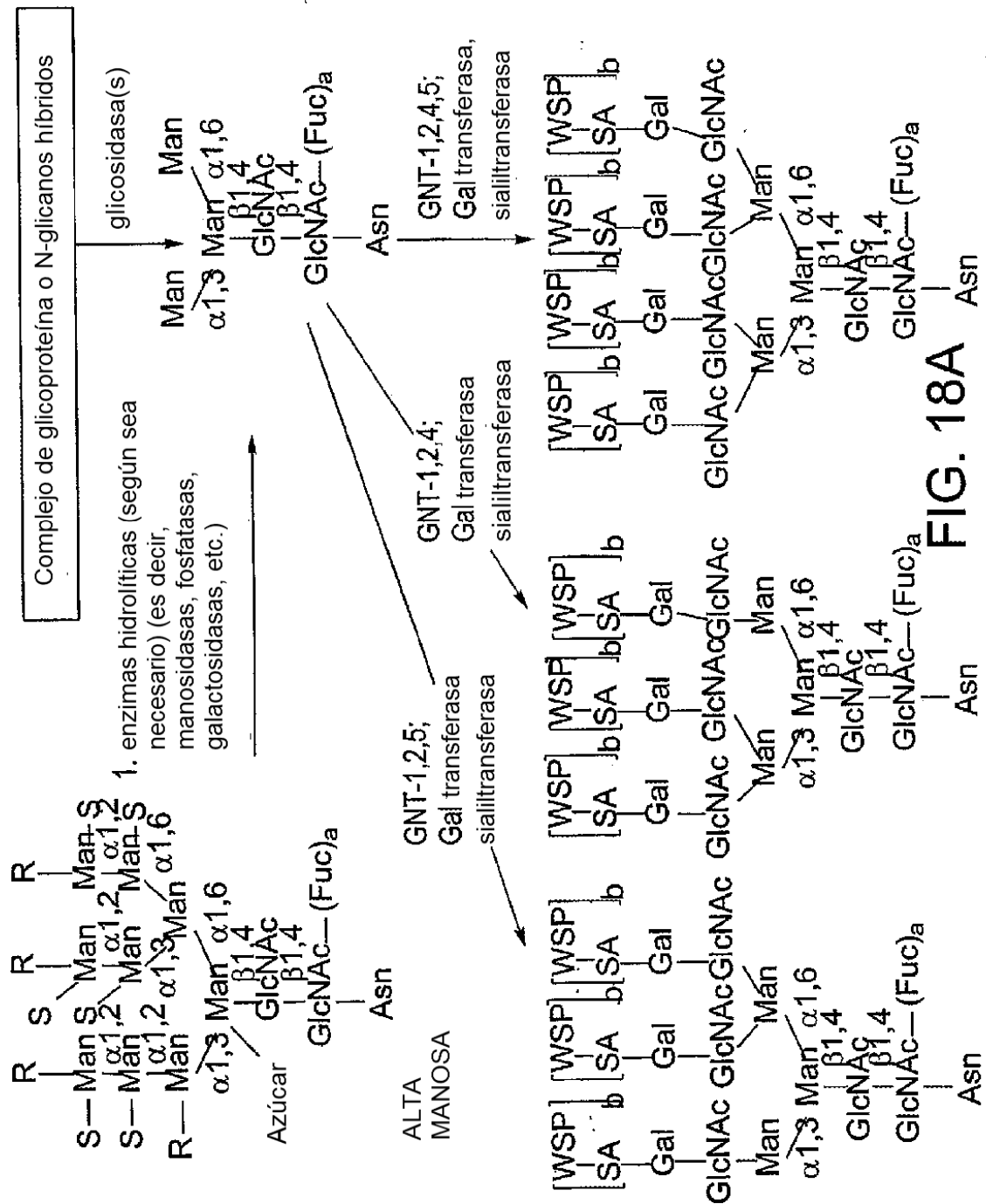


FIG. 17B



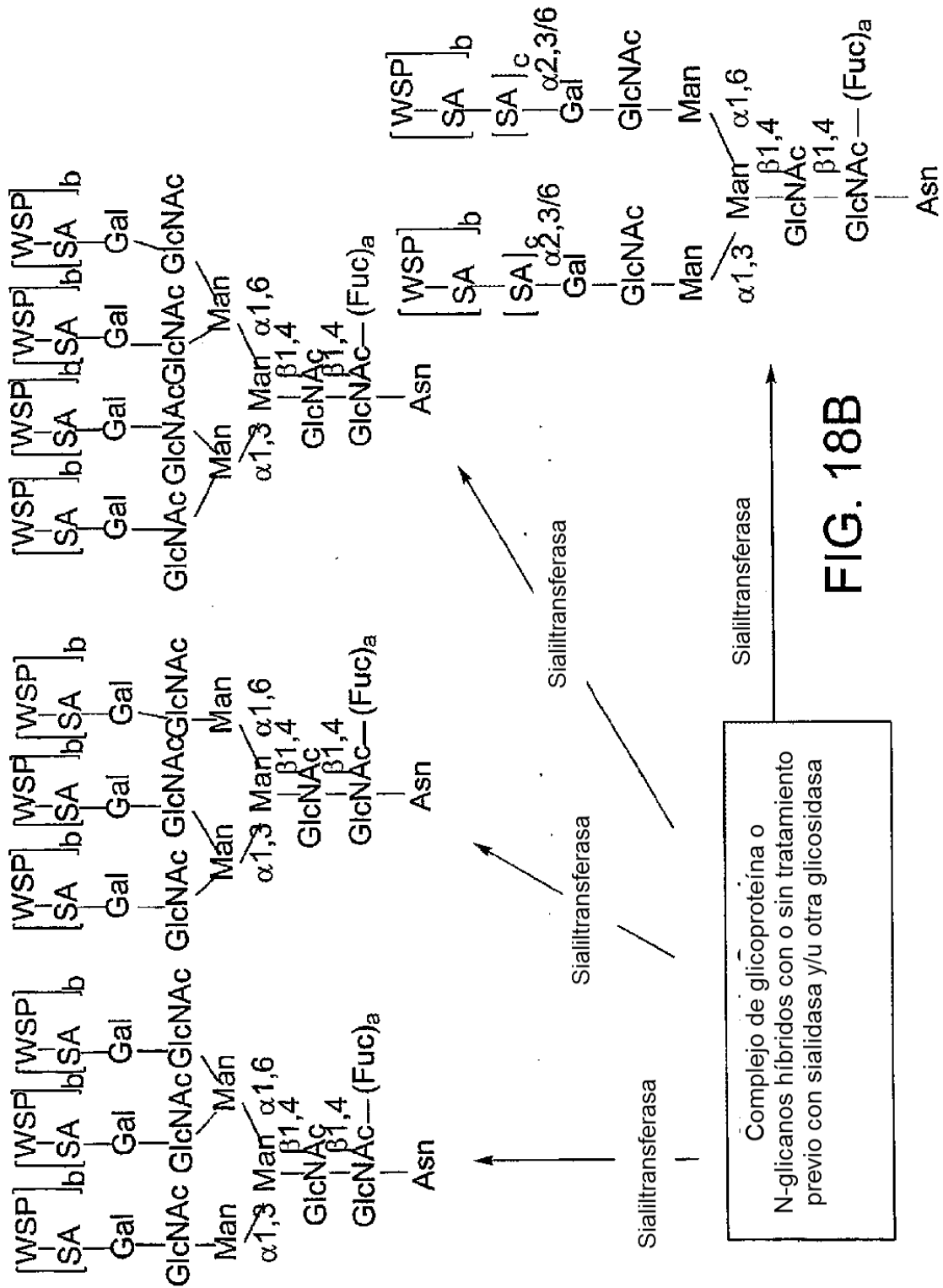


FIG. 18B

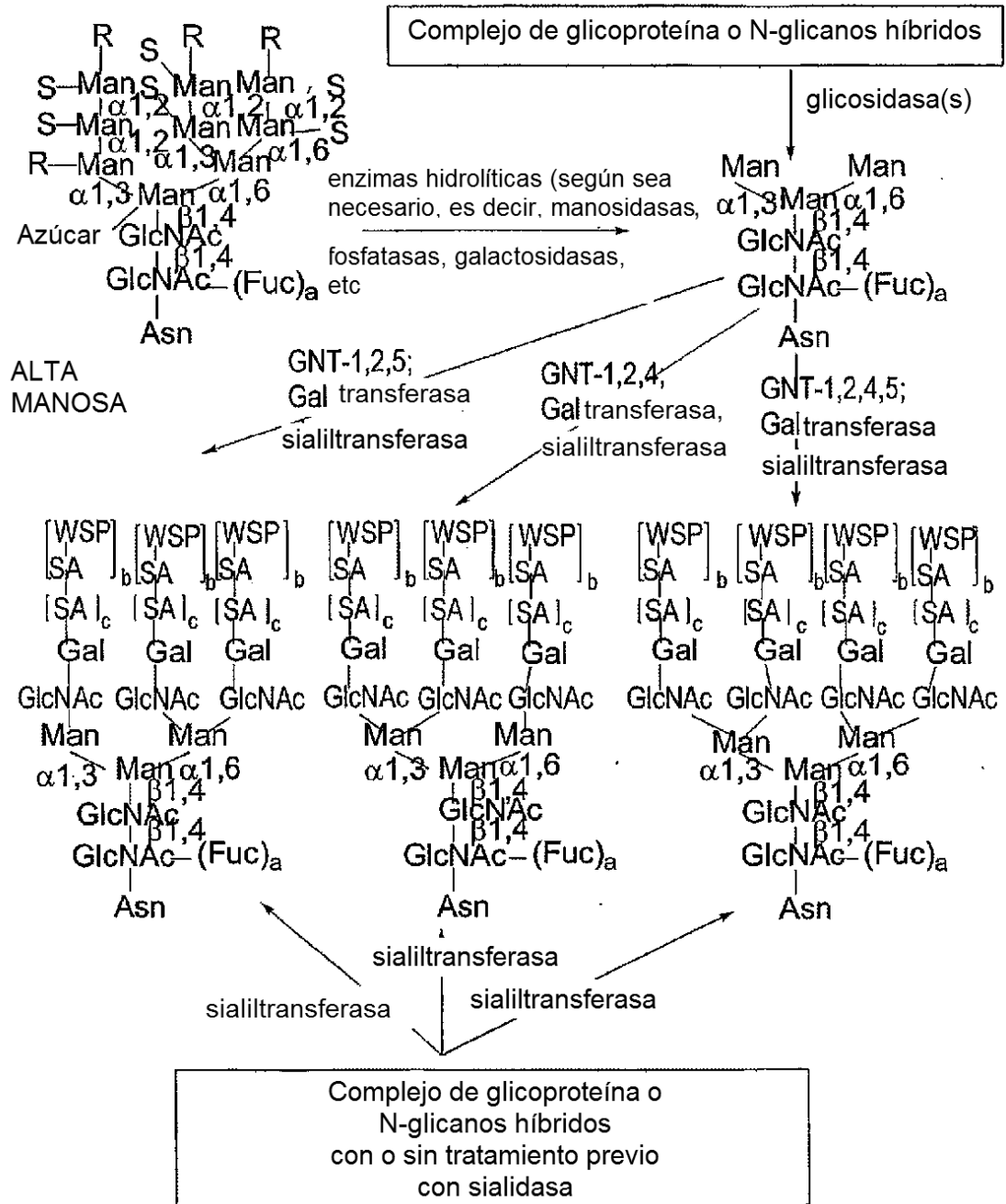
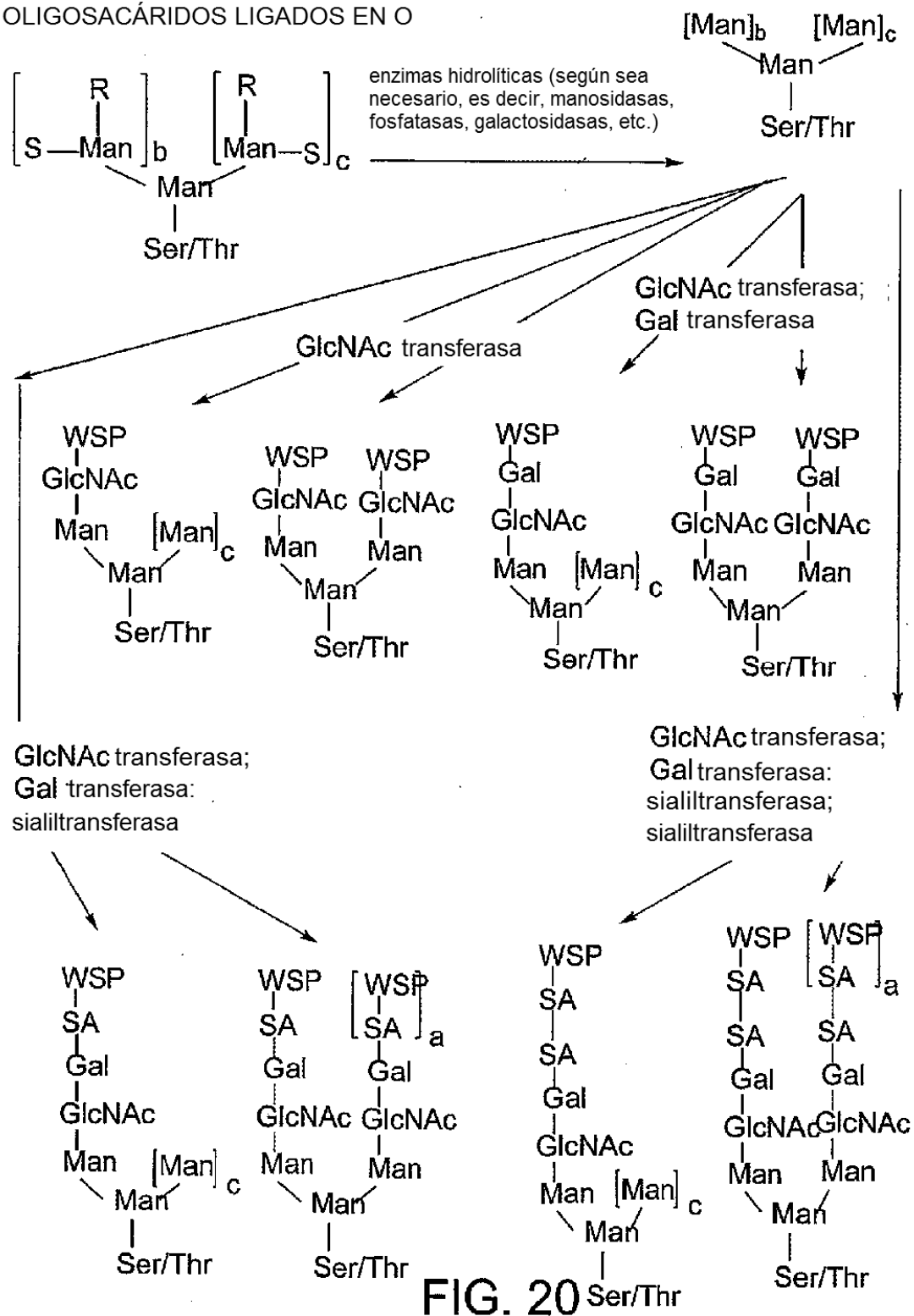
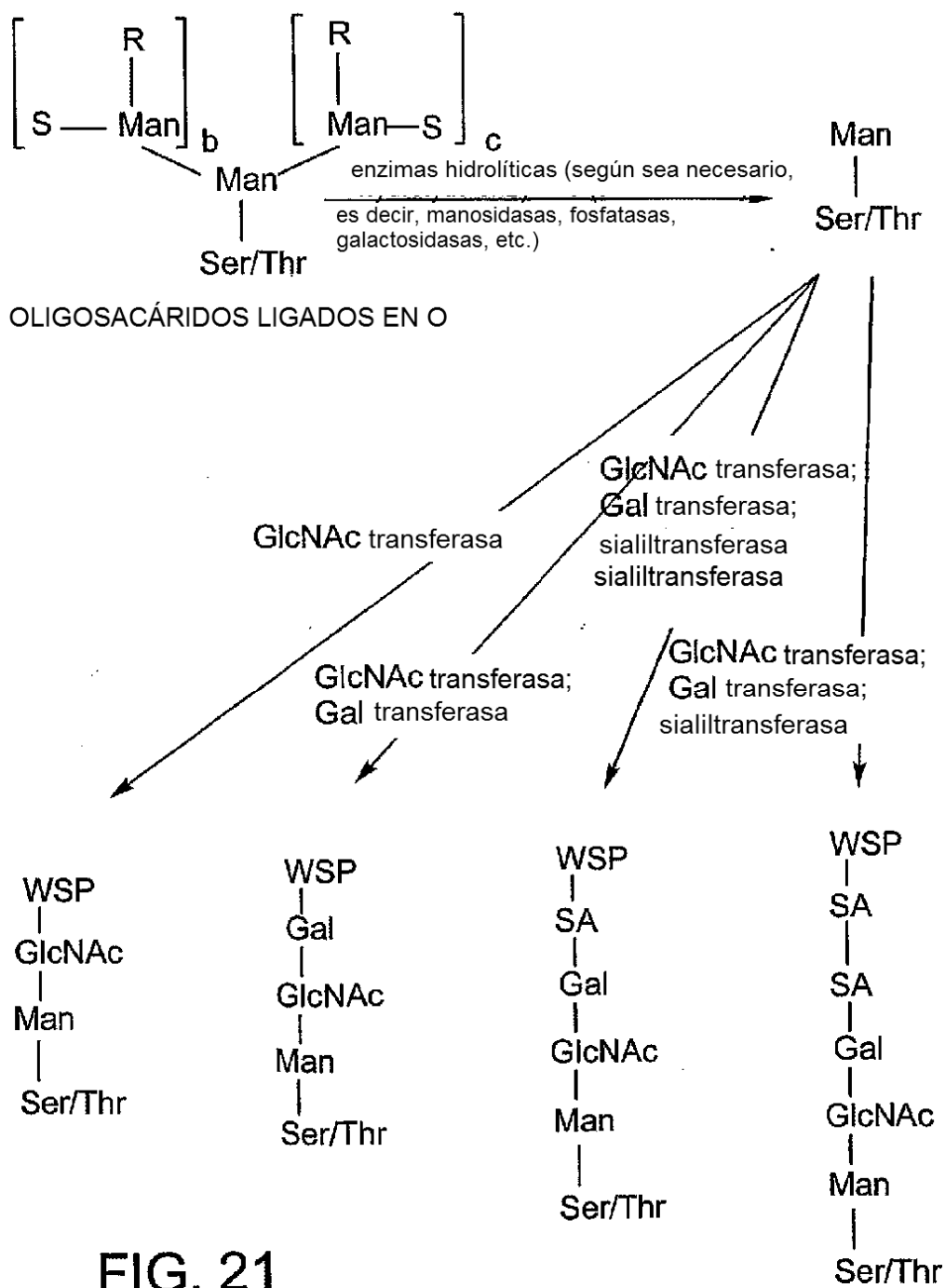


FIG. 19

OLIGOSACÁRIDOS LIGADOS EN O





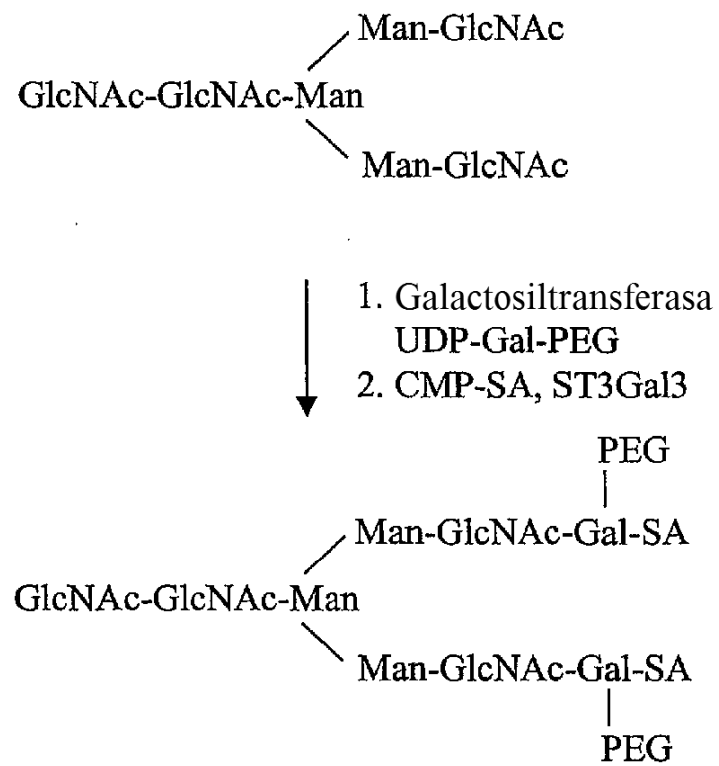


FIG. 22A

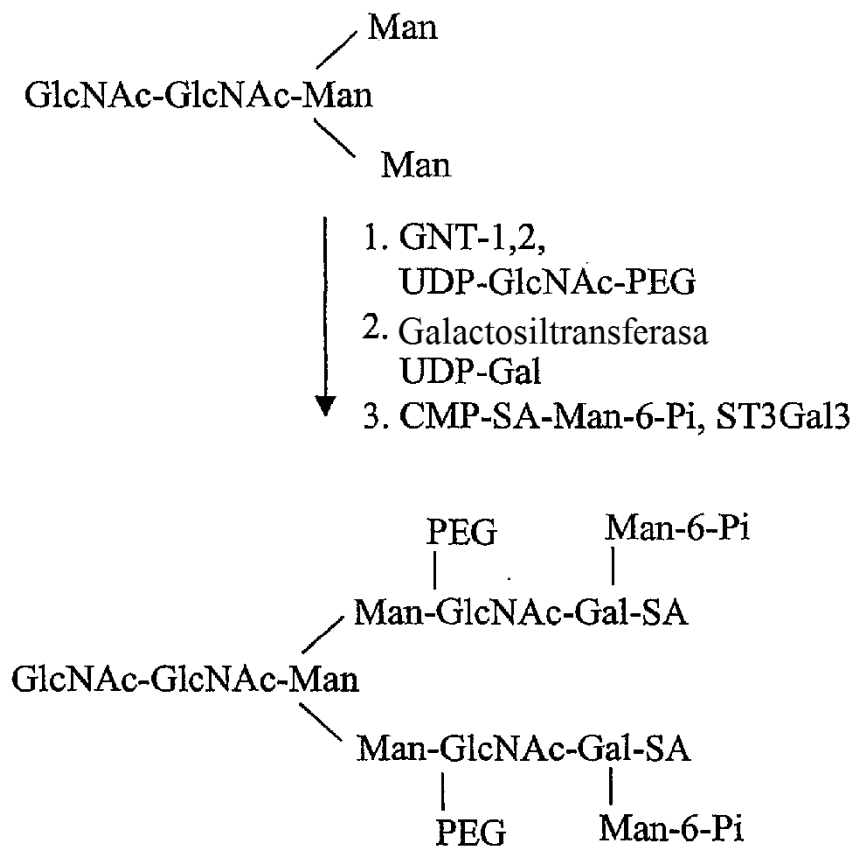


FIG. 22B

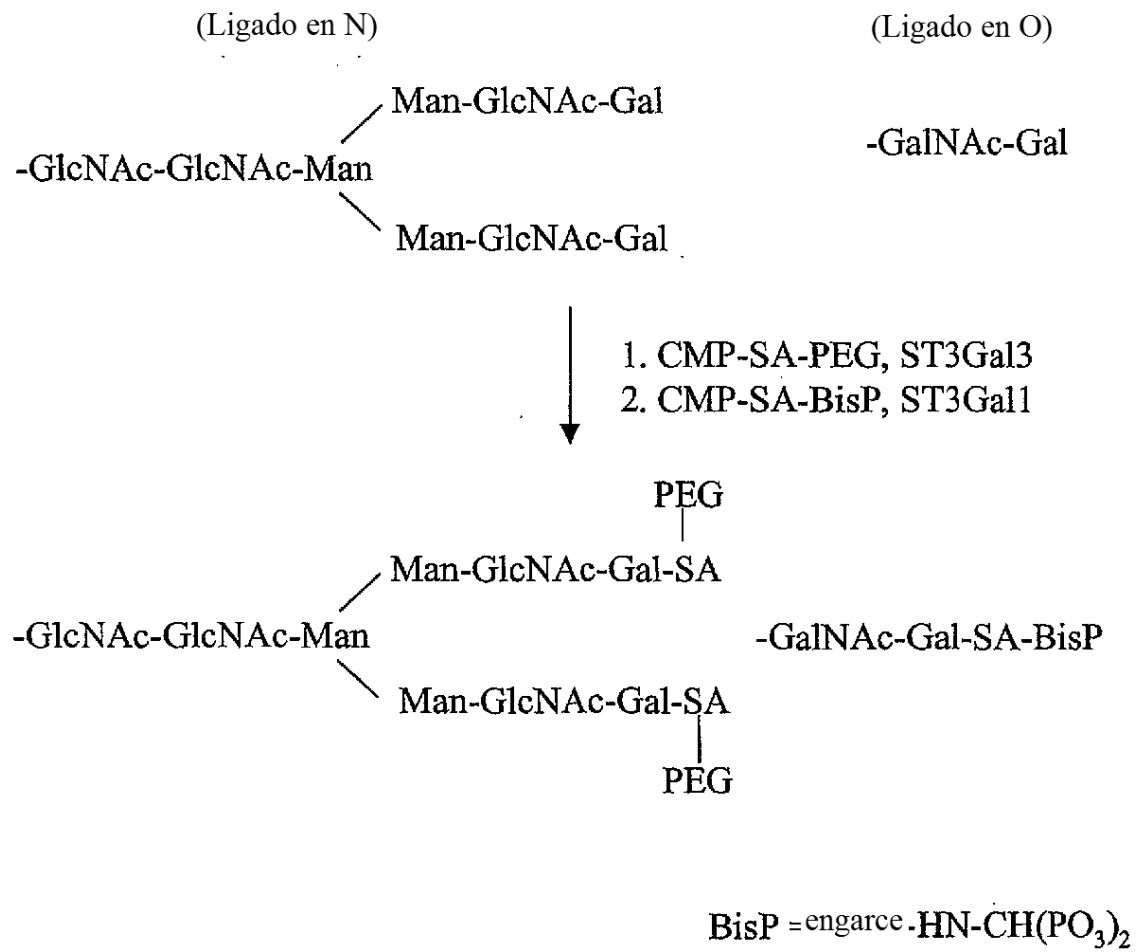


FIG. 22C

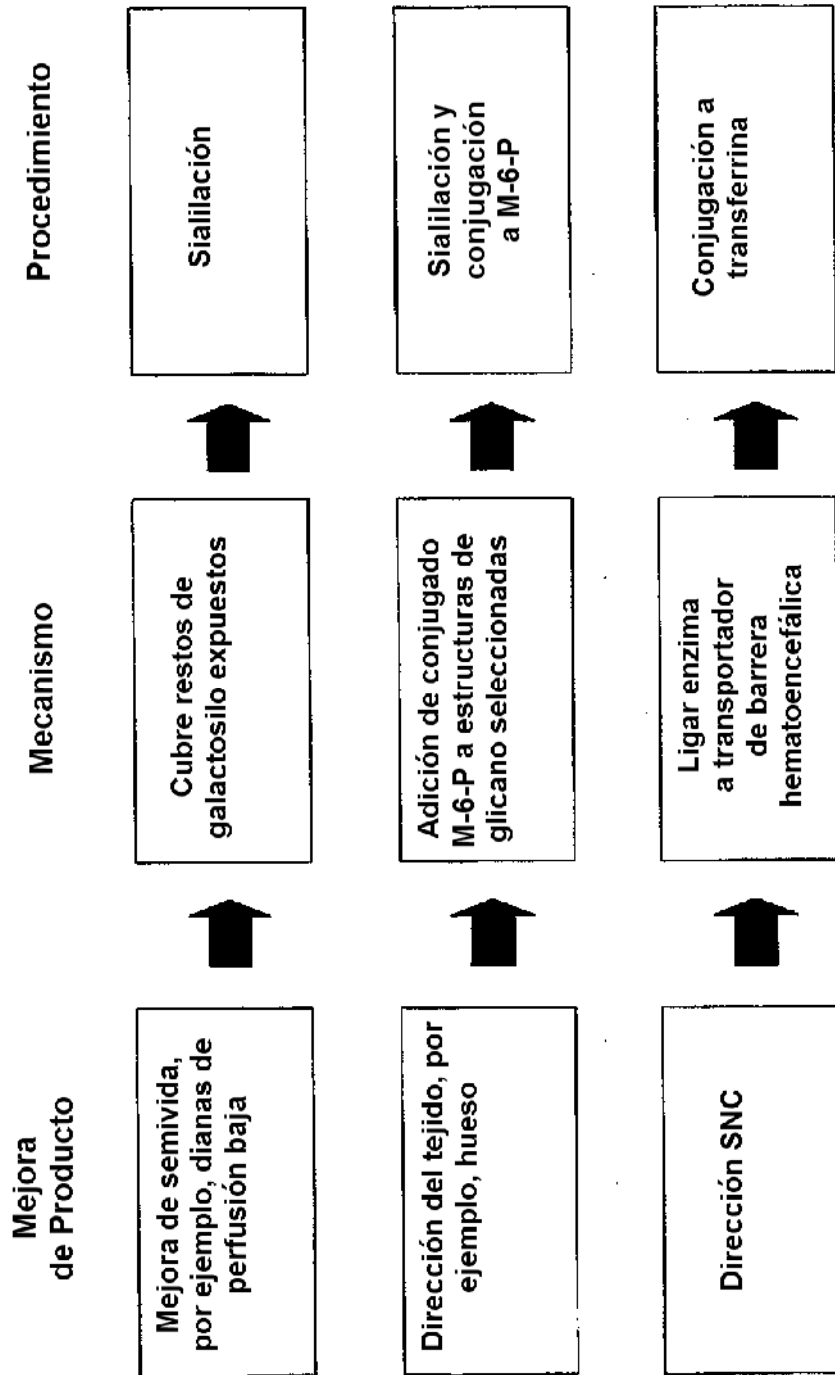


FIG. 23

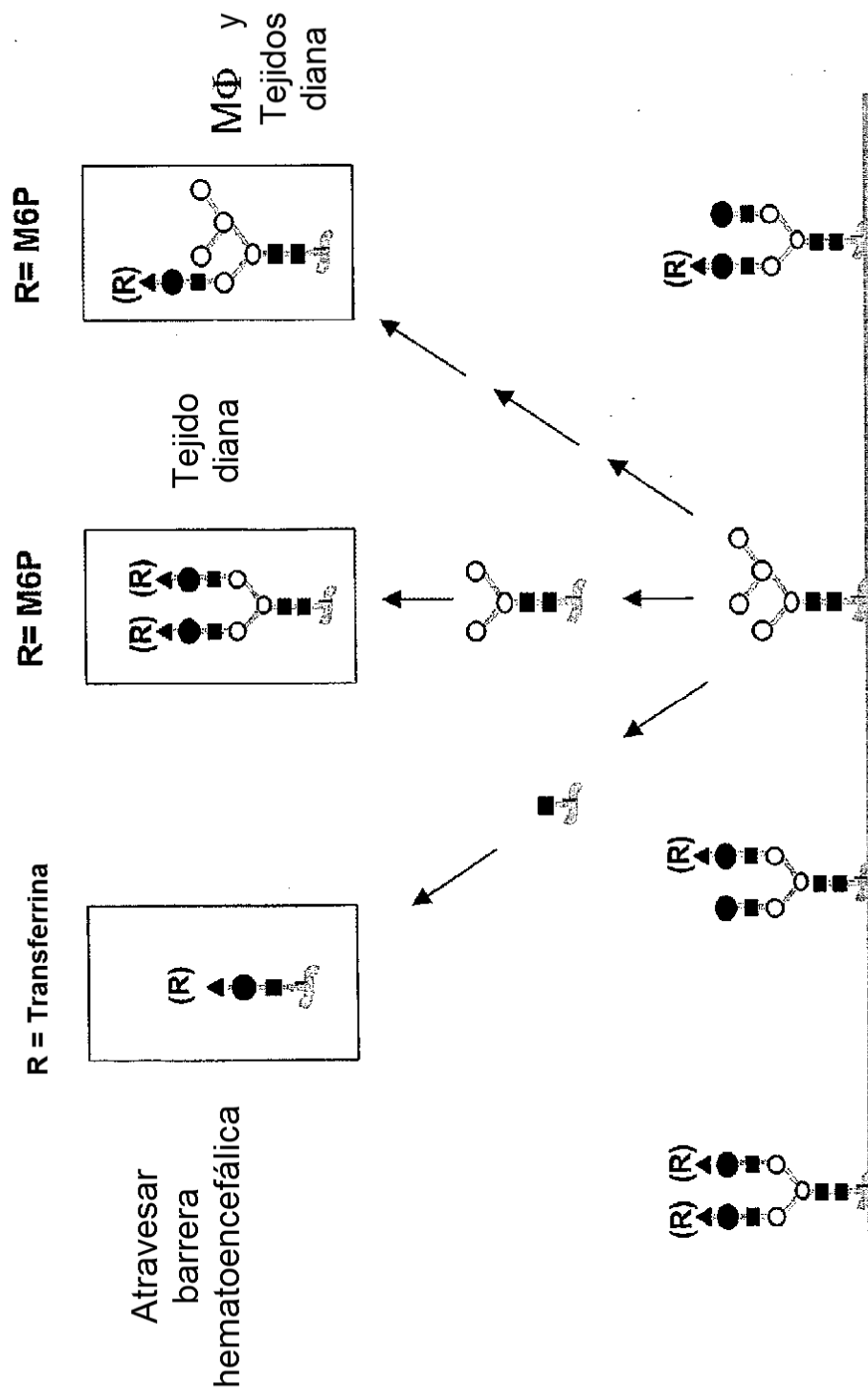


FIG. 24

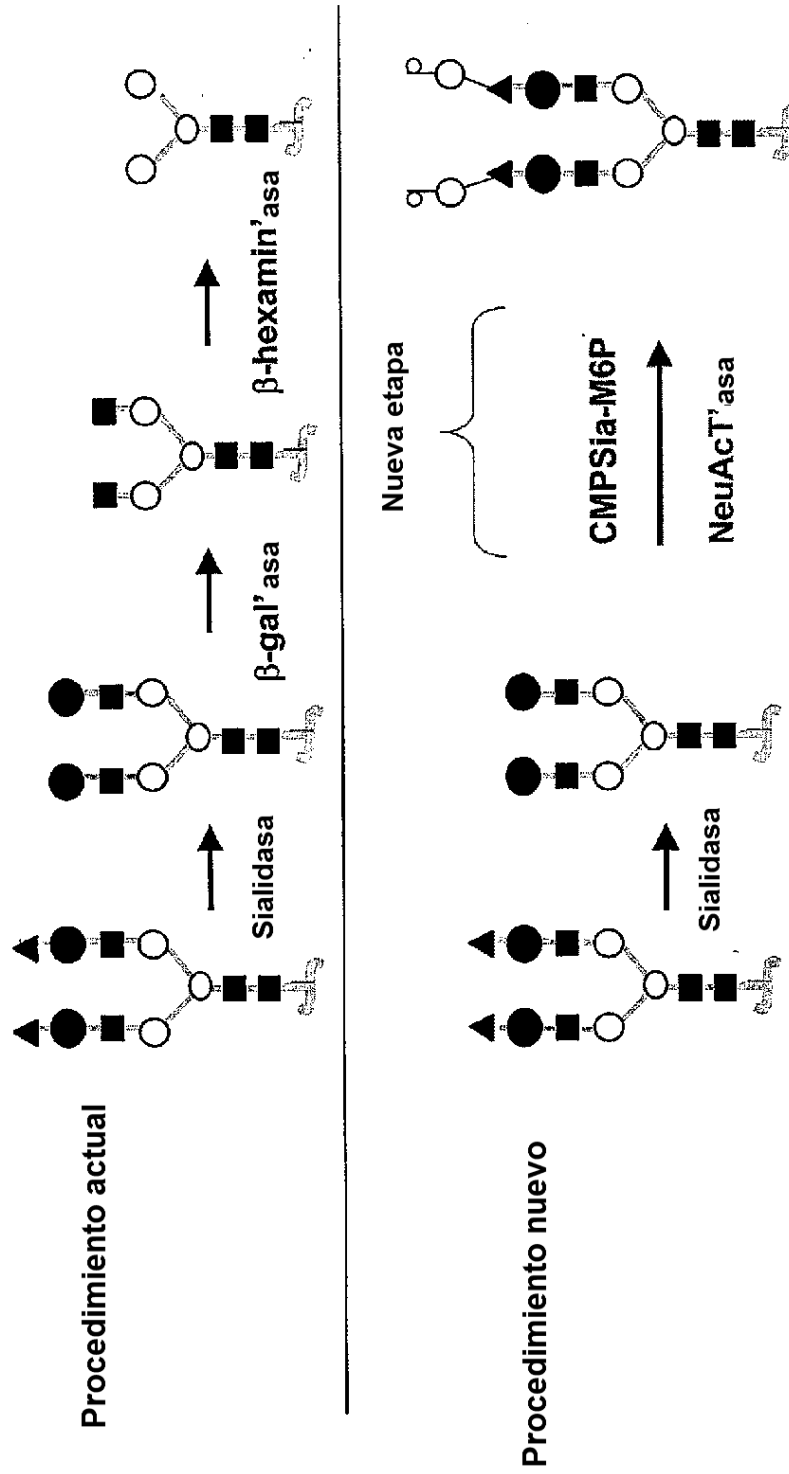


FIG. 25

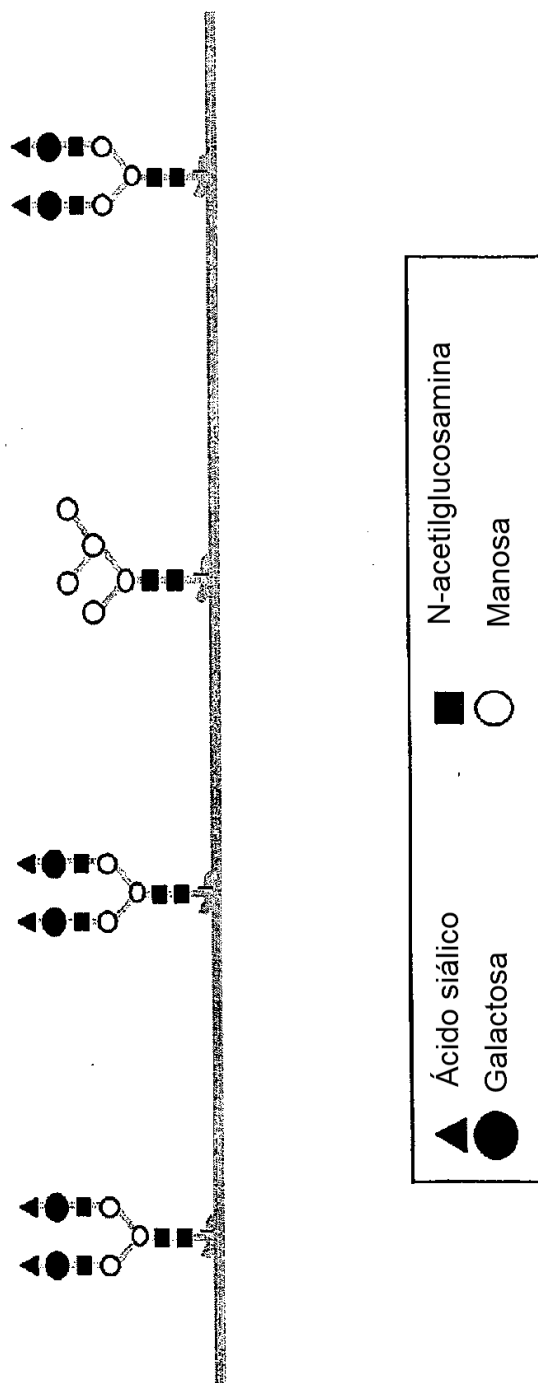
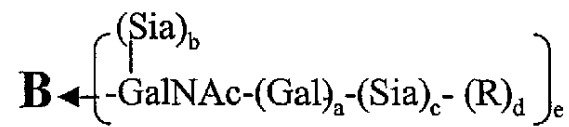
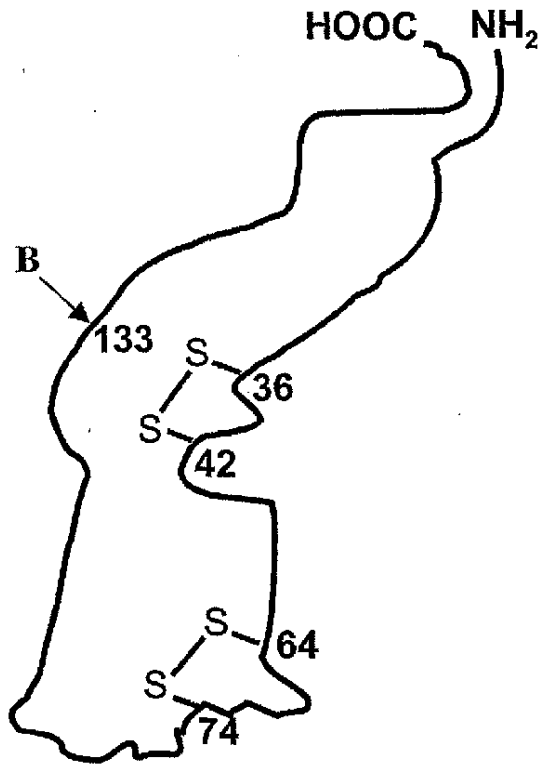


FIG. 26



a-c, c (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

d = 0

R = grupo modificador, manosa, oligomanosa

FIG. 27A

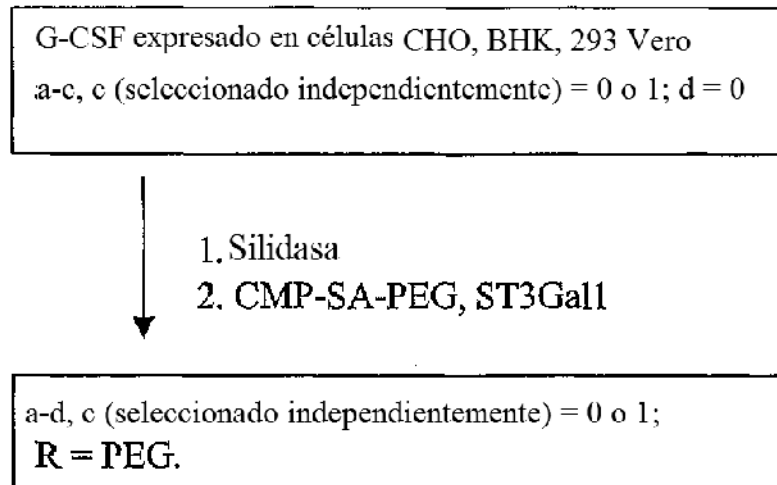


FIG. 27B

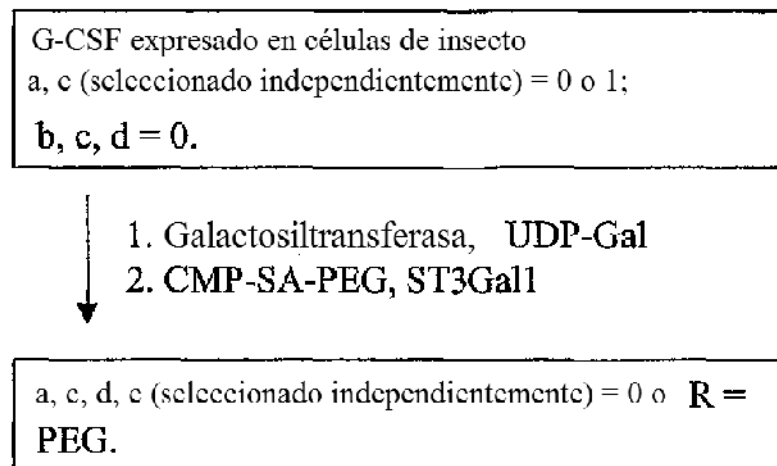


FIG. 27C

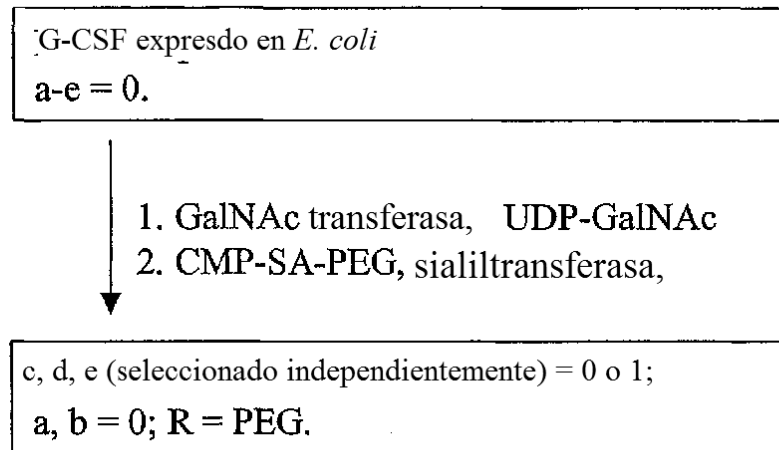


FIG. 27D

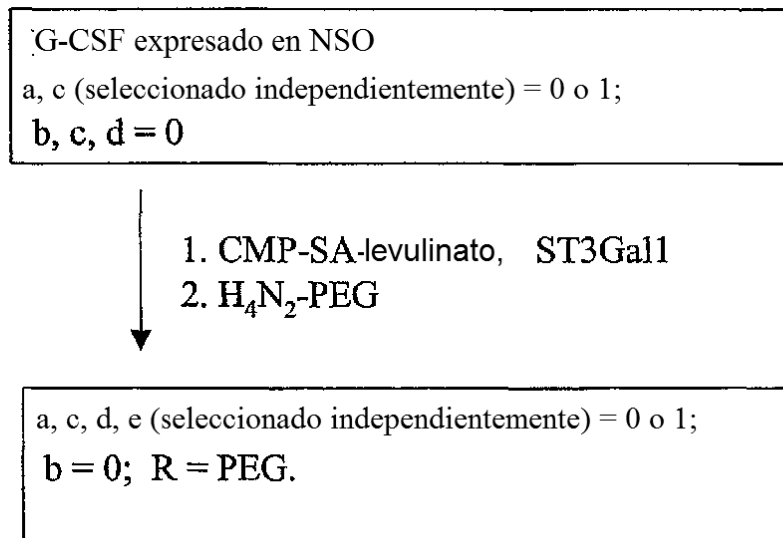


FIG. 27E

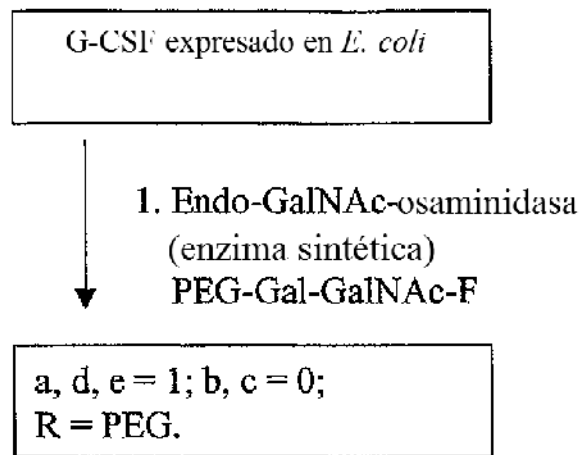


FIG. 27F

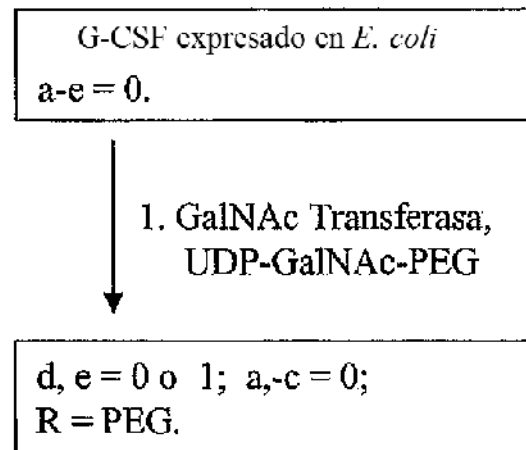
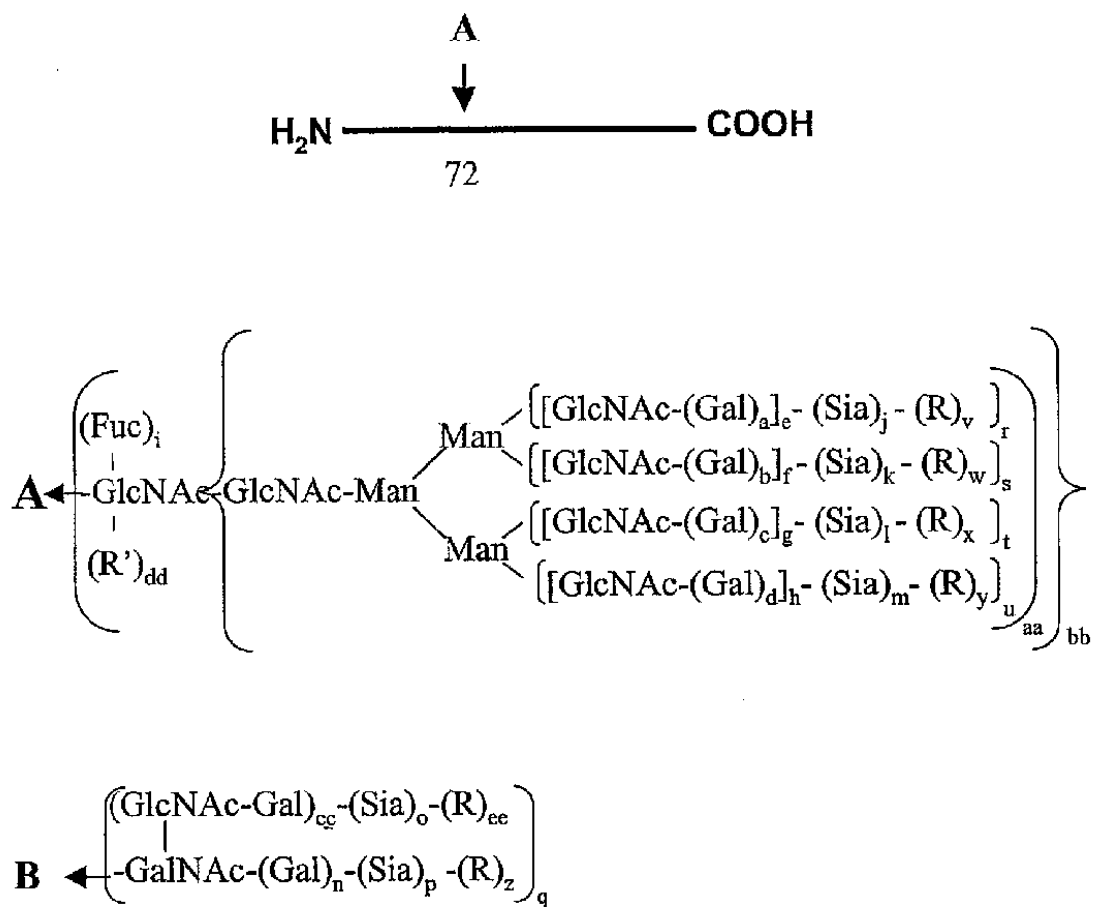


FIG. 27G



a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
aa, bb, cc, dd, ee (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20.
v-z = 0; **R** = grupo modificador, manosa, oligomanosa
R' = **H**, residuo de glicosilo, grupo modificador,
 glicoconjugado

FIG. 28A

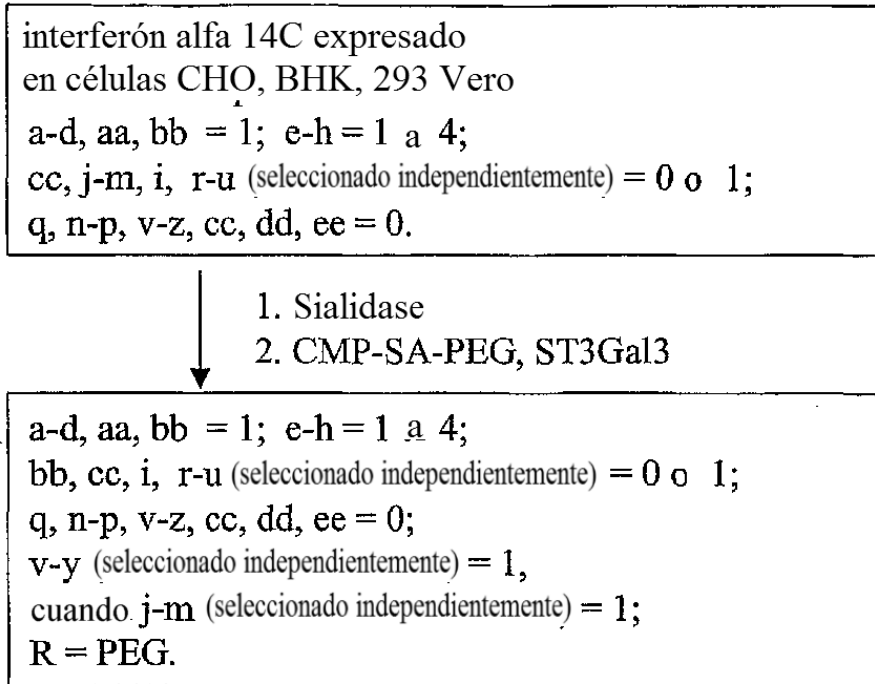


FIG. 28B

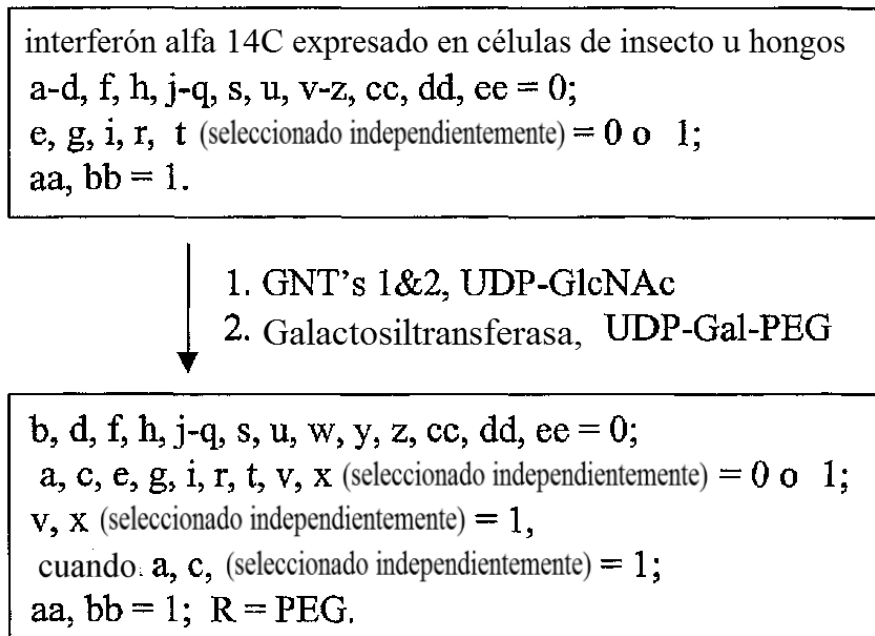


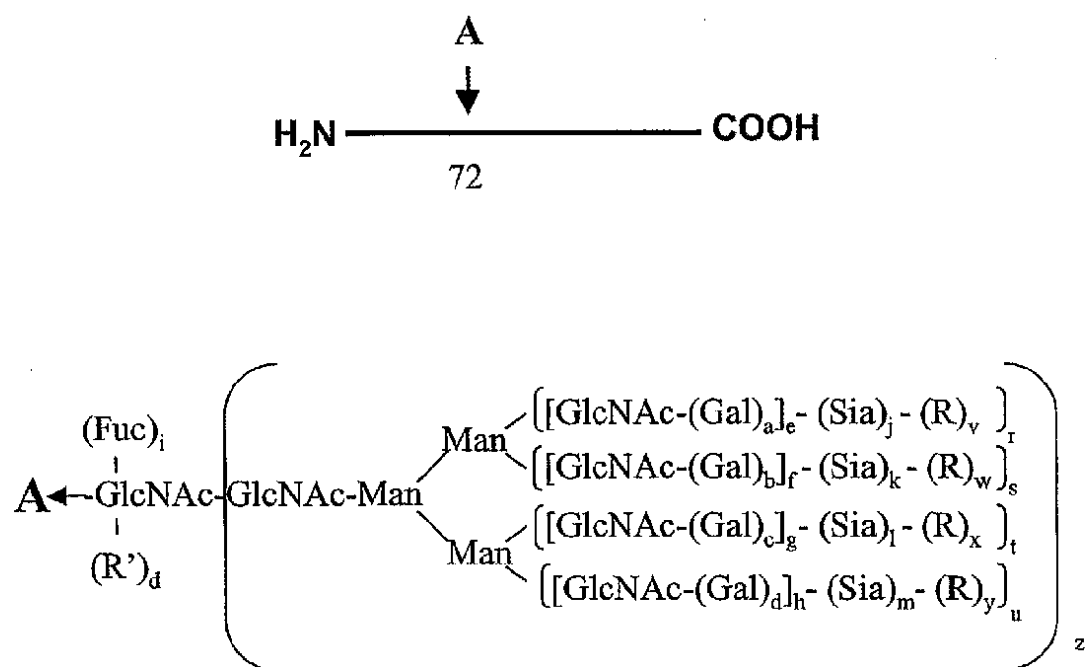
FIG. 28C

Interferón-alfa 14C expresado en levadura
a-q, cc, dd, ee, v-z = 0;
r-y (seleccionado independientemente)= 0 a 1;
aa, bb = 1;
R (ramificado o lineal) = Man, oligomanosa o
polisacárido

1. Endo-H
2. Galactosiltransferasa, UDP-Gal
3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-z, bb = 0; aa = 1; R' = -Gal-Sia-PEG.

FIG. 28D



a-d, i, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

n, v-y = 0; z = 0 o 1.

R = polímero; R' = azúcar, glicoconjugado

FIG. 28E

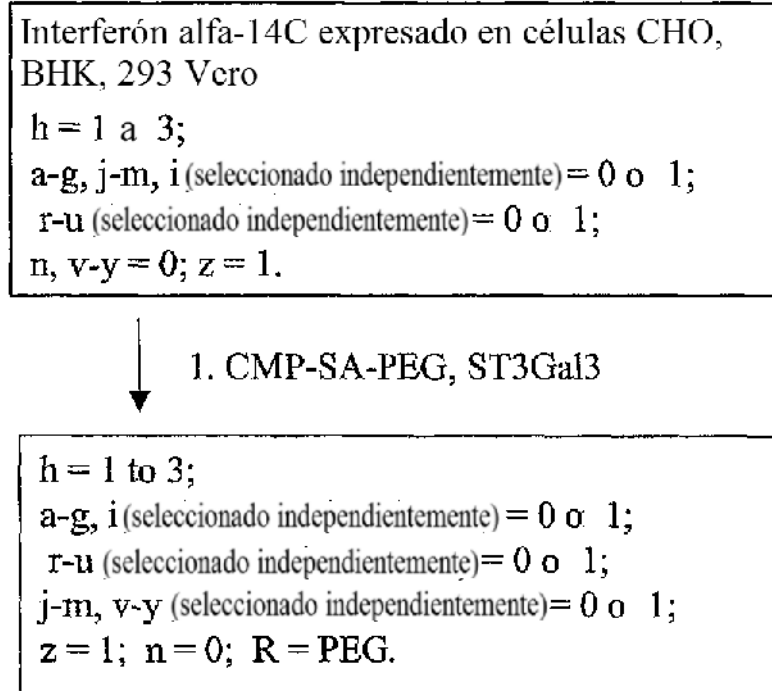


FIG. 28F

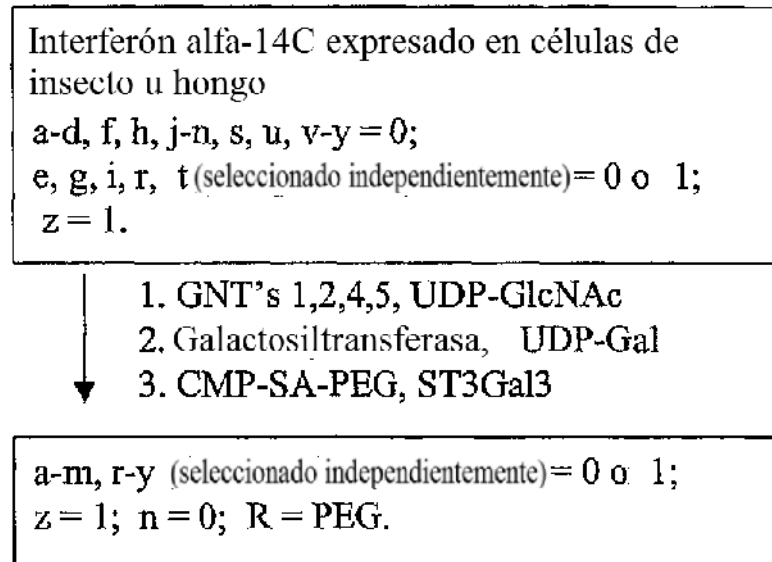


FIG. 28G

Interferón alfa-14C expresado en levadura
 $a-n = 0$; $r-y$ (seleccionado independientemente) = 0 a 1;
 $z = 1$; R (ramificado o lineal) = Man,
 oligomanosa.

1. manosidasas
2. GNT's 1,2,4,5, UDP-GlcNAc
3. Galactosiltransferasa, UDP-Gal
4. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

$a-m, r-y$ (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 $z = 1$; $n = 0$; R = PEG.

FIG. 28H

Interferón alfa-14C expresado en NSO
 $a-i, r-u$ (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 $j-m, n, v-y = 0$; $z = 1$.

1. CMP-SA-levulinato, ST3Gal3,
 tampón, sal
2. H_4N_2 -PEG

$a-i, j-m, r-y$ (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 $n = 0$; $z = 1$; R = PEG.

FIG. 28I

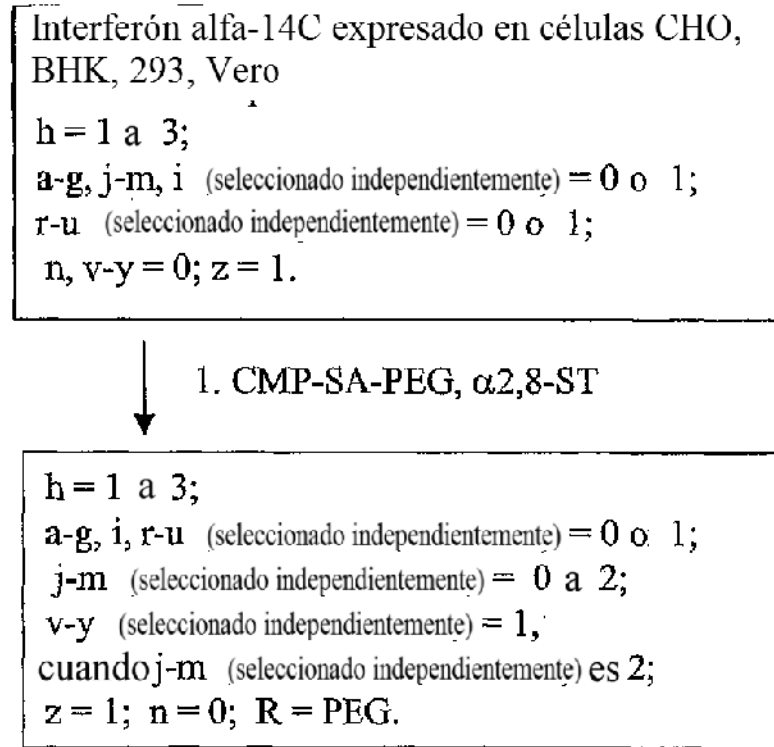


FIG. 28J

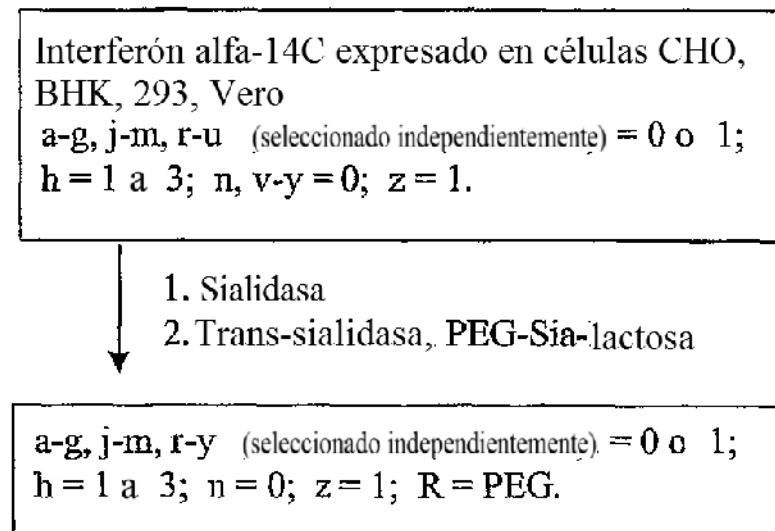


FIG. 28K

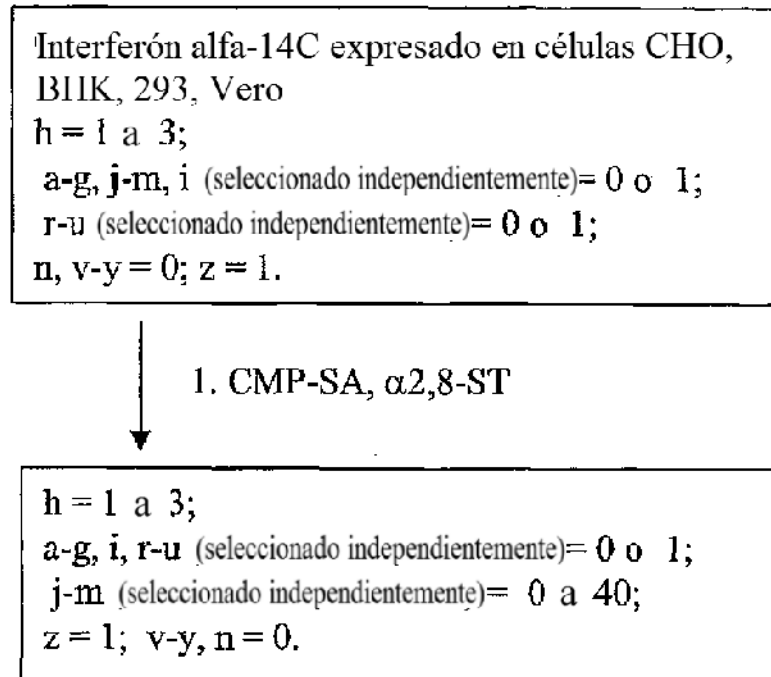


FIG. 28L

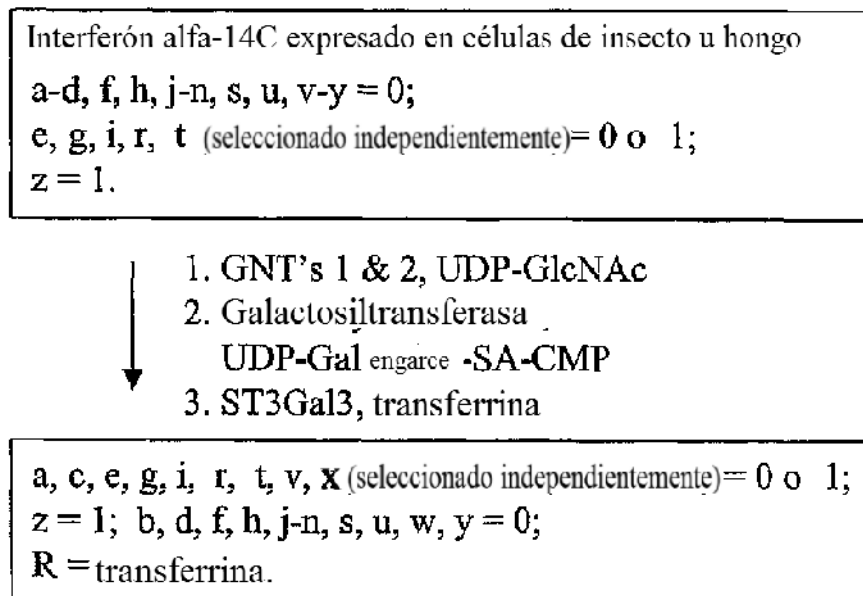


FIG. 28M

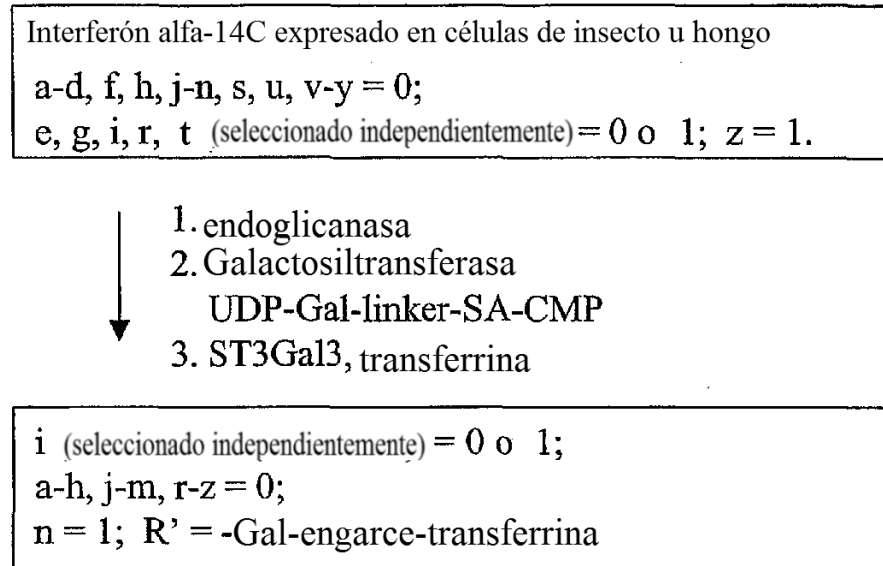
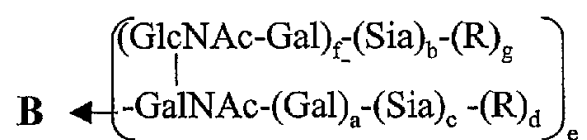
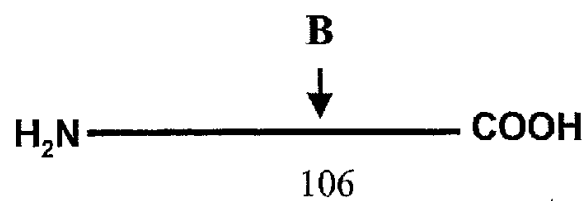


FIG. 28N



a-c, e, f (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
d, g = 0; R = polímero, glicoconjugado

FIG. 280

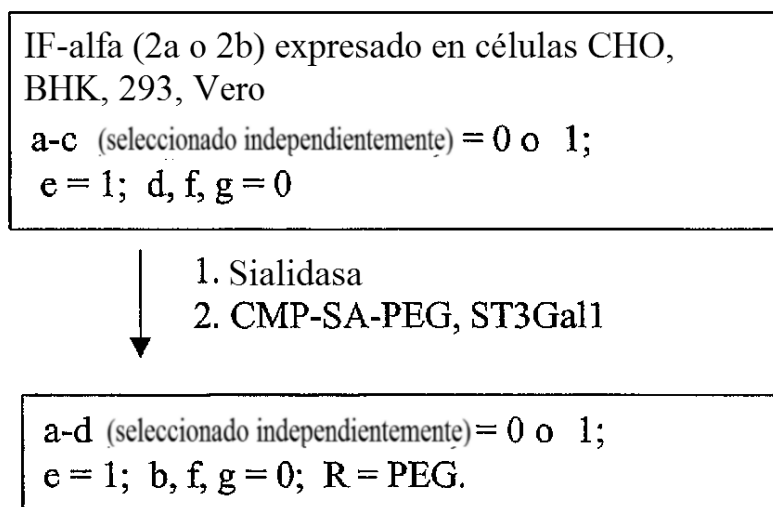


FIG. 28P

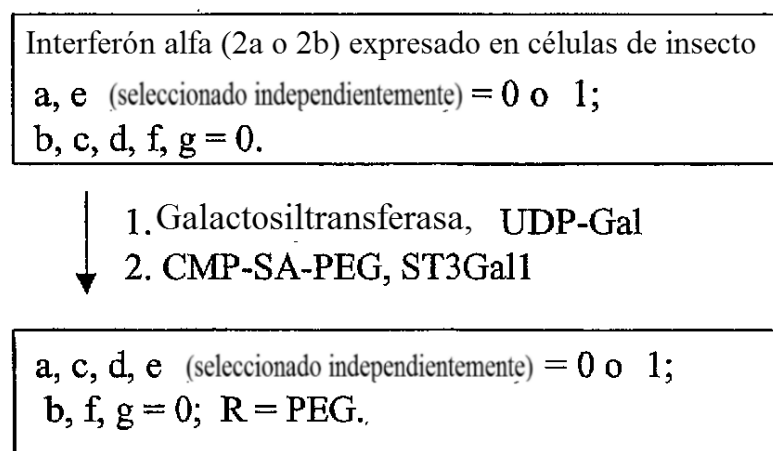


FIG. 28Q

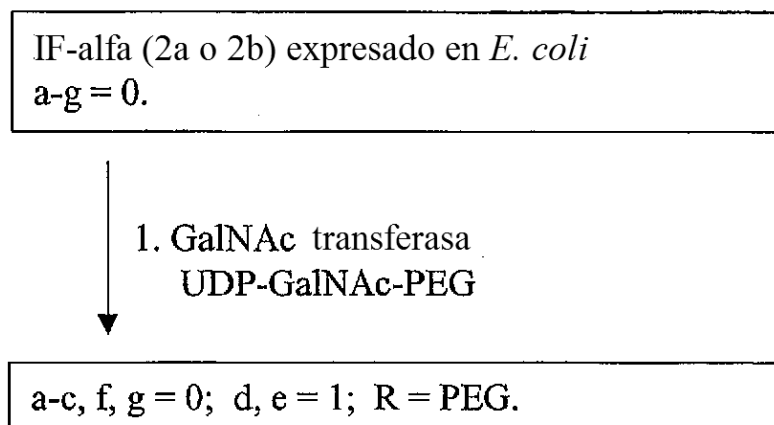


FIG. 28R

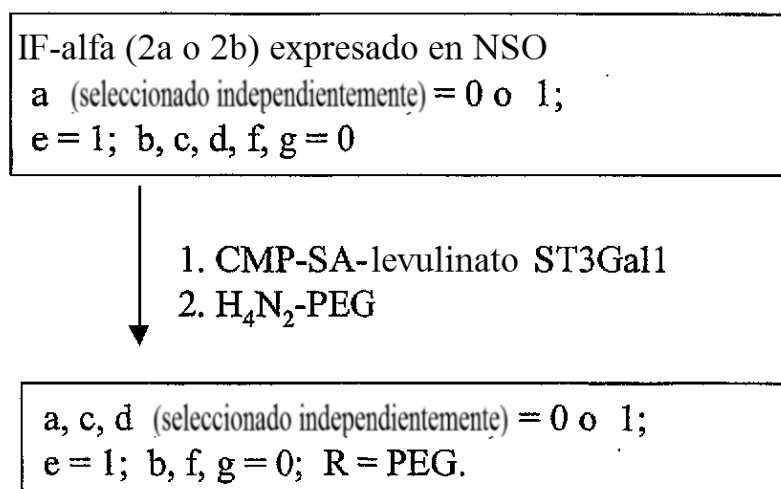


FIG. 28S

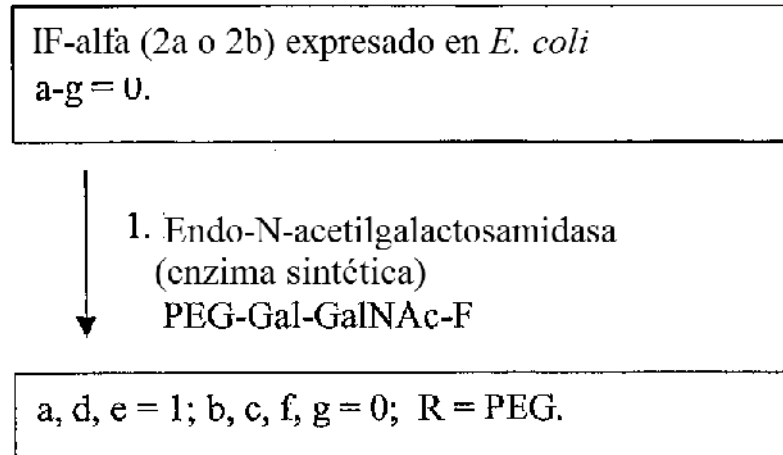


FIG. 28T

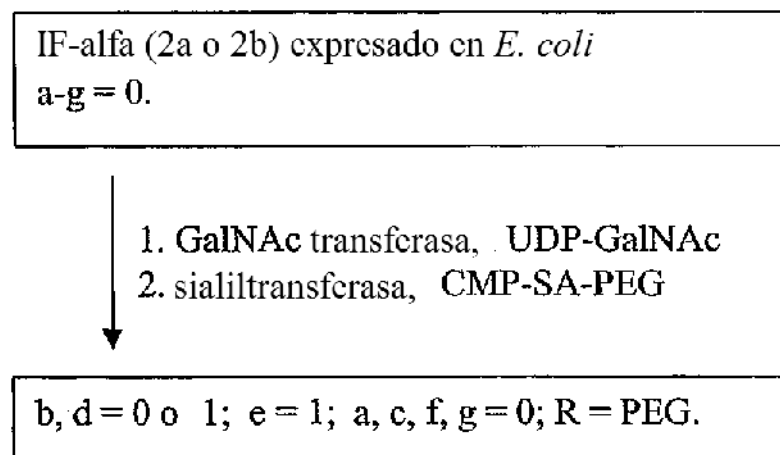


FIG. 28U

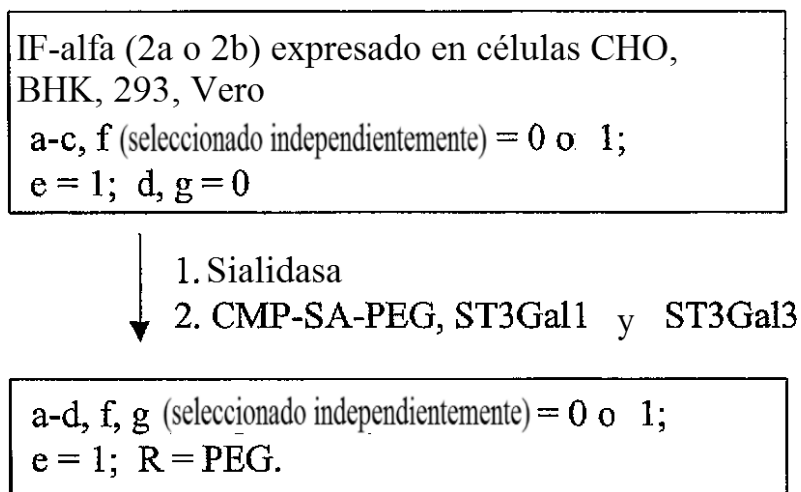


FIG. 28V

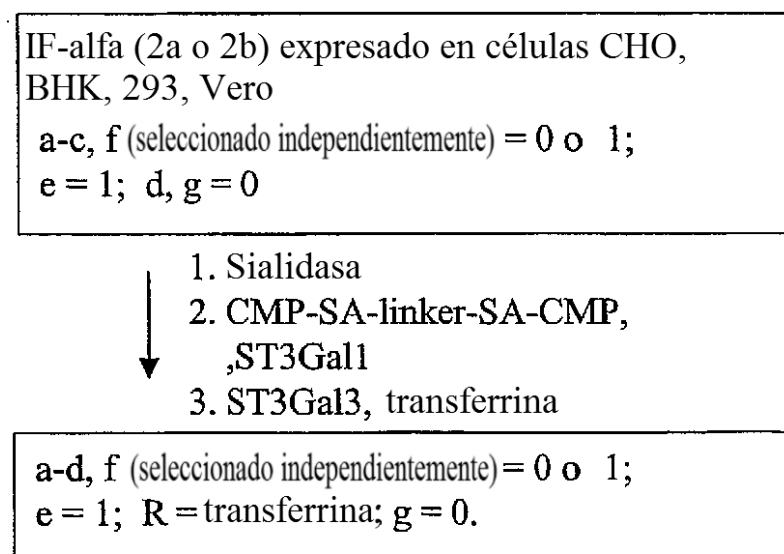
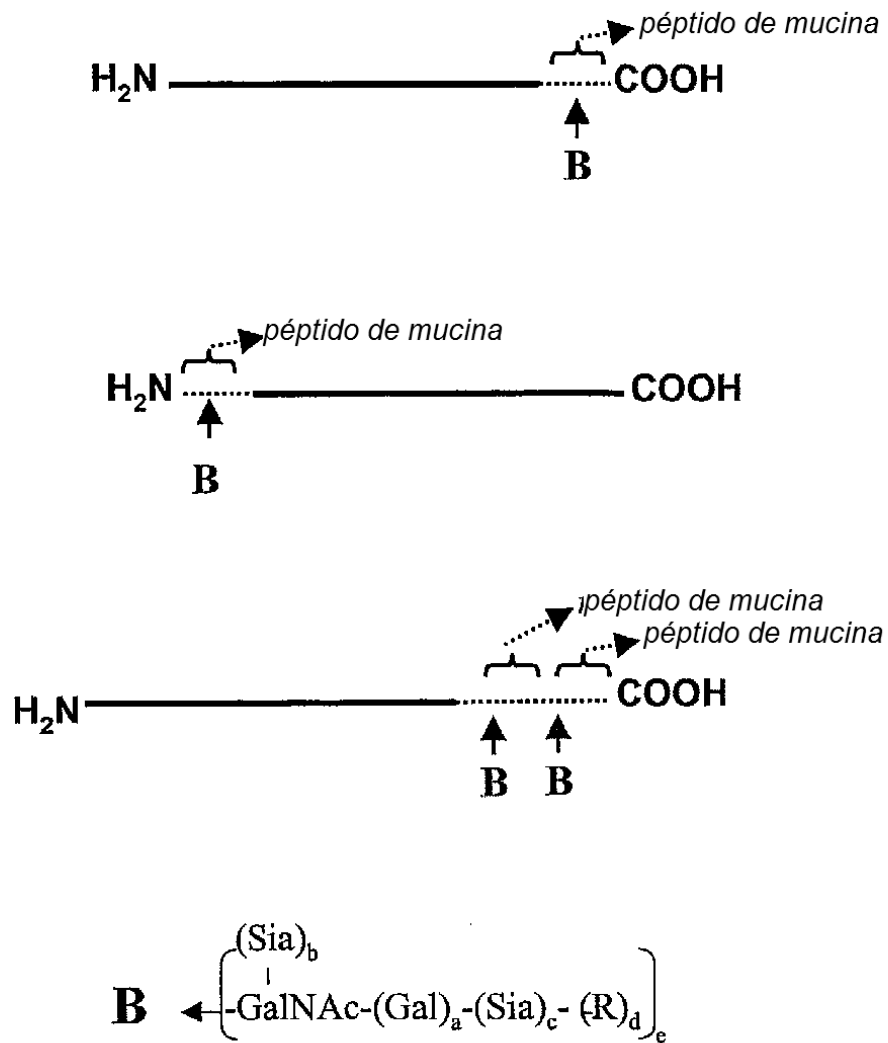


FIG. 28W



a-c, e (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
d = 0; R = polímero, glicoconjugado

FIG. 28X

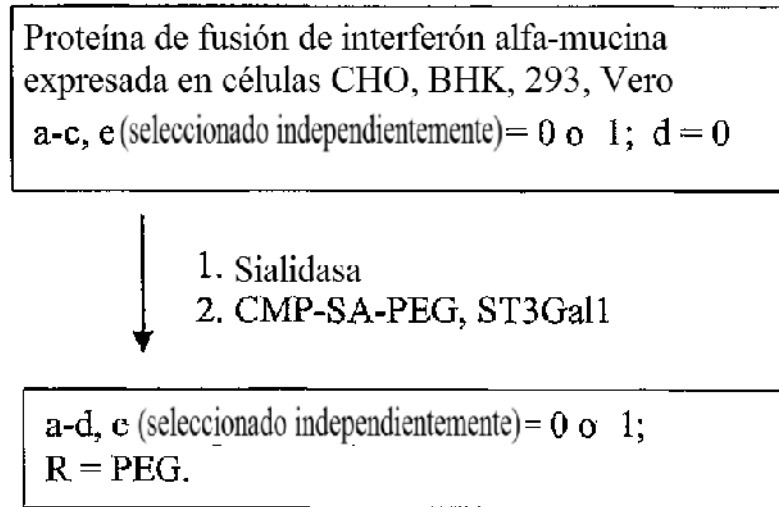


FIG. 28Y

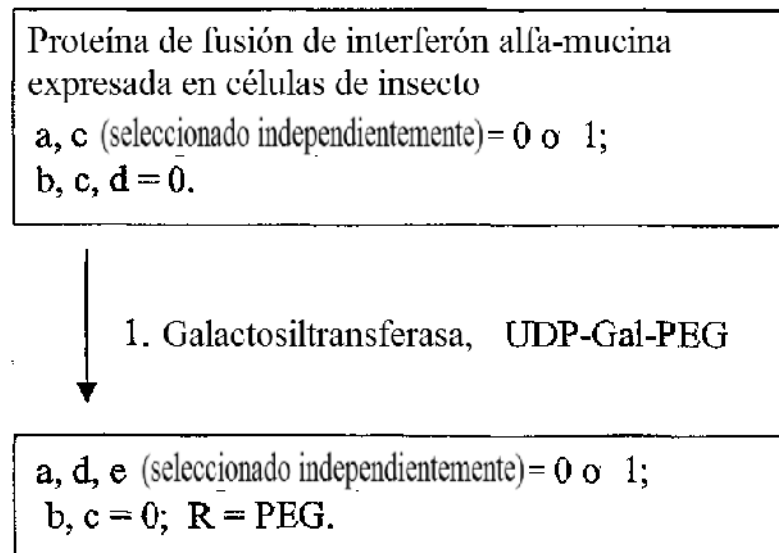


FIG. 28Z

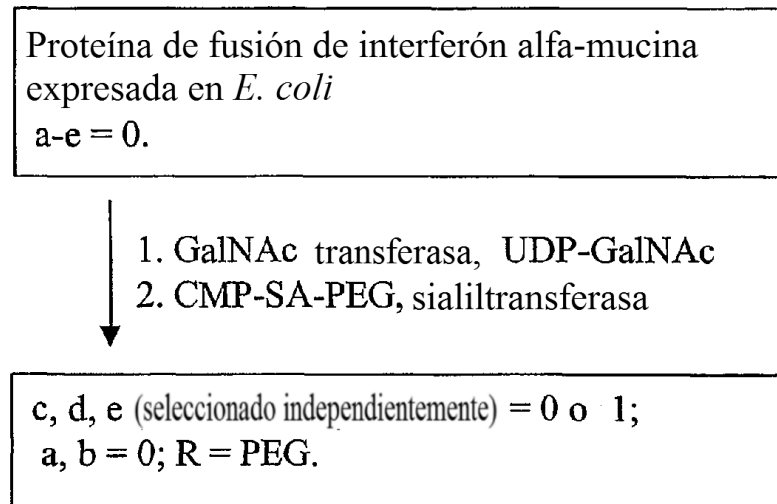
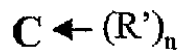
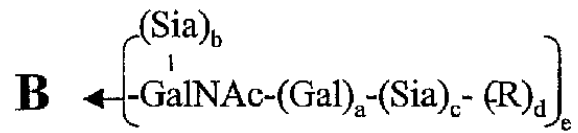
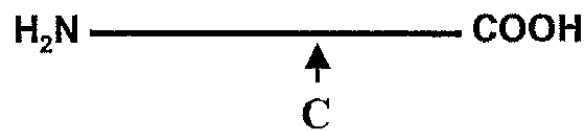
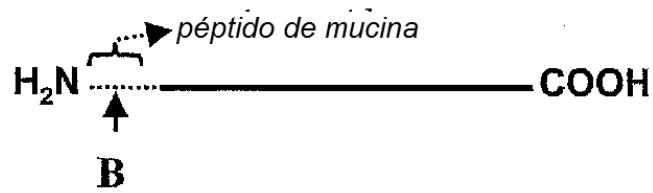
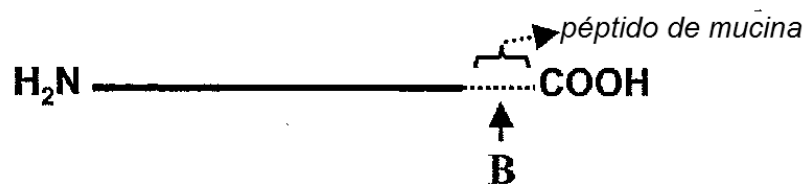


FIG. 28AA



a-c, e (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
d = 0; R = polímero, engarce

FIG. 28BB

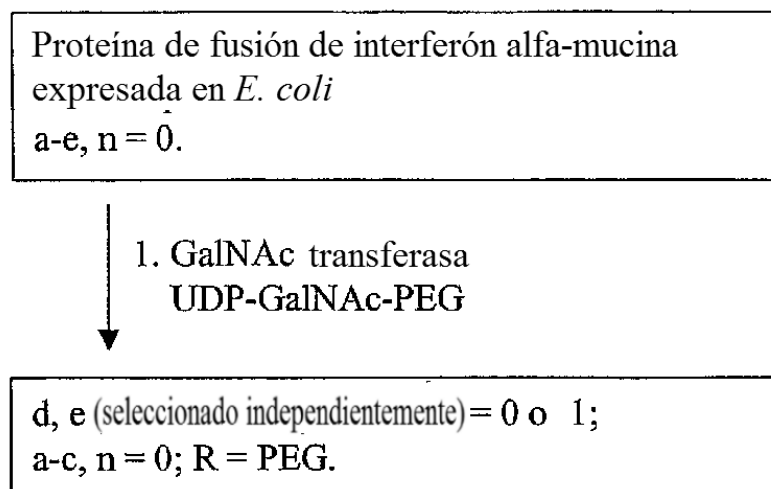


FIG. 28CC

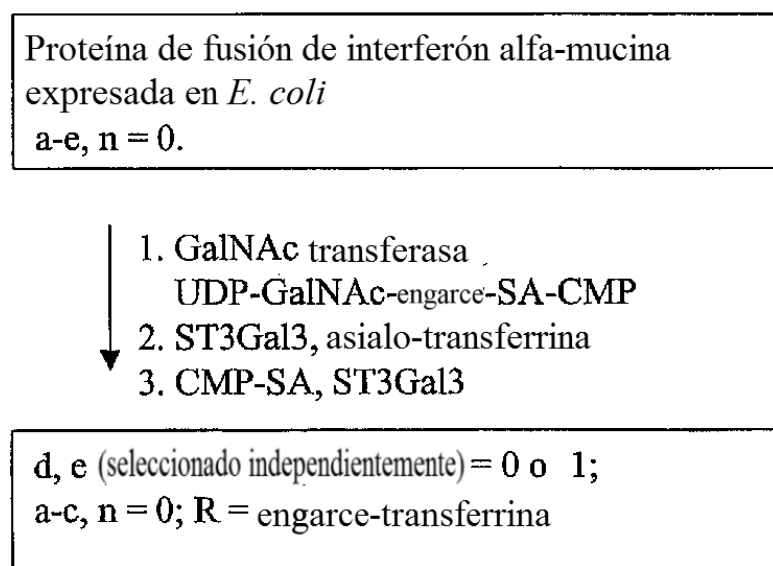


FIG. 28DD

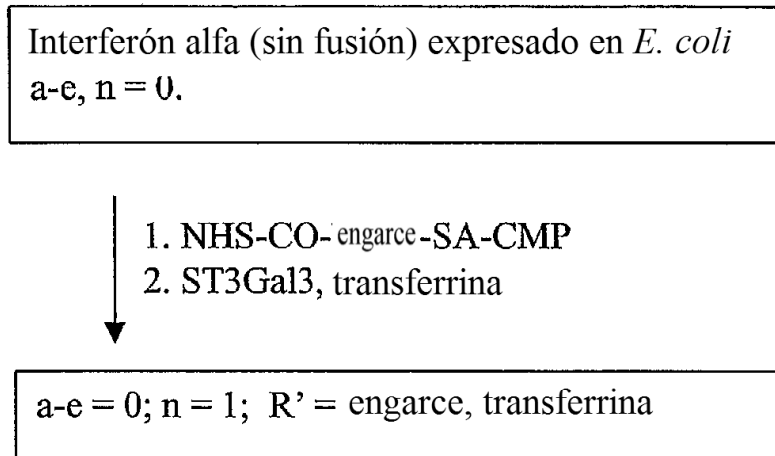
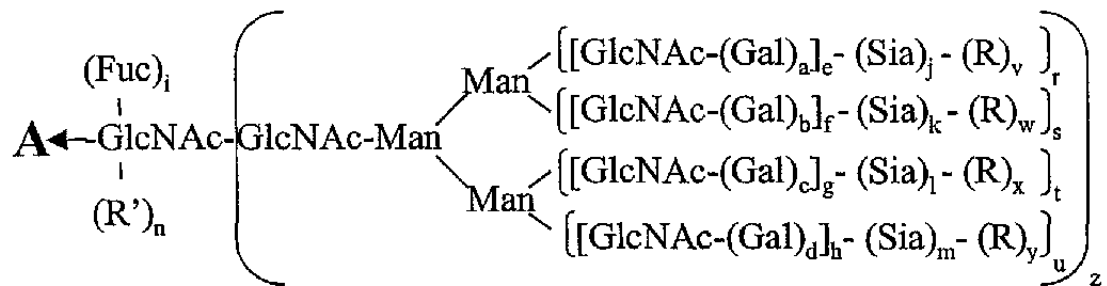
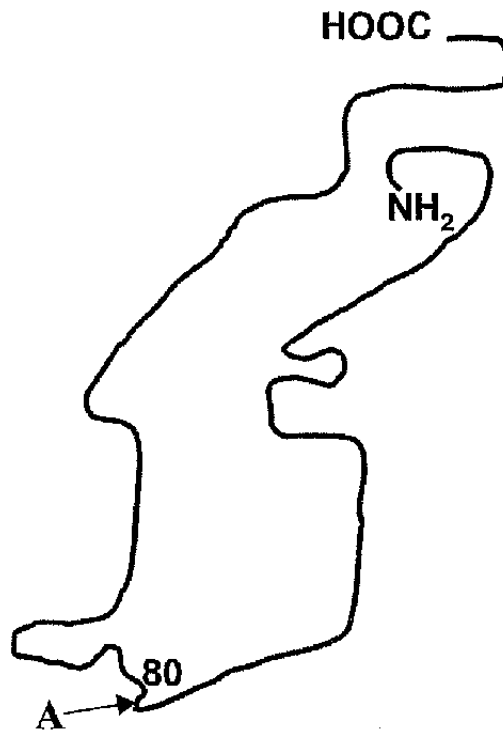


FIG. 28EE



a-d, i, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

n, v-y = 0; z = 0 o 1; R = polímero

FIG. 29A

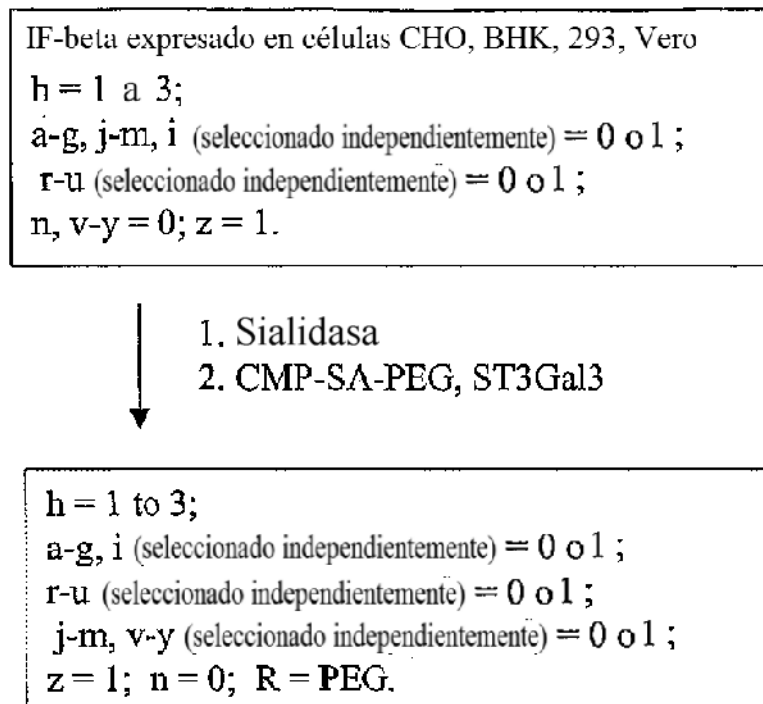


FIG. 29B

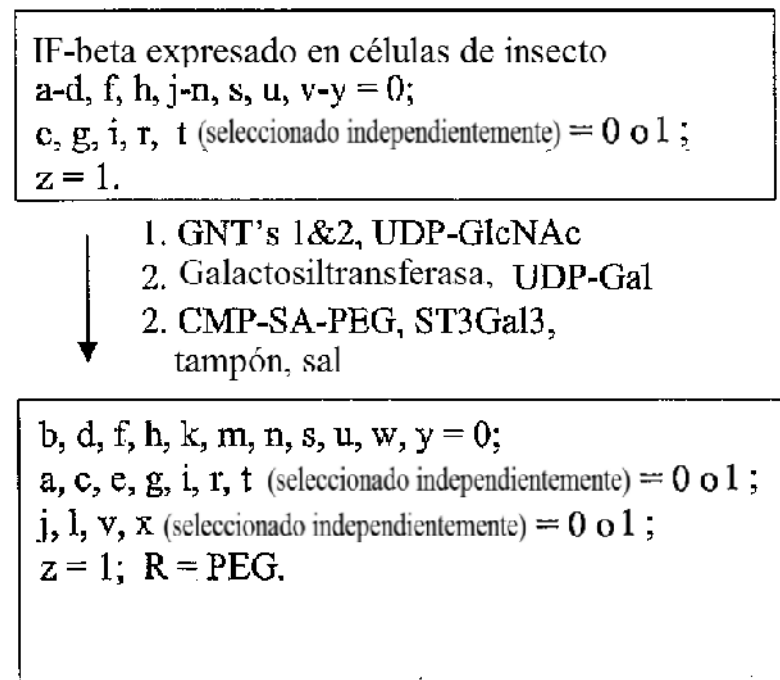


FIG. 29C

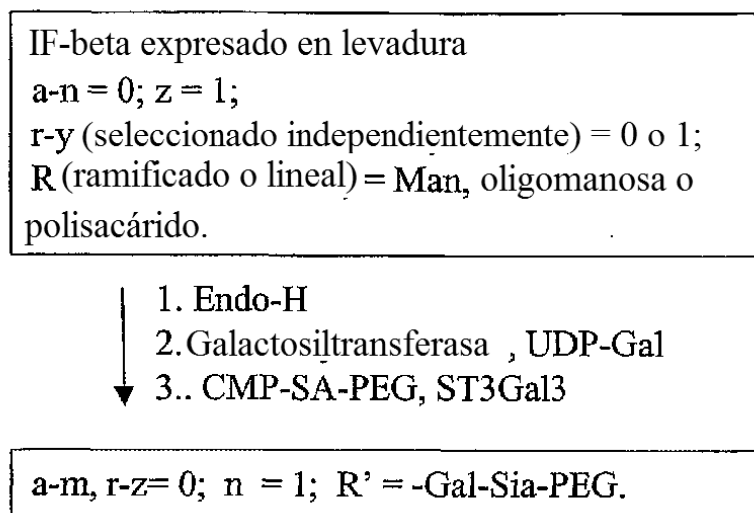


FIG. 29D

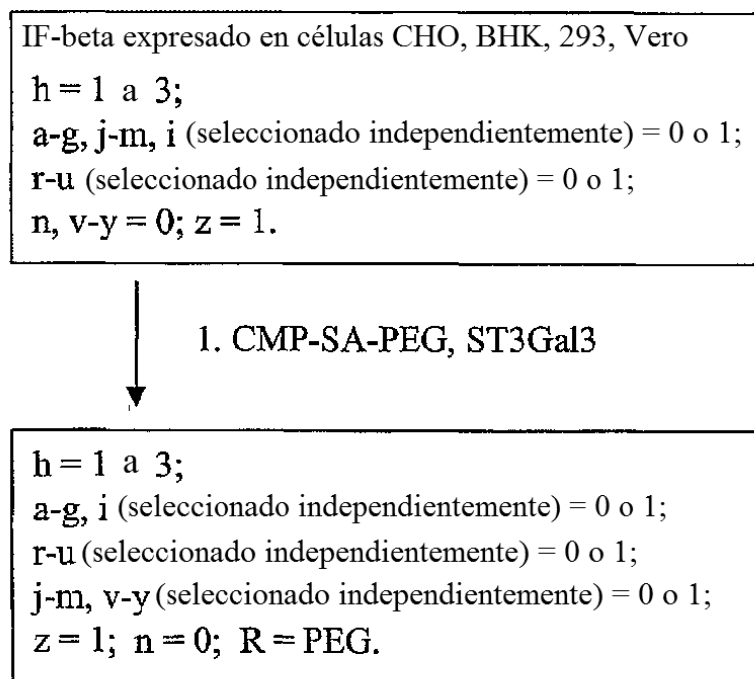


FIG. 29E

IF-beta expresado en células de insecto

a-d, f, h, j-n, s, u, v-y = 0; e, g, i, r, t
(seleccionado independientemente) = 0 o 1; z = 1

- ↓
1. GNT's 1,2,4,5, UDP-GlcNAc
 2. Galactosiltransferasa, UDP-Gal
 3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, r-y (seleccionado independientemente) 0 o 1;
z = 1; n = 0; R = PEG.

FIG. 29F

IF-beta expresado en levadura

a-n = 0; z = 1;
r-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R (ramificado o lineal) = Man, oligomanosa.

- ↓
1. manosidasas
 2. GNT's 1,2,4,5, UDP-GlcNAc
 3. Galactosiltransferasa, UDP-Gal
 4. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, r-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
z = 1; n = 0; R = PEG.

FIG. 29G

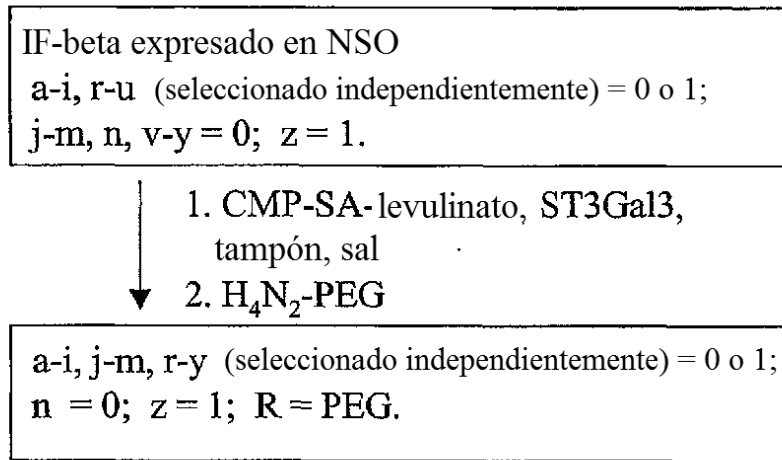


FIG. 29H

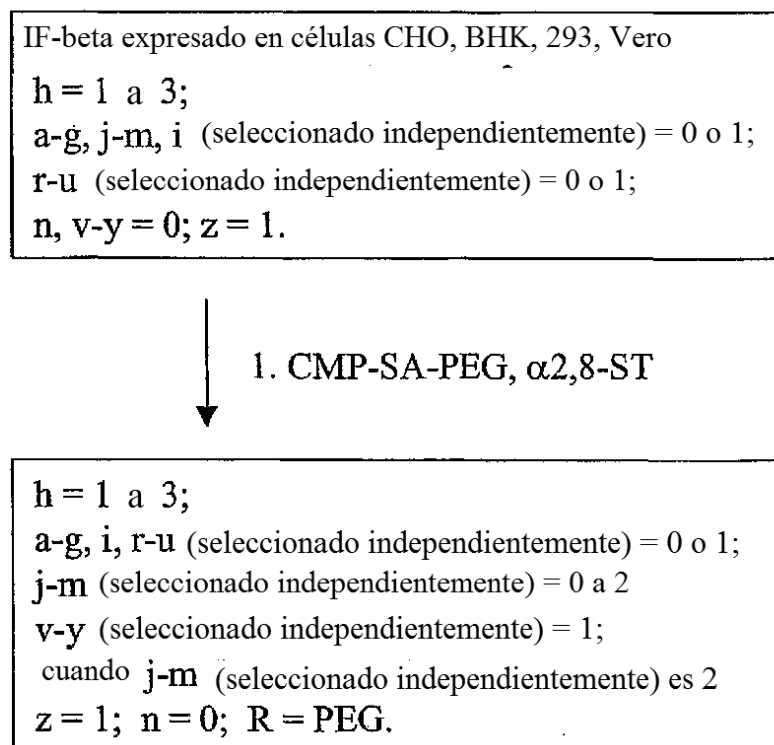


FIG. 29I

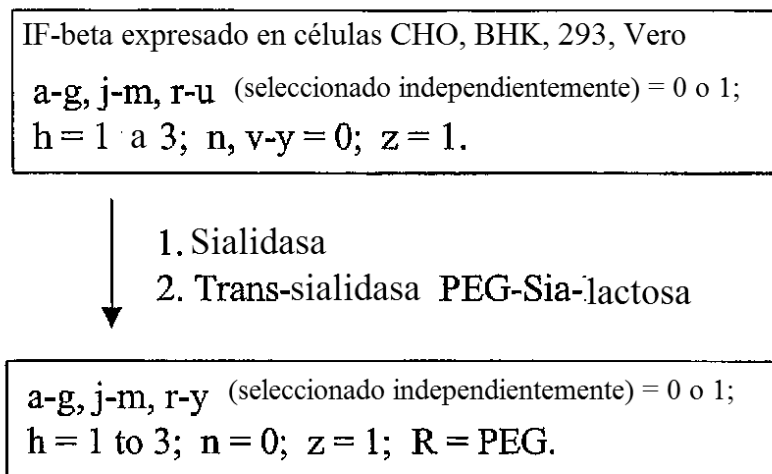


FIG. 29J

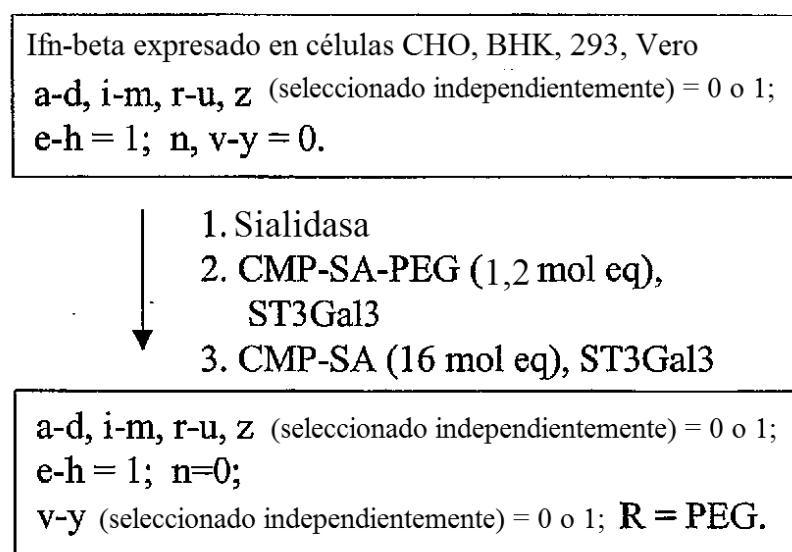


FIG. 29K

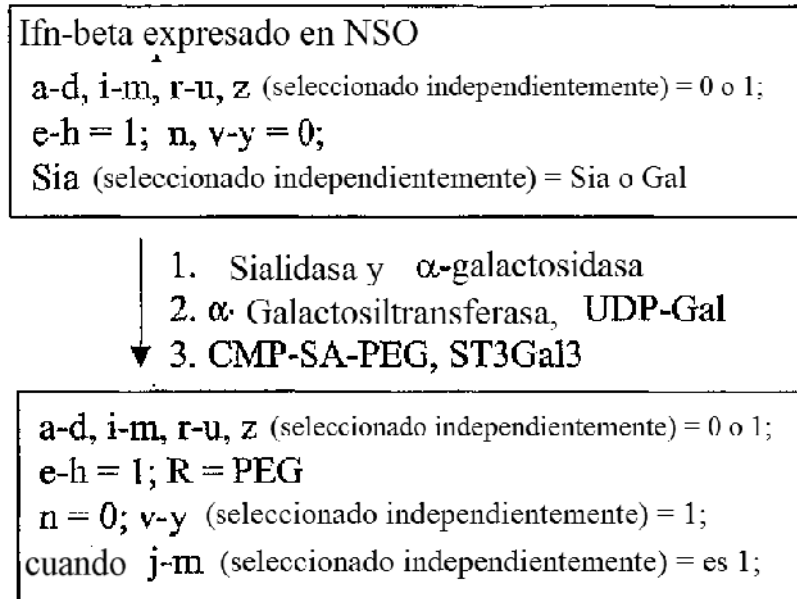


FIG. 29L

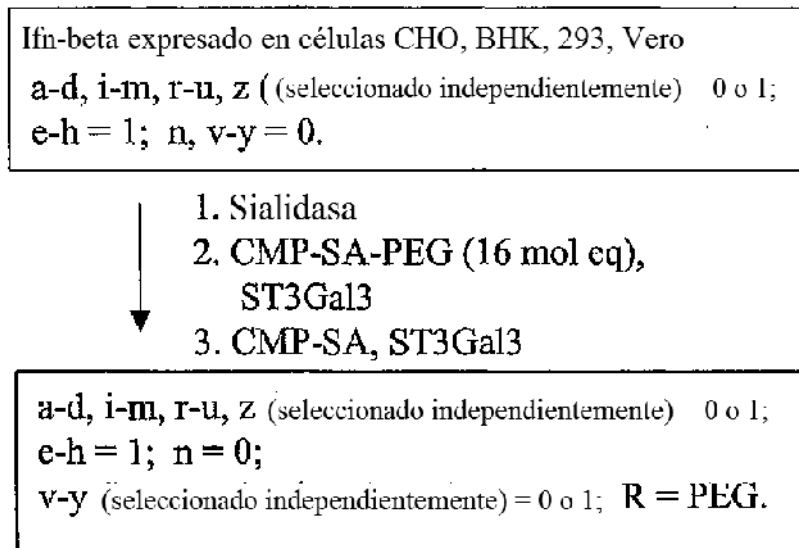


FIG. 29M

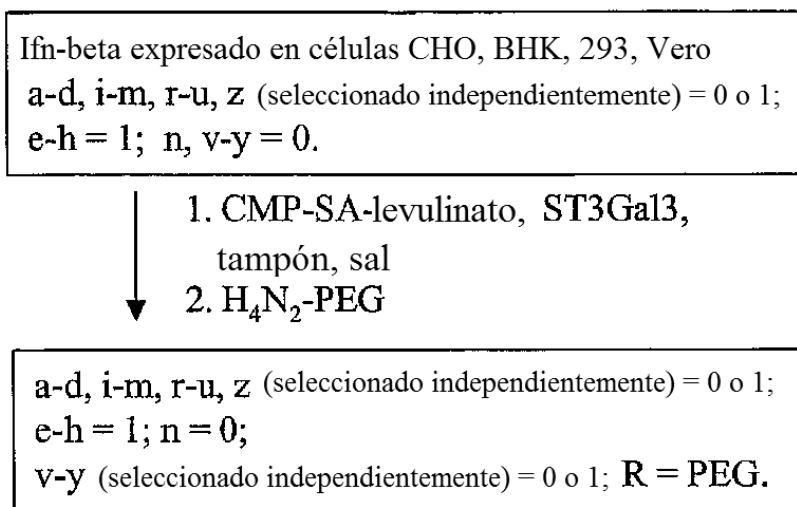


FIG. 29N

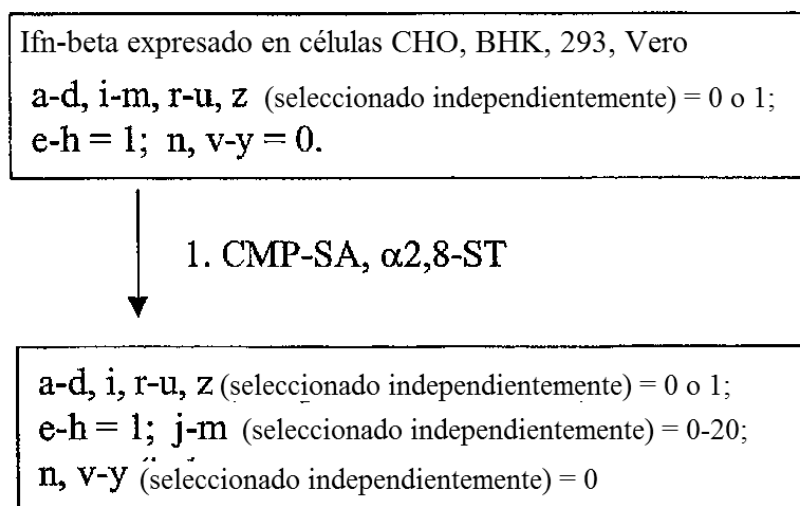
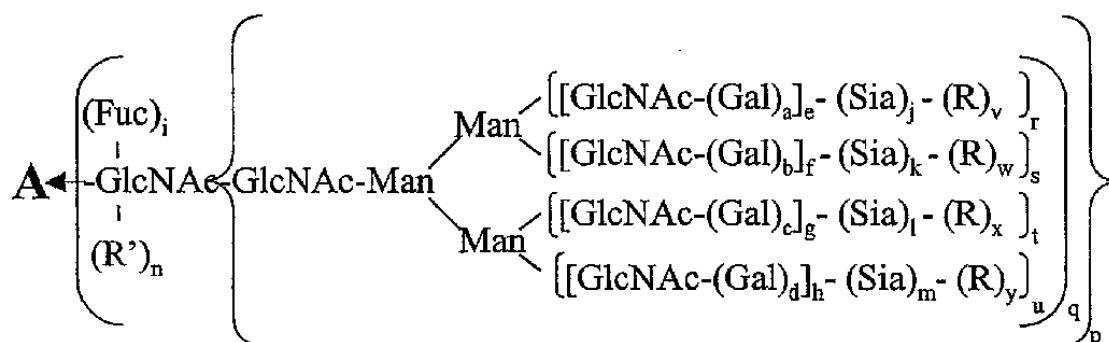
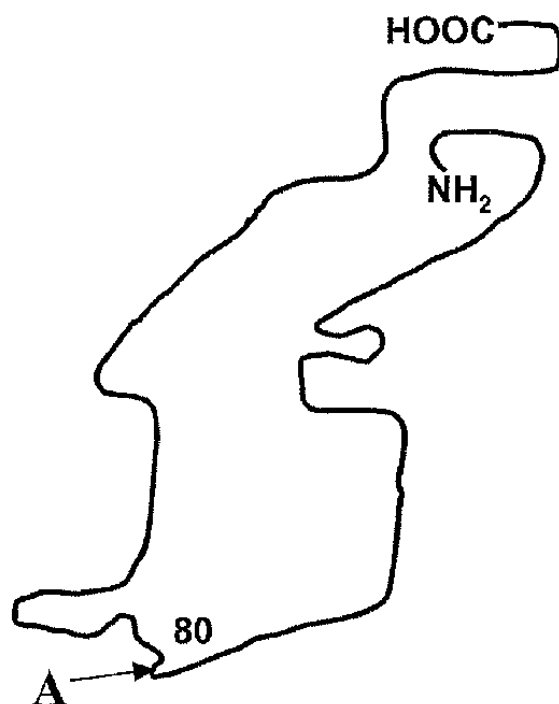


FIG. 29O



a-d, i, p-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6;
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100;
 v-y = 0; R = grupo modificador;
 R' = H, grupo glicosilo, grupo modificador
 glicoconjugado.

FIG. 29P

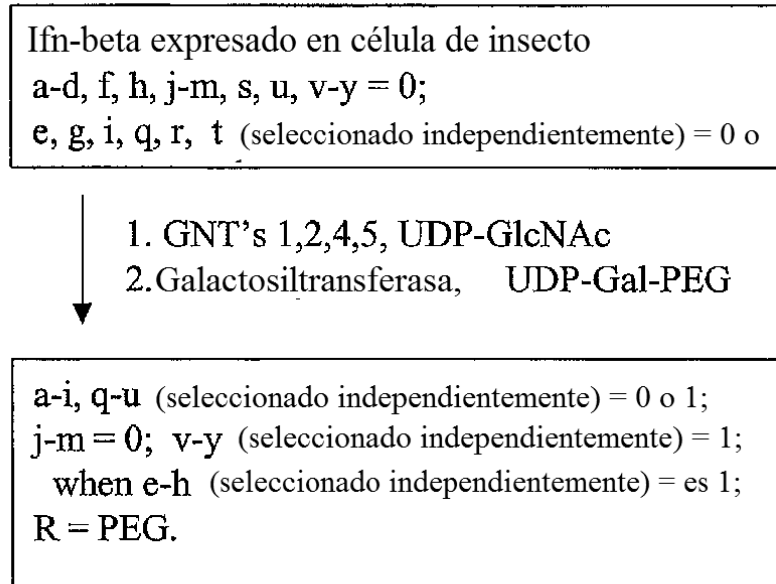


FIG. 29Q

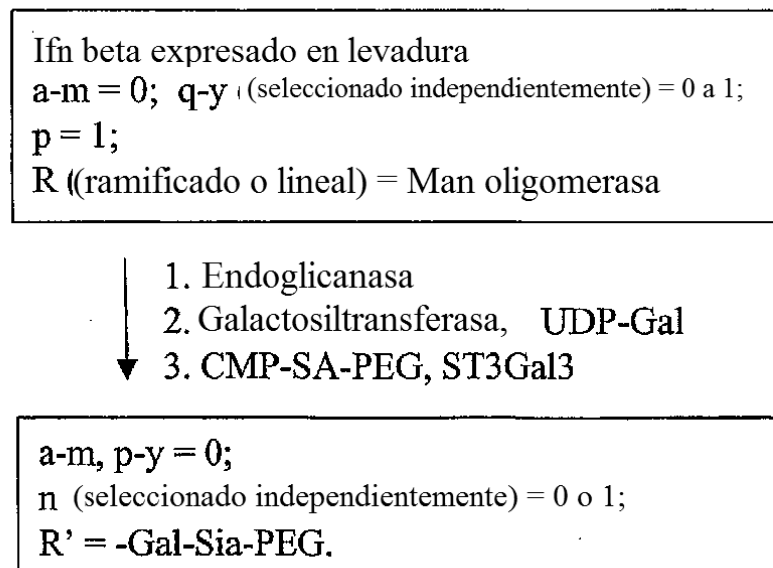


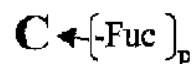
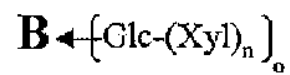
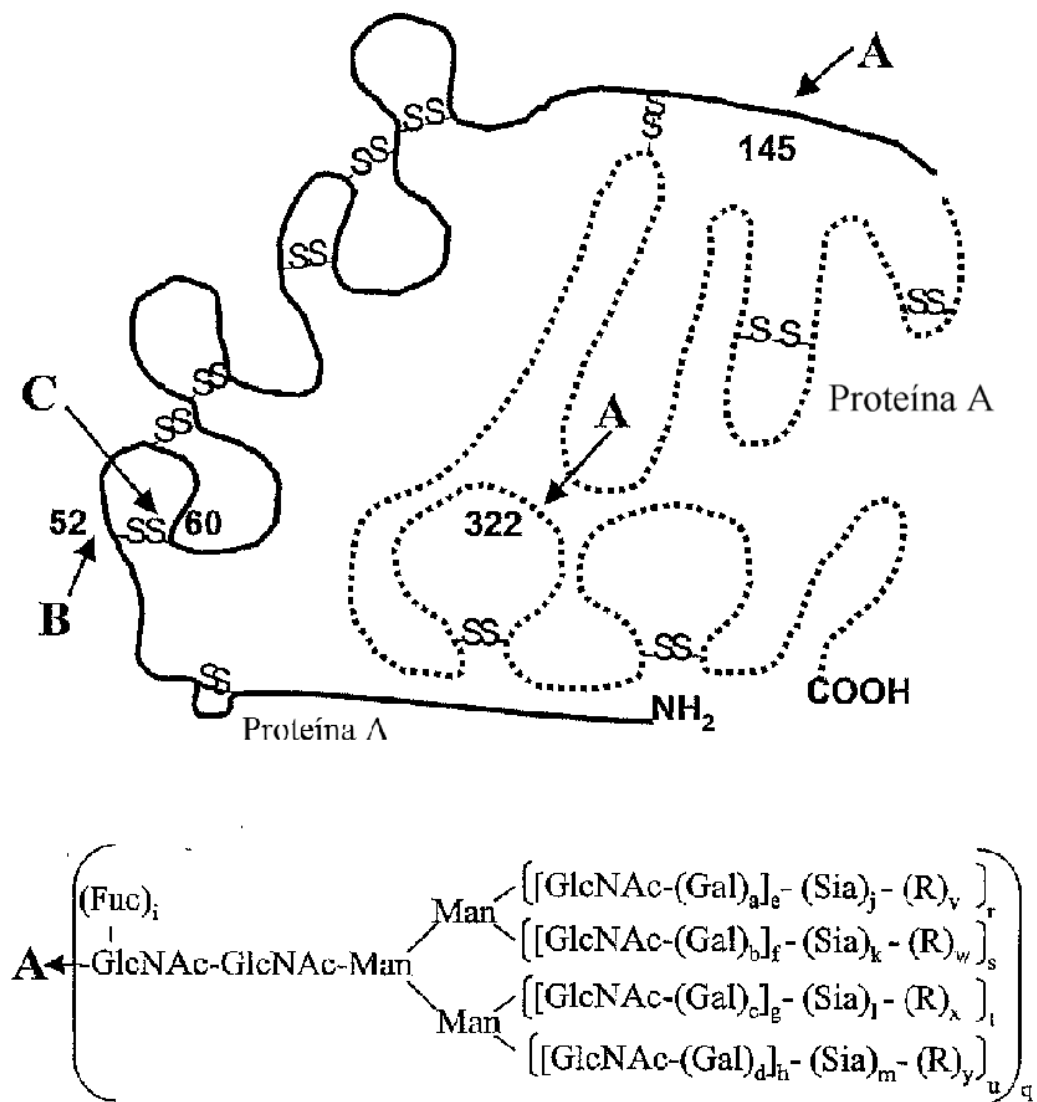
FIG. 29R

Ifn-beta expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y = 0.

- ↓
1. CMP-SA- engarce -SA-CMP,
ST3Gal3
 2. ST3Gal3, transferrina desialilada
 3. CMP-SA, ST3Gal3

a-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
p = 1; n = 0;
v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = engarce-transferrina

FIG. 29S



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

α, β (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h, n (seleccionado independientemente) = 0 a 6;

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20;

$$v-y=0;$$

R = grupo modificador, manosa, oligo-
manosa, Sia-Lewis X, Sia-Lewis A..

FIG. 30A

Factor VII o VIIa expresado en BHK

a-d, e, i, g, q, j, l, o, p (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, v-y = 0; n = 0-4.



1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG (16 mole eq),
ST3Gal3

a-d, e, g, i, q, j, l, o, p (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, w, y = 0; n = 0-4;
v, x, (seleccionado independientemente) = 1;
cuando j, l (respectivamente, seleccionado independientemente) es 1;
R = PEG.

FIG. 30B

Factor VII o VIIa expresado en células CHO, BHK, 293, Vero

a-d, e, i, g, q, j, l, o, p (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, v-y = 0; n = 0-4.



1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG (1,2 mol eq),
ST3Gal3
3. CMP-SA (8 mol eq), ST3Gal3

a-d, e, g, i, q, j, l, o, p (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, w, y = 0; n = 0-4;
v o x, (seleccionado independientemente) = 1;
cuando j o l, (respectivamente, seleccionado independientemente) es 1;
R = PEG.

FIG. 30C

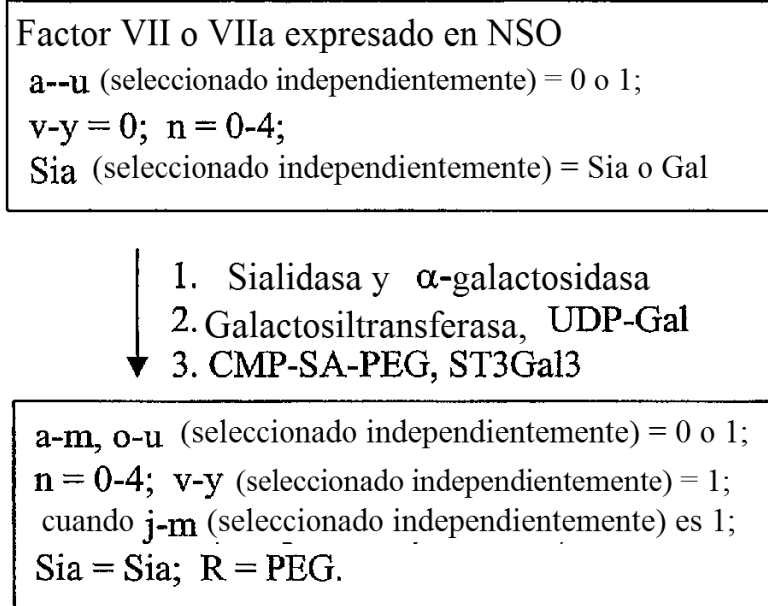
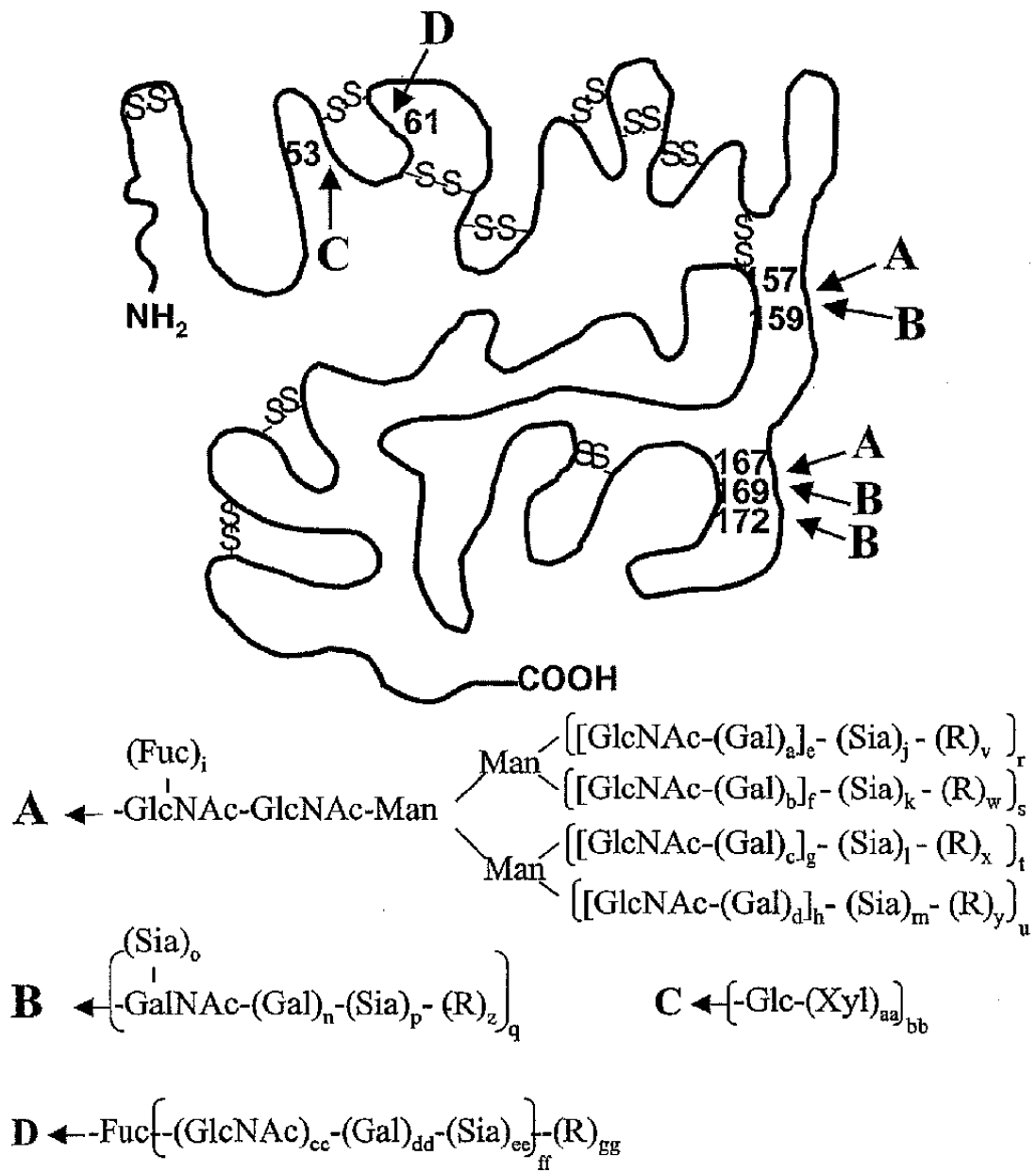


FIG. 30D



a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 bb, cc, dd, ee, ff, gg (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 e-h, aa (seleccionado independientemente) = 0 a 6;
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20;
 v-z = 0; R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa

FIG. 31A

Factor X expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j-m, i, n, o, p, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
v-z, gg = 0.



1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-d, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, n, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
o, p, z = 0;
j-m, ee, v-y, gg (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 31B

Factor IX expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, n, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j-m, i, o, p, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
v-z, gg = 0.



1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3
3. ST3Gal1, CMP-SA

a-d, n, p, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
j-m, ee, v-y, gg (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
o, z = 0; R = PEG.

FIG. 31C

Factor IX expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, n, q, bb, cc, dd, ff = 1; e-h, aa = 1 to 4; ee, j-m, i,
o, p, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1; v-z, gg = 0.

1. sialidasa
2. Galactosiltransferasa, UDP-Gal
3. CMP-SA, ST3Gal3
4. CMP-SA-PEG, ST3Gal1

a-d, n, q = 1; e-h = 1 to 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, r-u (seleccionado independientemente)
= 0 o 1; R = PEG;
o, v-y, gg = 0;
j-m, p, ee (seleccionado independientemente) = 0 o 1; pero cuando
p = 1, z = 1.

FIG. 31D

Factor IX expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, q = 1; e-h = 1 to 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j-m, i, n, o, p, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
v-z, gg = 0.

- CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-d, q = 1; e-h = 1 to 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, n, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1; R = PEG
o, p, z = 0; j-m, ee, v-y, gg (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;

FIG. 31E

Factor IX expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j-m, i, n, o, p, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
v-z, gg = 0.

- ↓ 1. CMP-SA-levulinato, ST3Gal3,
tampón, sal
2. H₄N₂-PEG

a-d, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, n, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
o, p, z = 0; R = PEG;
j-m, ee, v-y, gg (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

FIG. 31F

Factor IX expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, n, q, bb, cc, dd, ff = 1;
e-h, aa = 1 a 4;
ee, j-m, i, o, p, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
v-z, gg = 0.

- ↓ 1. CMP-SA-PEG, α2,8-ST

a-d, q = 1; e-h = 1 to 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, n, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
o, p, z = 0; R = PEG;
j-m, ee (seleccionado independientemente) = 0 a 2;
v-y, gg (seleccionado independientemente) = 0 o 1; cuando j-m
(seleccionado independientemente) es 2.

FIG. 31G

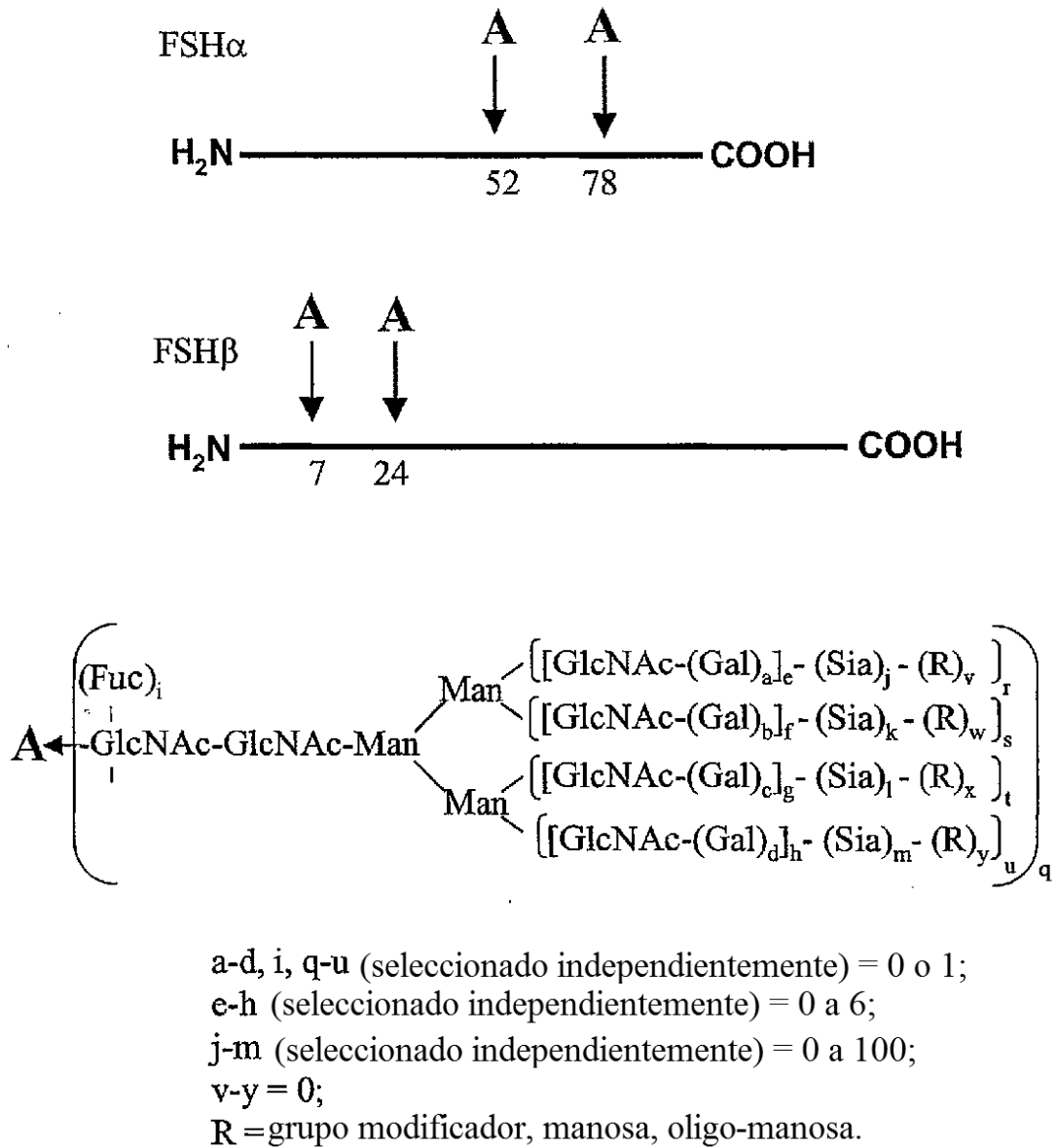


FIG. 32A

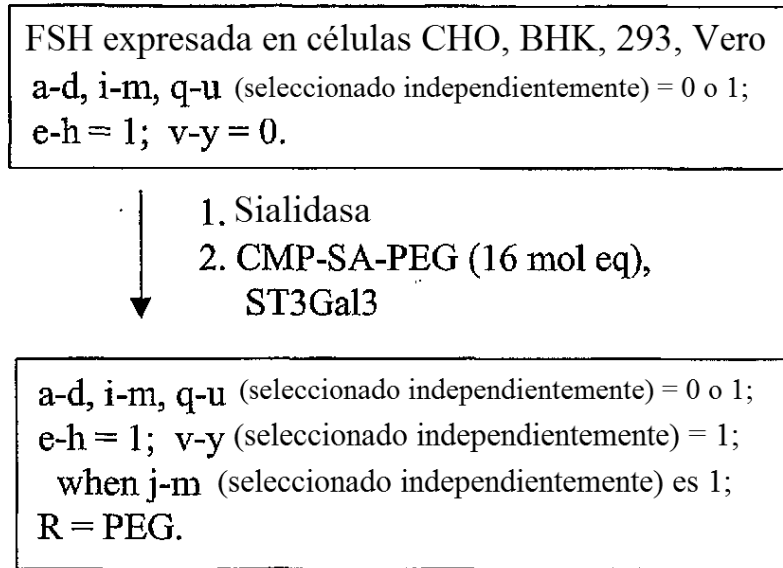


FIG. 32B

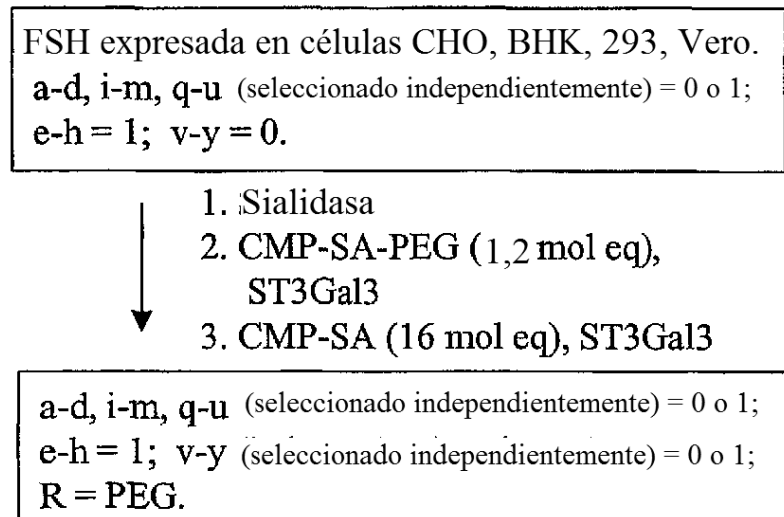


FIG. 32C

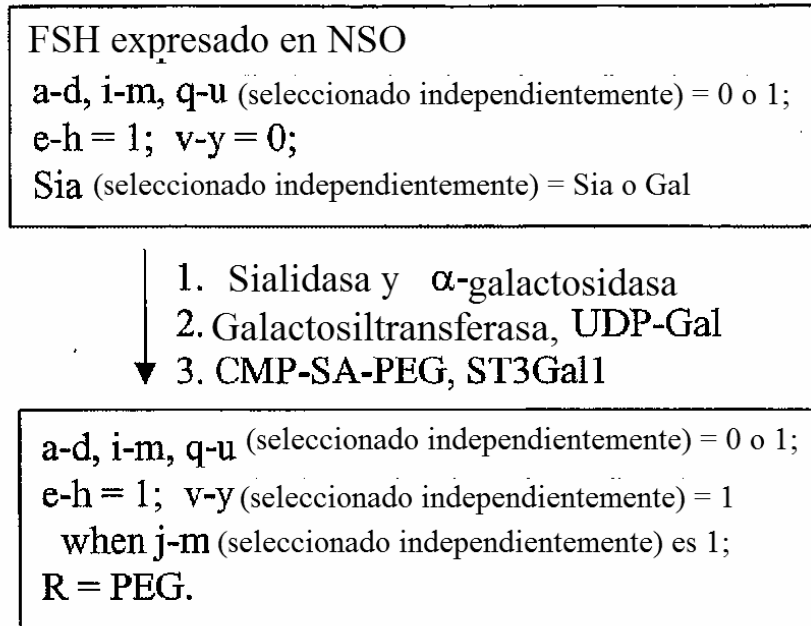


FIG. 32D

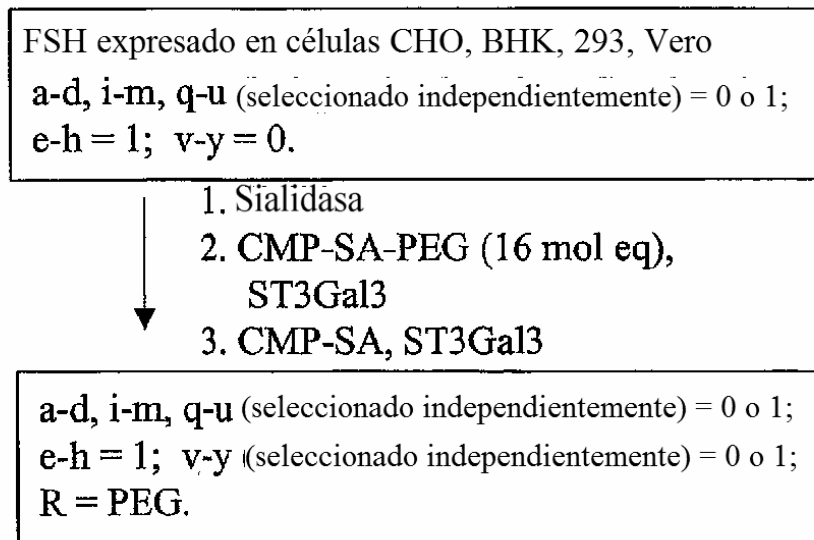


FIG. 32E

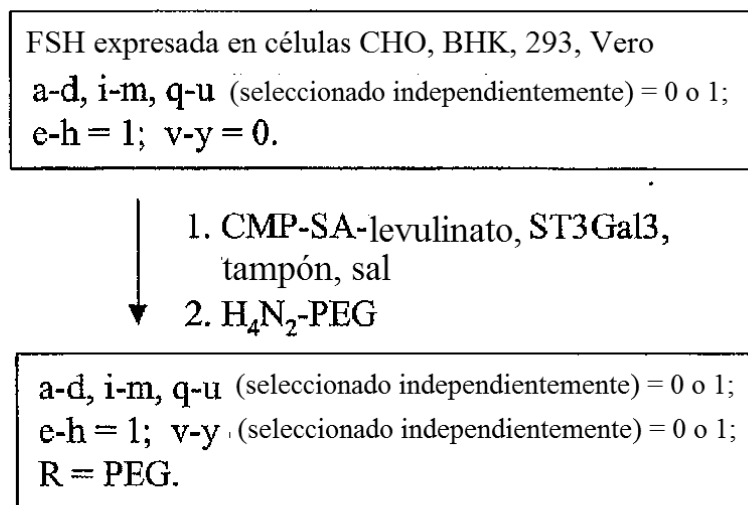


FIG. 32F

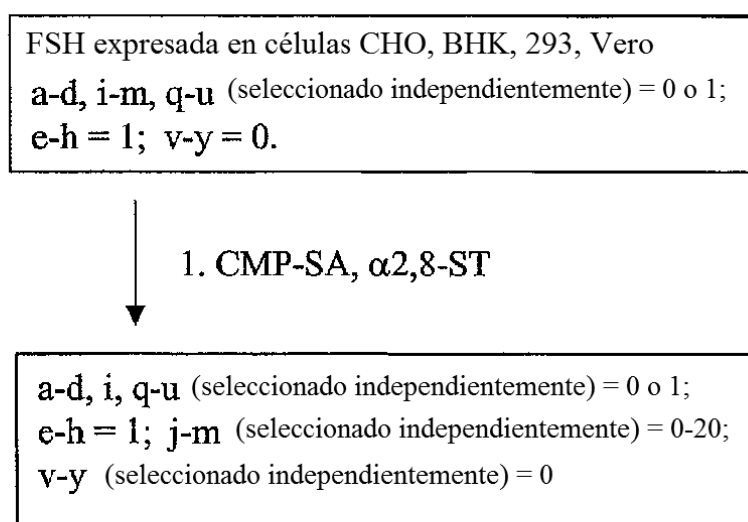


FIG. 32G

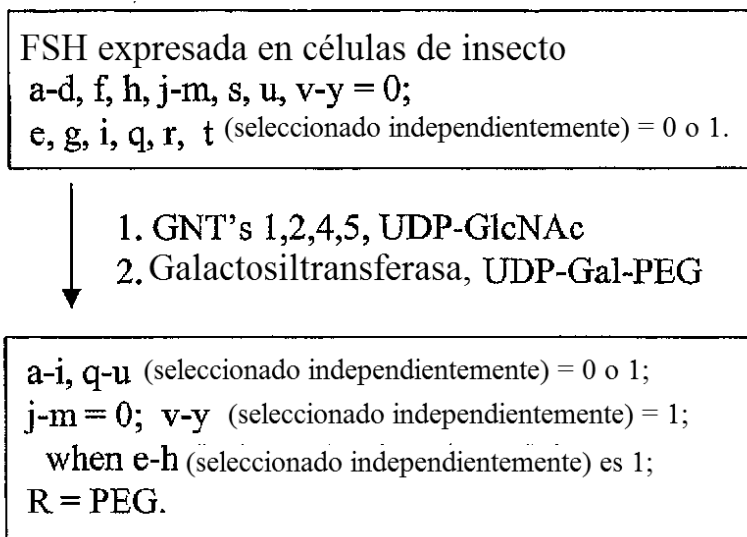


FIG. 32H

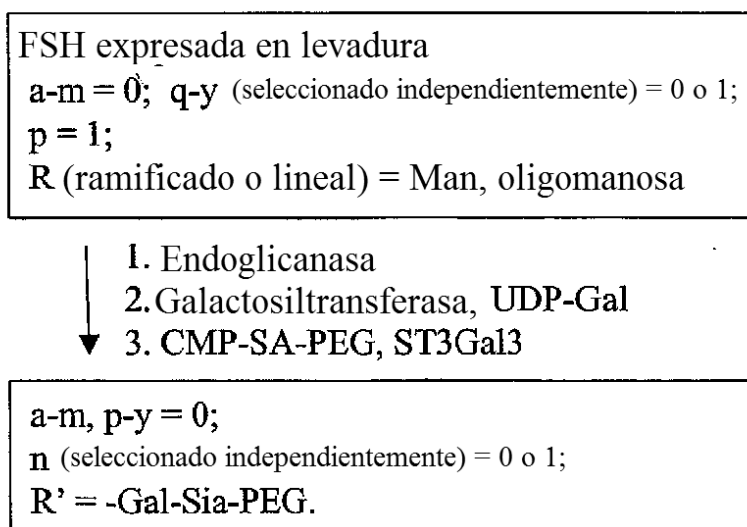


FIG. 32I

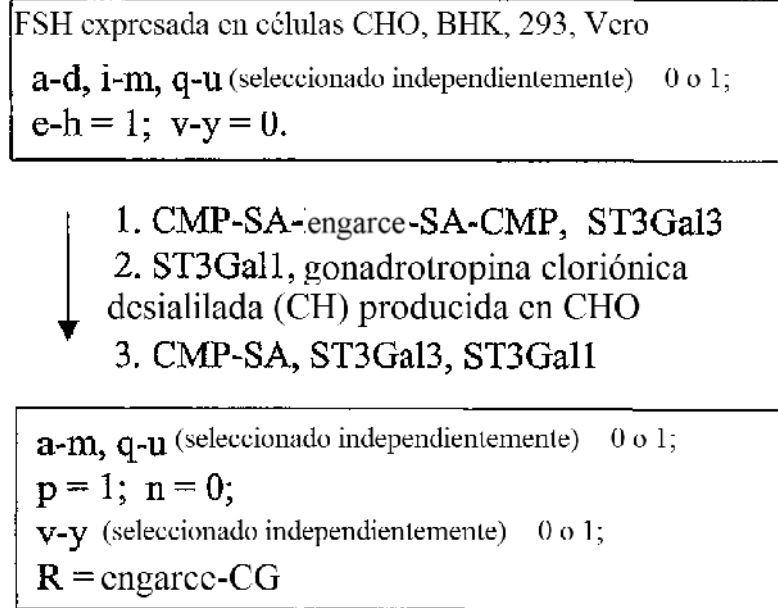
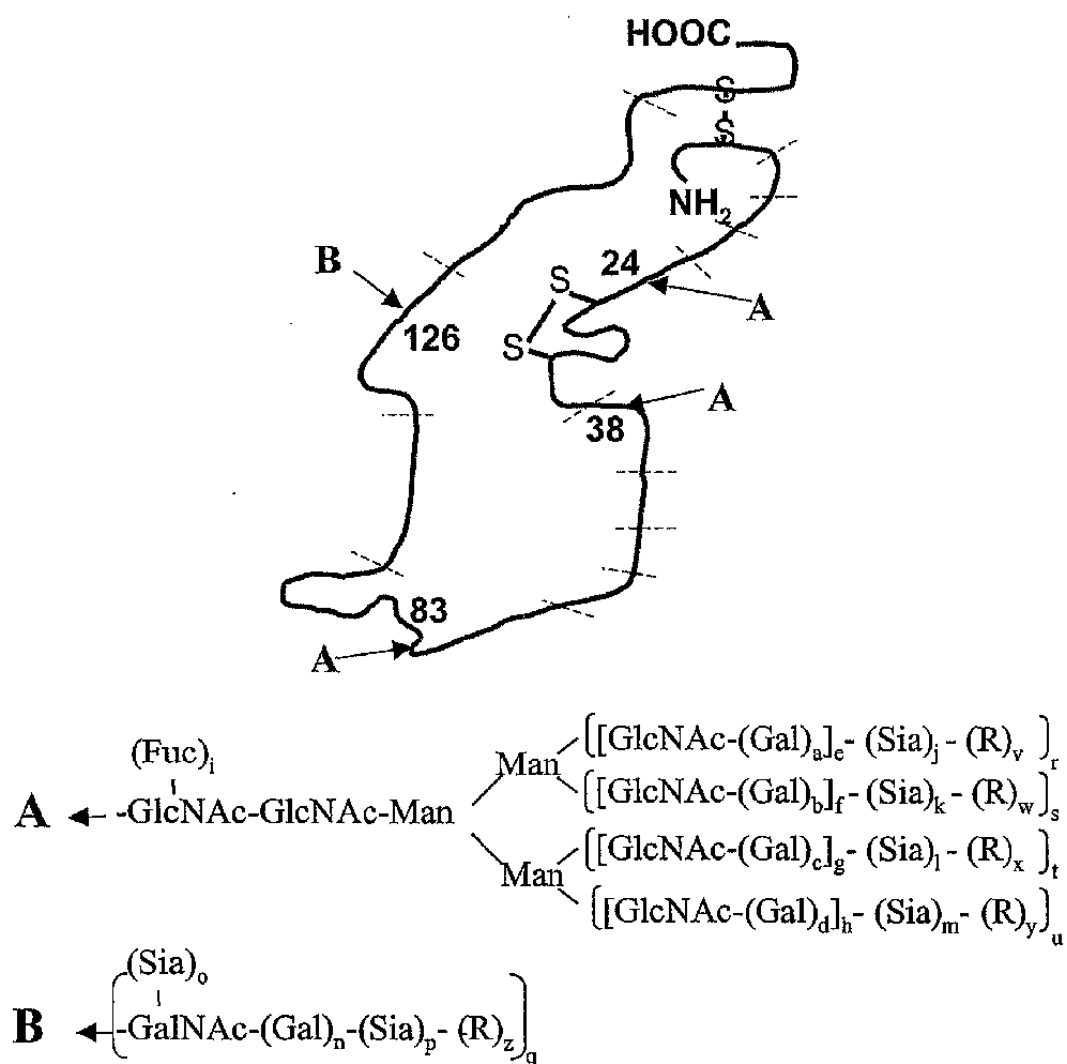


FIG. 32J



a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20.

v-z = 0;

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa

FIG. 33A

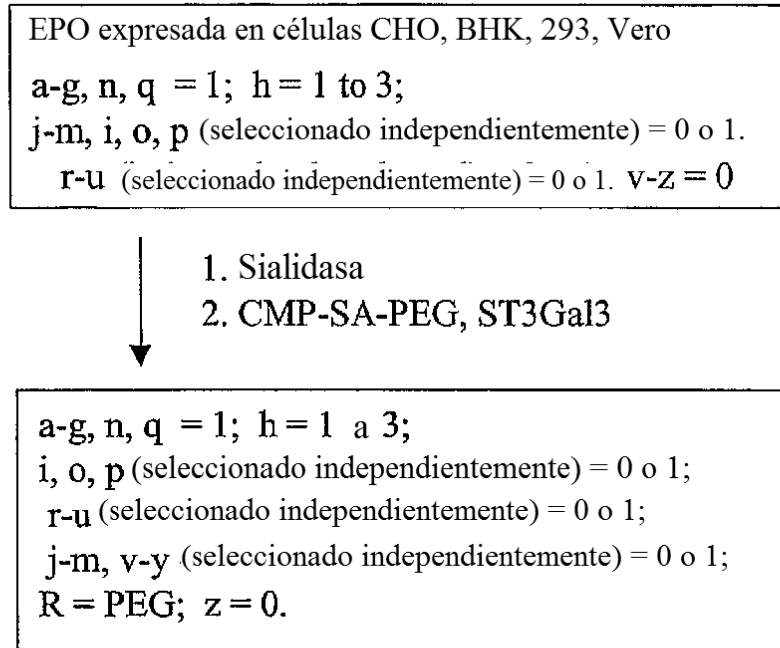


FIG. 33B

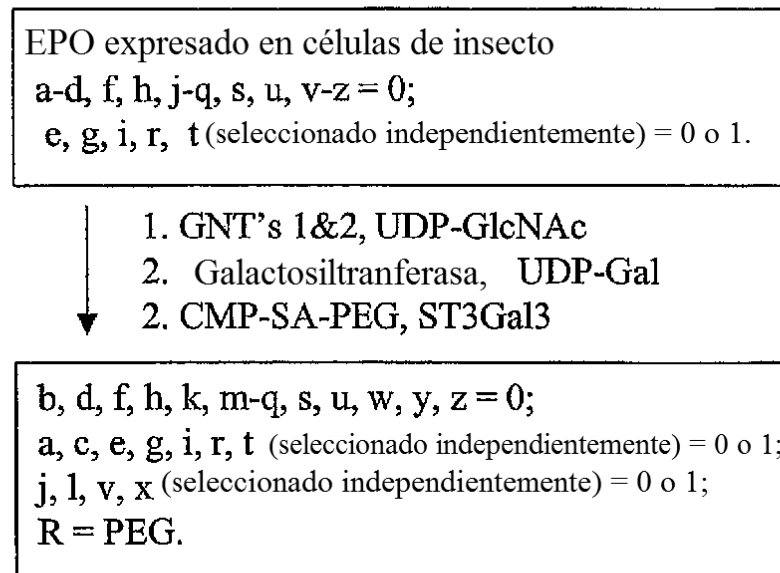


FIG. 33C

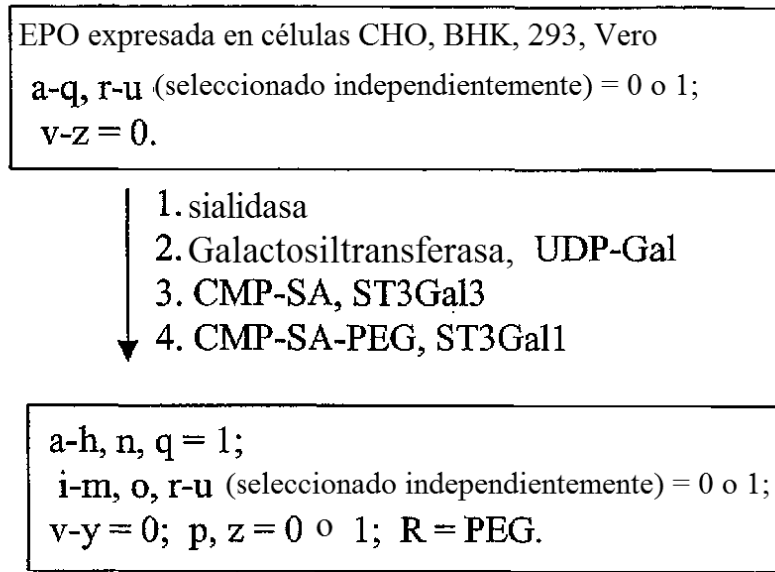


FIG. 33D

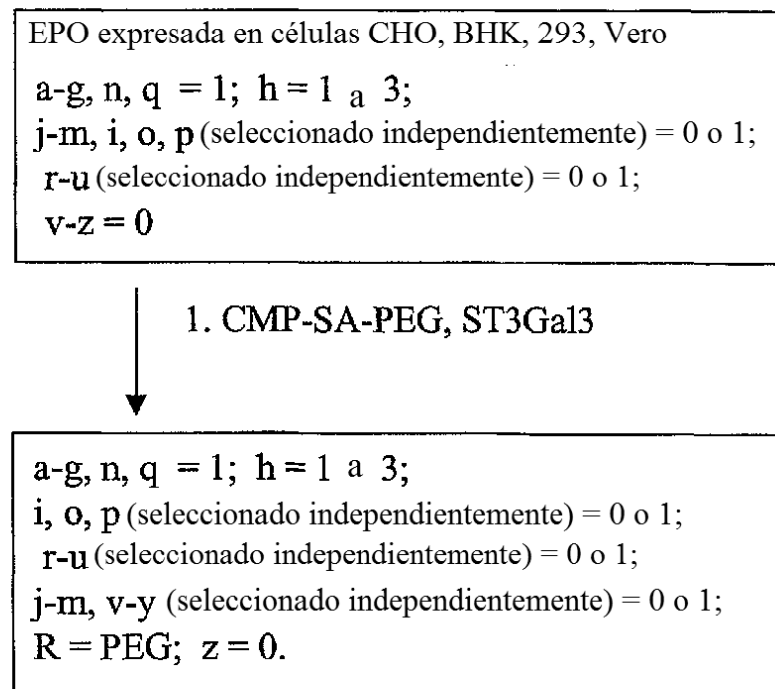


FIG. 33E

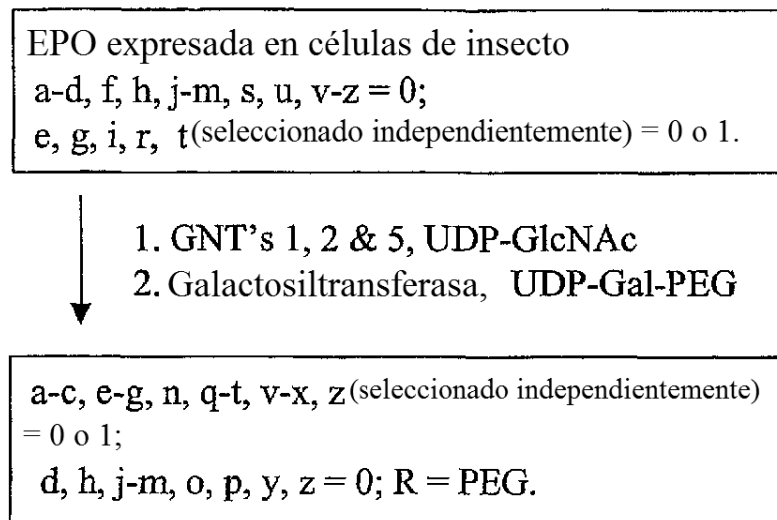


FIG. 33F

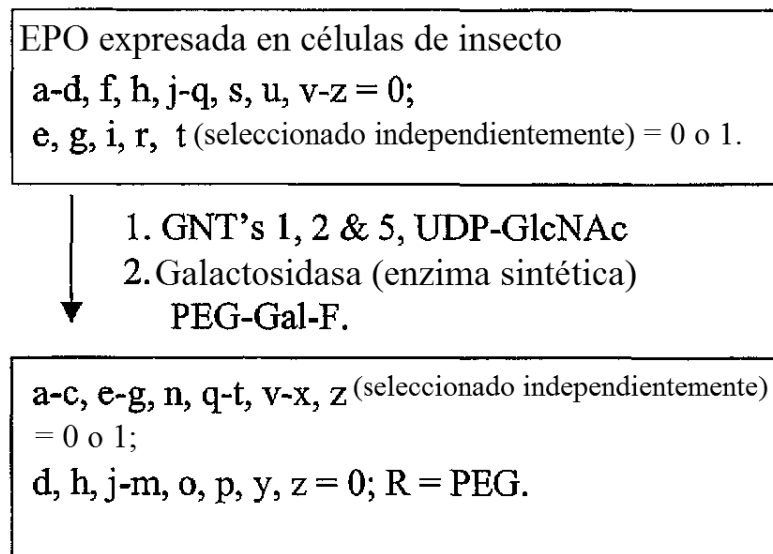


FIG. 33G

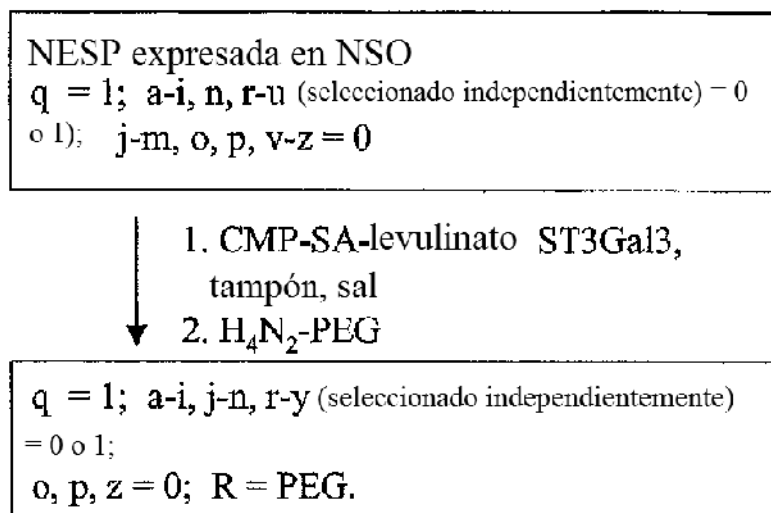


FIG. 33H

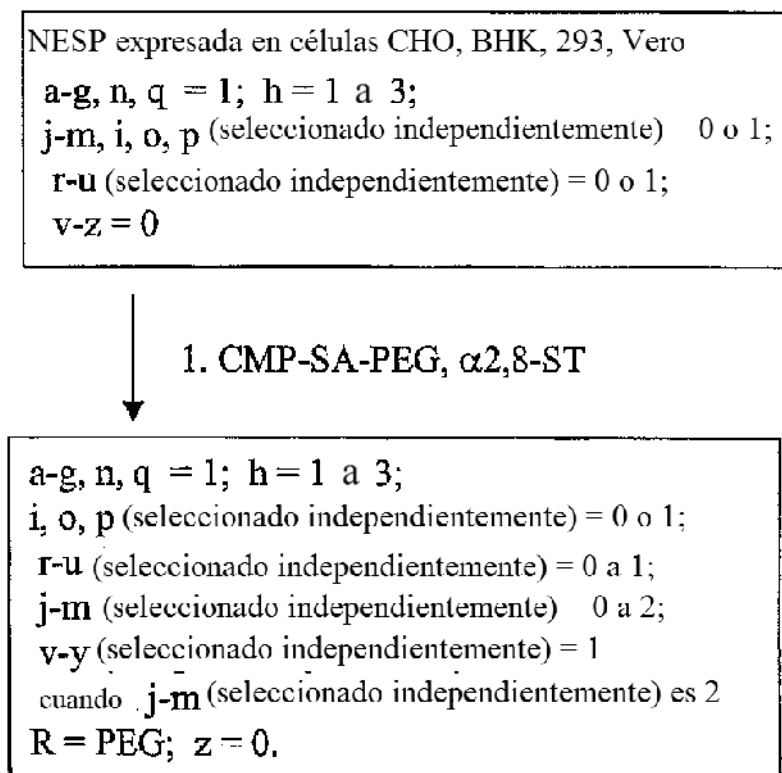


FIG. 33I

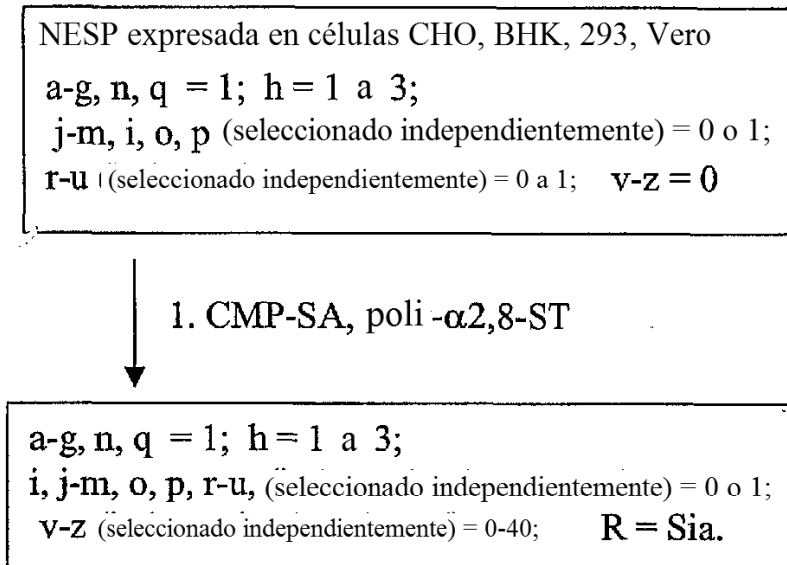
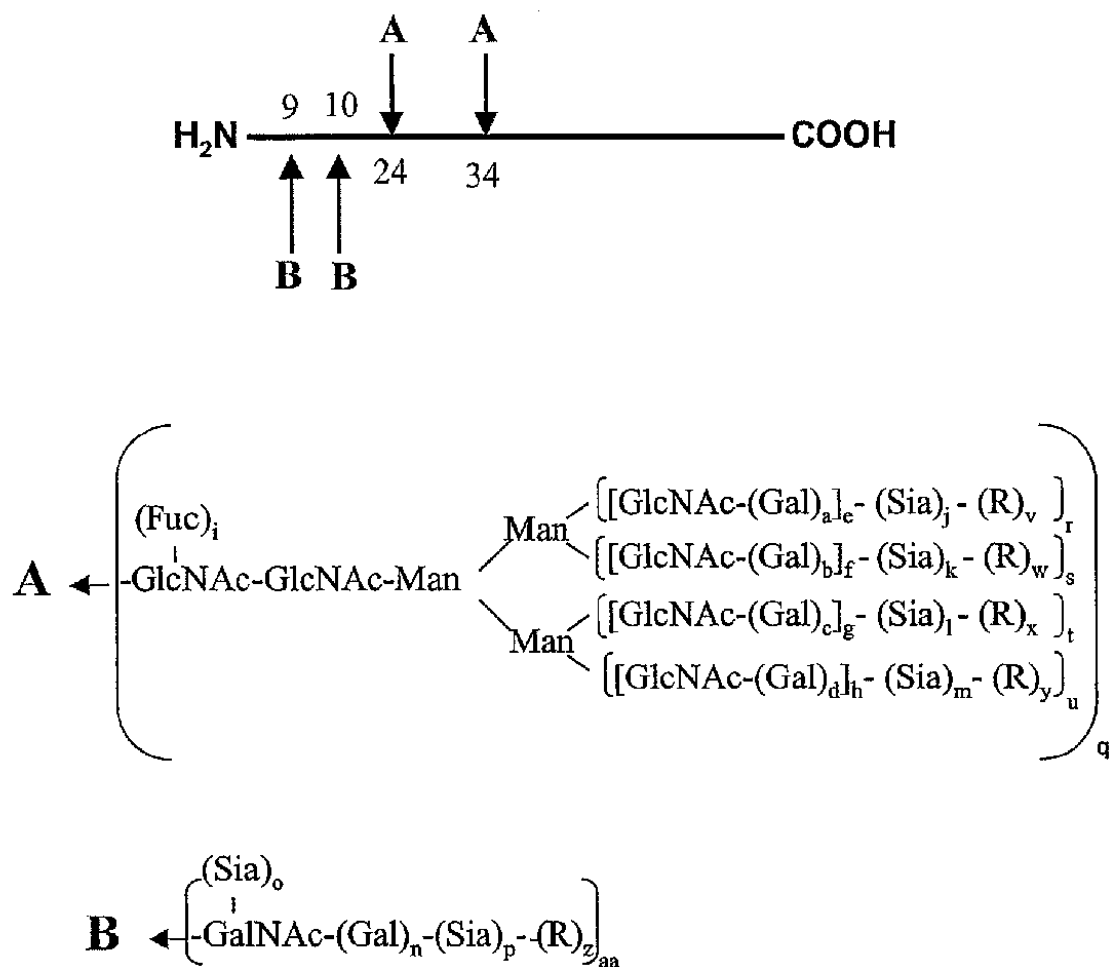


FIG. 33J



a-d, i, n-u, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.
 v-y = 0; R = polímero, glicoconjugado

FIG. 34A

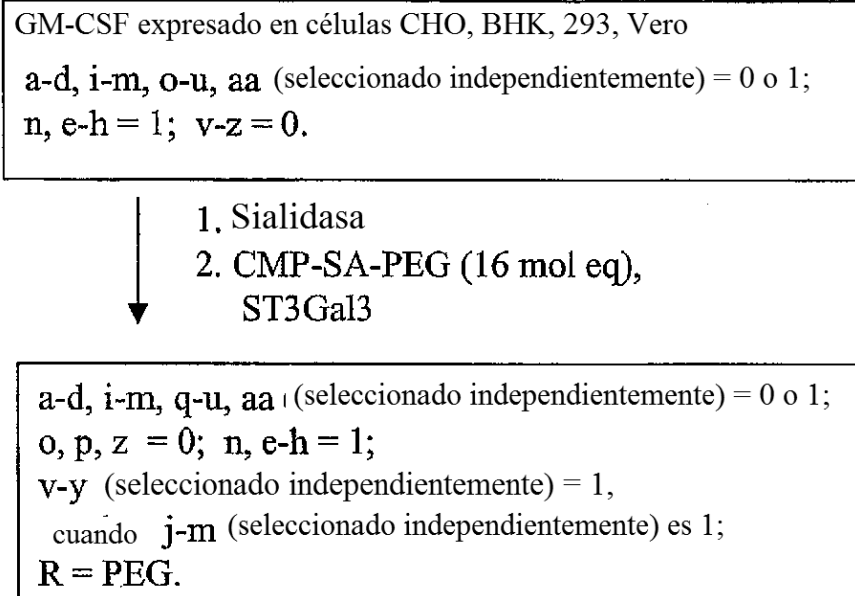


FIG. 34B

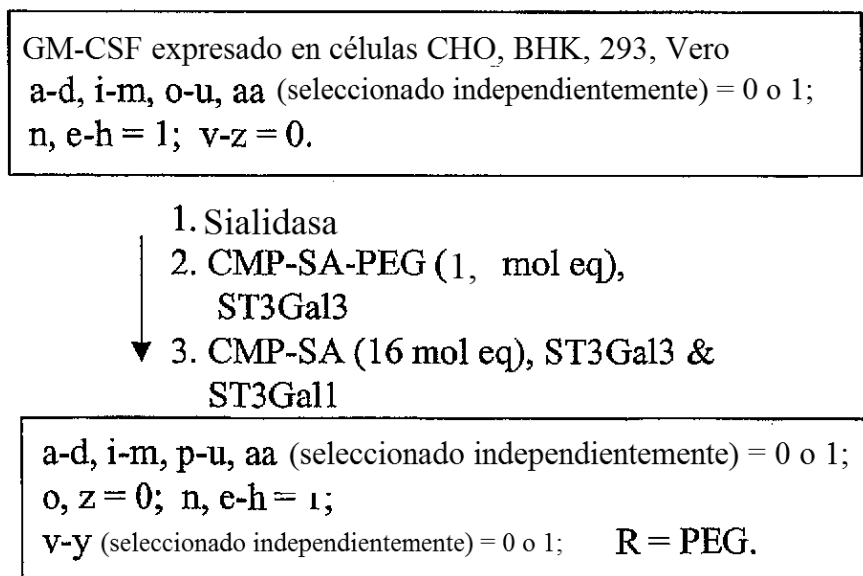


FIG. 34C

GM-CSF expresado en NSO

a-d, i-m, o-u, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n, e-h = 1; v-z = 0;
Sia (seleccionado independientemente) = Sia o Gal

- ↓
1. Sialidasa y α -galactosidasa
 2. CMP-SA, ST3Gal3
 2. CMP-SA-PEG, ST3Gal1

a-d, i-m, p-u, z, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n, e-h = 1; o, v-y = 0; z = 1, cuando p = 1; R = PEG.

FIG. 34D

GM-CSF expresado en células CHO, BHK, 293, Vero

a-d, i-m, o-u, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n, e-h = 1; v-z = 0.

- ↓
1. Sialidasa
 2. CMP-SA-PEG (16 mol eq),
ST3Gal3
 3. CMP-SA, ST3Gal3

a-d, i-m, q-y, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
o, p, z = 0; n, e-h = 1; R = PEG.

FIG. 34E

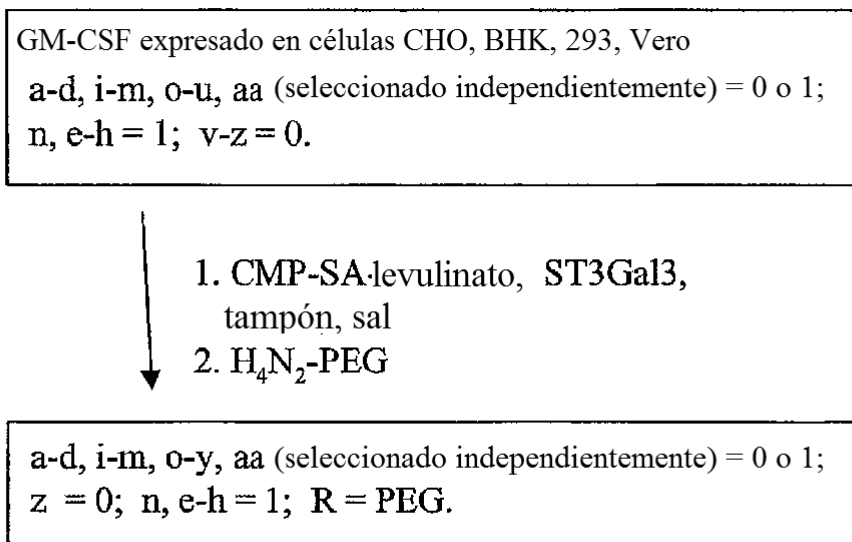


FIG. 34F

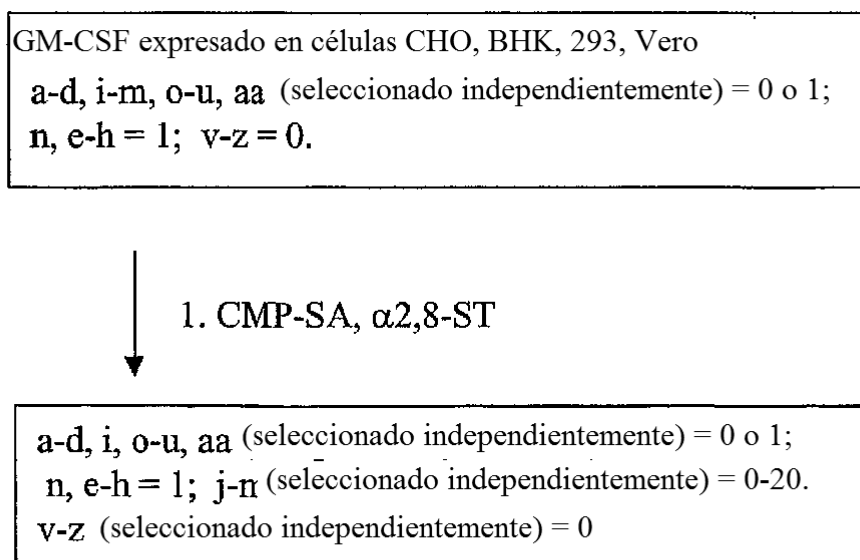
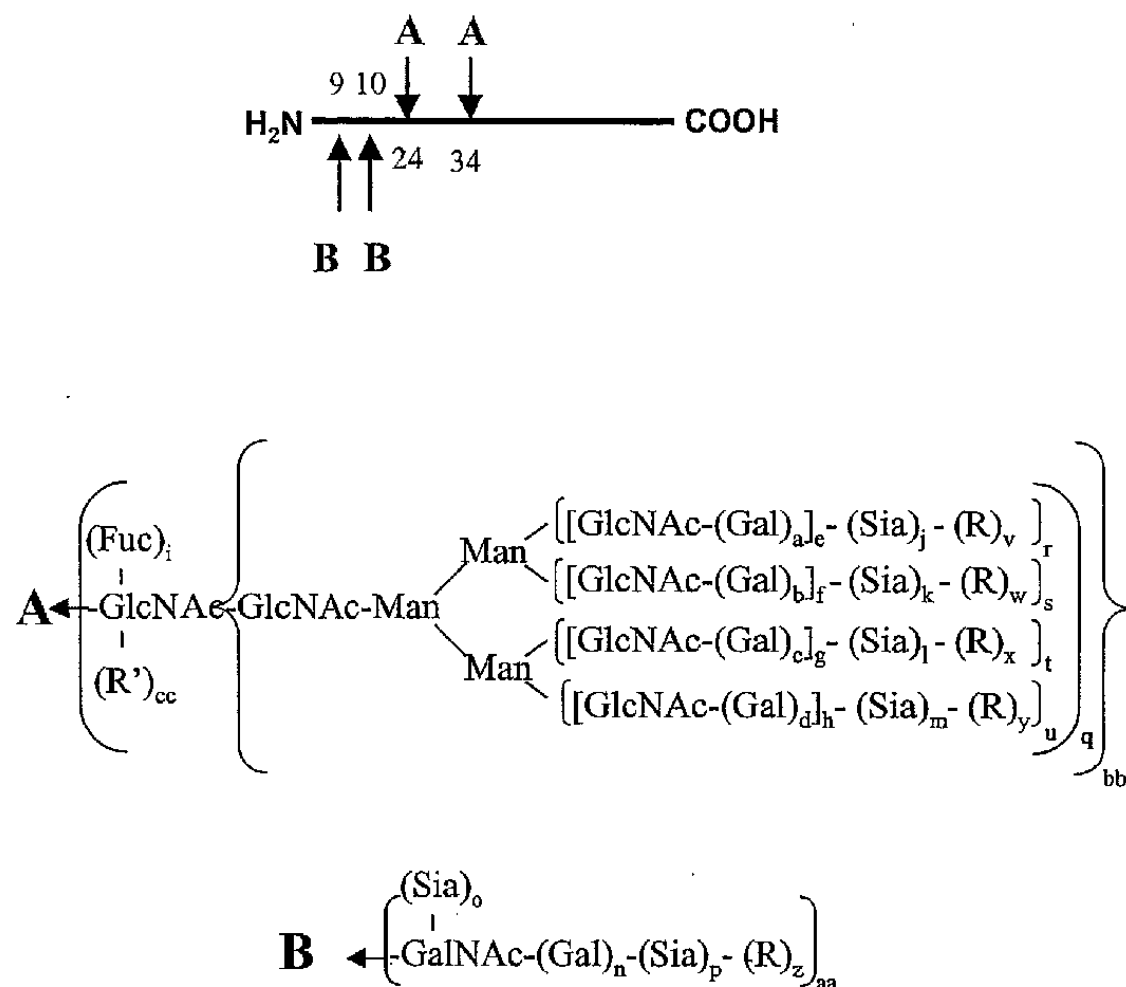


FIG. 34G



a-d, i, n-u, aa, bb, cc (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.

v-y = 0; R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.

R' = H, resto de glicosilo, grupo modificador, gliconjugado.

FIG. 34H

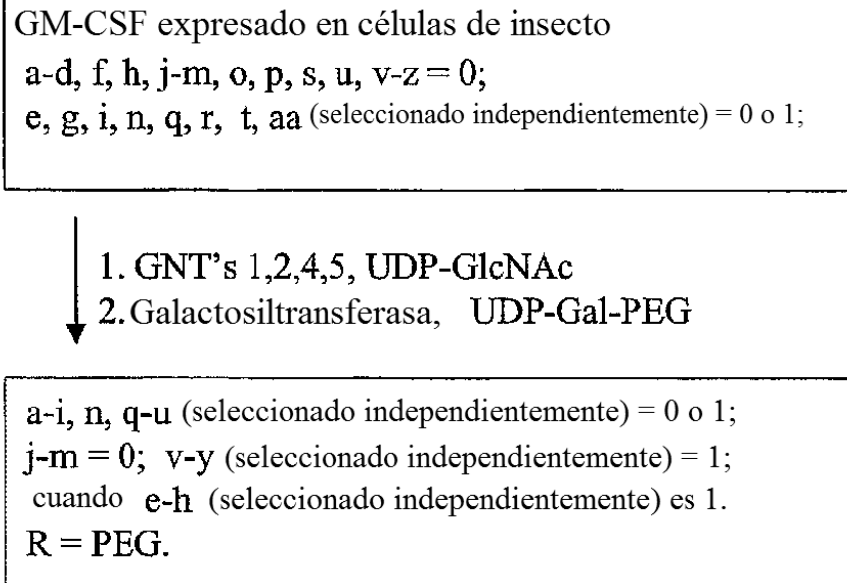


FIG. 34I

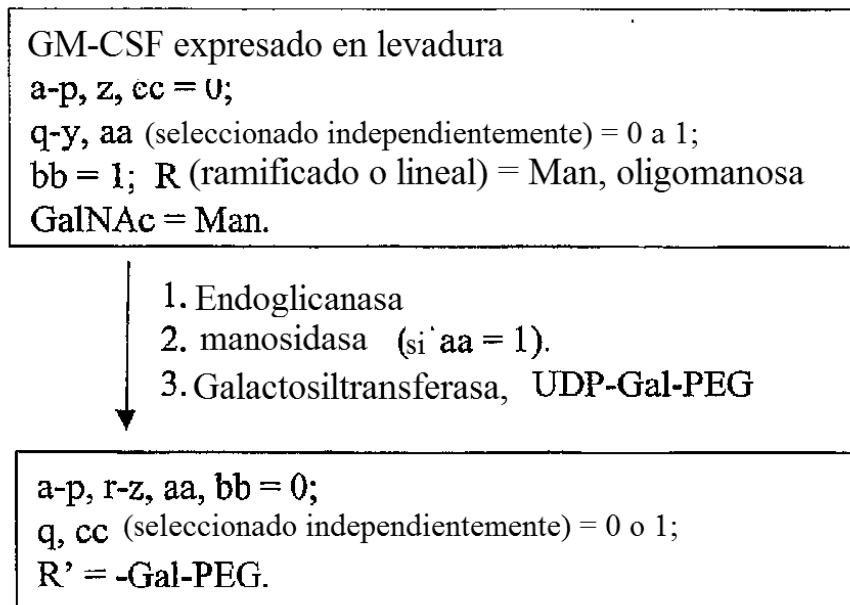


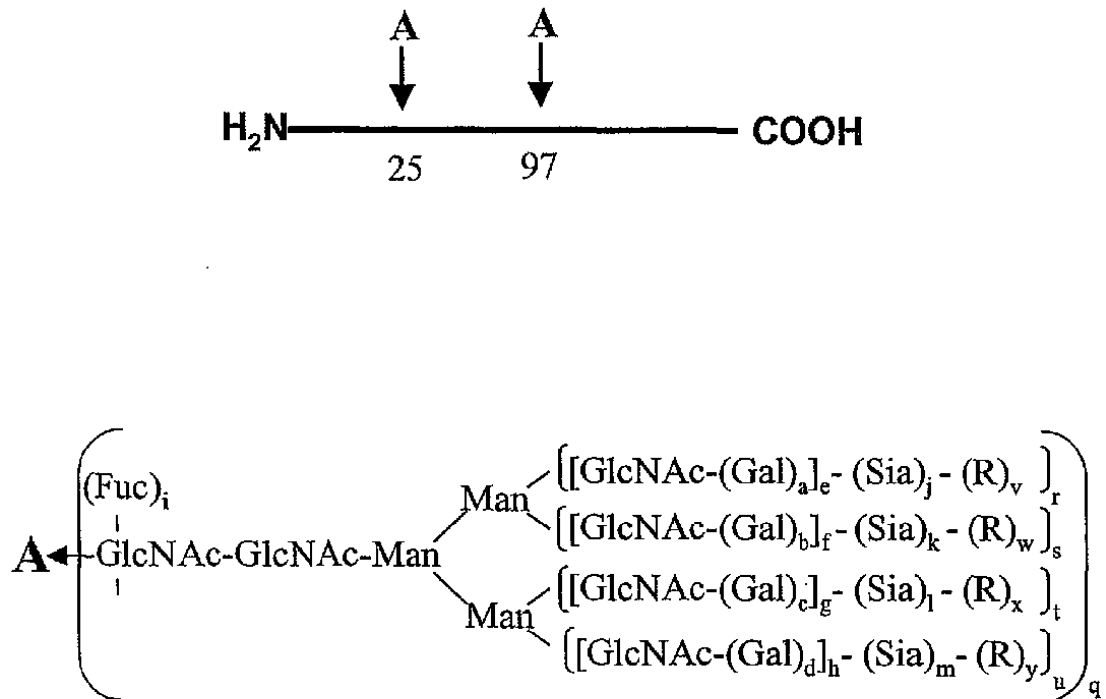
FIG. 34J

GM-CSF expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a--m, o-u, aa, bb (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n, v-z, cc = 0.

- ↓
1. sialidasa
 2. CMP-SA, ST3Gal3
 2. CMP-SA-^{engarce} -SA-CMP, ST3Gal1
 3. ST3Gal3, transferrina

a--m, p-u, z, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
o, v-y, cc = 0; bb, n = 1; R = transferrina

FIG. 34K



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.
 v-y = 0; R = polímero

FIG. 35A

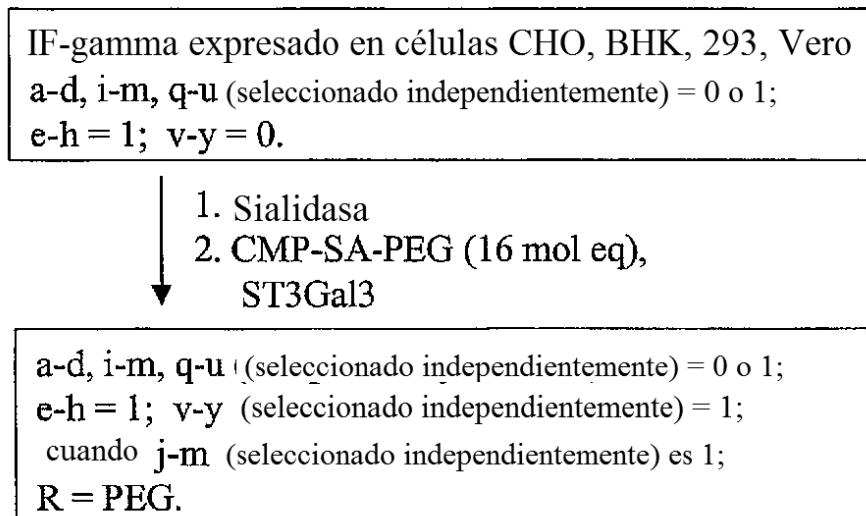


FIG. 35B

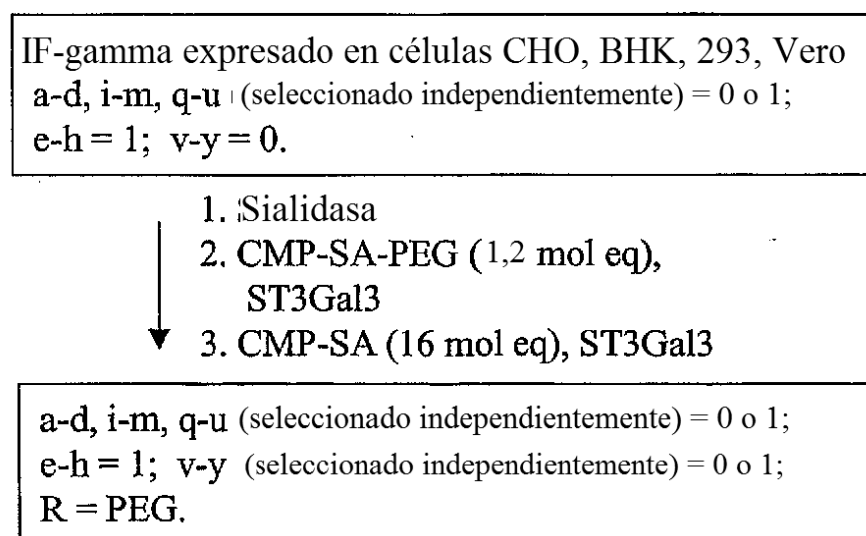


FIG. 35C

Interferón gamma expresado en NSO

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

e-h = 1; v-y = 0;

Sia (seleccionado independientemente) = Sia o Gal

1. Sialidasa y α -galactosidasa
2. α -Galactosiltransferasa, UDP-Gal
- ▼ 3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 1;

cuando j-m (seleccionado independientemente) es 1;

R = PEG.

FIG. 35D

Interferón-gamma expresado en células CHO, BHK, 293, Vero

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

e-h = 1; v-y = 0.

1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG (16 mol eq), ST3Gal3
- ▼ 3. CMP-SA, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 0 o

R = PEG.

FIG. 35E

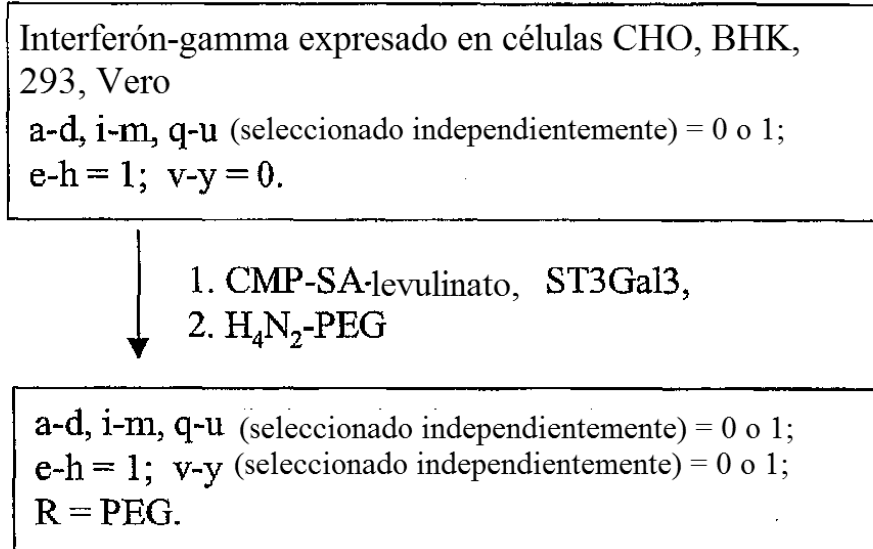


FIG. 35F

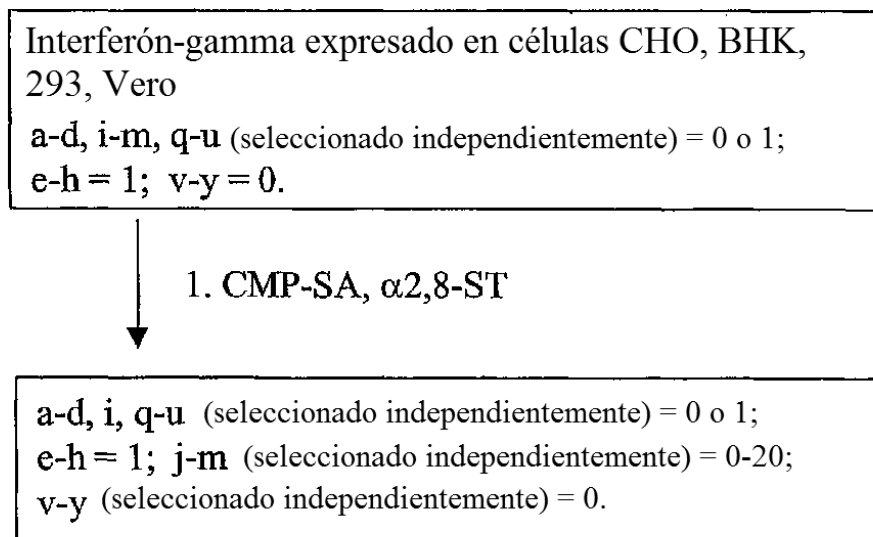
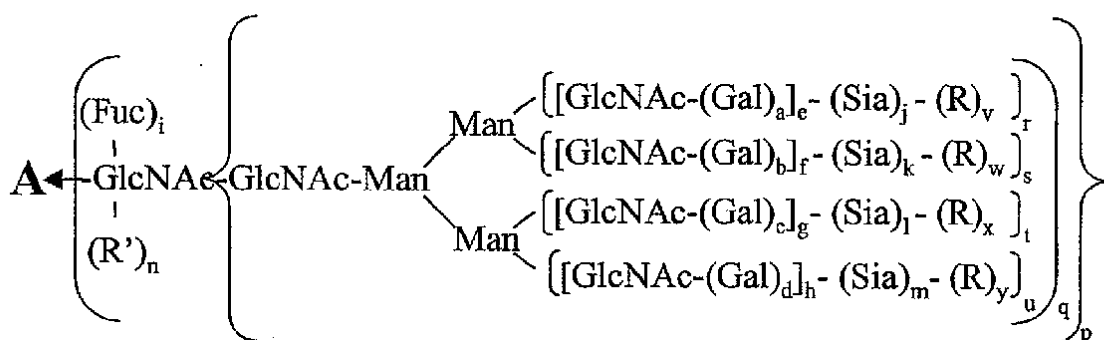
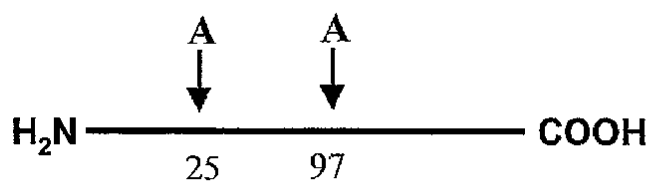


FIG. 35G



a-d, i, n, p-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100;

v-y = 0;

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa;

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador, glicoconjugado.

FIG. 35H

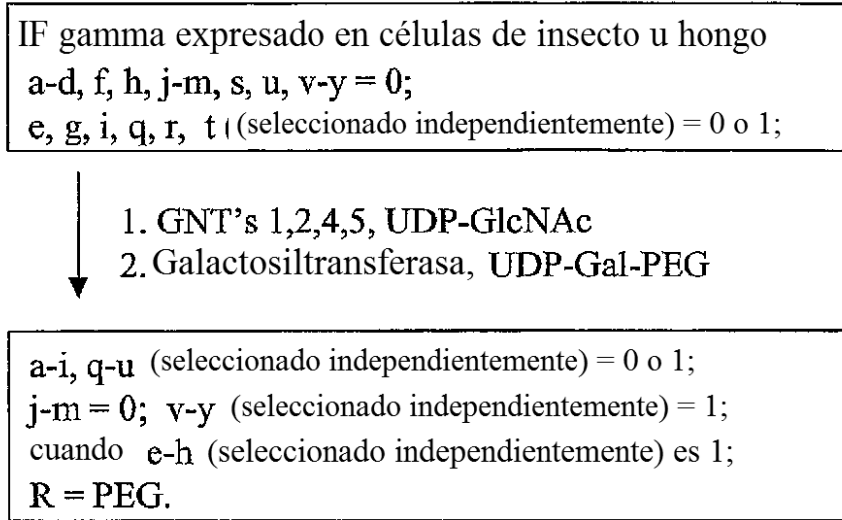


FIG. 35I

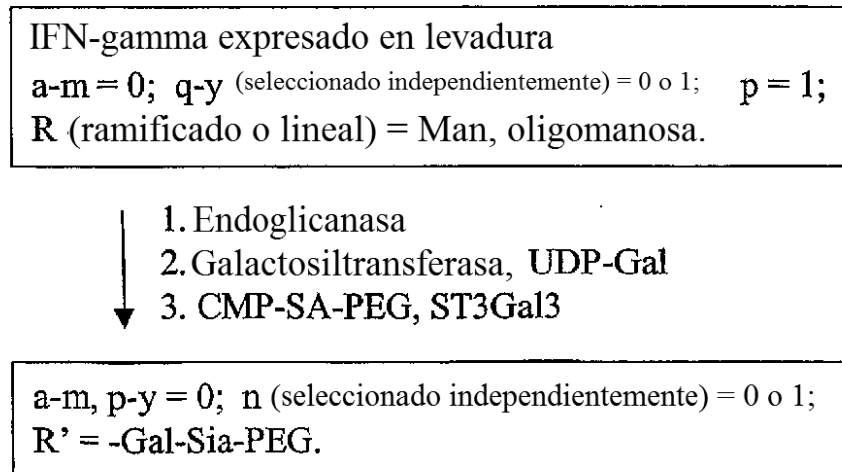


FIG. 35J

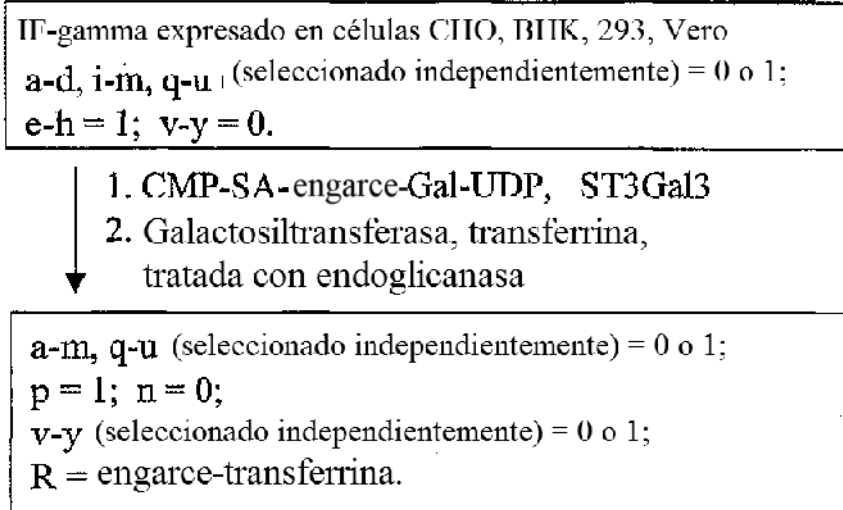


FIG. 35K

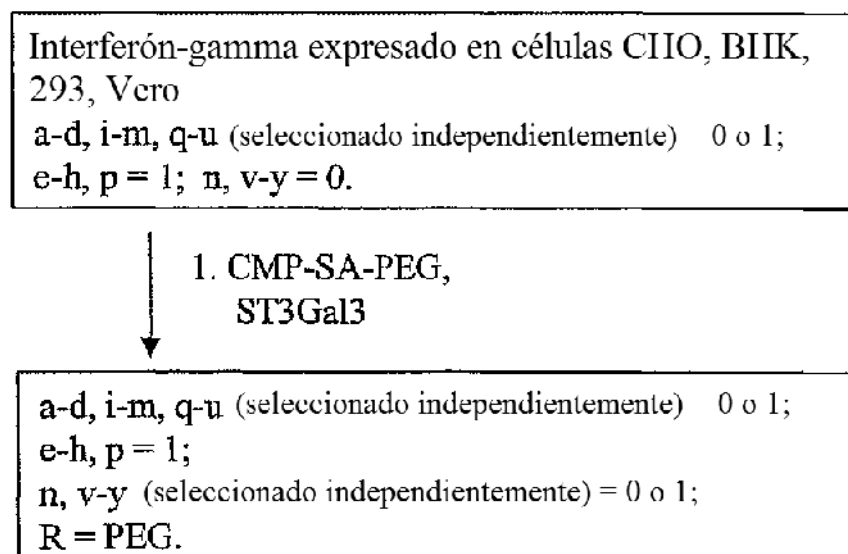


FIG. 35L

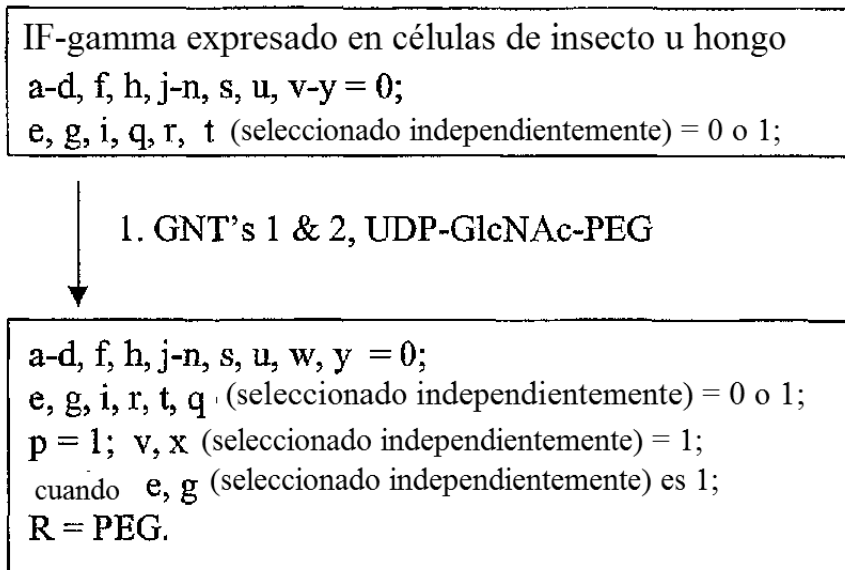


FIG. 35M

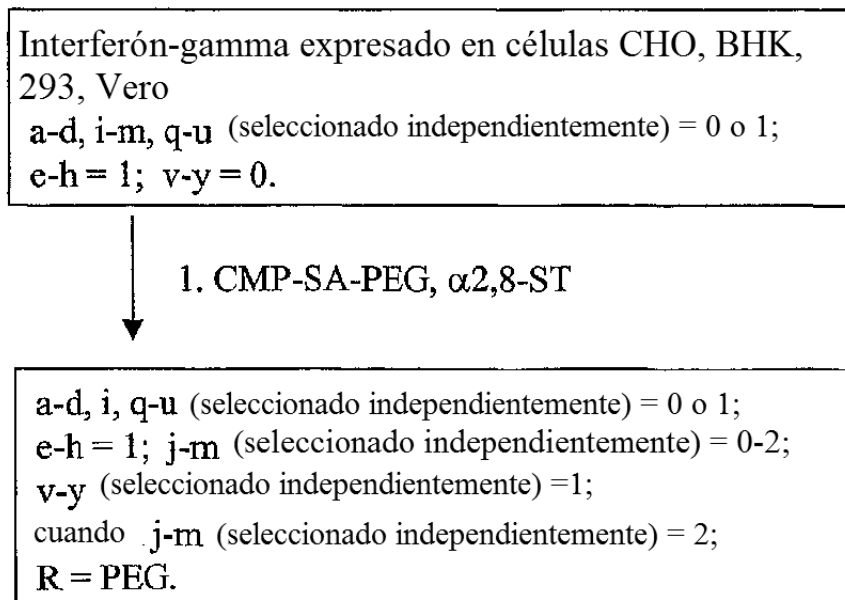
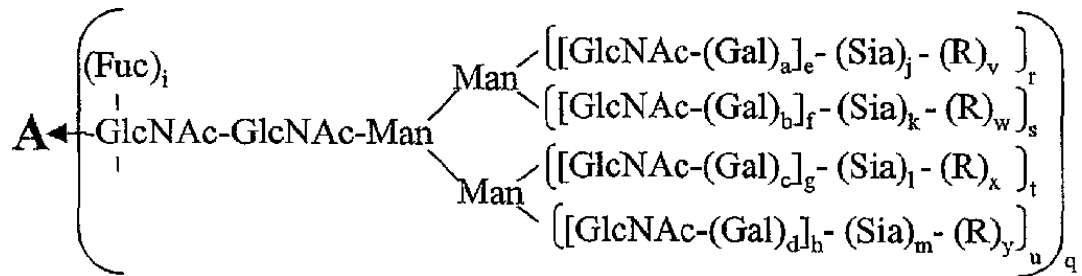
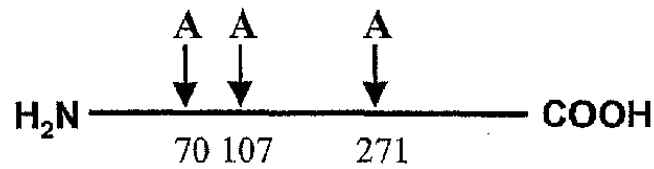


FIG. 35N



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.
 v-y = 0; R = polímero.

FIG. 36A

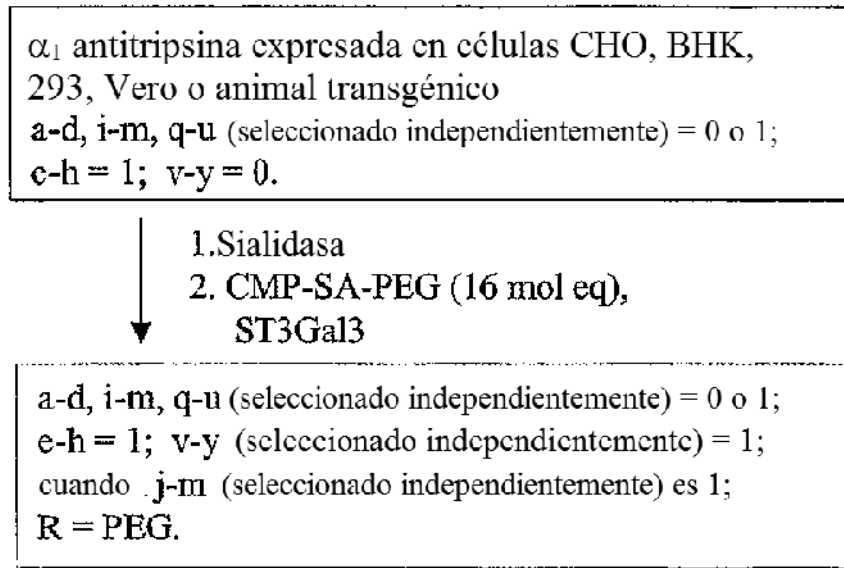


FIG. 36B

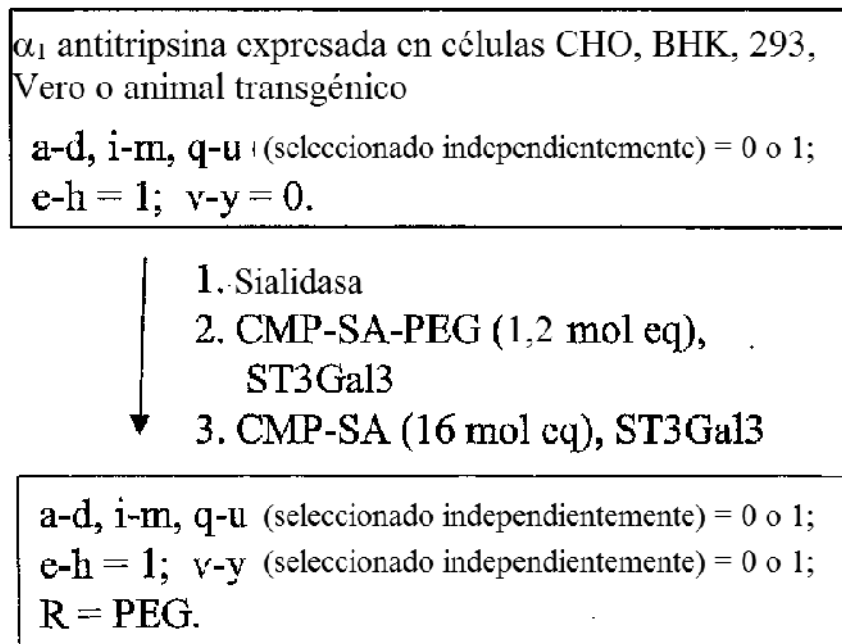


FIG. 36C

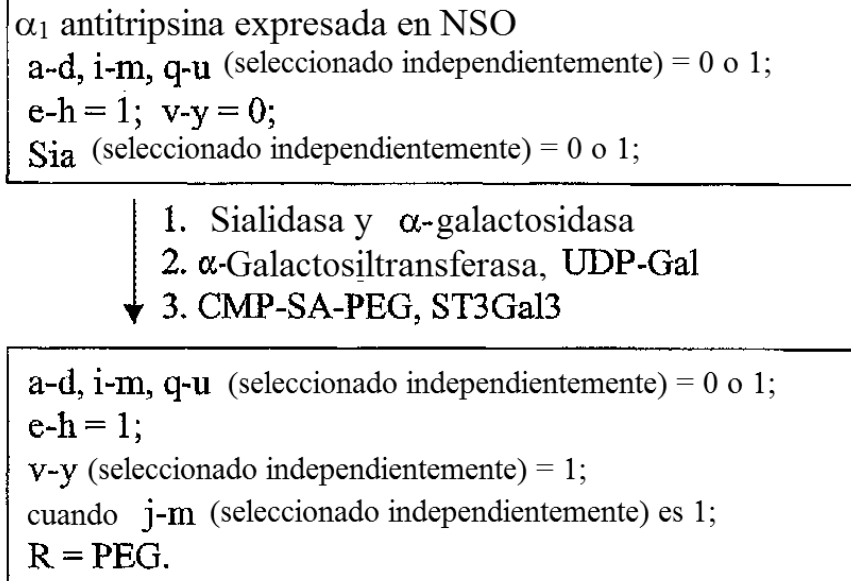


FIG. 36D

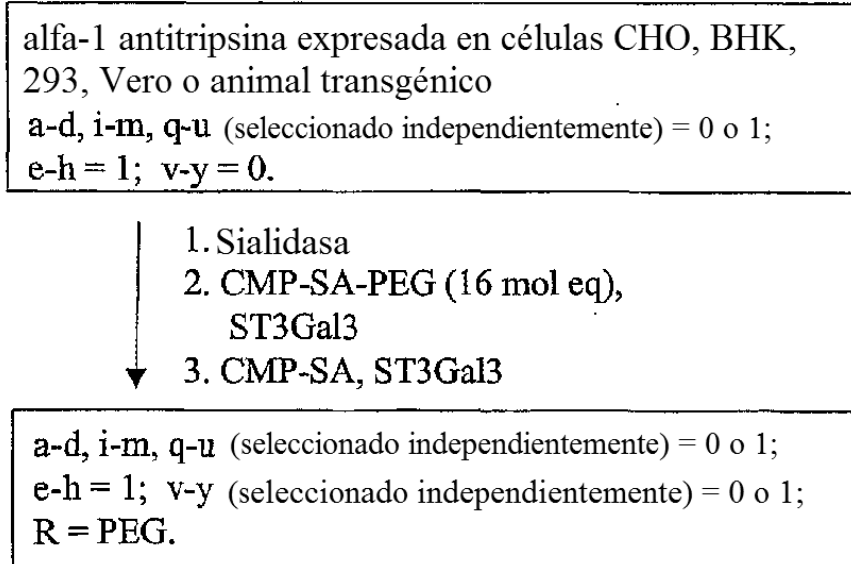


FIG. 36E

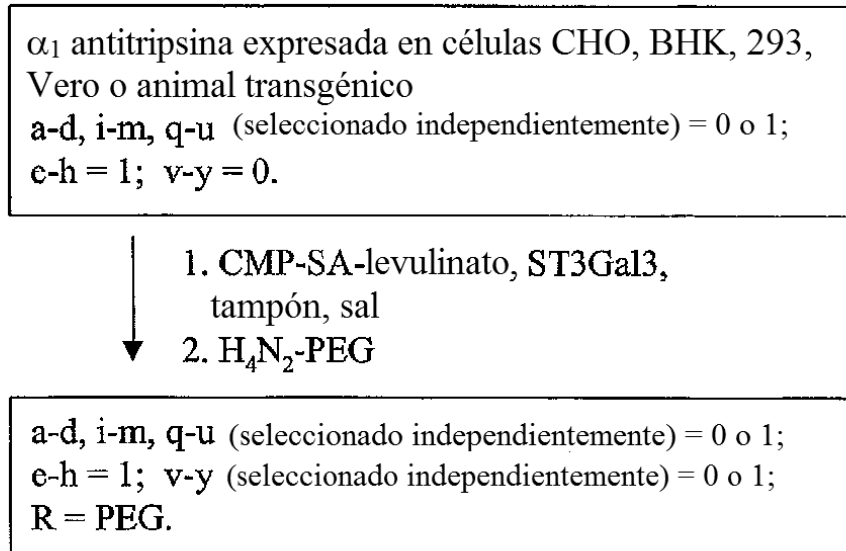


FIG. 36F

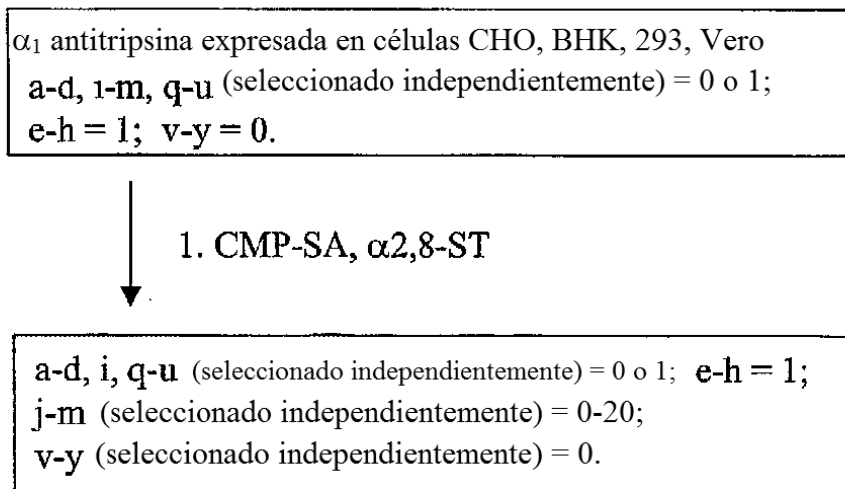
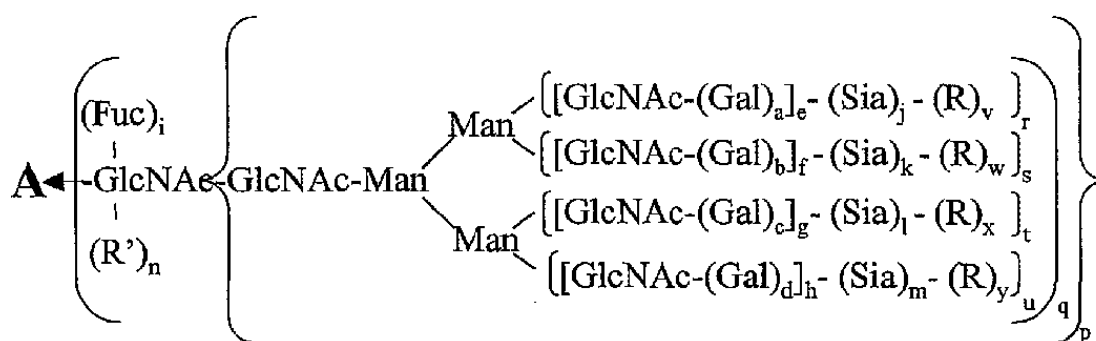
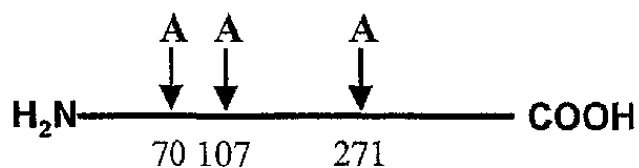


FIG. 36G



a-d, i, n, p-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.

v-y = 0;

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador, glicoconjugado.

FIG. 36H

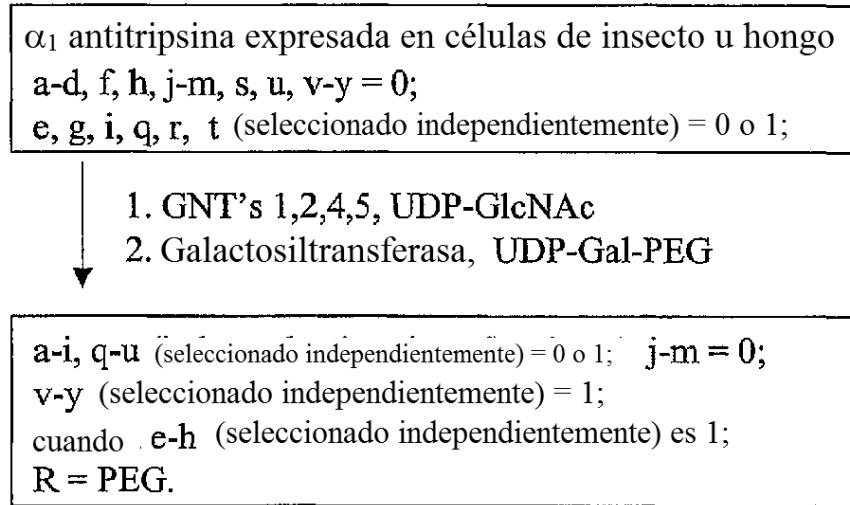


FIG. 36I

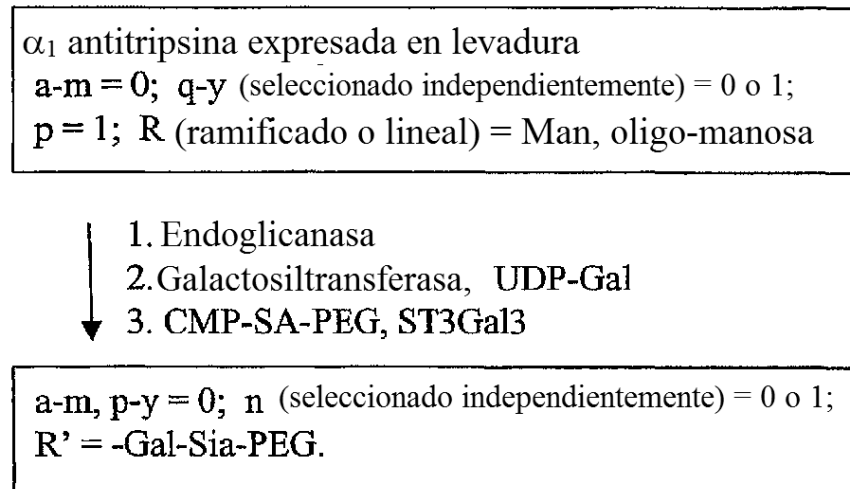


FIG. 36J

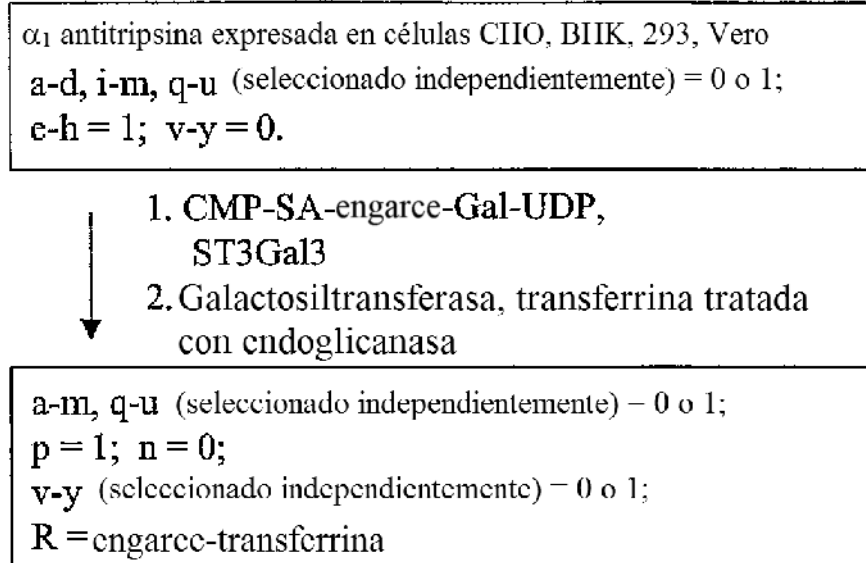
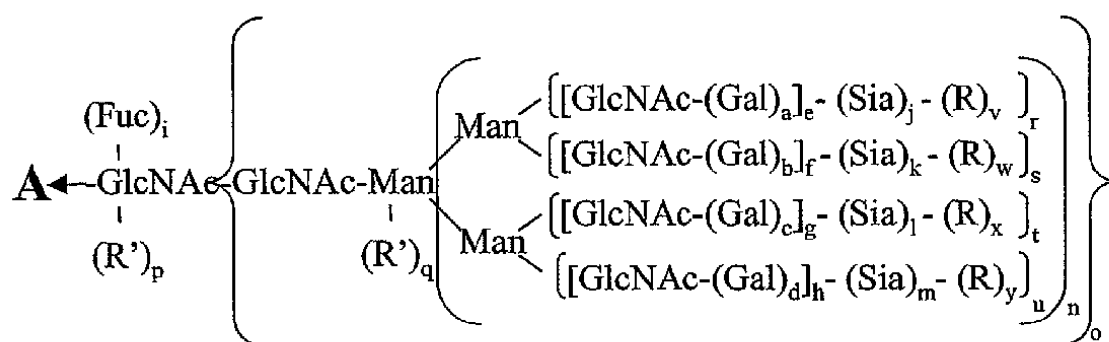
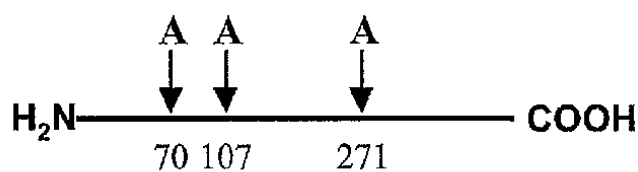


FIG. 36K



a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20.

R = polímero;

R', R'' (seleccionado independientemente) = azúcar, glicoconjugado

FIG. 36L

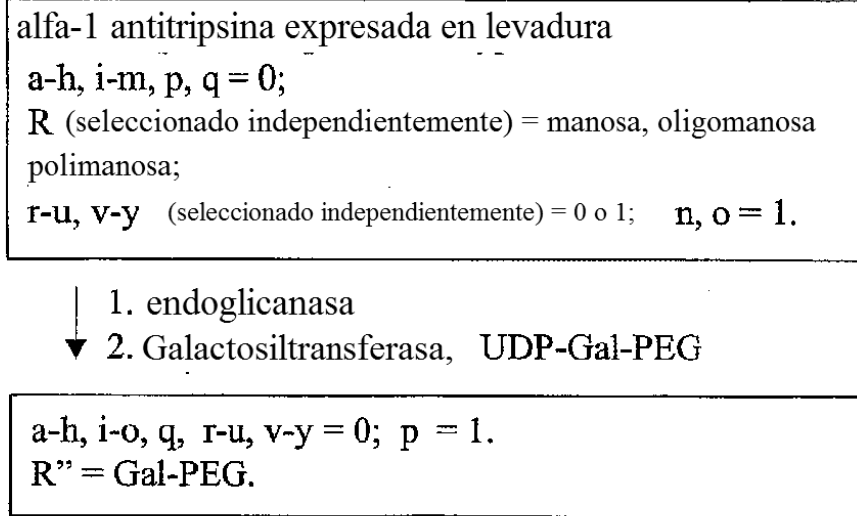


FIG. 36M

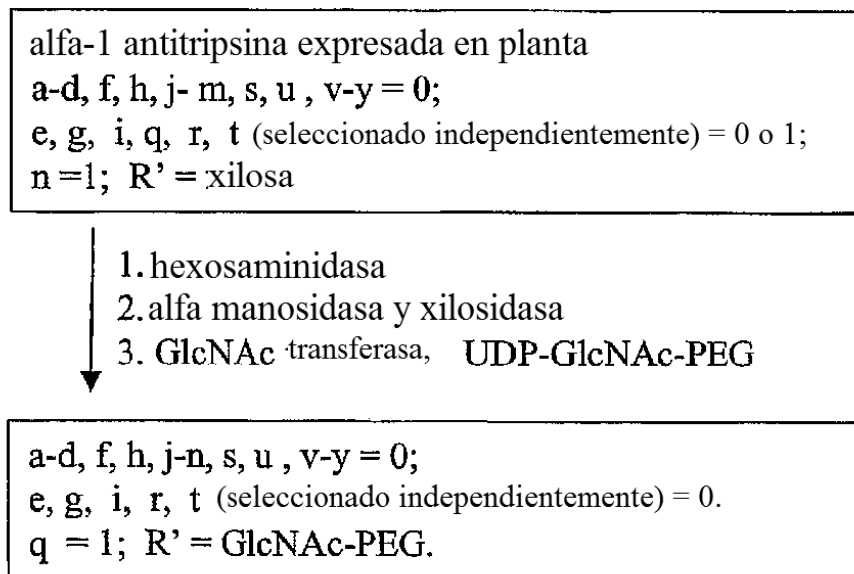


FIG. 36N

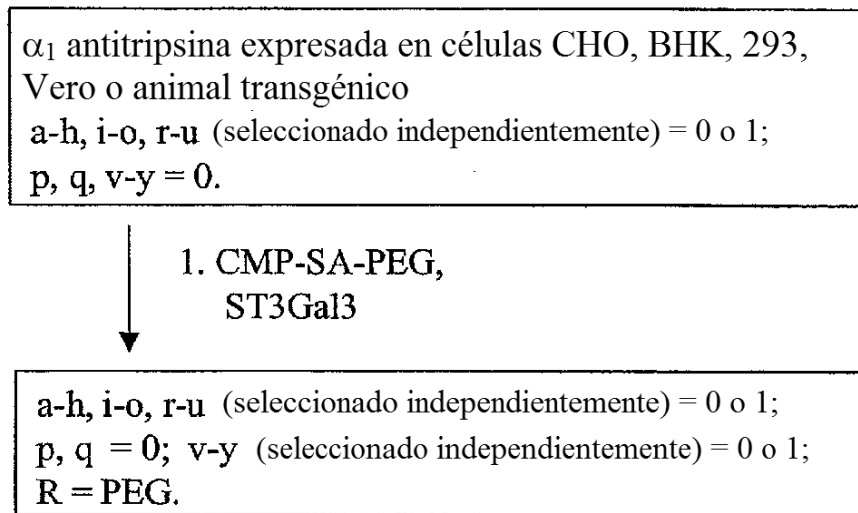
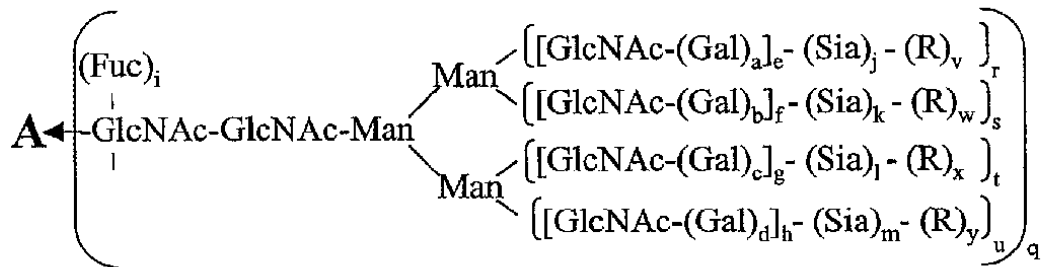
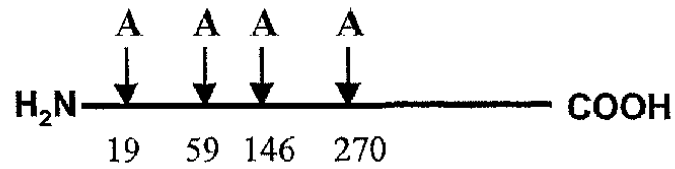


FIG. 360



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.
 v-y = 0; R = polímero

FIG. 37A

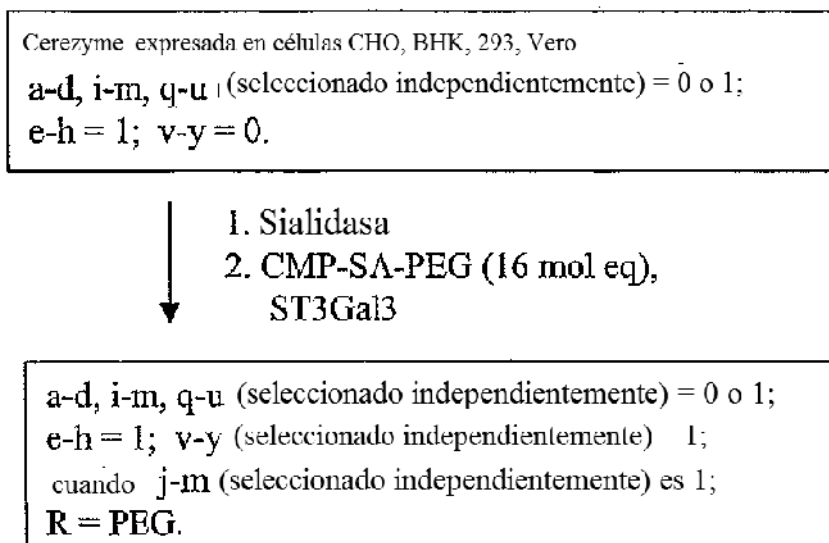


FIG. 37B

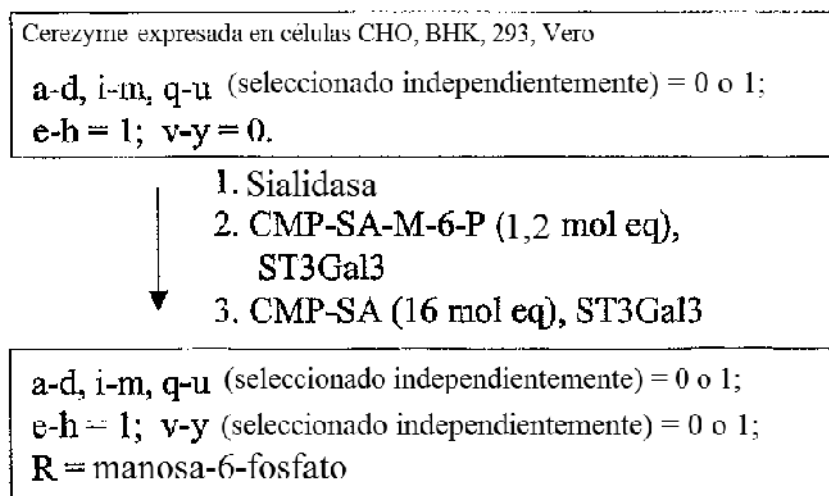


FIG. 37C

Cerezyme expresada en NSO

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

e-h = 1; v-y = 0;

Sia (seleccionado independientemente) = Sia o Gal

- ↓
1. Sialidasa y α -galactosidasa
 2. α -Galactosiltransferasa, UDP-Gal
 3. CMP-SA-M-6-P, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 1;

cuando j-m (seleccionado independientemente) es 1;

R = manosa-6-fosfato

FIG. 37D

Cerezyme expresada en células CHO, BHK, 293, Vero.

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

e-h = 1; v-y = 0.

- ↓
1. Sialidasa
 2. CMP-SA-PEG (16 mol eq),
ST3Gal3
 3. CMP-SA, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o

e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

R = Manosa-6-fosfato

FIG. 37E

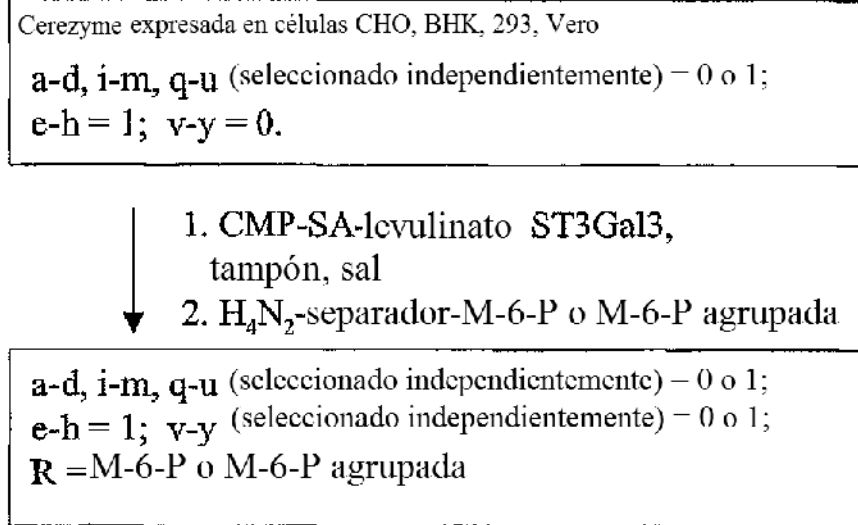


FIG. 37F

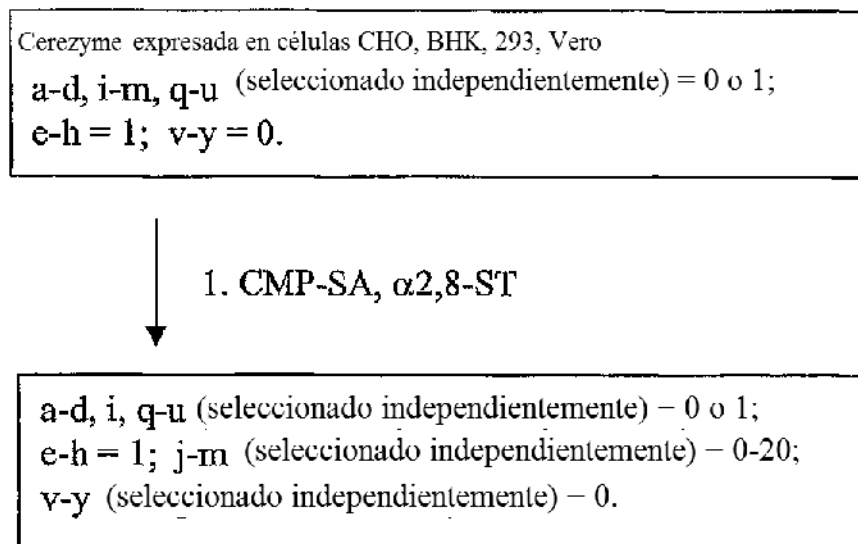
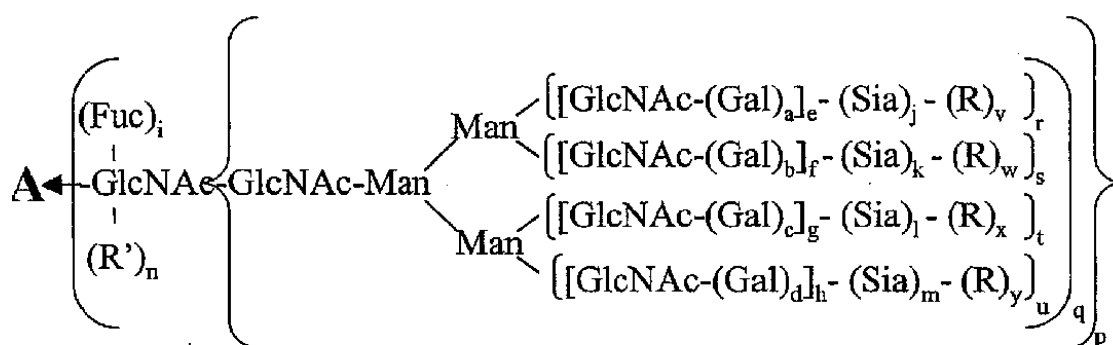
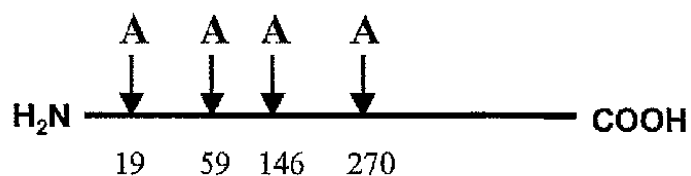


FIG. 37G



a-d, i, n, p-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.

v-y = 0;

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador, glicoconjugado.

FIG. 37H

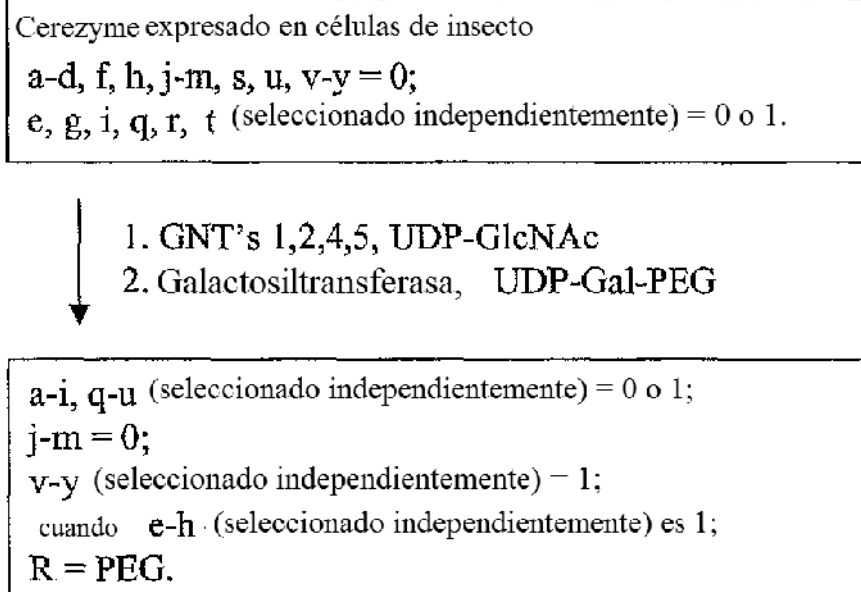


FIG. 37I

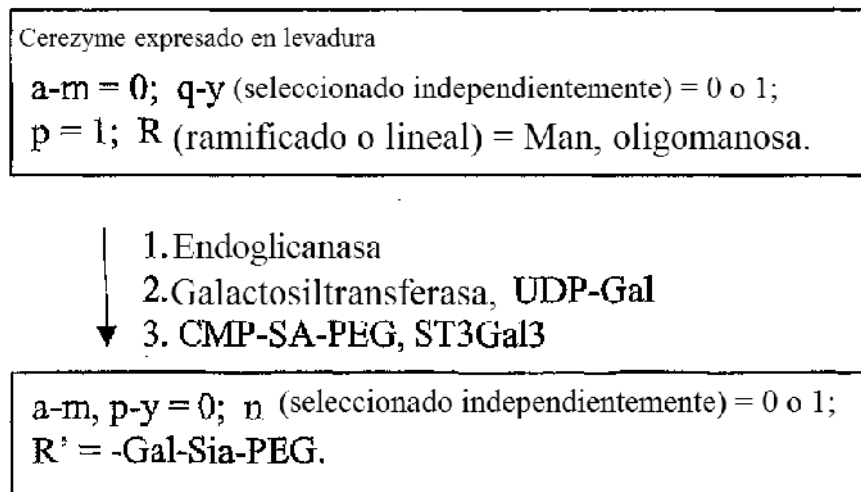


FIG. 37J

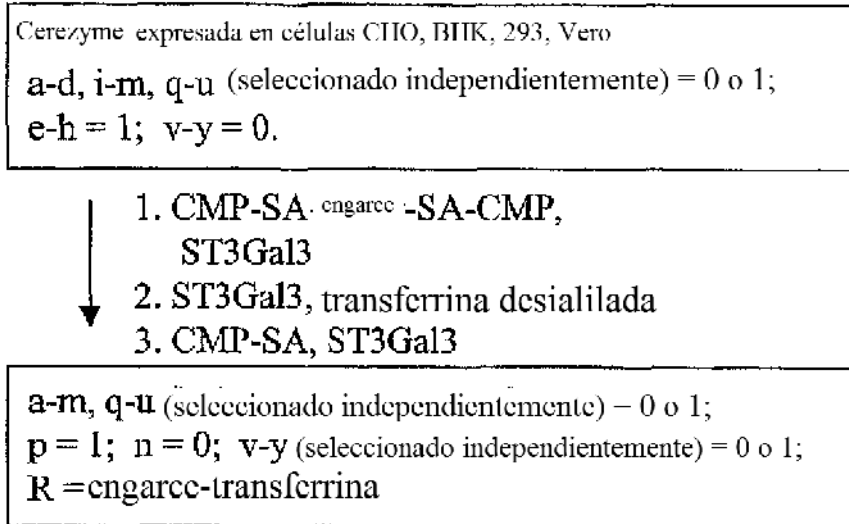
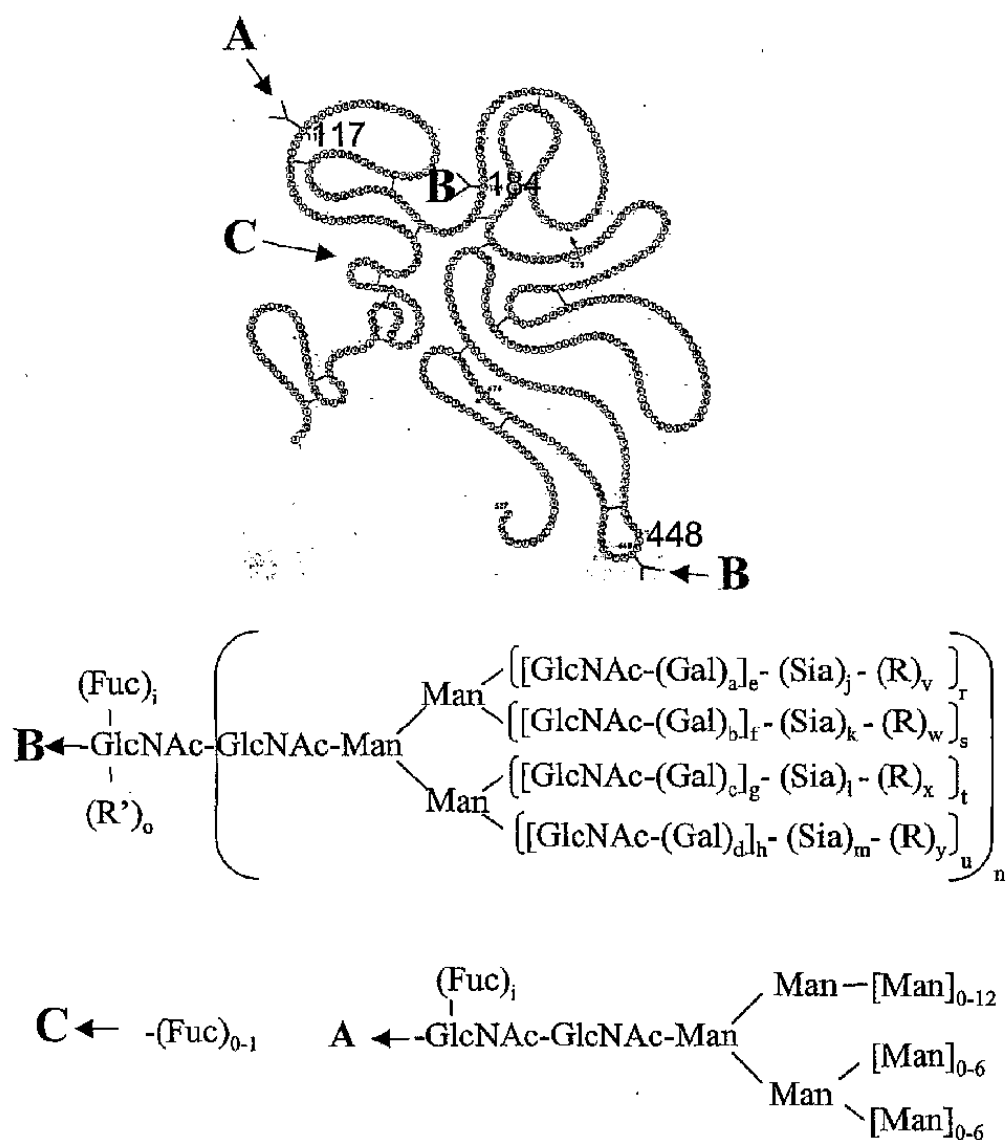


FIG. 37K



a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.
j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20.
R = polímero R' = azúcar, glicoconjugado

FIG. 38A

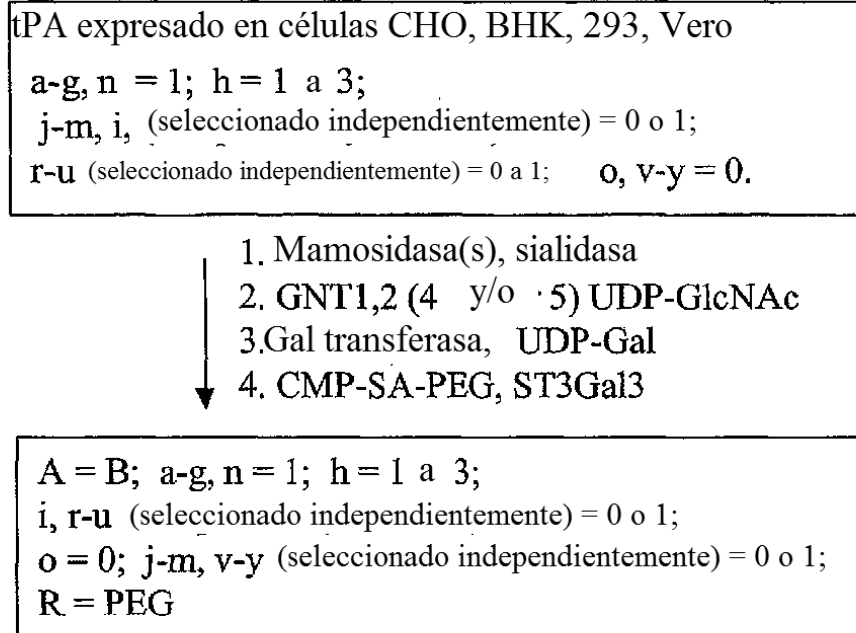


FIG. 38B

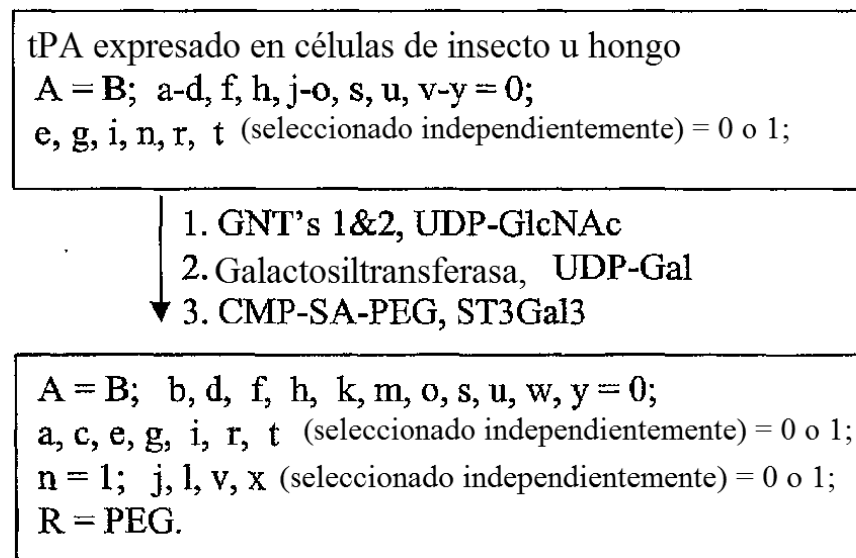


FIG. 38C

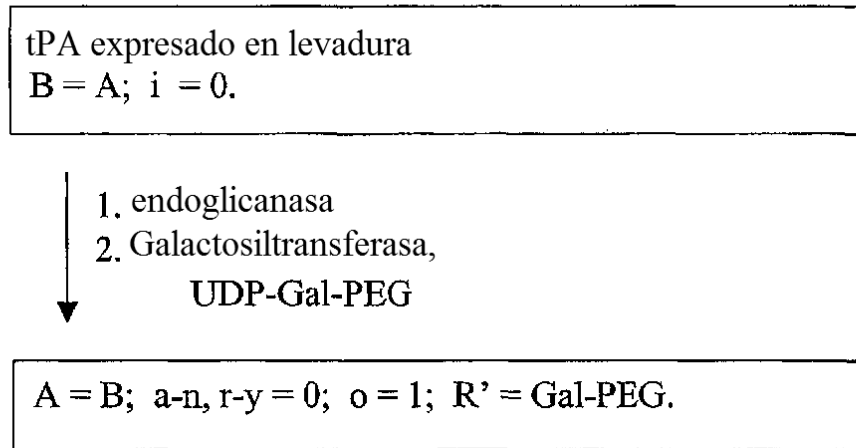


FIG. 38D

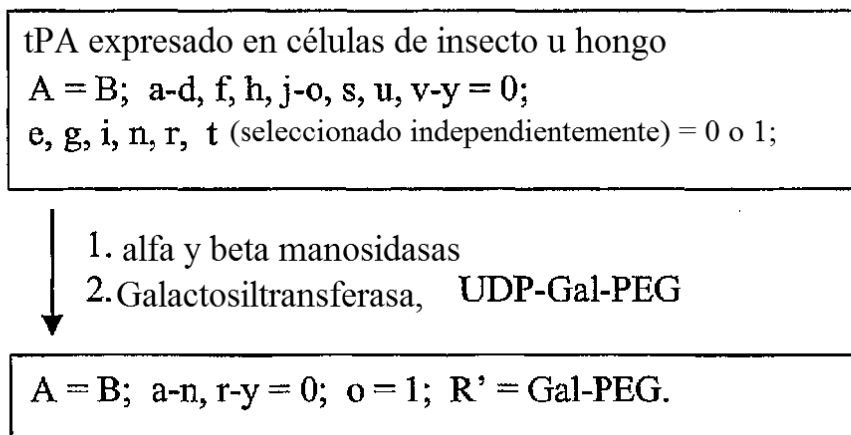


FIG. 38E

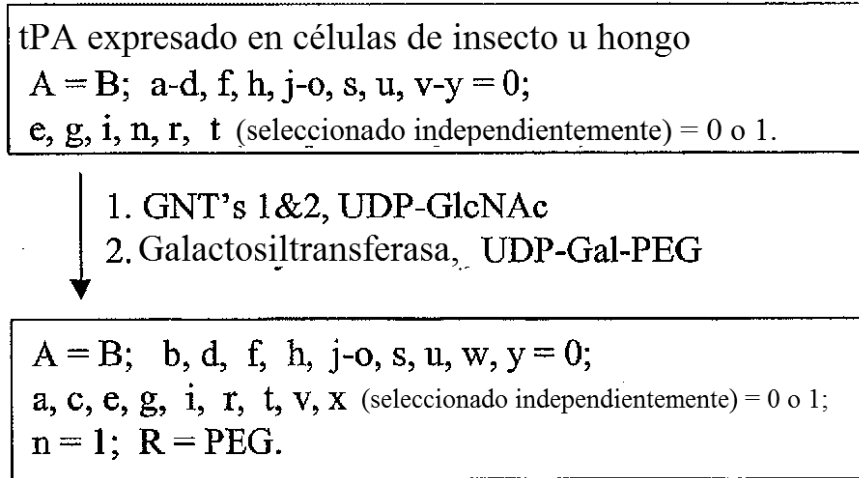


FIG. 38F

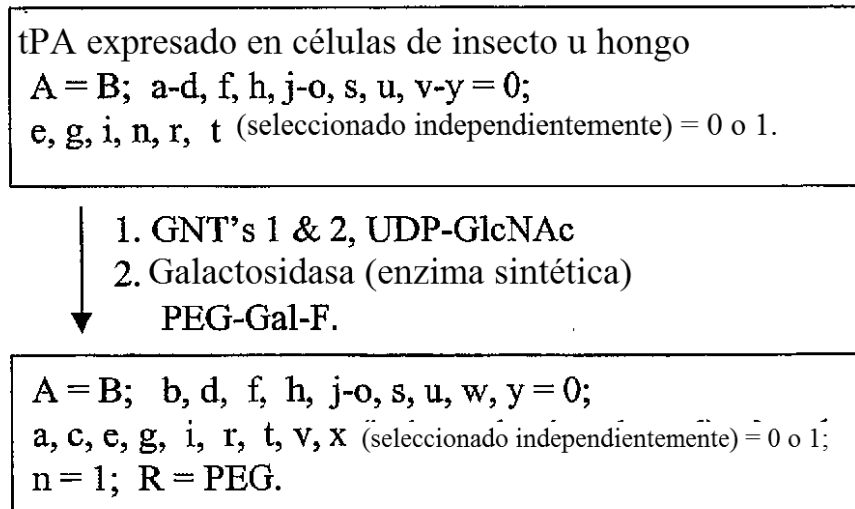
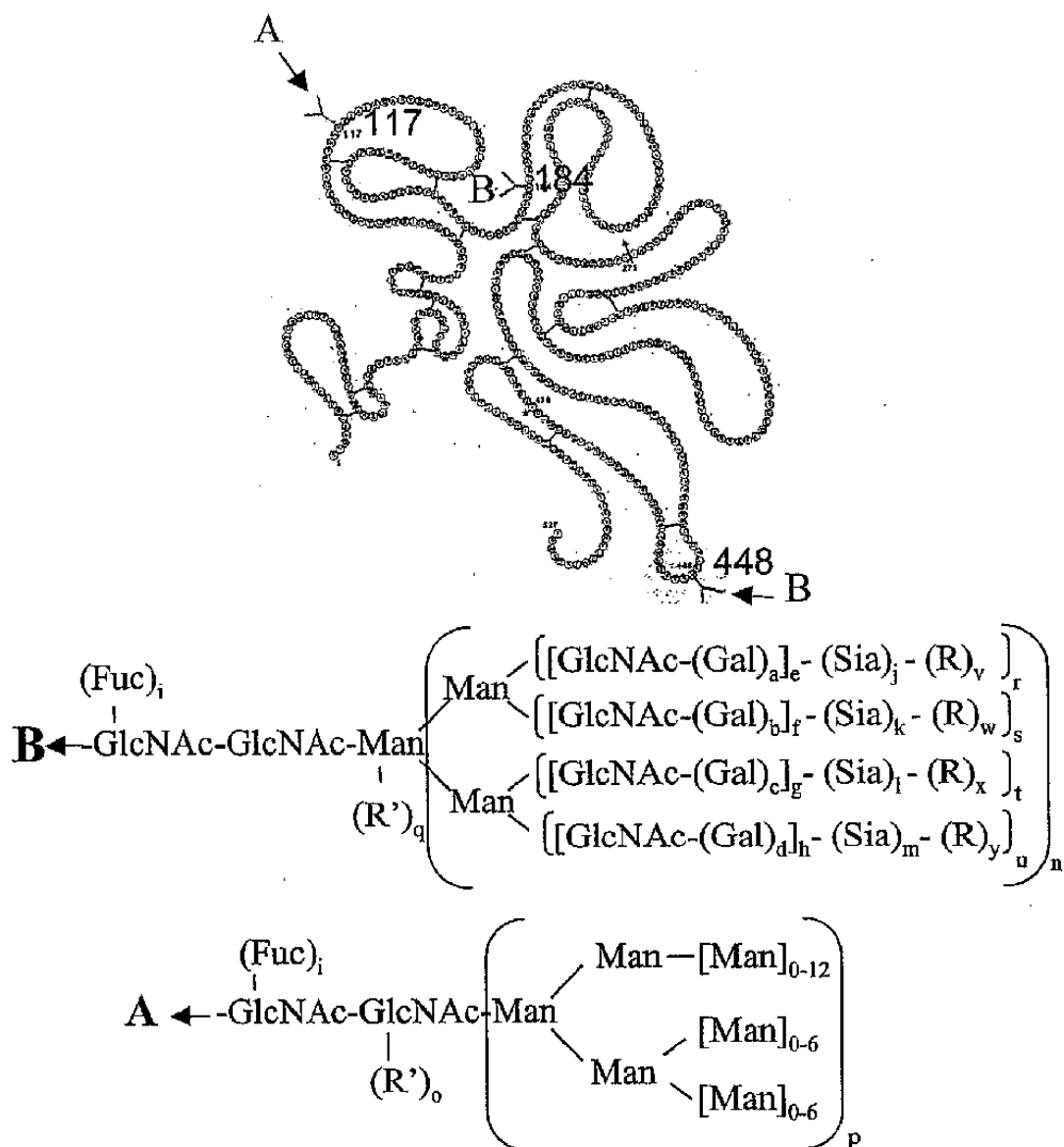


FIG. 38G



a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20.
 R = polímero; R' = azúcar, glicoconjugado.

FIG. 38H

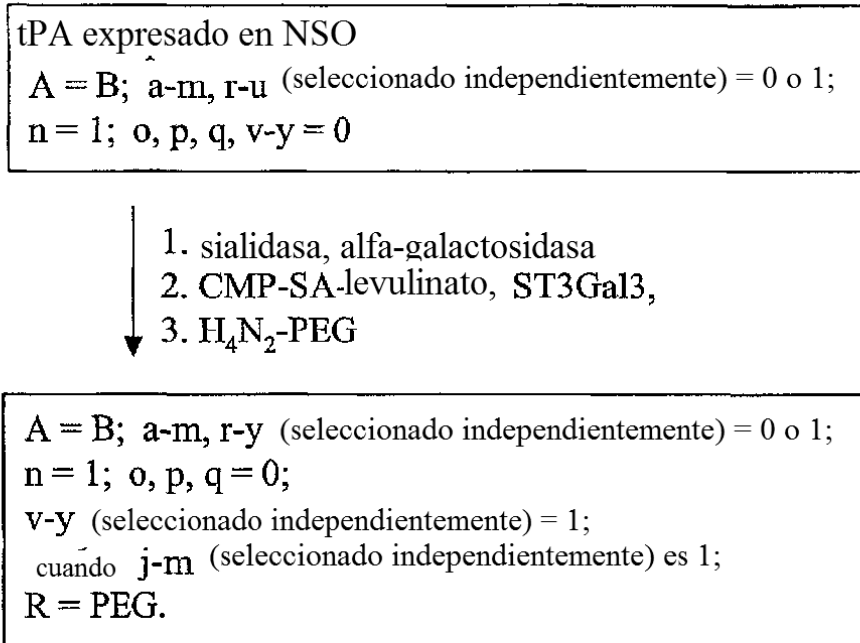


FIG. 38I

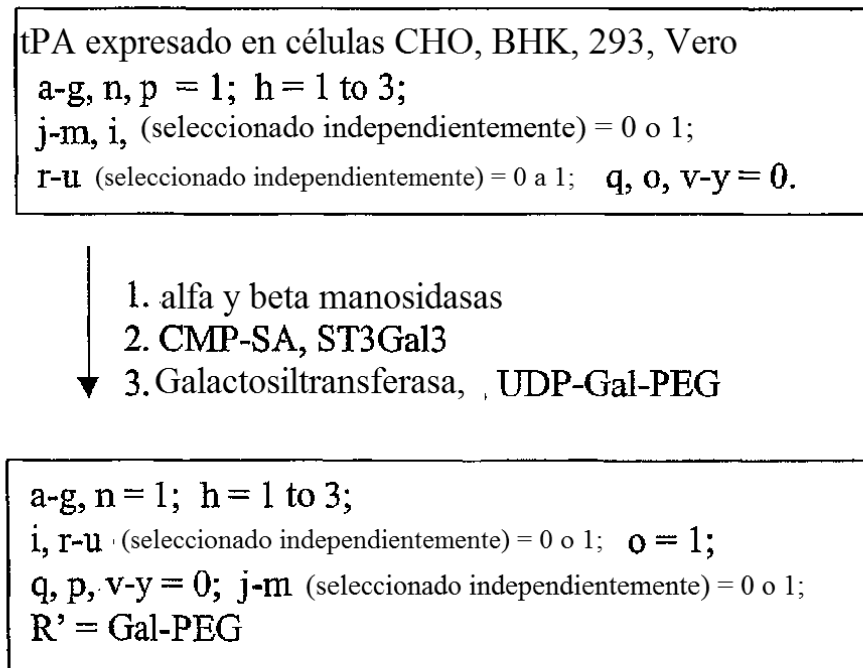


FIG. 38J

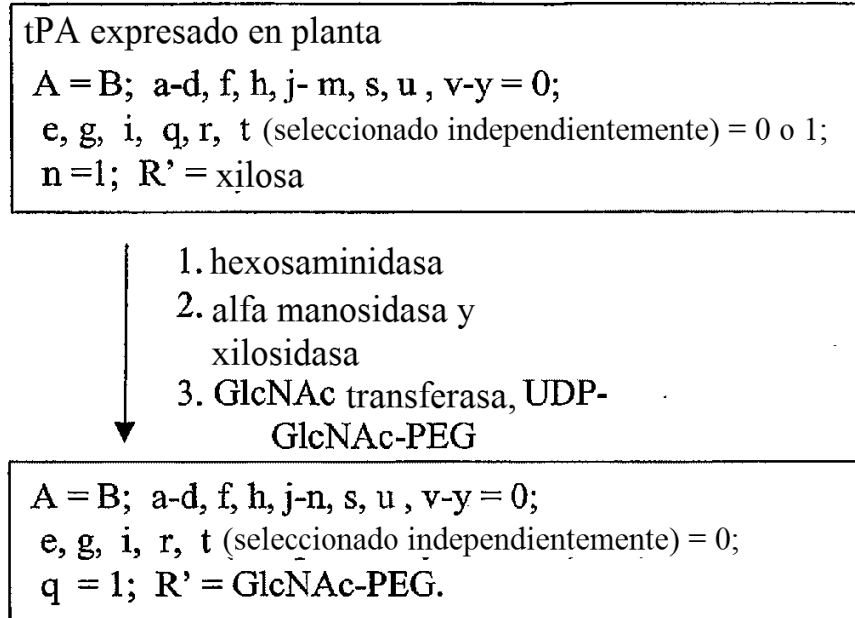
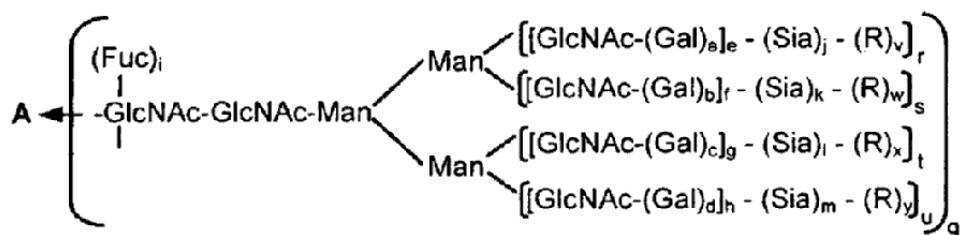
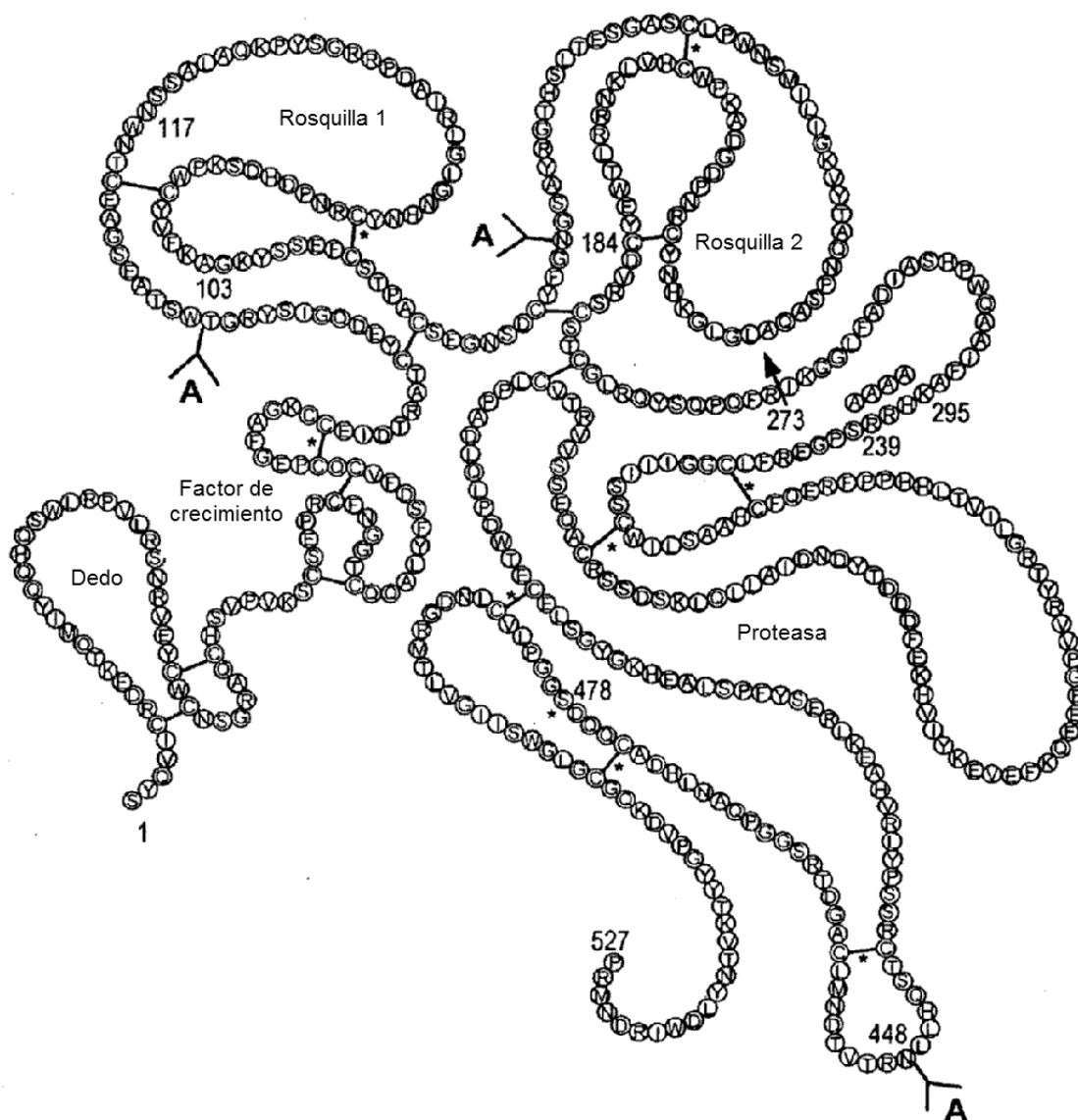


FIG. 38K



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.
v-y = 0; R = polímero

FIG. 38L

tPA TNK expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y = 0.

- ↓
1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG (16 mol eq),
ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 1;
cuando j-m (seleccionado independientemente) es 1;
R = PEG.

FIG. 38M

tPA TNK expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y = 0.

- ↓
1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG (1,2 mol eq),
ST3Gal3
3. CMP-SA (16 mol eq), ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 38N

tPA TNK expresado en NSO

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

e-h = 1; v-y = 0;

Sia (seleccionado independientemente) = Sia o Gal

1. Sialidasa y α -galactosidasa
2. Galactosiltransferasa, UDP-Gal
- ▼ 3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

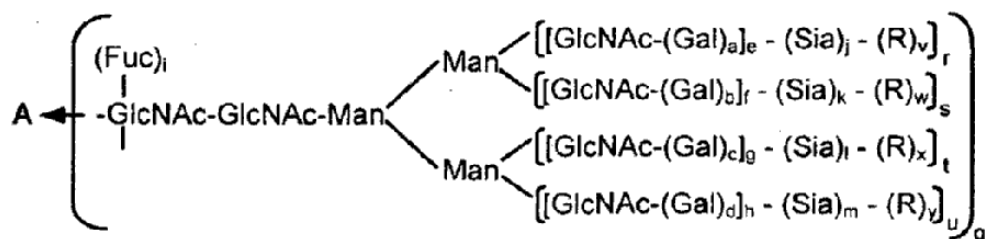
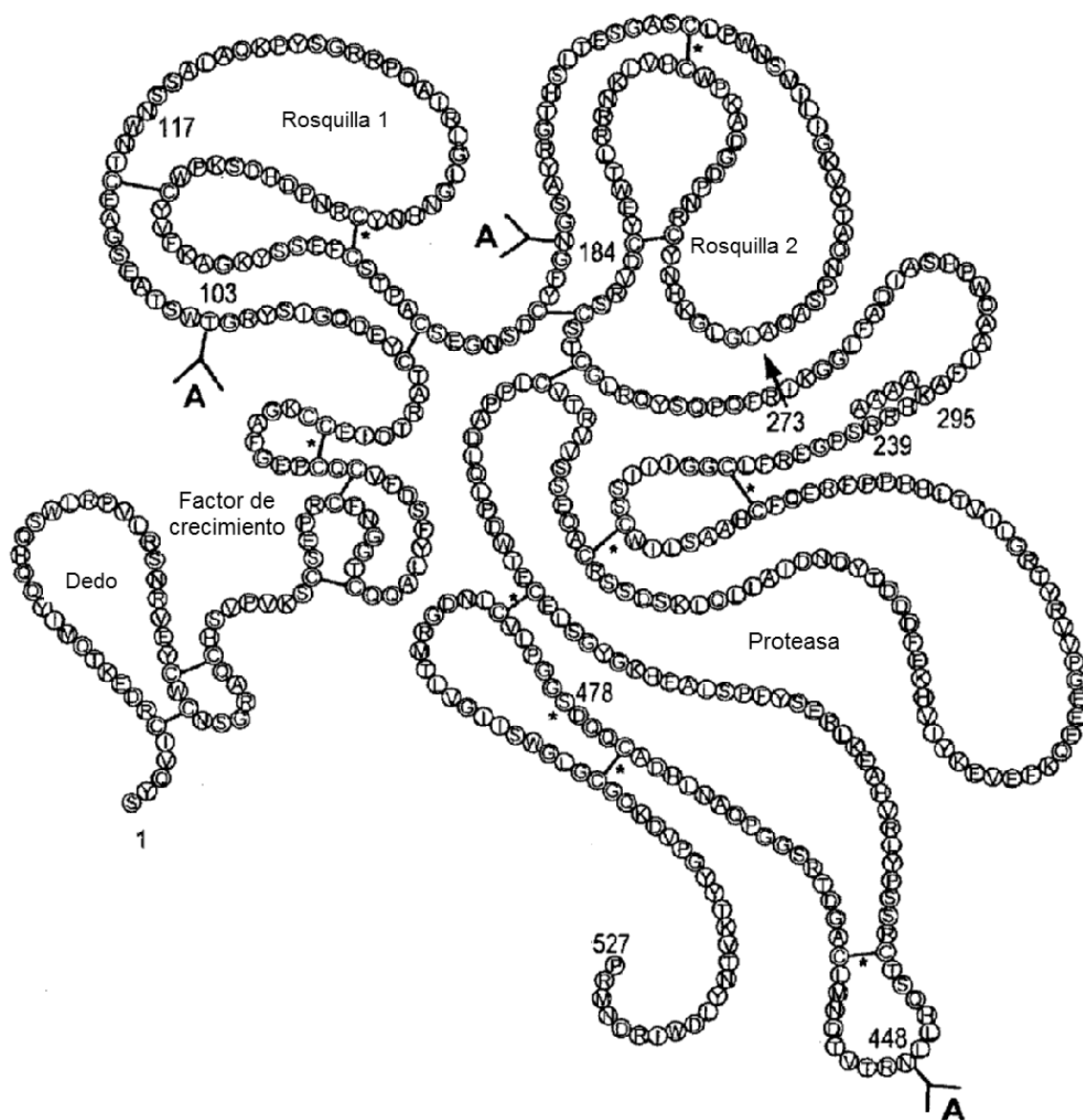
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 1;

cuando j-m (seleccionado independientemente) es 1;

R = PEG.

FIG. 380



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.
 v-y = 0; R = polímero

FIG. 38P

tPA TNK expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y = 0.

- ↓
1. Sialidasa
 2. CMP-SA-PEG (16 mol eq),
ST3Gal3
 3. CMP-SA, ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 38Q

tPA TNK expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y = 0.

- ↓
1. CMP-SA-levulinato, ST3Gal3,
tampón, sal
 2. H₄N₂-PEG

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 38R

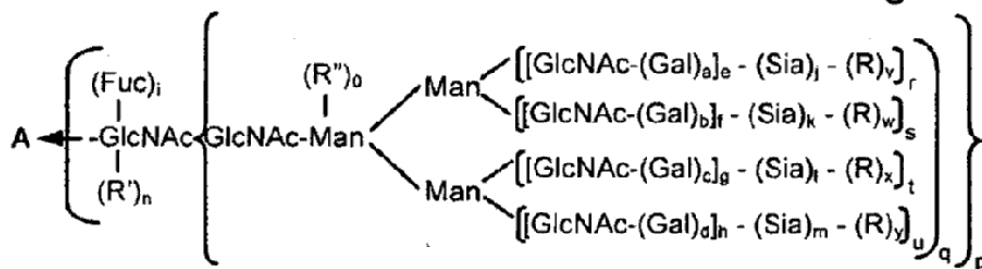
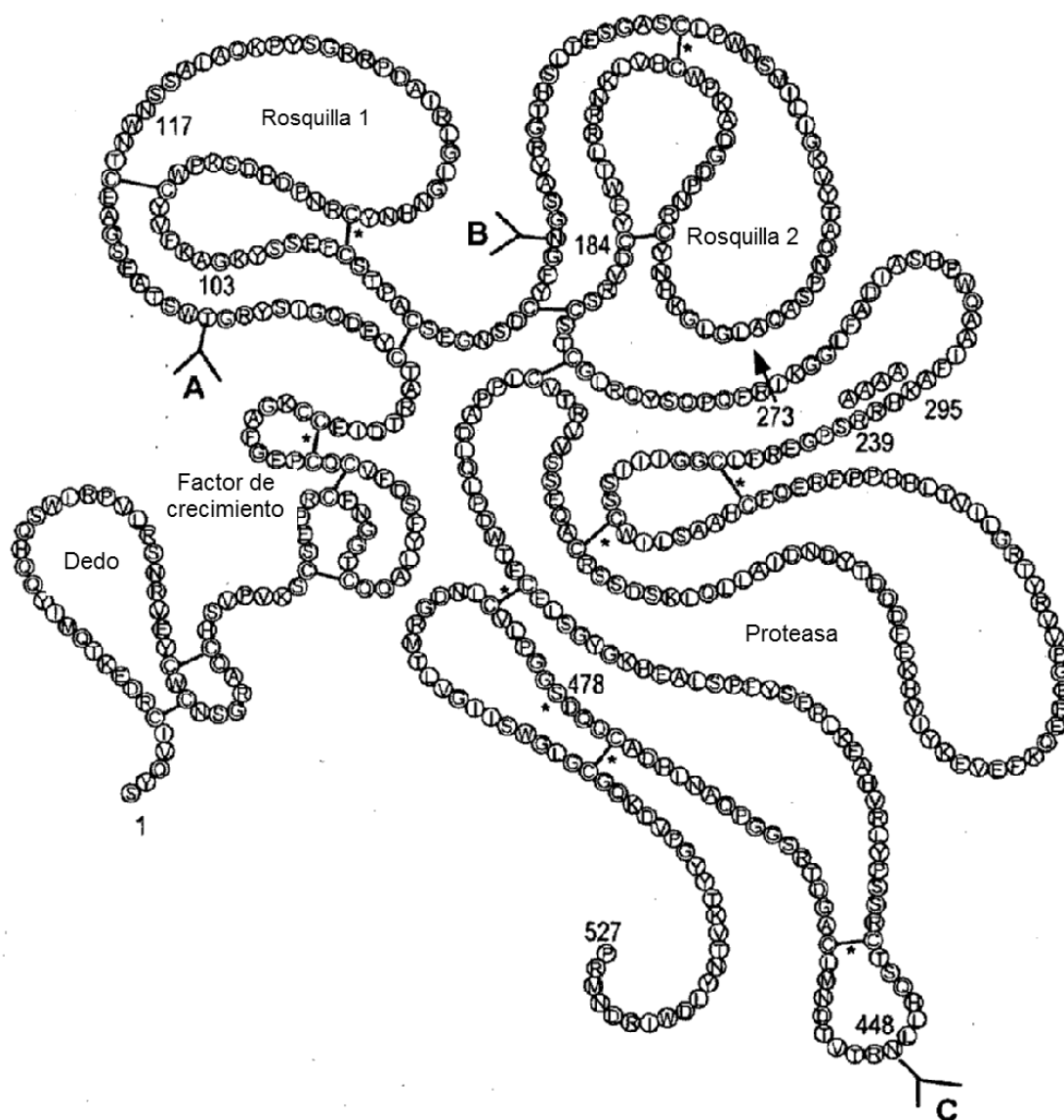
tPA TNK expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y = 0.



1. CMP-SA, α 2,8-ST

a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; j-m (seleccionado independientemente) = 0-20;
v-y (seleccionado independientemente) = 0.

FIG. 38S



a-d, i, n-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador, glicoconjugado.

R'' = residuo de glicosilo

FIG. 38T

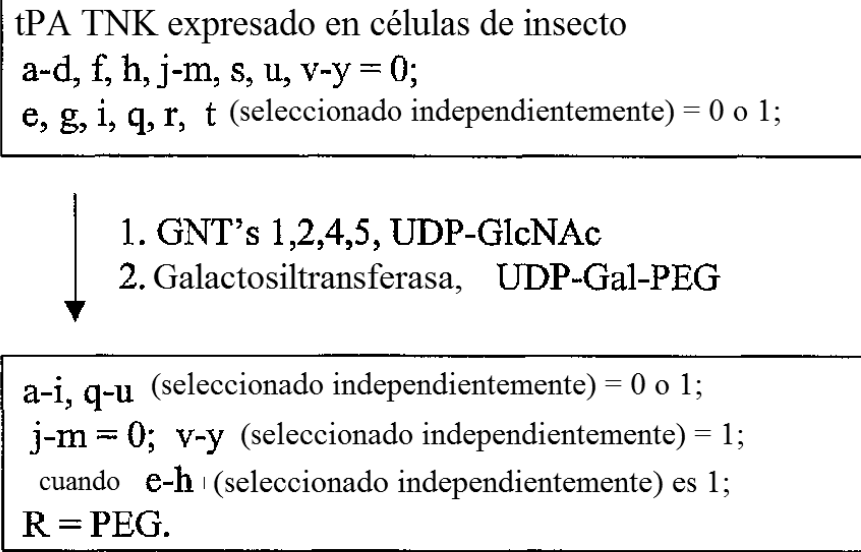


FIG. 38U

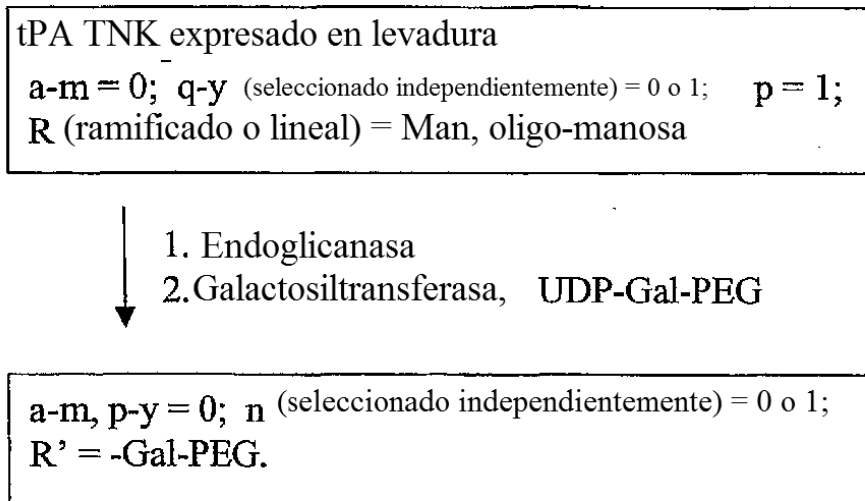


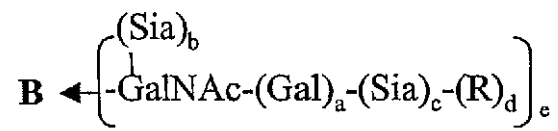
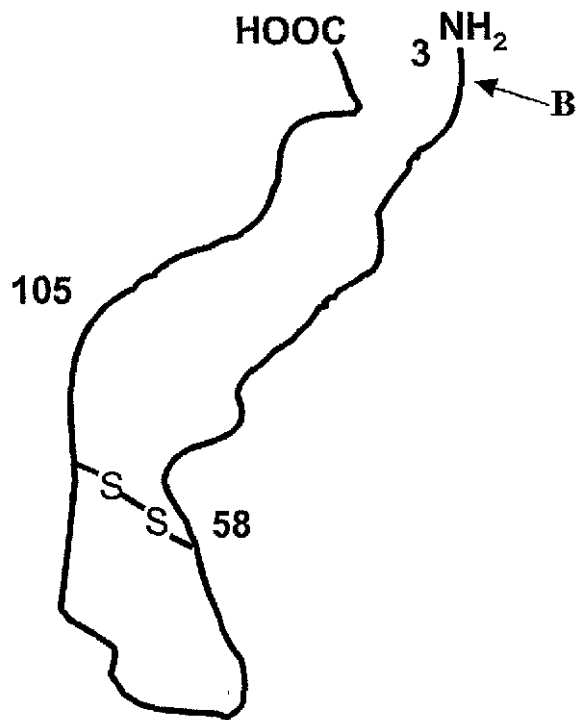
FIG. 38V

tPA TNK expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; **v-y** = 0.

- ↓
1. CMP-SA-**engarce**-Gal-UDP,
ST3Gal3
 2. Galactosiltransferasa, quimera de IG
anti-TNF producida en CHO

a-m, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1; **p, q** = 1;
n = 0; **v-y** (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = **engarce**-proteína de quimera de IG anti-TNF

FIG. 38W



a-c, e (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
d = 0;
R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.

FIG. 39A

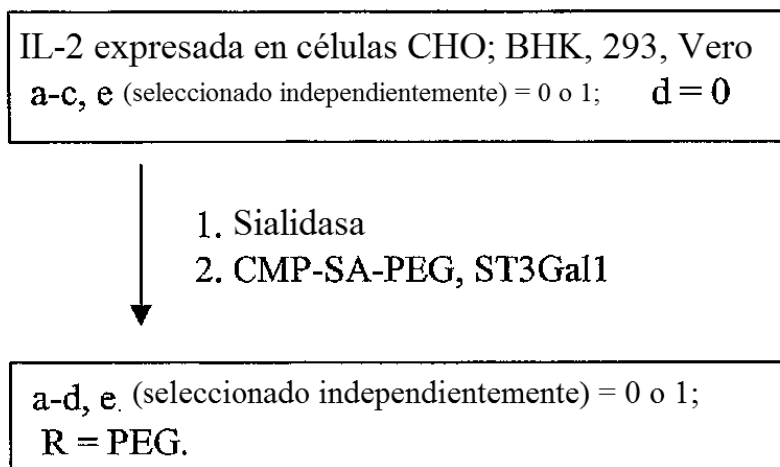


FIG. 39B

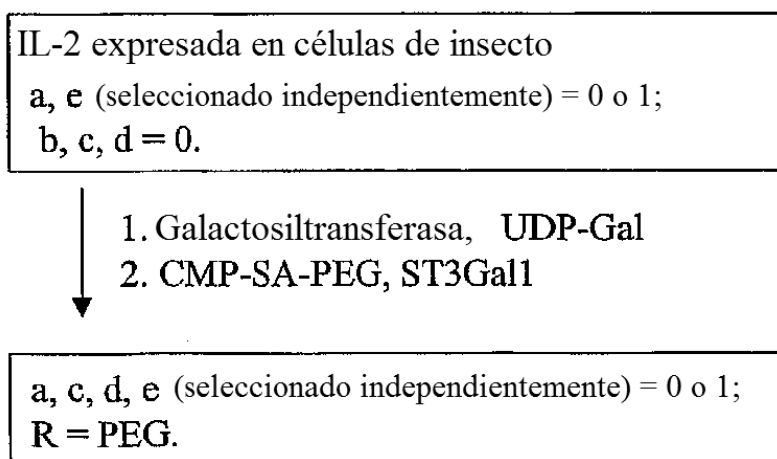


FIG. 39C

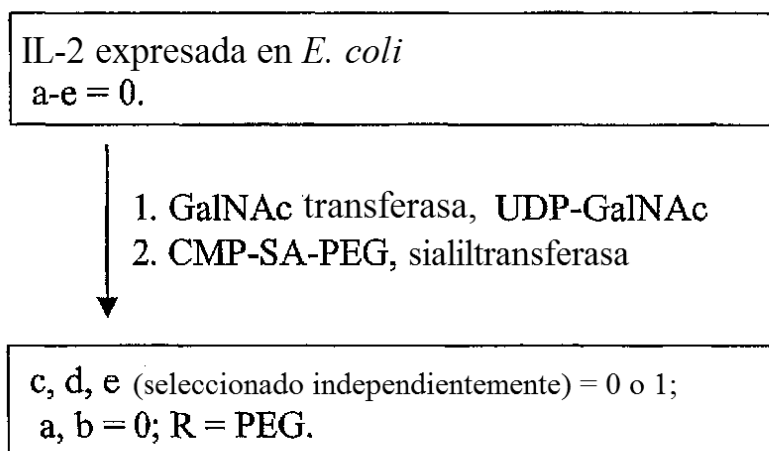


FIG. 39D

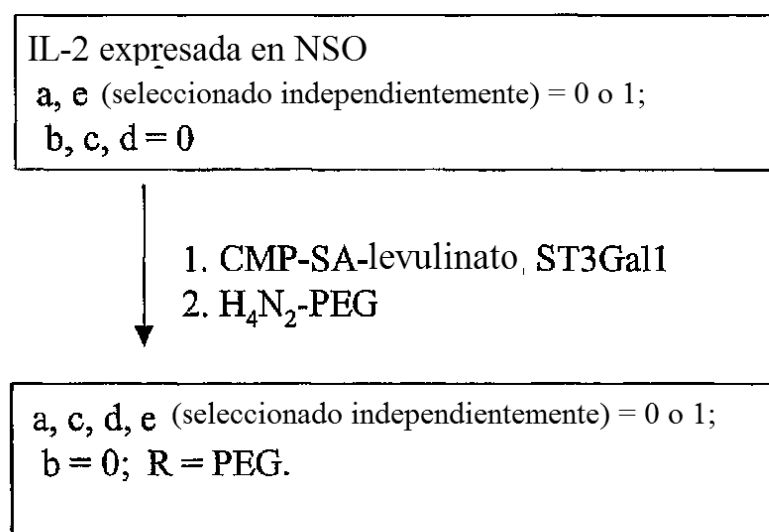


FIG. 39E

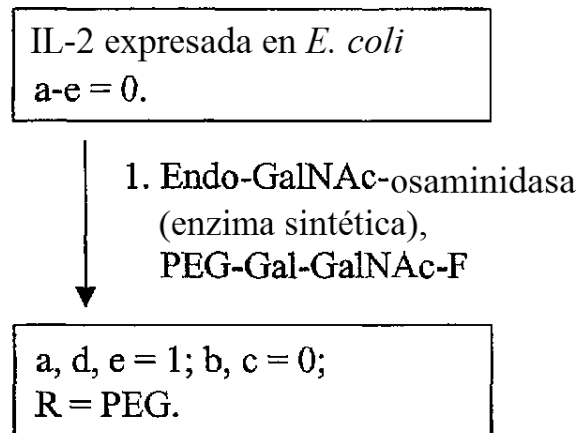


FIG. 39F

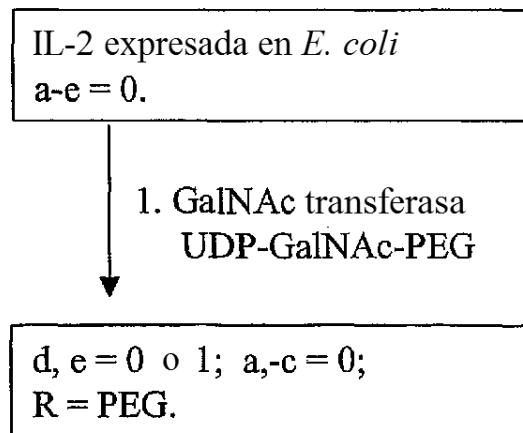
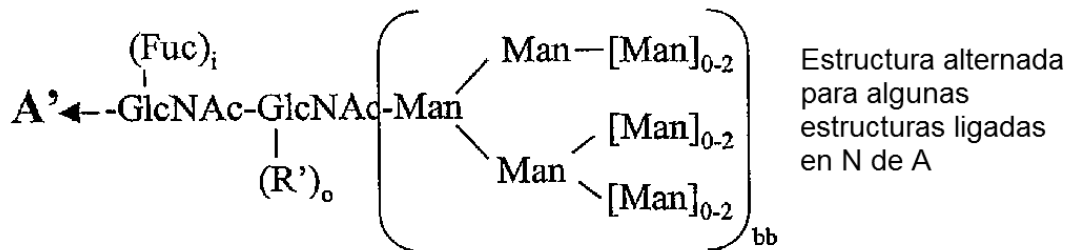
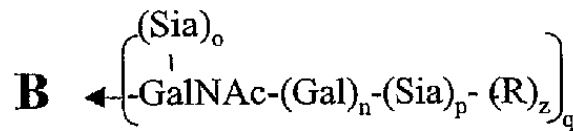
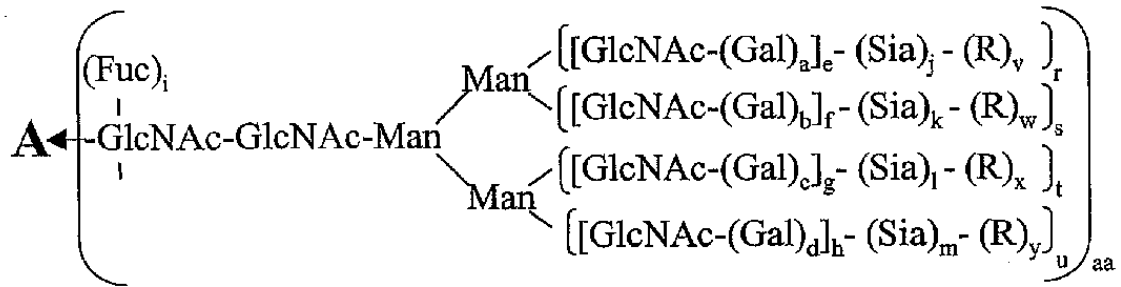


FIG. 39G

2 péptidos
sitios ligados en N **A** y **A'**
Sitios ligados en O - **B**



a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
aa, bb (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20.
v-z = 0; R = polímero, glicoconjugado.

FIG. 40A

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293, Vero, MDCK, HEKC

e-h = 1 a 4;

aa, bb, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

v-z = 0.

- ↓
1. Sialidasa
 2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

e-h = 1 a 4;

aa, bb, a-d, i, n, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

o, p, z = 0; j-m, v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

R = PEG.

FIG. 40B

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S, Vero, MDCK, 293S, HEKC

e-h = 1 a 4;

aa, bb, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

v-z = 0.

- ↓
1. Sialidasa
 2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3
 3. ST3Gal1, CMP-SA

e-h = 1 a 4;

aa, bb, a-d, i, n, p-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

o, z = 0; j-m, v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

R = PEG.

FIG. 40C

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293s,
Vero, MDCK, HEKC
e-h = 1 a 4;
aa, bb, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
v-z = 0.



1. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

e-h = 1 to 4;
aa, bb, a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
z = 0; j-m, v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 40D

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S,
Vero, MDCK, HEKC
e-h = 1 a 4;
aa, bb, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
v-z = 0.



1. CMP-SA-PEG, ST3Gal1

e-h = 1 to 4;
aa, bb, a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
z = 0; j-m, v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 40E

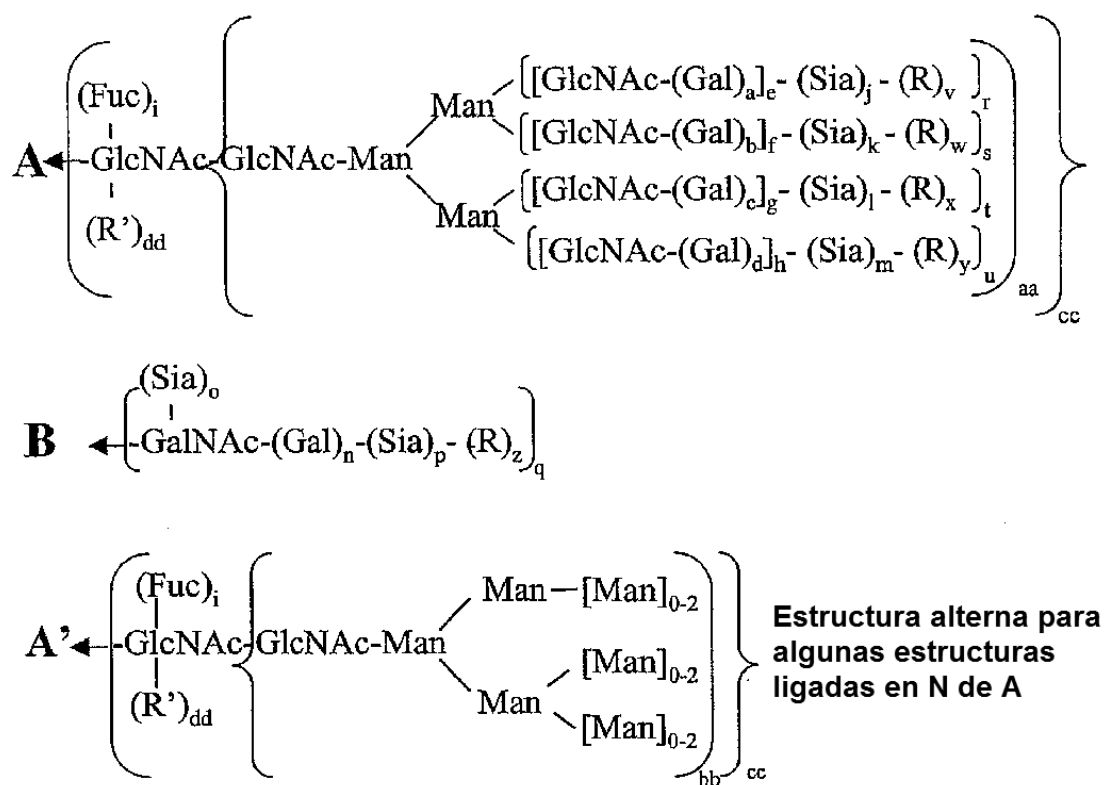
Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S,
Vero, MDCK, HEKC
e-h = 1 a 4;
aa, bb, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
v-z = 0.

↓ 1. CMP-SA-PEG, α 2,8-ST

e-h = 1 a 4;
aa, bb, a-d, i, n-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
z = 0; j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 2;
v-y (seleccionado independientemente) = 1;
cuando j-m (seleccionado independientemente) es 2;
R = PEG.

FIG. 40F

2 péptidos

Sitios ligados en N **A** o **A'**Sitios ligados en O **B**

a-d, i, n-u, (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

aa, bb, cc, dd (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20.

v-z = 0;

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador glicoconjugado.

FIG. 40G

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S, Vero, MDCK, HEKC
 e-h = 1 a 4;
 aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 dd, v-z = 0.

↓ 1. CMP-SA-levulinato, ST3Gal3,
 2. H₄N₂-PEG

e-h = 1 a 4;
 aa, bb, cc, a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 dd, z = 0; j-m, v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 R = PEG.

FIG. 40H

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S, Vero, MDCK, HEKC
 e-h = 1 a 4;
 aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 dd, v-z = 0.

↓ 1. endo-H
 2. galactosiltransferasa, UDP-Gal-PEG

e-h = 1 a 4;
 aa, bb, dd, a-d, i, j-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 cc, v-z = 0; R' = -Gal-PEG.

FIG. 40I

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S, Vero, MDCK, HEKC
 e-h = 1 a 4;
 aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 dd, v-z = 0.

- ↓ 1. ST3Gal3, CMP-SA
 2. endo-H
 3. galactosiltransferasa, UDP-Gal-PEG

e-h = 1 a 4;
 aa, bb, dd, a-d, i, j-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 cc, v-z = 0; R' = -Gal-PEG.

FIG. 40J

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S, Vero, MDCK, HEKC
 e-h = 1 a 4;
 aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 dd, v-z = 0.

- ↓ 1. manosidasas
 2. GNT 1 & 2, UDP-GlcNAc
 3. galactosiltransferasa, UDP-Gal-PEG

e-h = 1 a 4;
 aa, a-d, i, j-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 bb, cc, dd, z = 0; R = PEG.

FIG. 40K

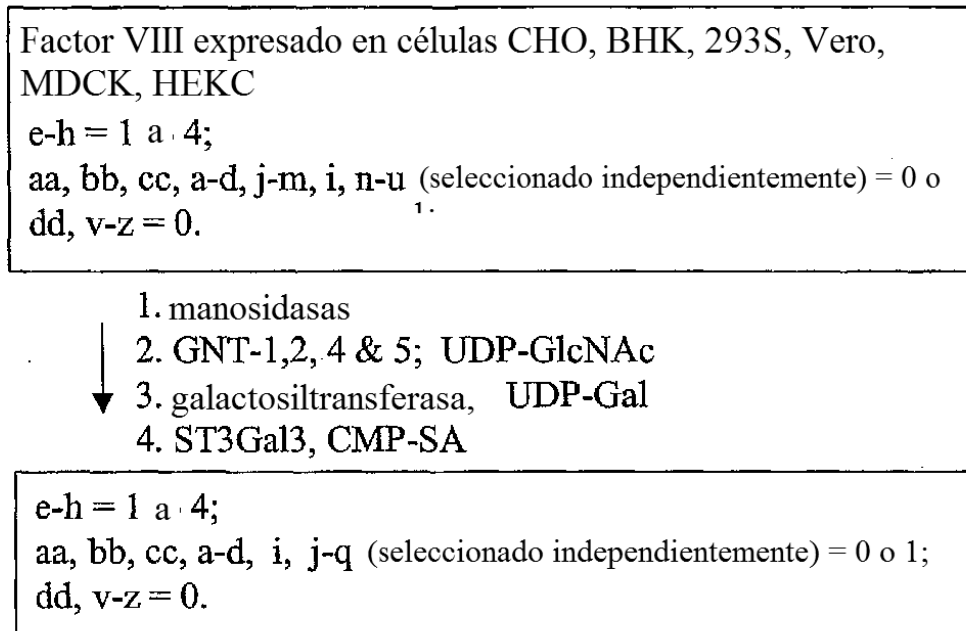


FIG. 40L

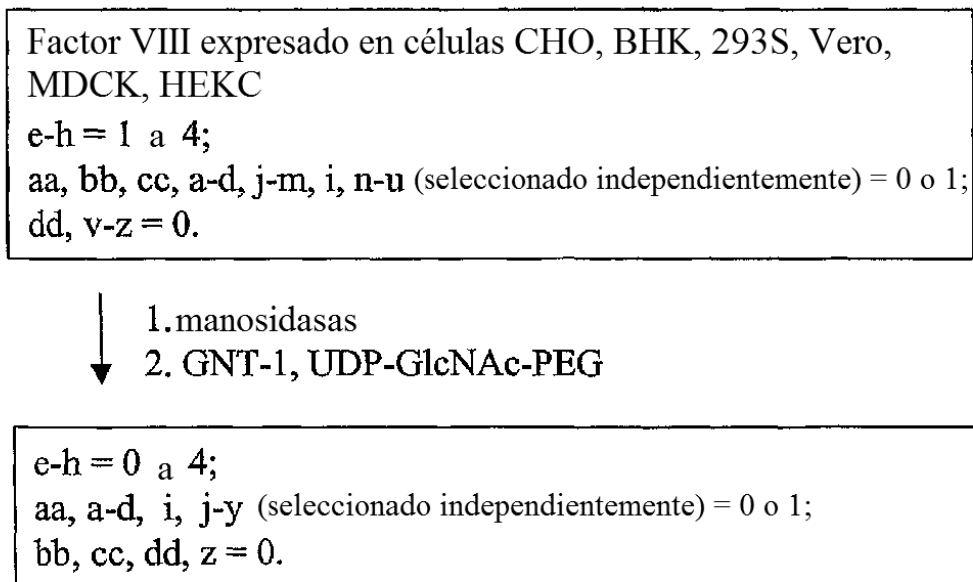
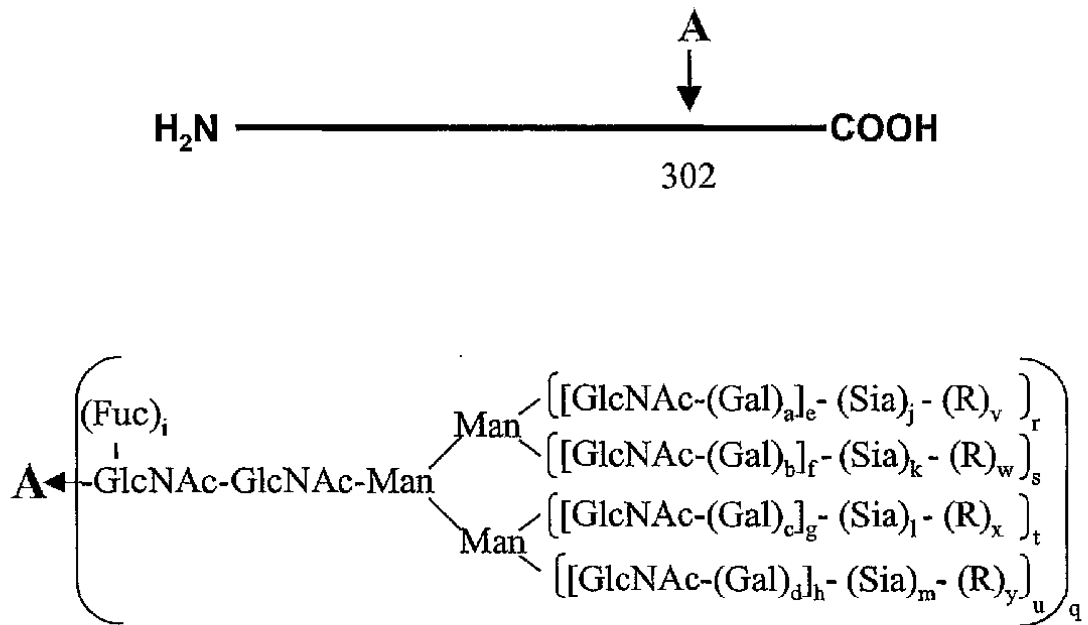


FIG. 40M



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.
 v-y = 0; R = polímero

FIG. 41A

Uroquinasa expresada en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; **v-y** = 0.

- ↓
1. Sialidasa
 2. CMP-SA-PEG (16 mol eq),
ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; **v-y** (seleccionado independientemente) = 1;
 cuando **j-m** (seleccionado independientemente) es 1;
R = PEG.

FIG. 41B

Uroquinasa expresada en células CHO, BHK, 293,
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; **v-y** = 0.

- ↓
1. Sialidasa
 2. CMP-SA-PEG (1,2 mol eq),
ST3Gal3
 3. CMP-SA (16 mol eq), ST3Gal3

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; **v-y** (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 41C

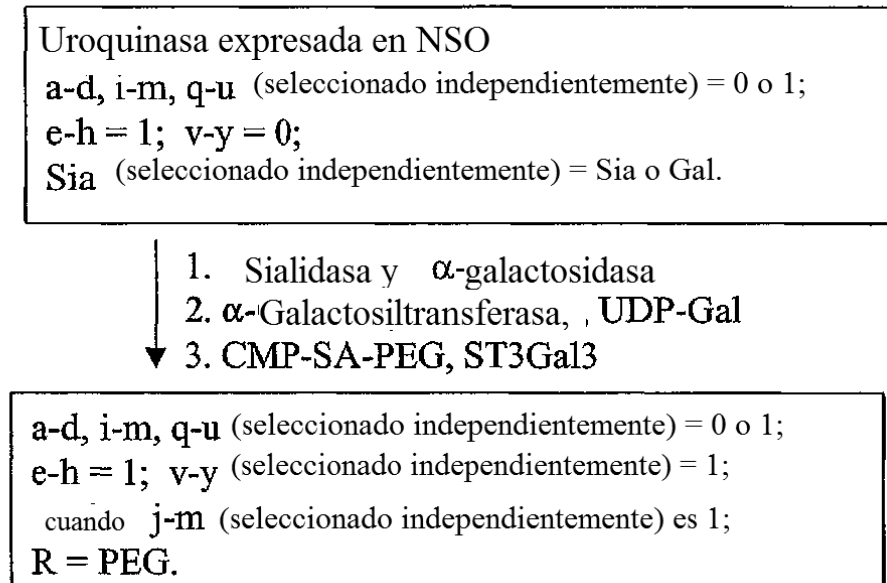


FIG. 41D

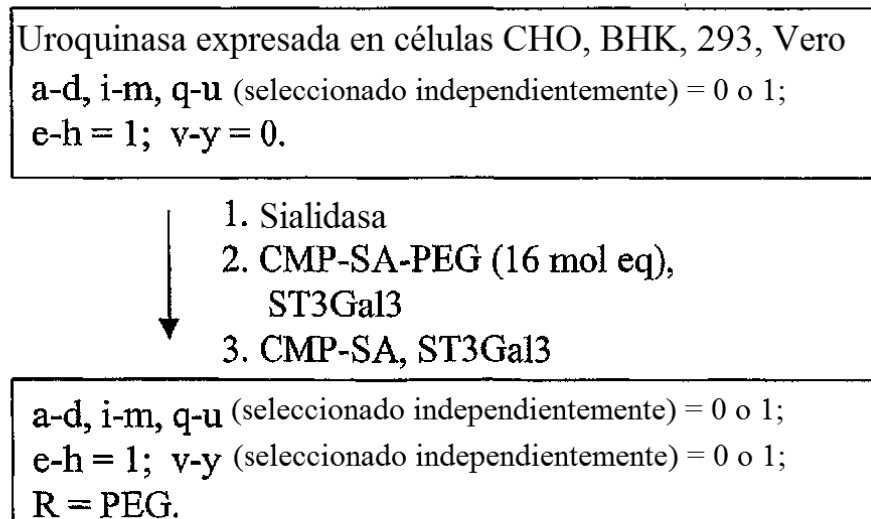


FIG. 41E

Uroquinasa expresada en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y = 0.

- ↓
1. CMP-SA-levulinato, ST3Gal3,
buffer, salt
 2. H₄N₂-PEG

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

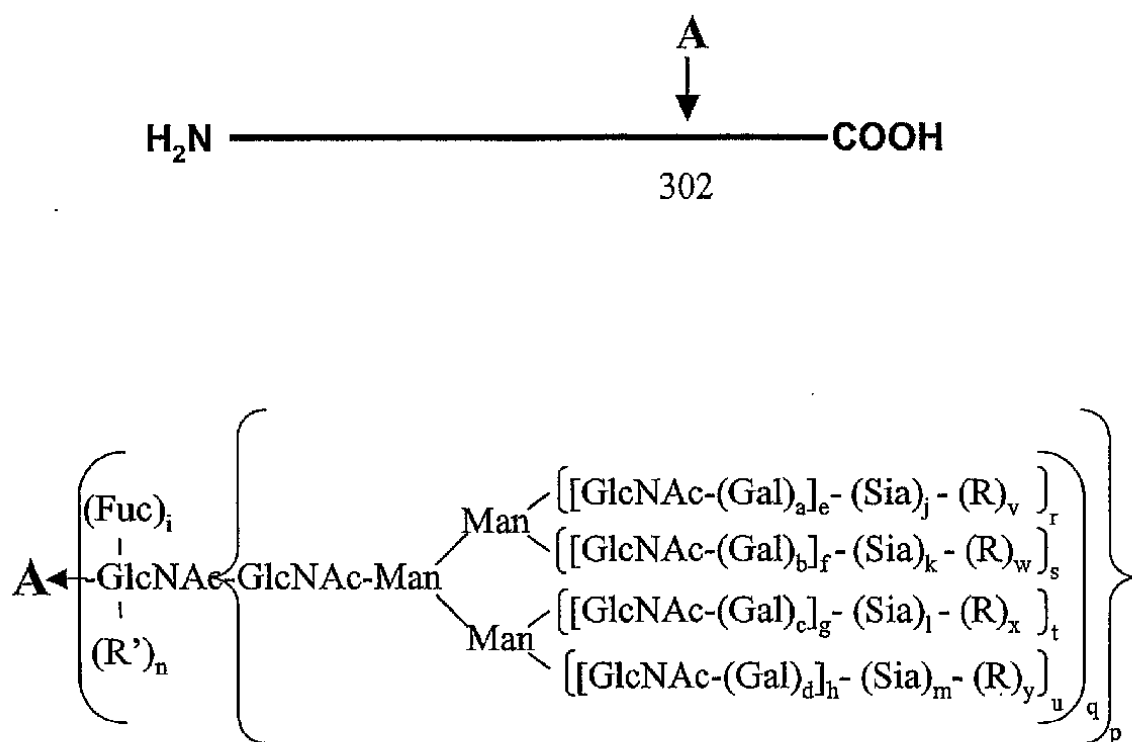
FIG. 41F

Uroquinasa expresada en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y = 0.

- ↓
1. CMP-SA, α 2,8-ST

a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1;
j-m (seleccionado independientemente) = 0-20;
v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

FIG. 41G



a-d, i, n, p-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.

$$v-y=0;$$

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa;

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador,

glicoconjugado.

FIG. 41H

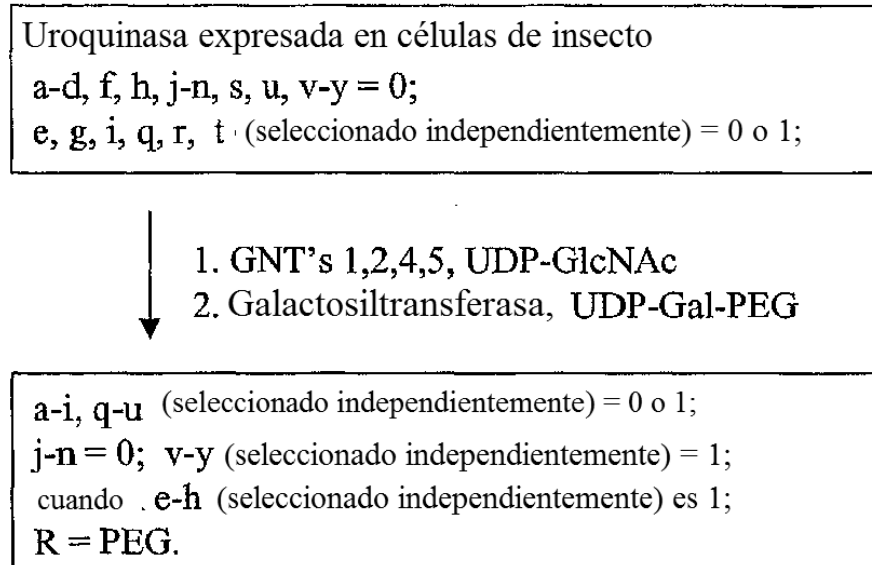


FIG. 41I

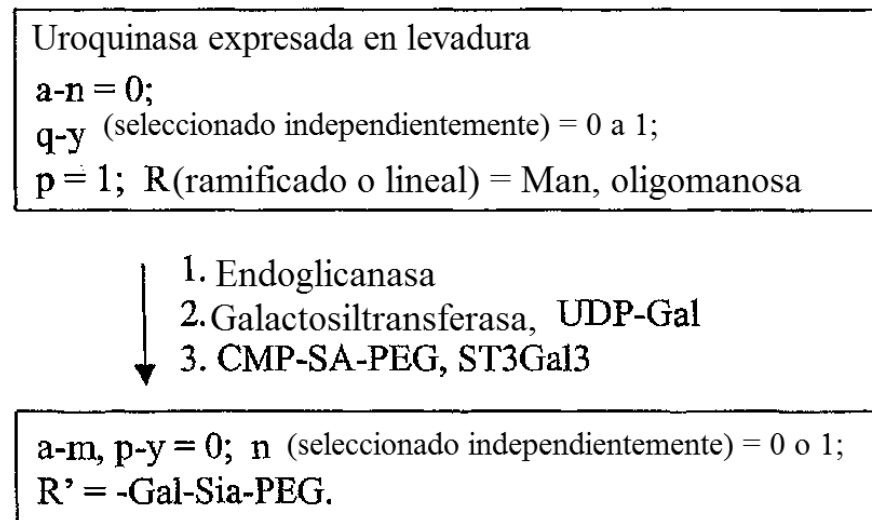


FIG. 41J

Uroquinasa expresada en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; **n, v-y** = 0.

- ↓
1. CMP-SA-^{engarce}-SA-CMP, ST3Gal3
 2. ST3Gal1, uroquinasa desialilada producida en CHO
 - ↓ 3. CMP-SA, ST3Gal3, ST3Gal1

a-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
p = 1; **n** = 0;
v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = ^{engarce}-uroquinasa

FIG. 41K

Uroquinasa aislada
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; **v-y** = 0; **n** = 0;
Sia (seleccionado independientemente) = **Sia** o **SO₄**;
Gal (seleccionado independientemente) = **Gal** o **GalNAc**;
GlcNAc (seleccionado independientemente) = **GlcNAc** o **GlcNAc-Fuc**.

- ↓
1. sulfohidrolasa
 2. CMP-SA-PEG, sialiltransferasa

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n = 0; **e-h** = 1; **Sia** = **Sia**;
Gal (seleccionado independientemente) = **Gal** o **GalNAc**;
GlcNAc (seleccionado independientemente) = **GlcNAc** o **GlcNAc-Fuc**.
v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 41L

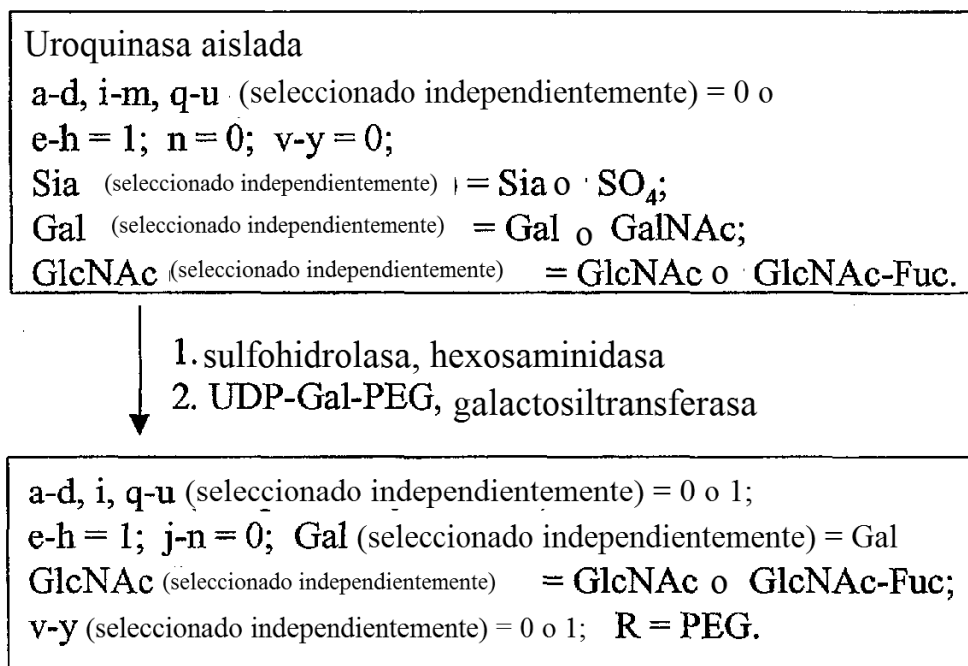
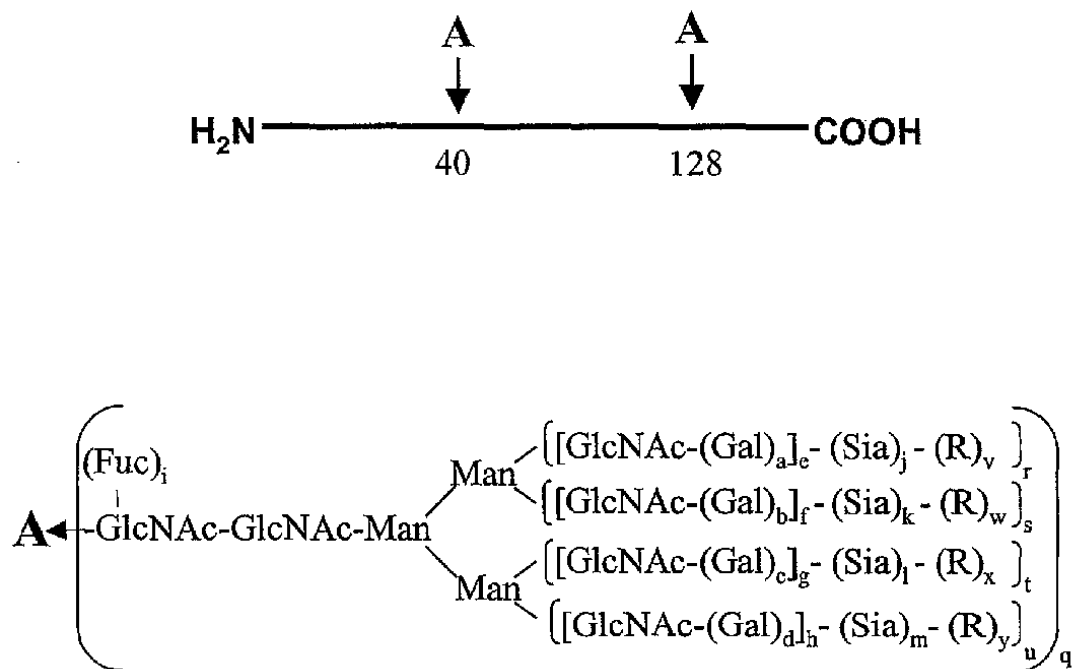


FIG. 41M



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.
v-y = 0; R = polímero, glicoconjugado.

FIG. 42A

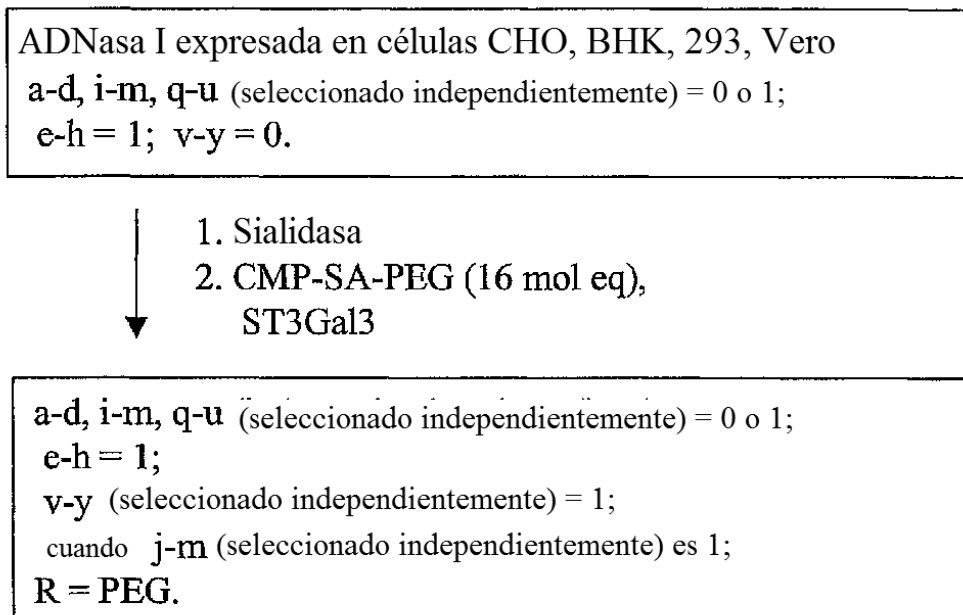


FIG. 42B

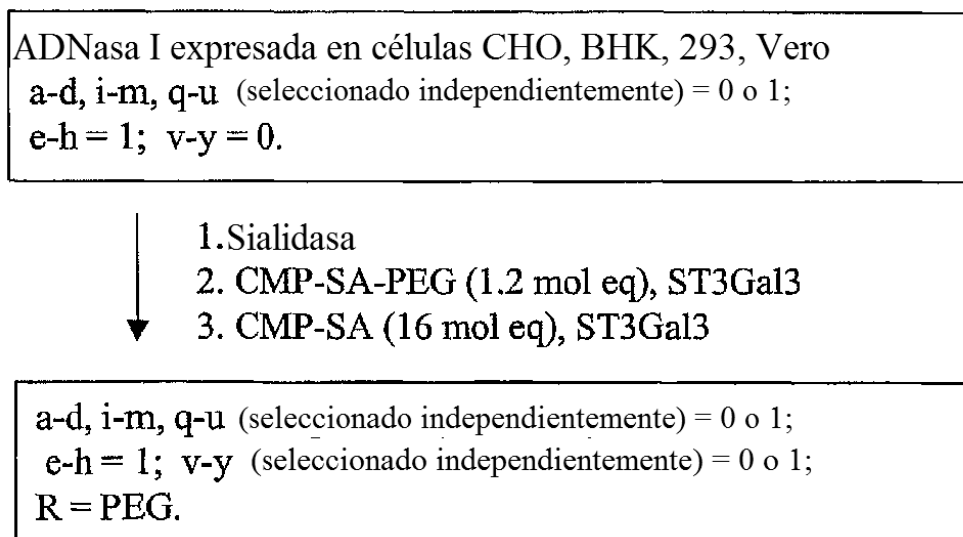


FIG. 42C

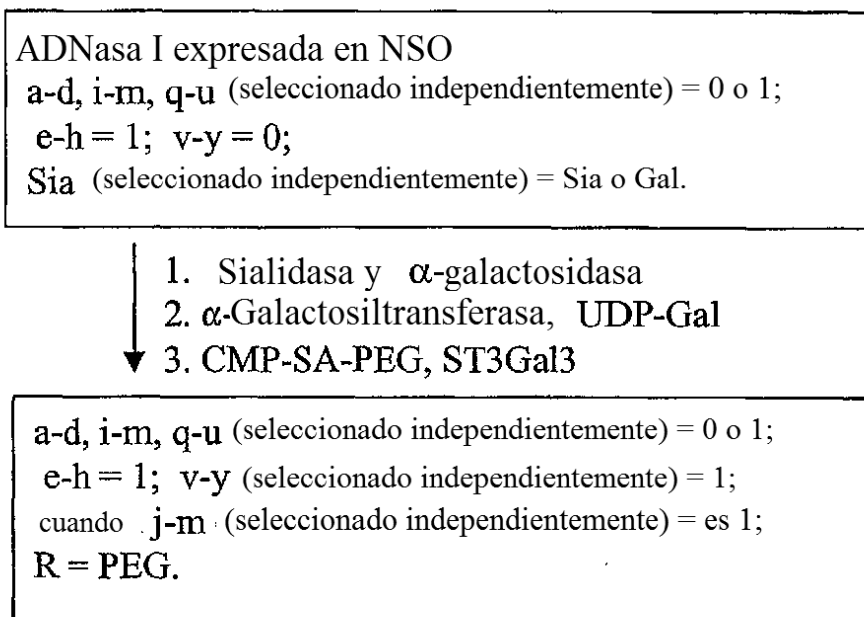


FIG. 42D

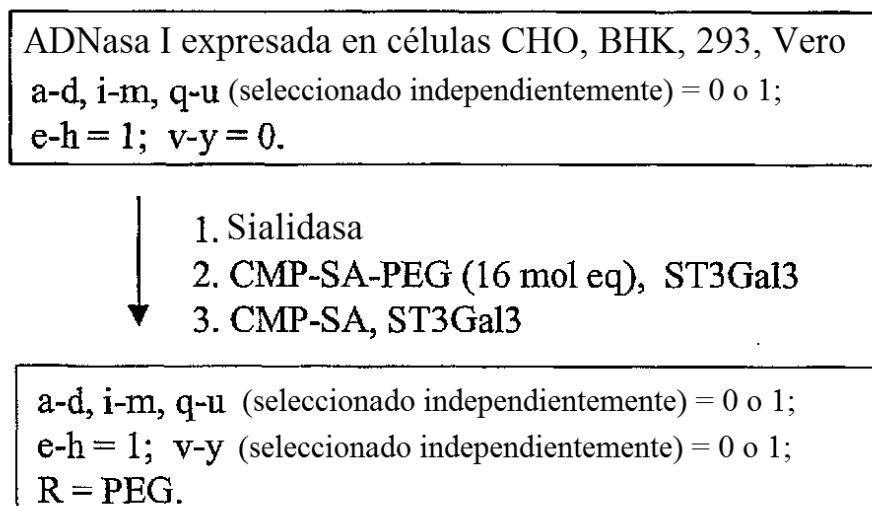


FIG. 42E

ADNasa I expresada en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓
1. CMP-SA-levulinato, ST3Gal3,
tampón, sal
2. H₄N₂-PEG

a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

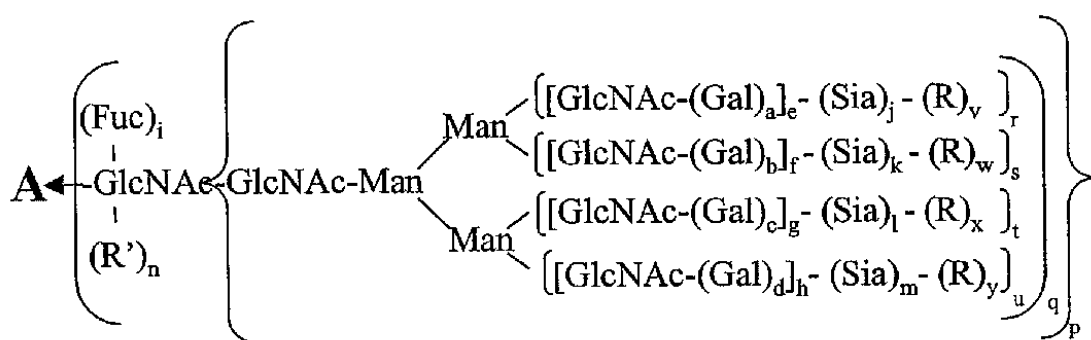
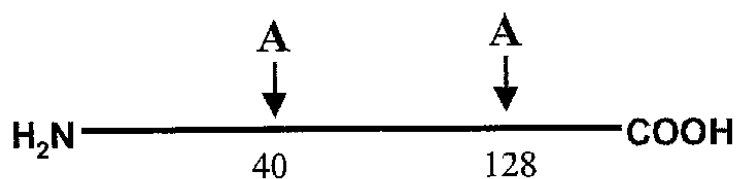
FIG. 42F

ADNasa I expresada en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1; v-y = 0.

↓
1. CMP-SA, α2,8-ST

a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e-h = 1;
j-m (seleccionado independientemente) = 0-20;
v-y (seleccionado independientemente) = 0.

FIG. 42G



a-d, i, n, p-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.

$$v-y=0;$$

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa;

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador, glicoconjugado.

FIG. 42H

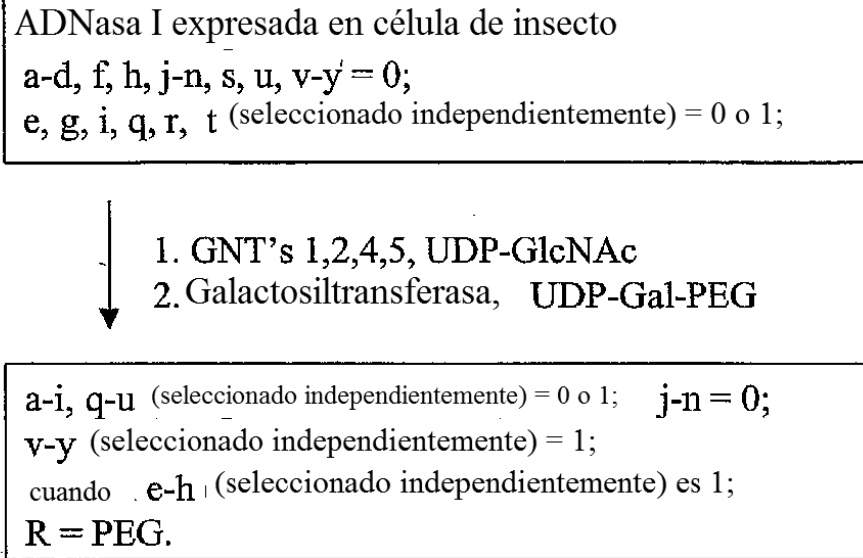


FIG. 42I

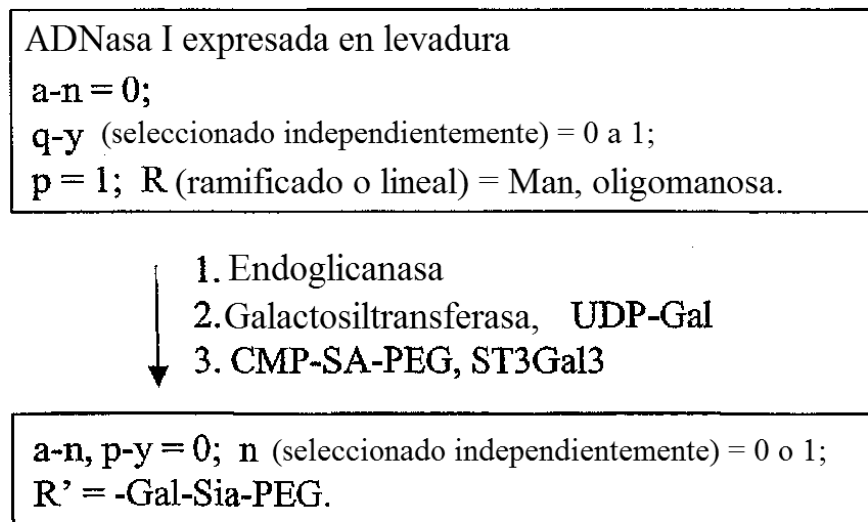


FIG. 42J

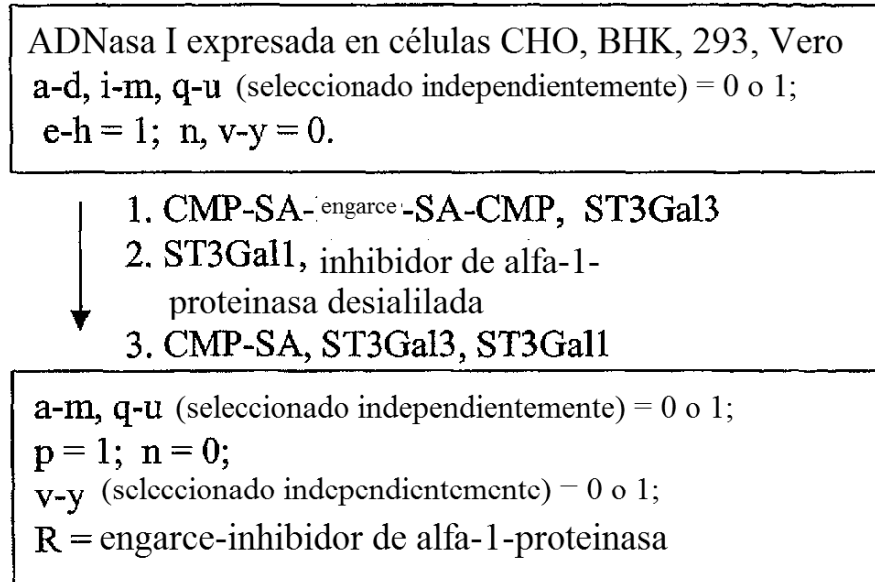
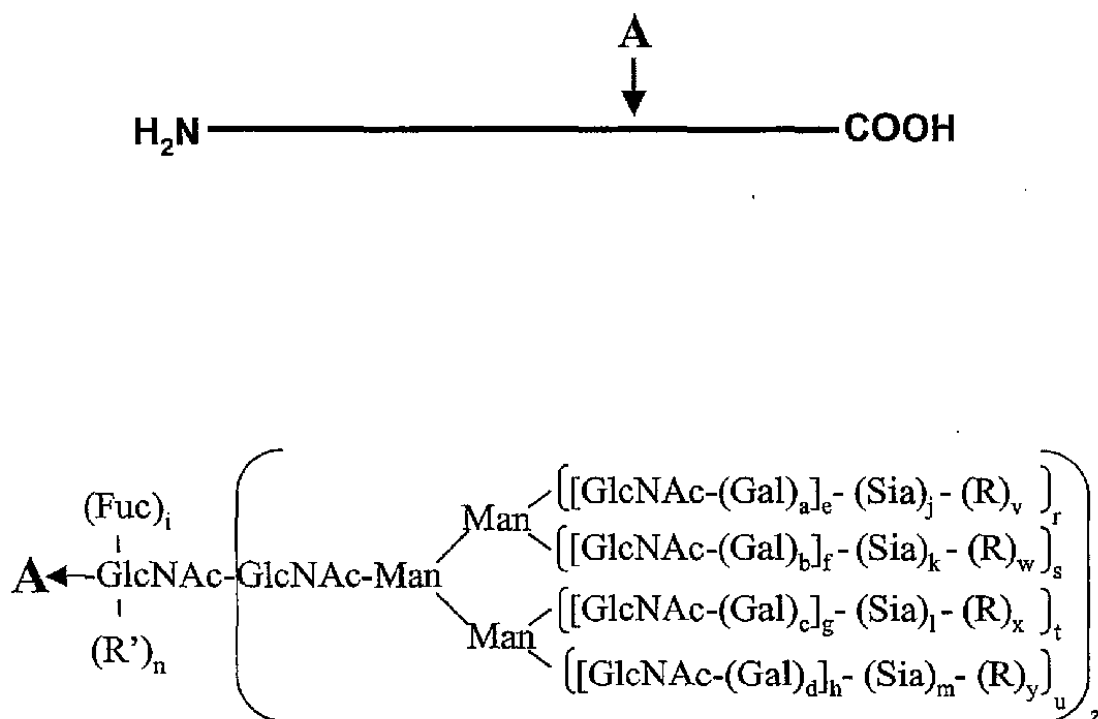


FIG. 42K



a-d, i, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

n, v-y = 0; z = 0 o 1;

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa;

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador glicoconjugado.

FIG. 43A

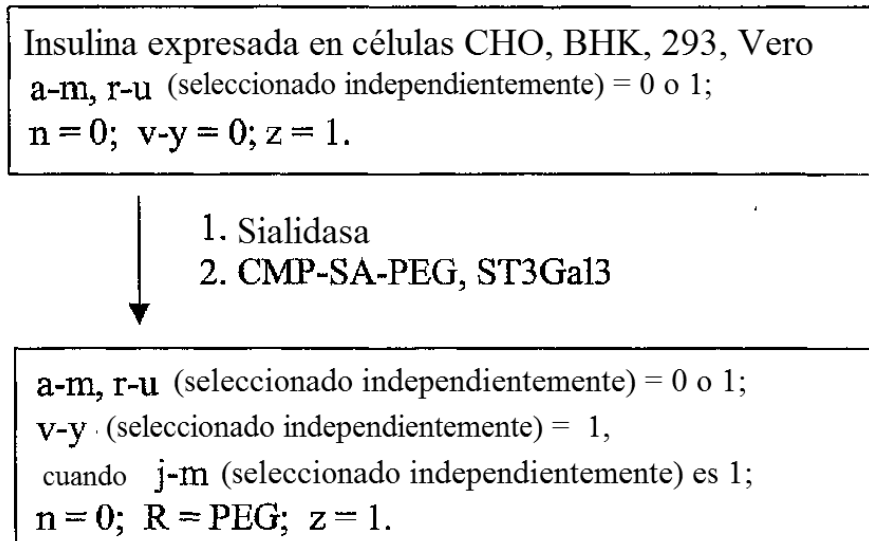


FIG. 43B

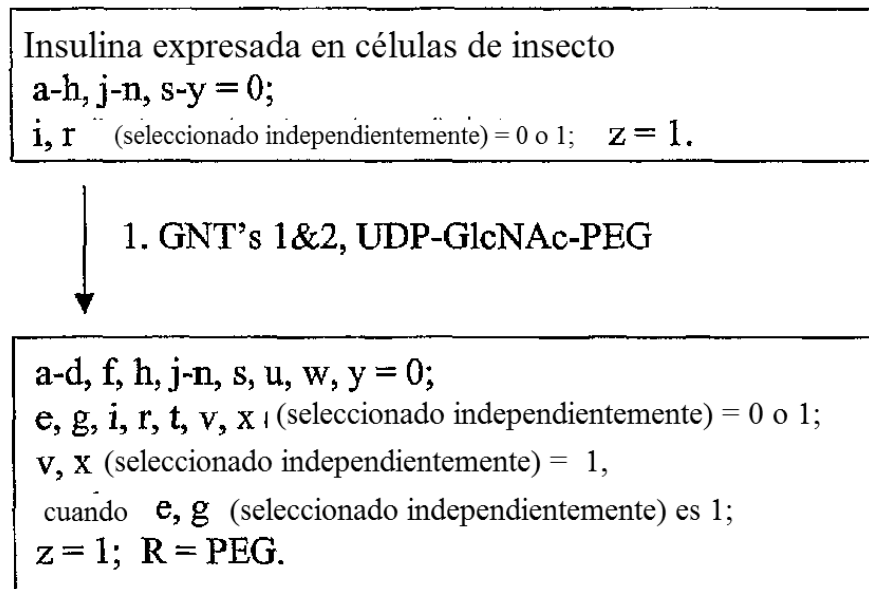


FIG. 43C

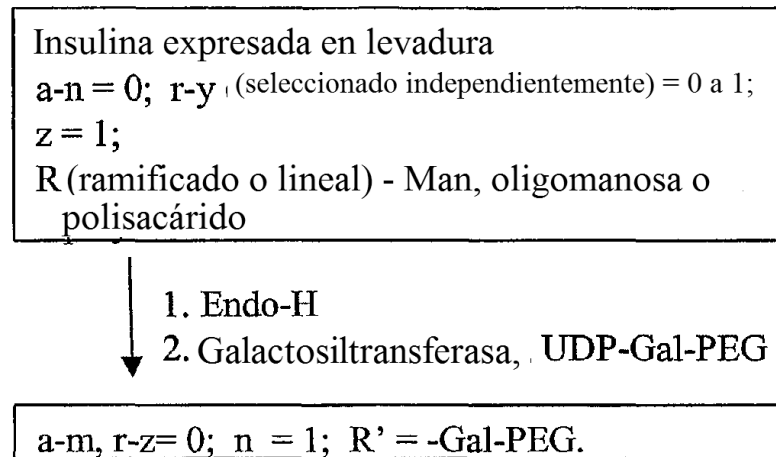
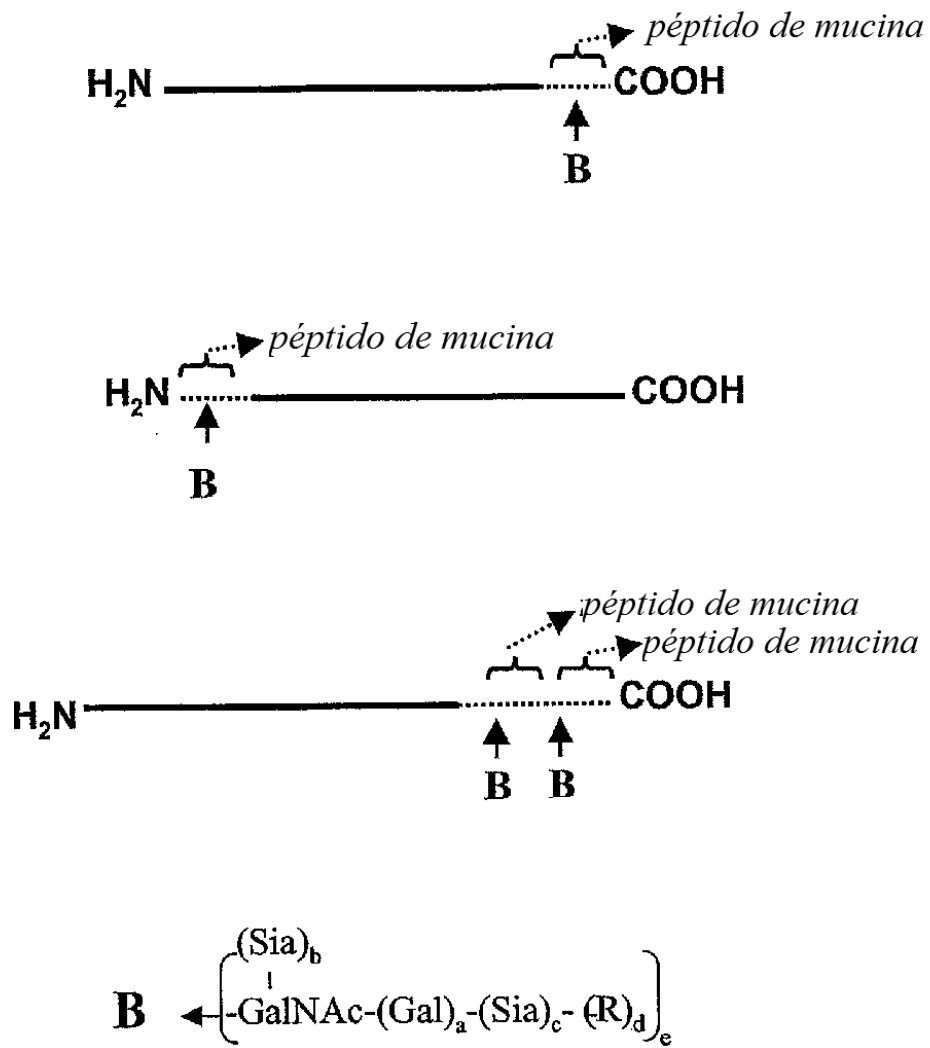


FIG. 43D



a-c, e (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
d = 0; R = polímero

FIG. 43E

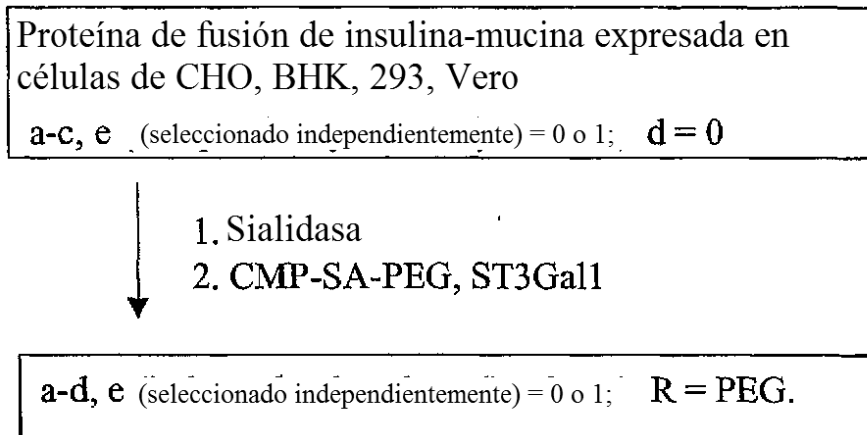


FIG. 43F

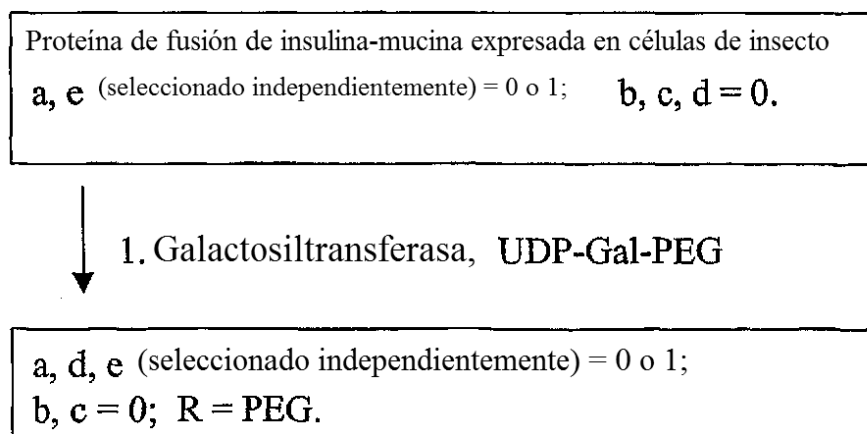


FIG. 43G

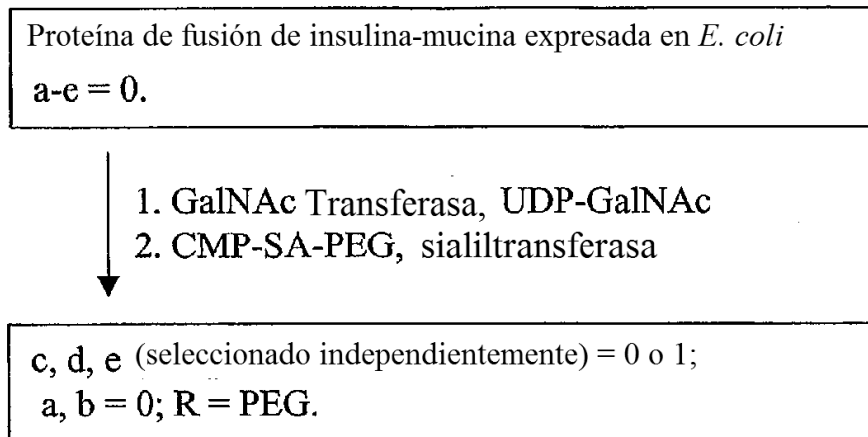
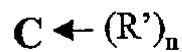
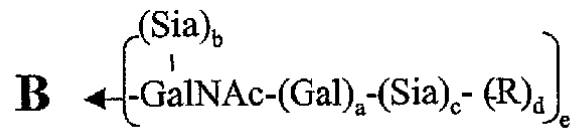
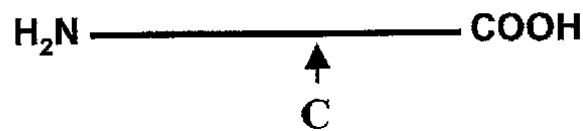
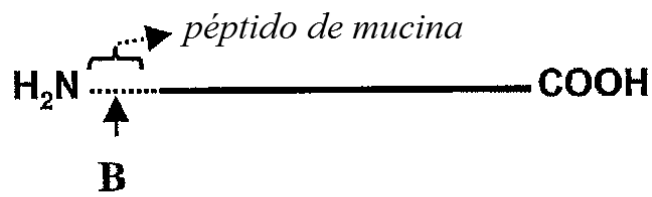
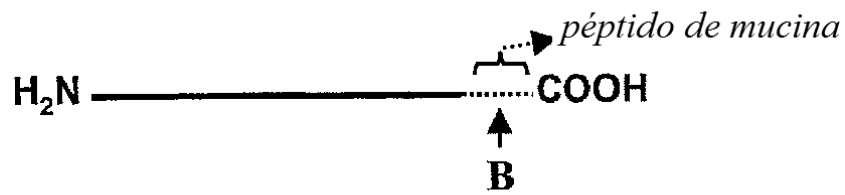


FIG. 43H



a-c, e (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
d = 0; R = grupo modificador, manosa,
oligo-manosa.

FIG. 43I

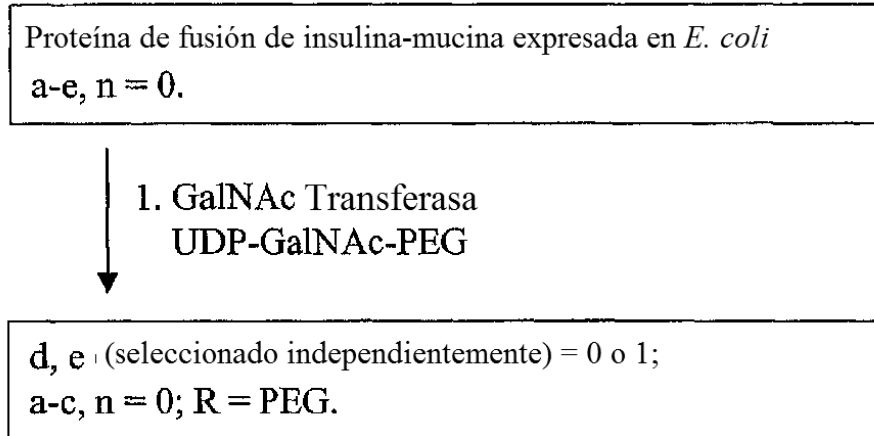


FIG. 43J

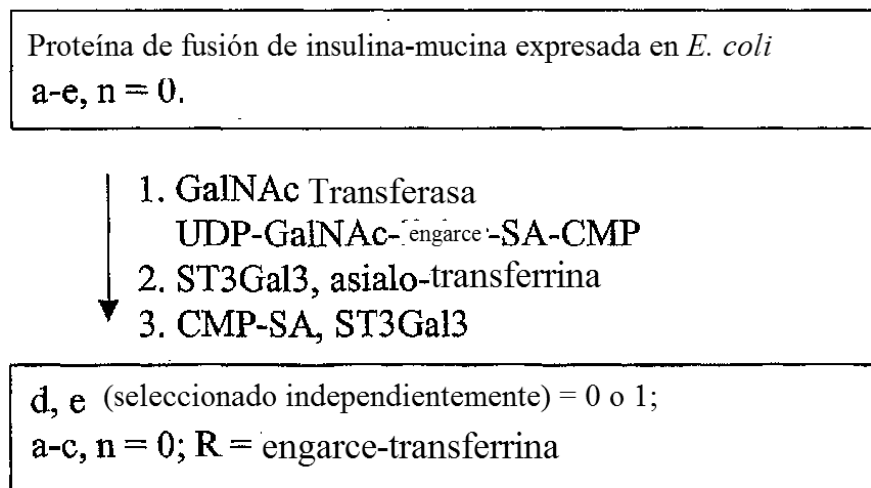


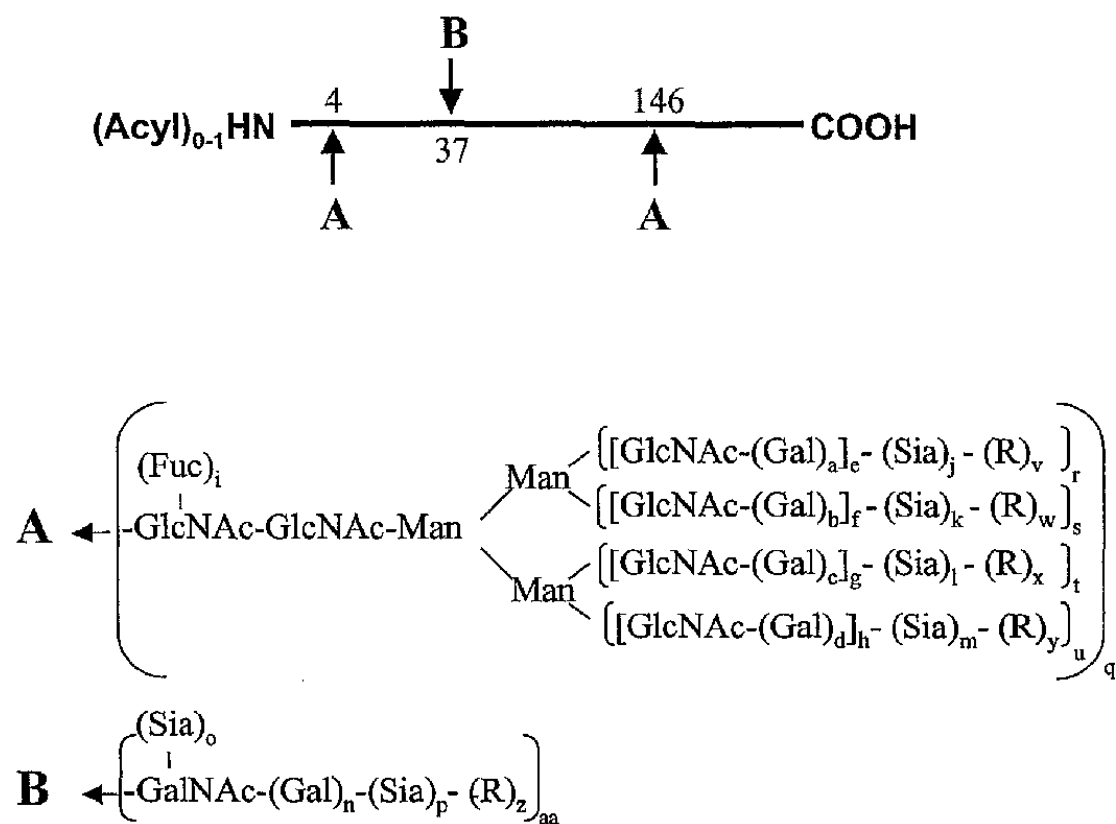
FIG. 43K

Péptido de insulina (N) no mucina expresado en *E. coli*
a-e, n = 0.

1. NHS-CO- engarce -SA-CMP
2. ST3Gal3, asialo-transferrina
3. CMP-SA, ST3Gal3

a-e = 0; n = 1;
R' = engarce-transferrina

FIG. 43L



a-d, i, n-u, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 100.

v-y = 0; R = polímero, glicoconjugado.

FIG. 44A

Antígeno M expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, o-u, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n, e-h = 1; v-z = 0.

- ↓
1. Sialidasa
2. CMP-SA-engarce-lípido A
ST3Gal3

a-d, i-m, q-u, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
o, p, z = 0; n, e-h = 1;
v-y (seleccionado independientemente) = 1,
cuando j-m (seleccionado independientemente) es 1;
R = engarce - lípido A

FIG. 44B

Antígeno M expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, i-m, o-u, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n, e-h = 1; v-z = 0.

- ↓
1. Sialidas
2. CMP-SA-engarce-toxina del tétano, ST3Gal1
3. CMP-SA, ST3Gal3

a-d, i-m, p-u, z, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
o, v-y = 0; n, e-h = 1; R = toxina del tétano

FIG. 44C

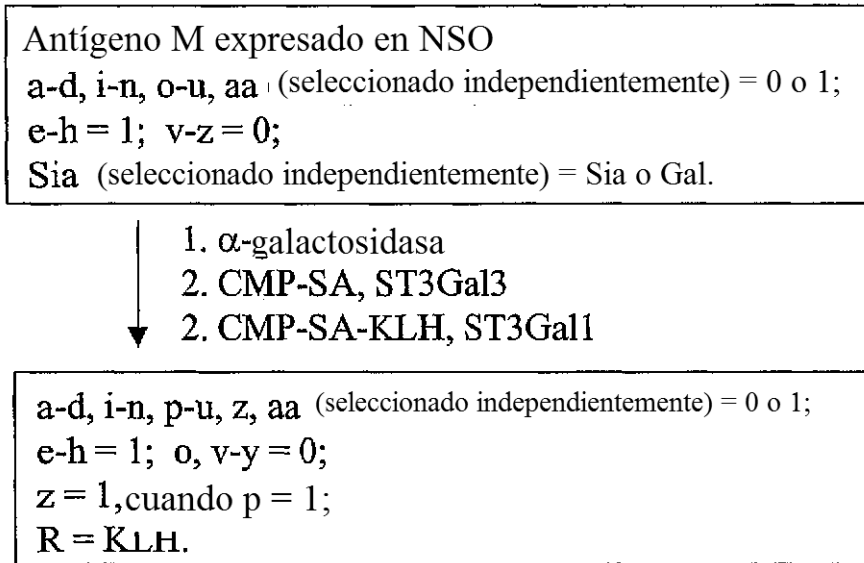


FIG. 44D

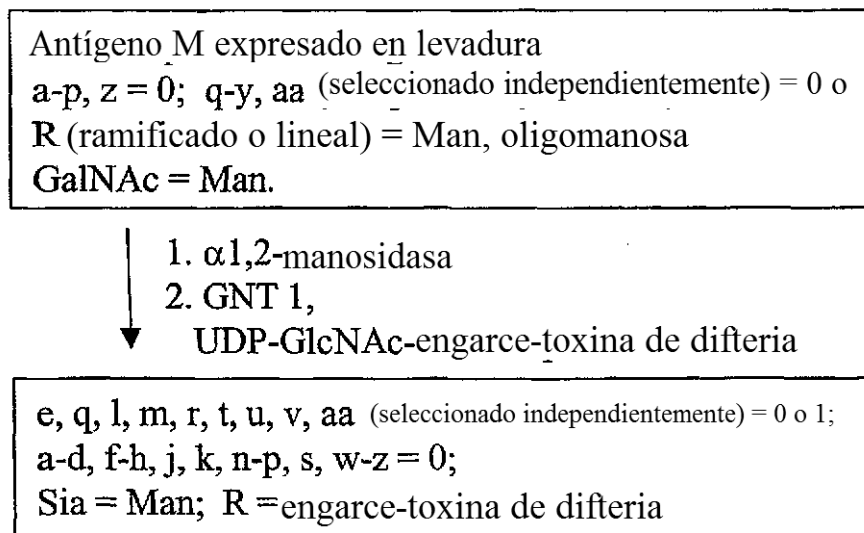


FIG. 44E

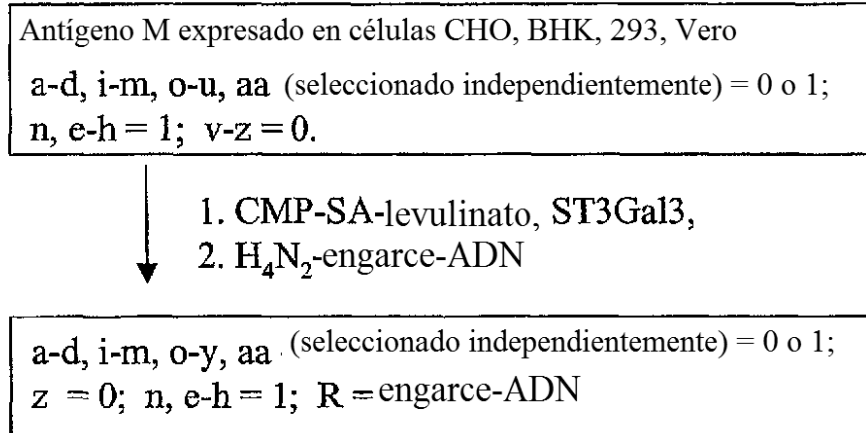


FIG. 44F

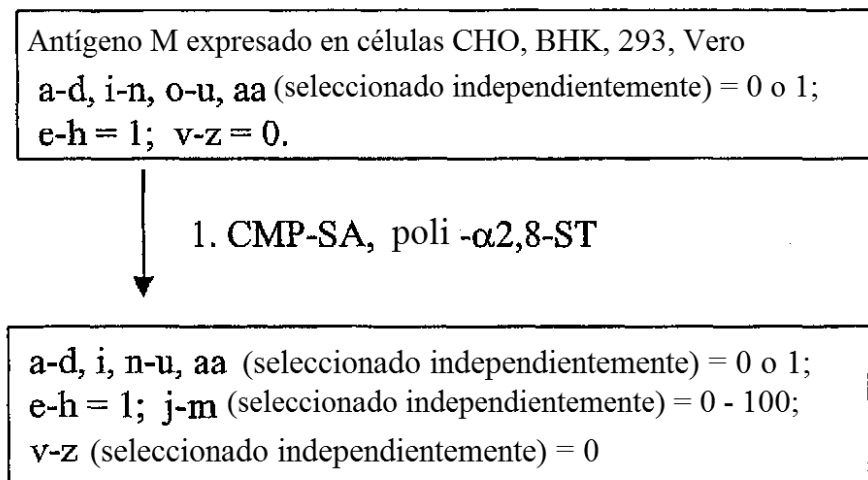
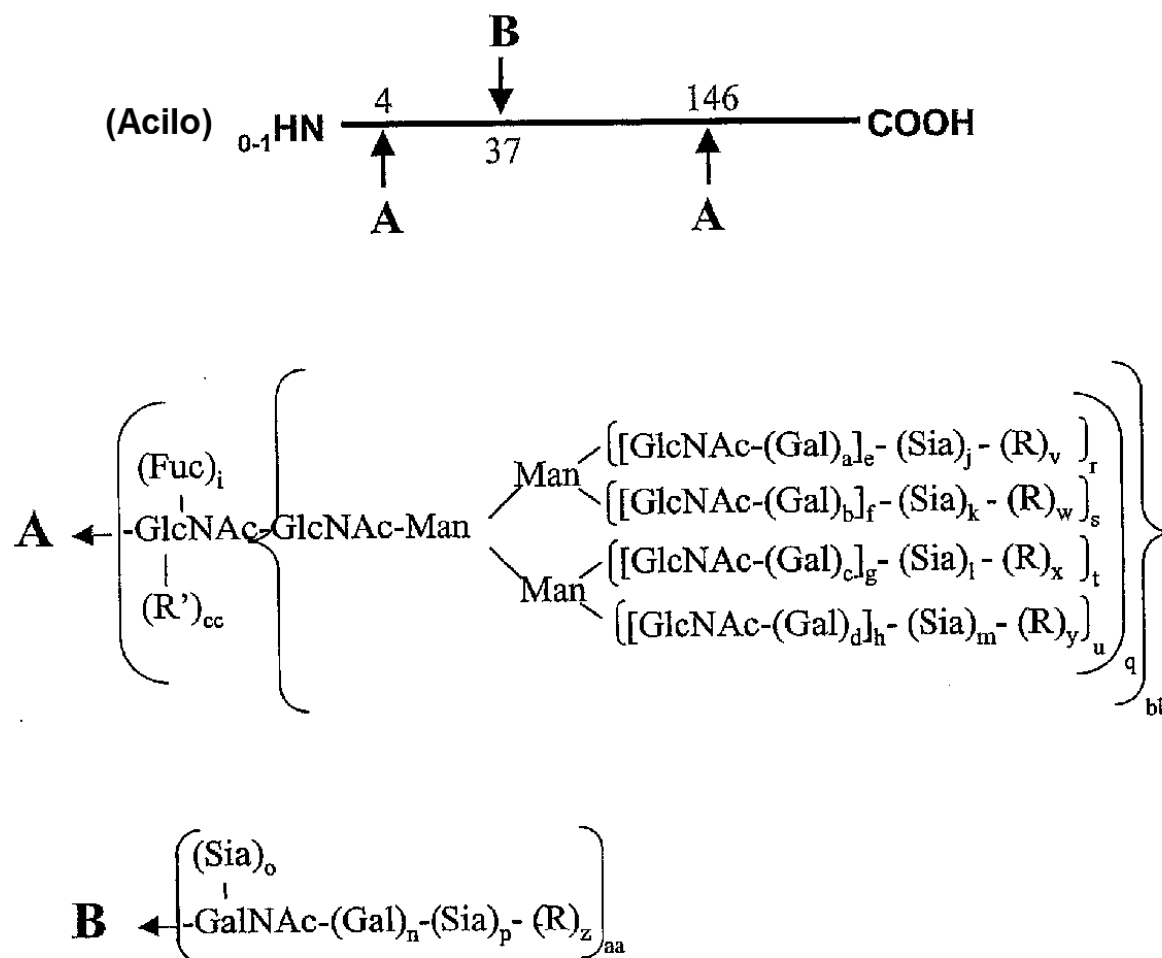


FIG. 44G



a-d, i, n, q-u, aa, bb, (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-p (seleccionado independientemente) = 0 a 100.

Cc, v-y = 0;

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador glicoconjugado.

FIG. 44H

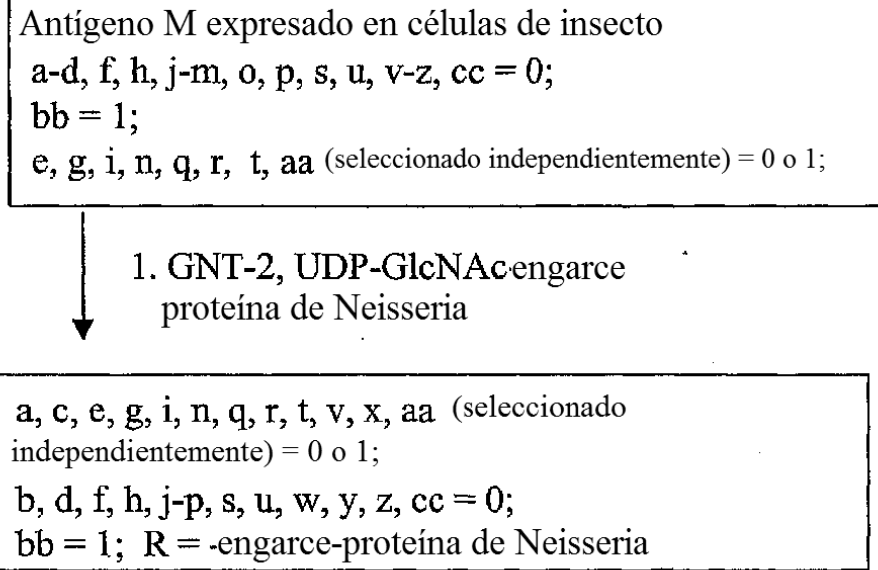


FIG. 44I

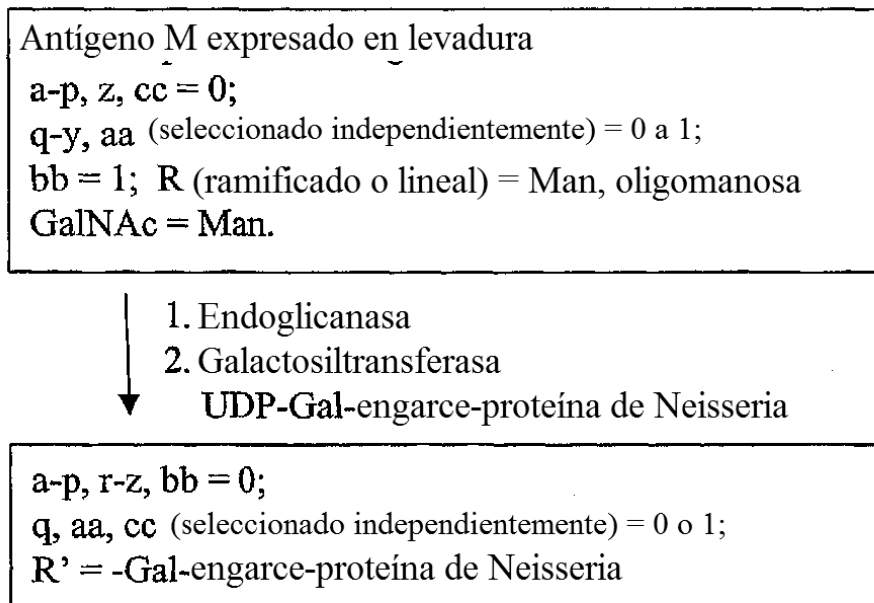


FIG. 44J

Antígeno M expresado en levadura

a-p, z, cc = 0;

q-y, aa (seleccionado independientemente) = 0 a 1; bb = 1;

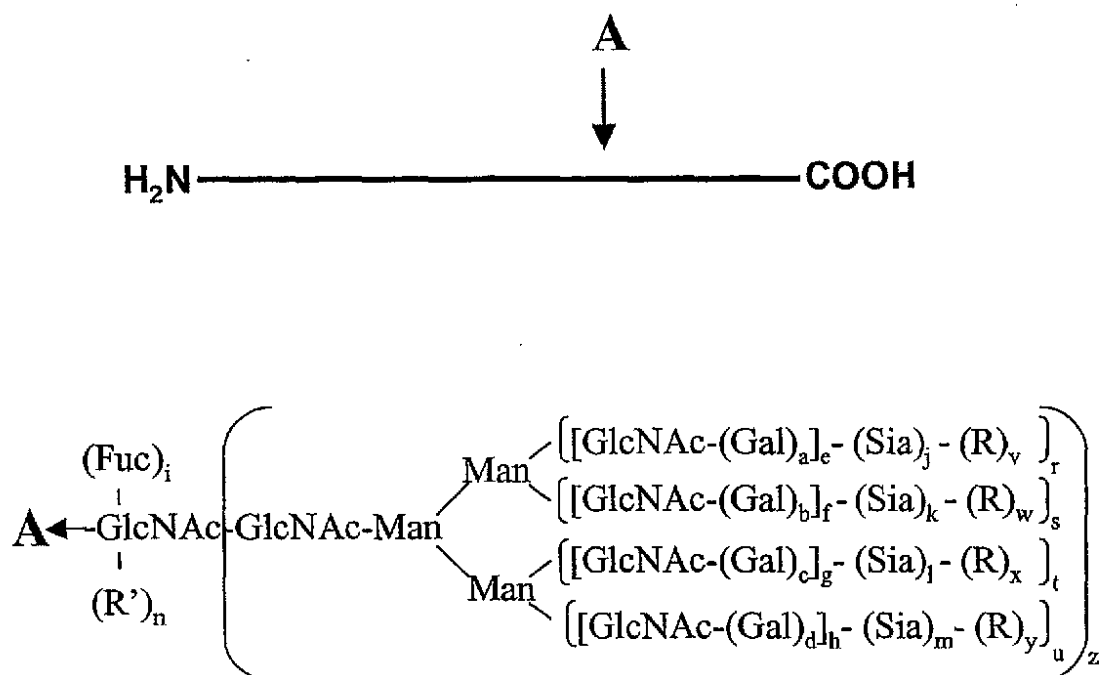
R(ramificado o lineal) = Man, oligomanosa

GalNAc = Man.

1. manosidasas
2. GNT 1 & 2, UDP-GlcNAc
3. UDP-Gal, Galactosiltransferasa
4. CMP-SA, sialiltransferasa

a, c, e, g, j, l, q, r, t, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
b, d, f, h, k, m-p, s, u-z, cc = 0; bb = 1.

FIG. 44K



a-d, i, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 n, v-y = 0; z = 0 o 1;
 R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa;
 R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador,
 glicoconjugado.

FIG. 45A

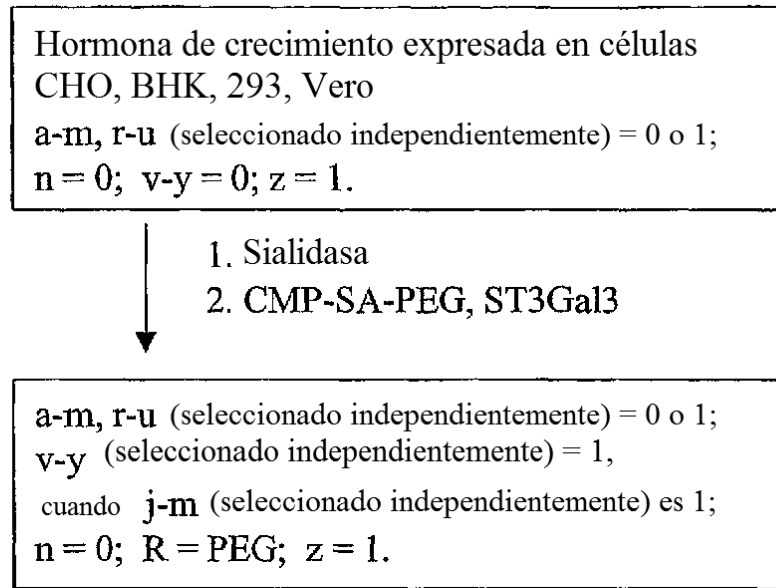


FIG. 45B

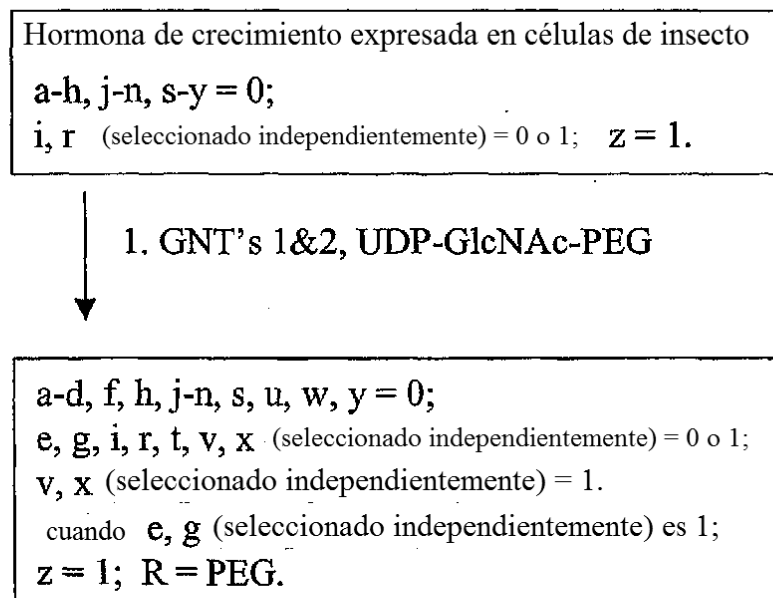


FIG. 45C

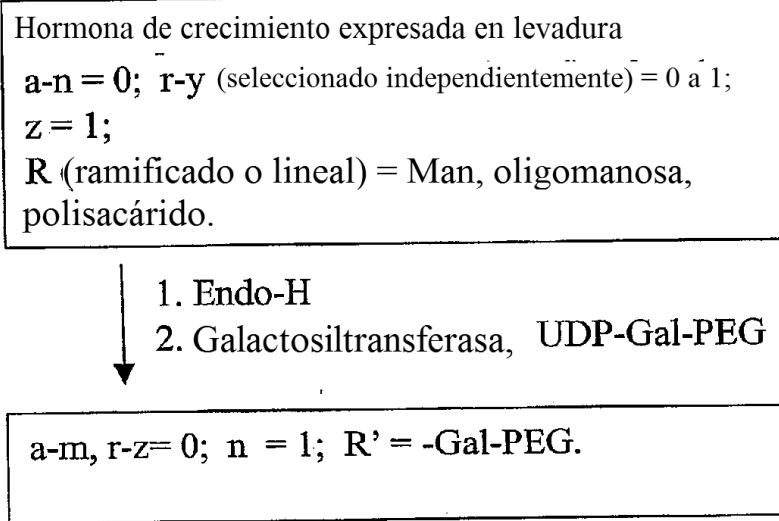
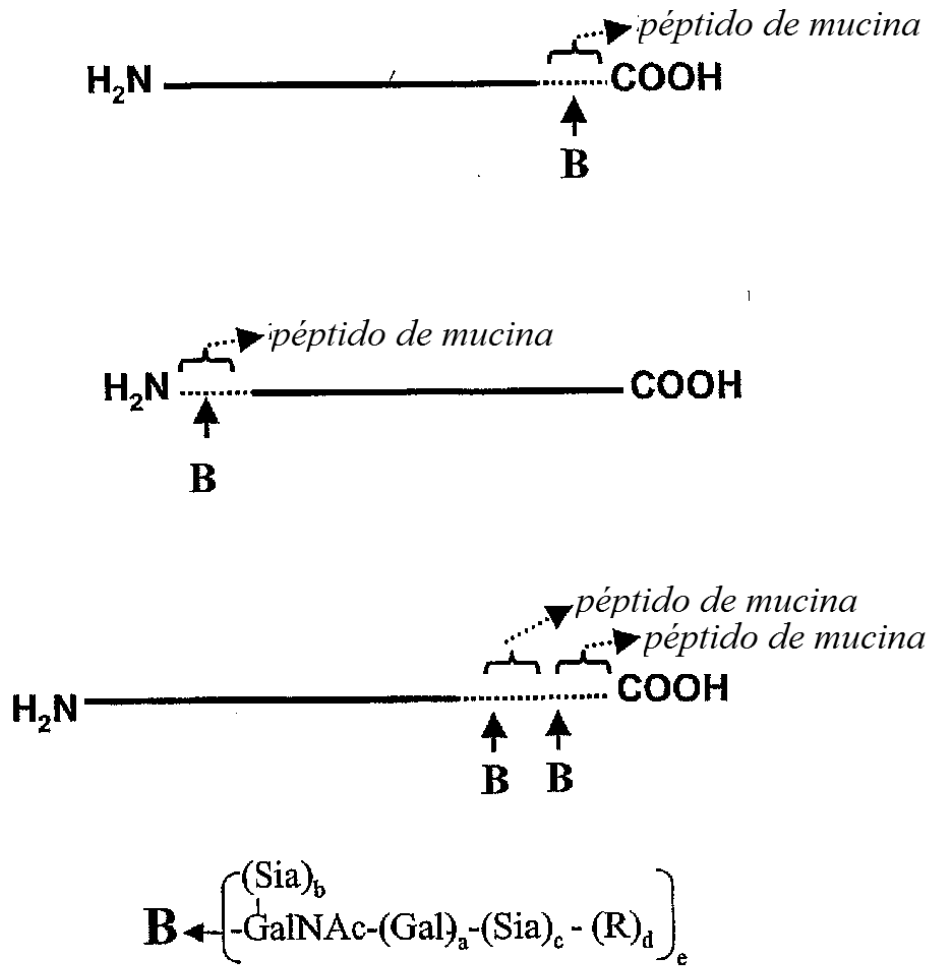


FIG. 45D



a-c, e (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
d = 0;
R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.

FIG. 45E

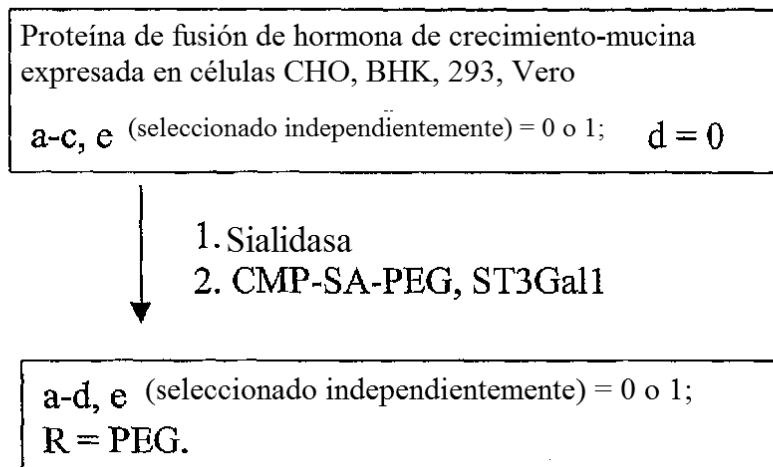


FIG. 45F

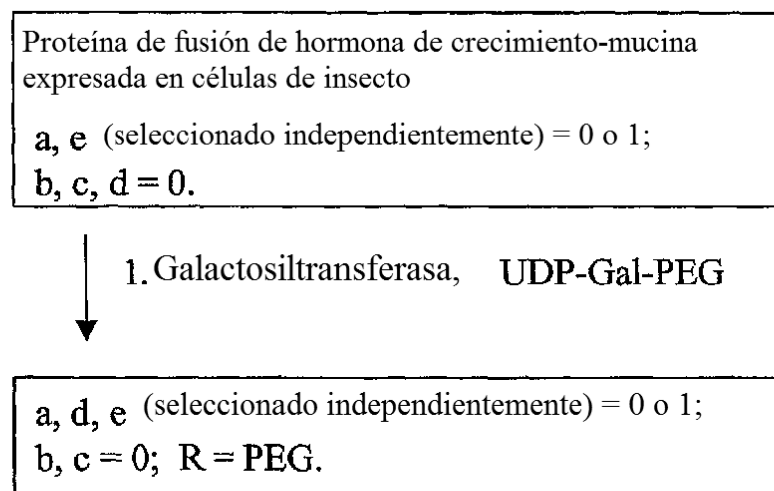


FIG. 45G

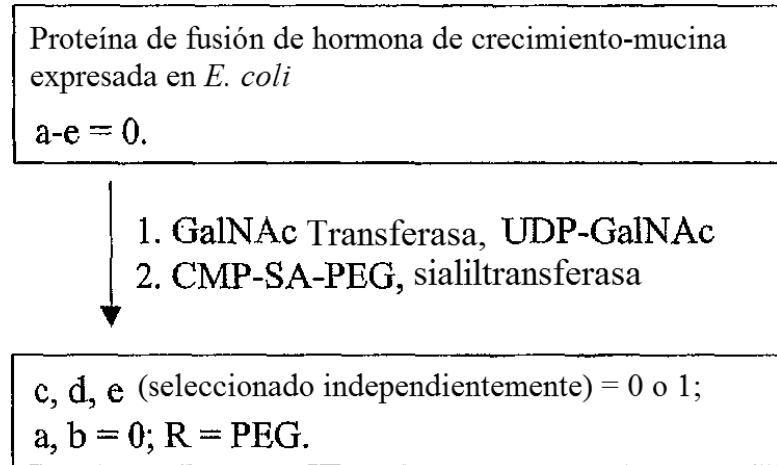


FIG. 45H

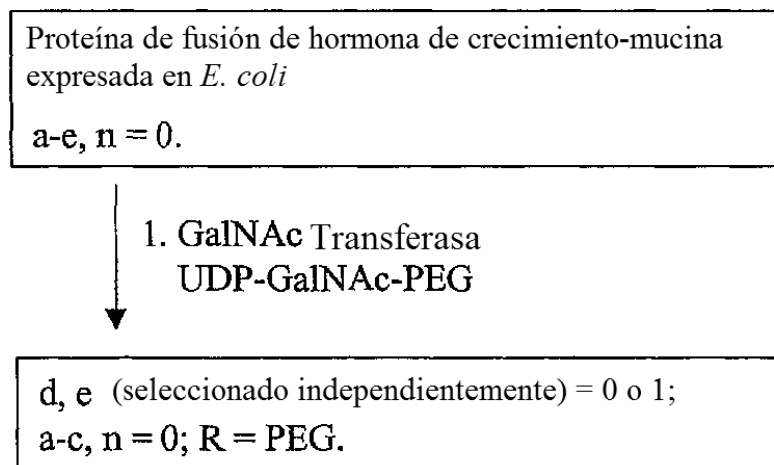


FIG. 45I

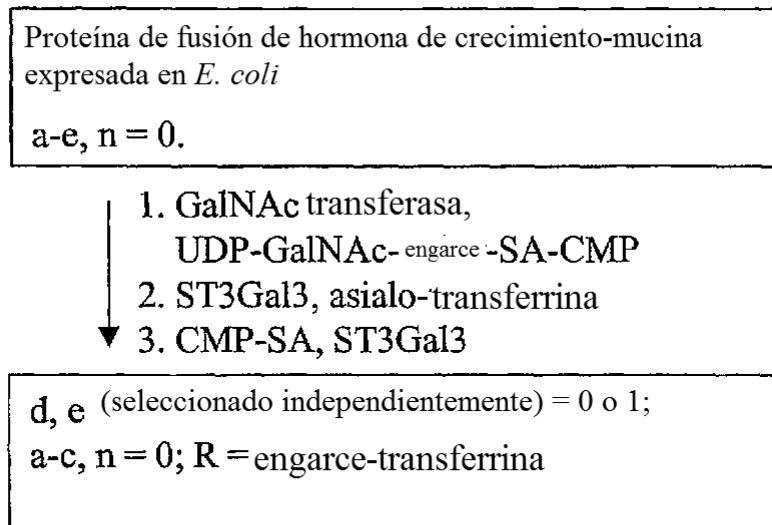


FIG. 45J

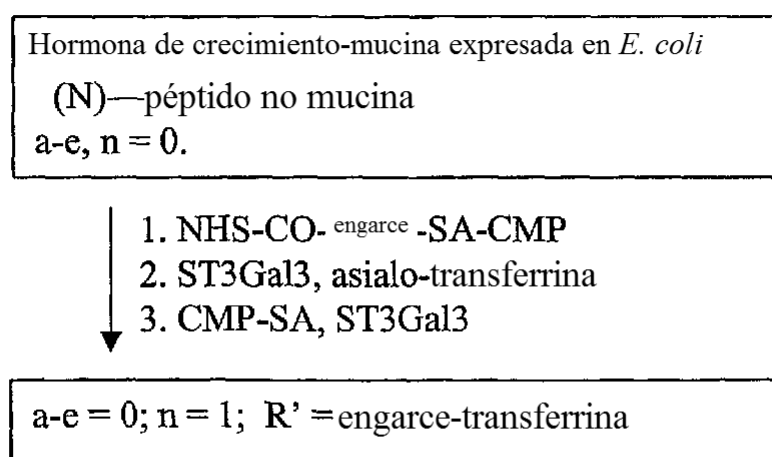
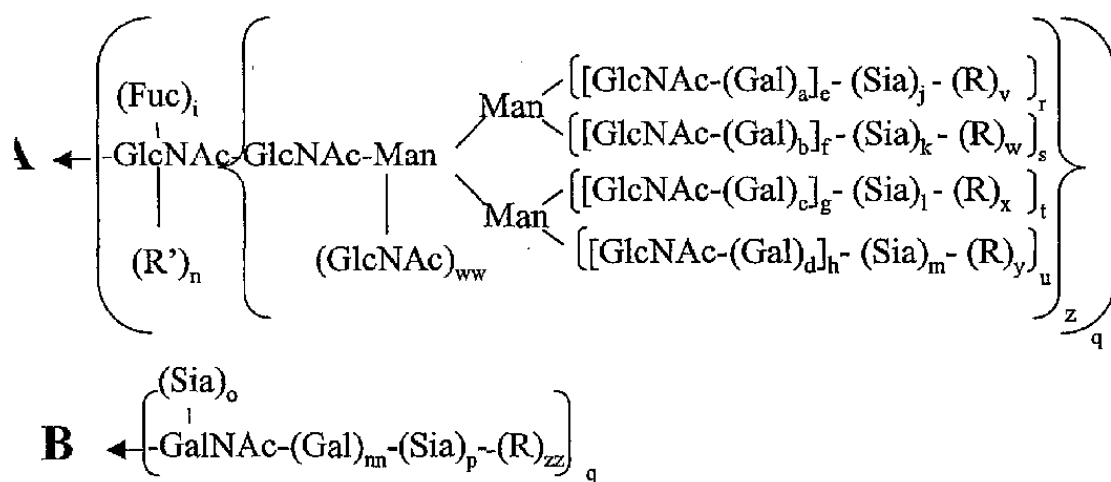
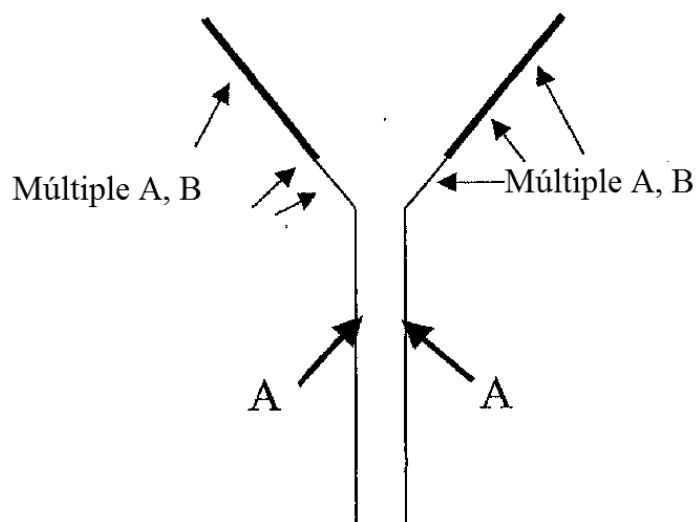


FIG. 45K



a-d, i-m, q-u, w, z, $\overline{m}$, ww, zz (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.

n, v-y = 0;

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador, glicoconjugado.

FIG. 46A

Fusión de receptor de TNF-IgG expresada en células de CHO, BHK, 293, Vero o animales transgénicos
a-m, o-u, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n = 1; v-z = 0.

- ↓ 1. CMP-SA, ST3Gal1
2. galactosiltransferasa, UPD-Gal
3. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, o-u, v-y, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n = 1; z = 0; R = PEG.

FIG. 46B

Fusión de receptor de TNF-IgG expresada en células de CHO, BHK, 293, Vero
a-m, o-u, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n = 1; v-z = 0.

- ↓ 1. sialidasa
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal1

a-i, p-u, z, aa (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
n = 1; o, j-m, v-y = 0; R = PEG.

FIG. 46C

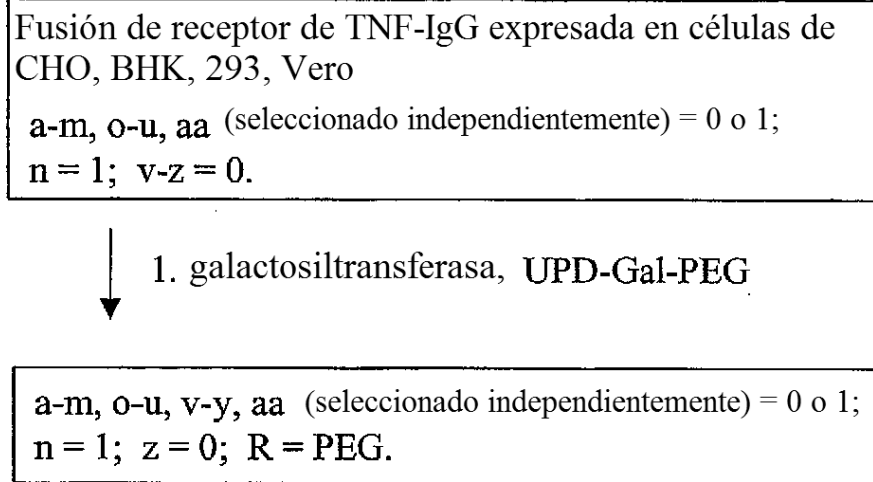


FIG. 46D

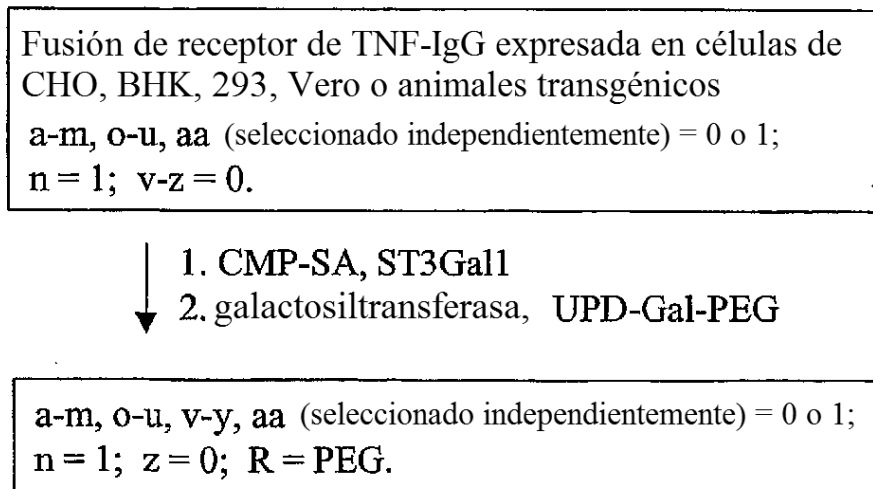


FIG. 46E

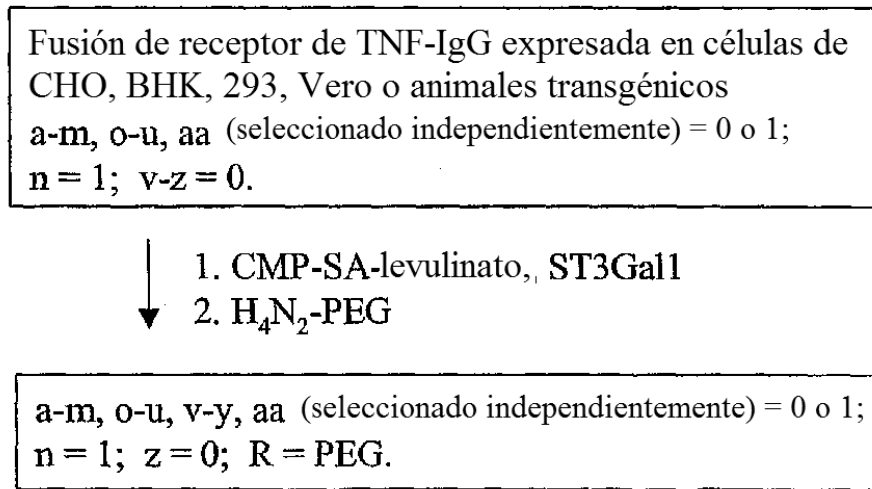


FIG. 46F

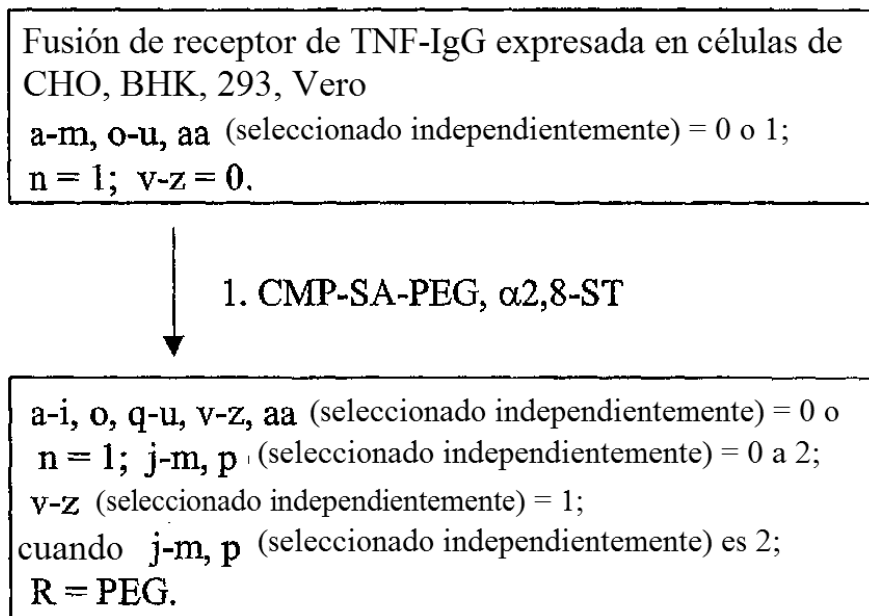
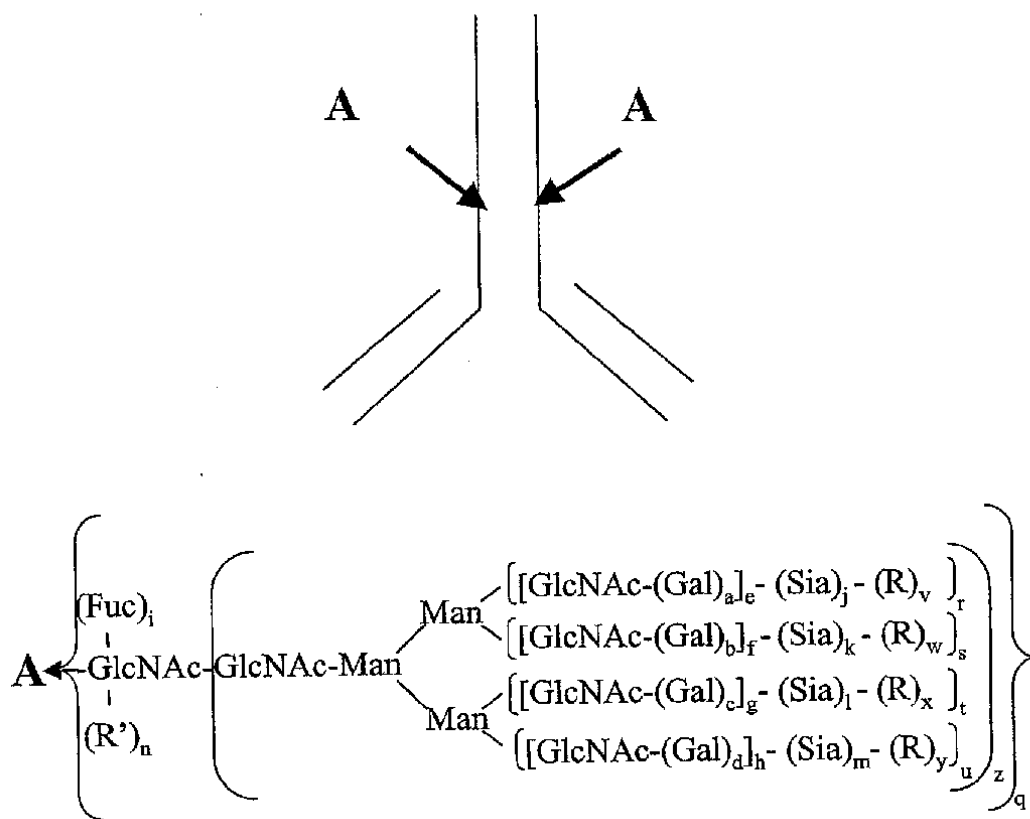


FIG. 46G



a-d, i, l, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.

$$j-k \text{ (seleccionado independientemente)} = 0 \text{ o } 1.$$

$M = 0$ a 20.

$$n, v-y=0; z=0 \text{ } 0 \text{ } 1;$$

R = polímero, toxina, complejo de isotopo radioactivo, fármaco, manosa, oligo-manosa

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador, glicoconjugado.

FIG. 47A

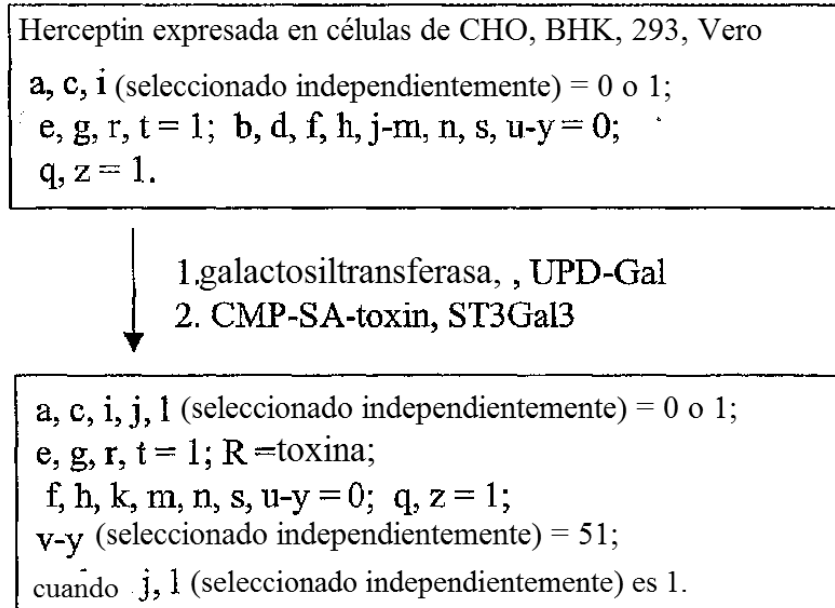


FIG. 47B

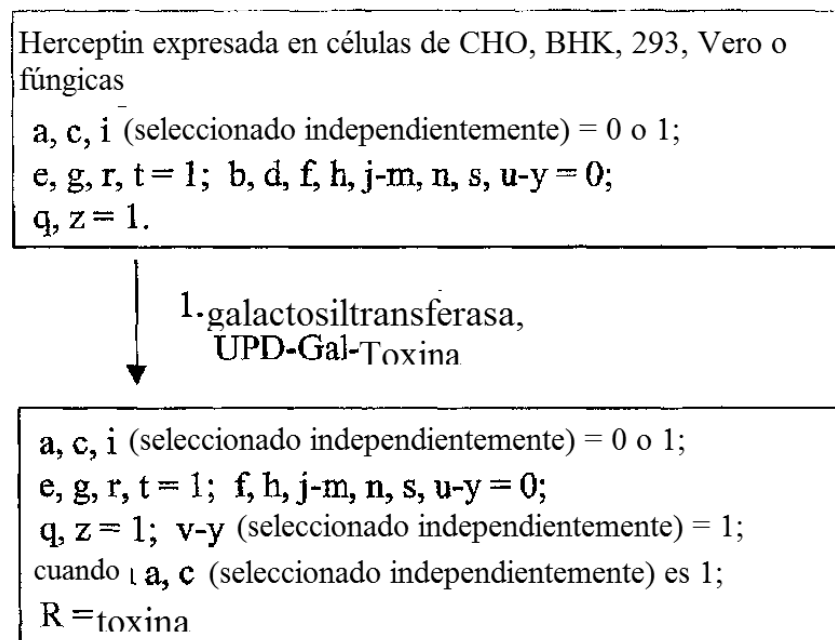


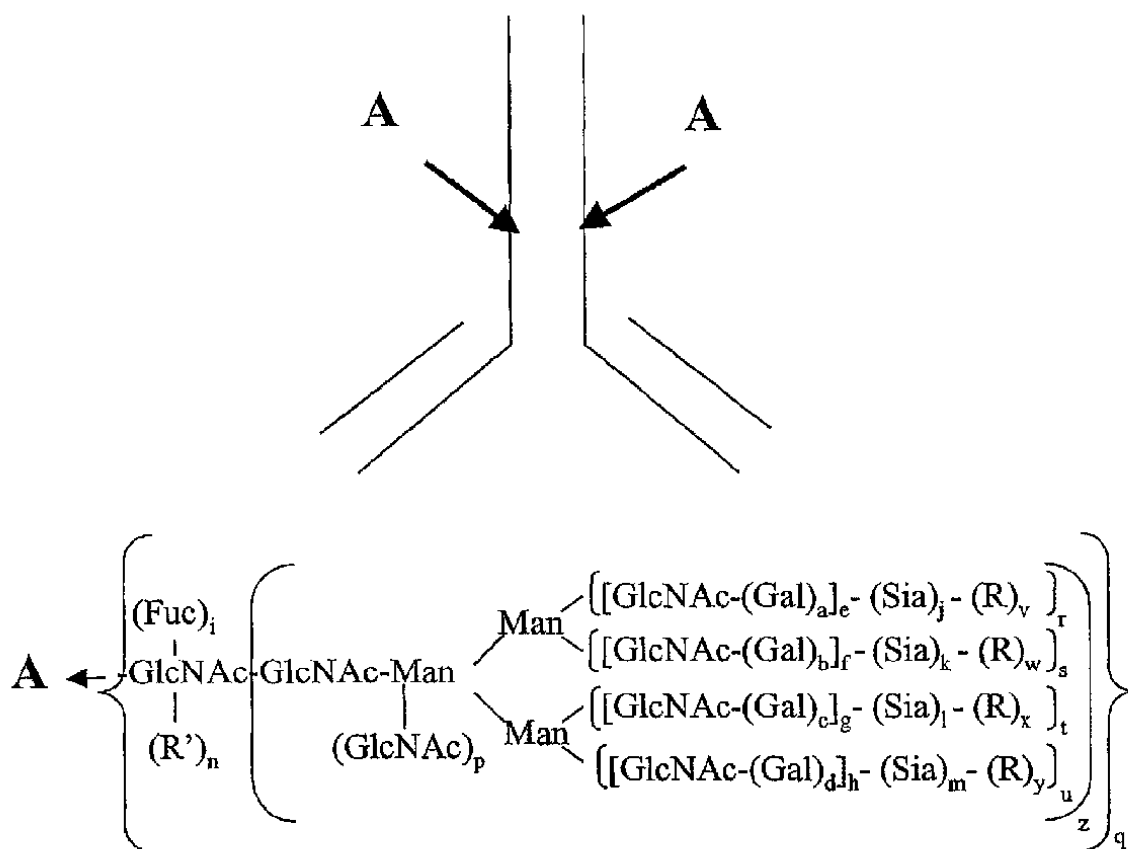
FIG. 47C

Herceptin expresado en hongos
 e, g, i, r, t (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 $a-d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0; q, z = 1.$

1. Endo-H
2. Galactosiltransferasa, UDP-Gal
- ↓ 3..Complejo CMP-SA-isotopo radioactivo, ST3Gal3

$a-m, r-z = 0; q, n = 1;$
 $R' = \text{-Complejo Gal-Sia-isotopo radioactivo}$

FIG. 47D



a-d, i, p-u, (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

c-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.

j -m (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

$$n, v-y=0; z=0 \text{ or } 1;$$

R = polímero, toxina, complejo de isótopo radioactivo, fármaco, manosa oligo-manosa

$R' = H$, residuo de glicosilo, grupo modificador, glicoconjugado.

FIG. 48A

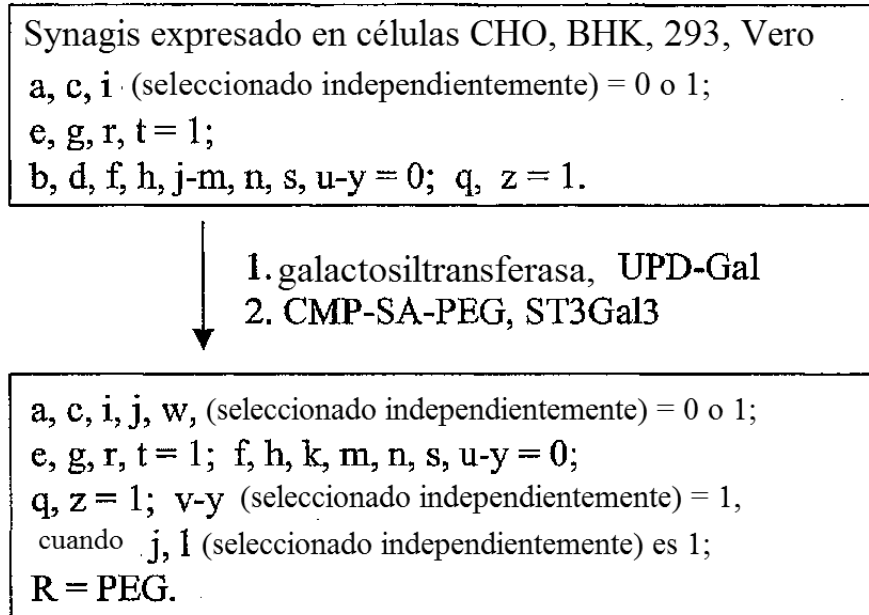


FIG. 48B

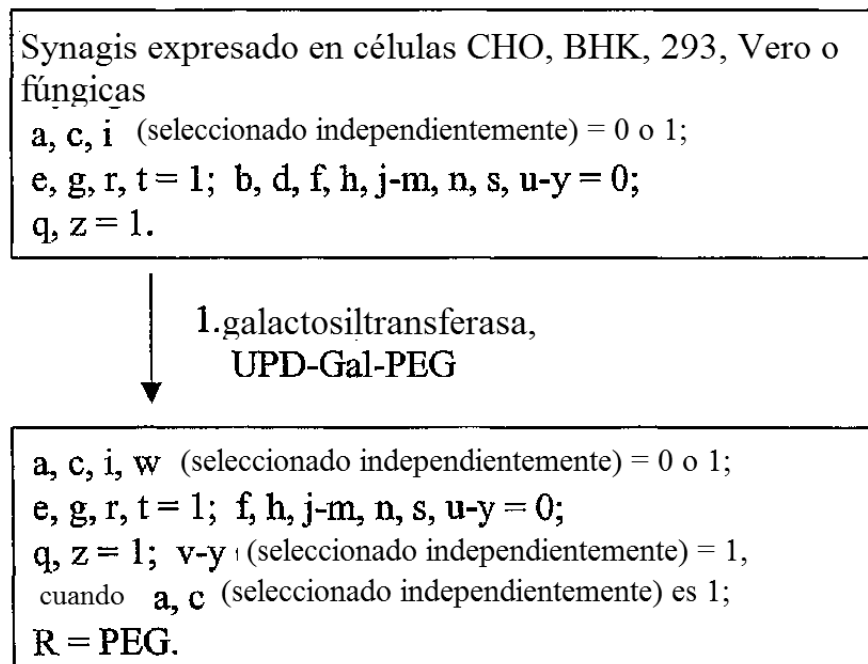


FIG. 48C

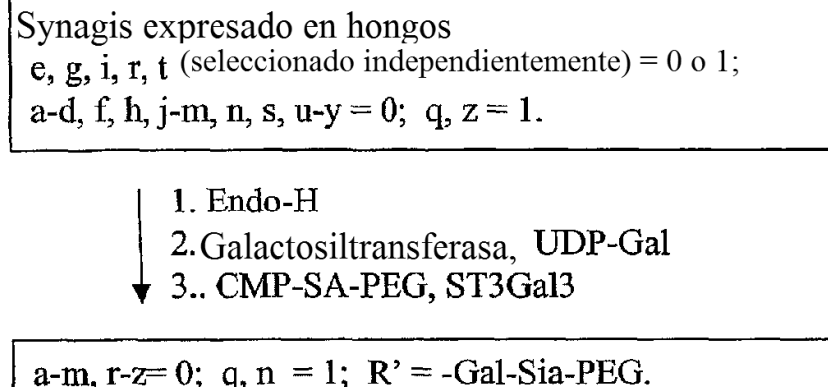
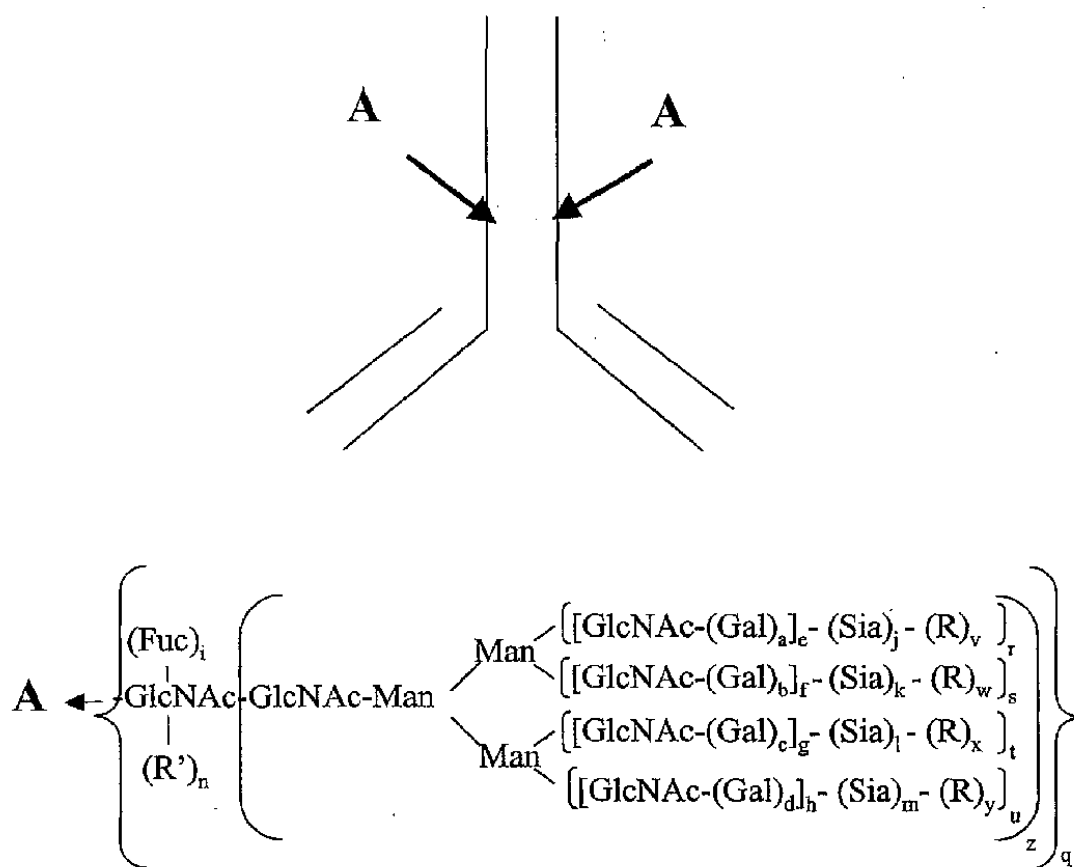


FIG. 48D



a-d, i, q-u, w (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20.

n, v-y = 0; z = 0 o 1;

R = polímero, toxina, complejo de isótopo radioactivo, fármaco, manosa oligo-manosa.

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador, glicoconjugado.

FIG. 49A

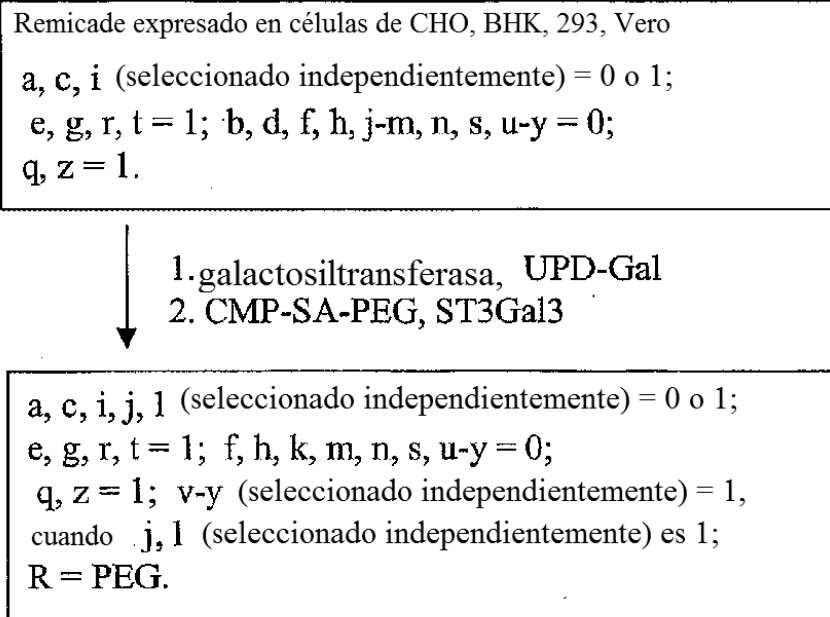


FIG. 49B

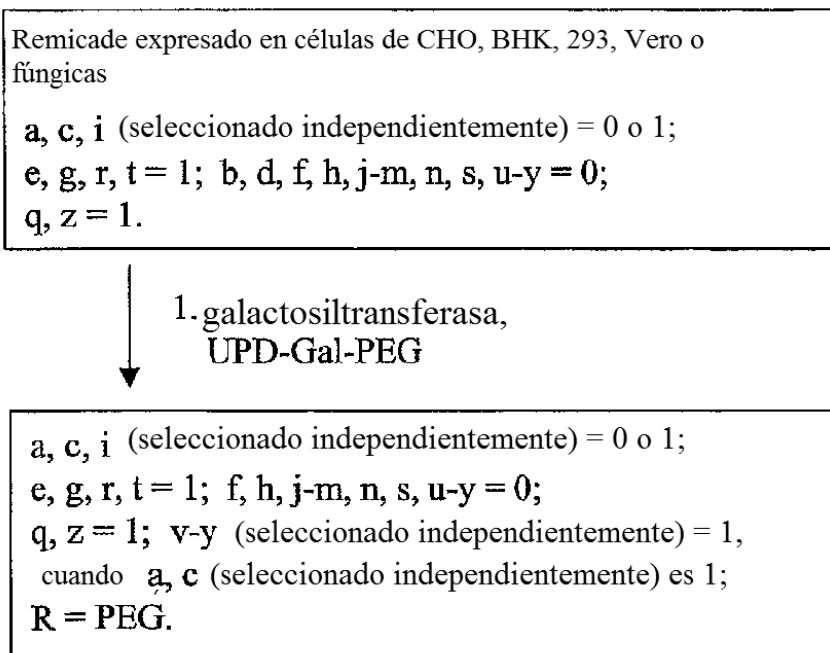


FIG. 49C

Remicade expresado en hongos

e, g, i, r, t (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

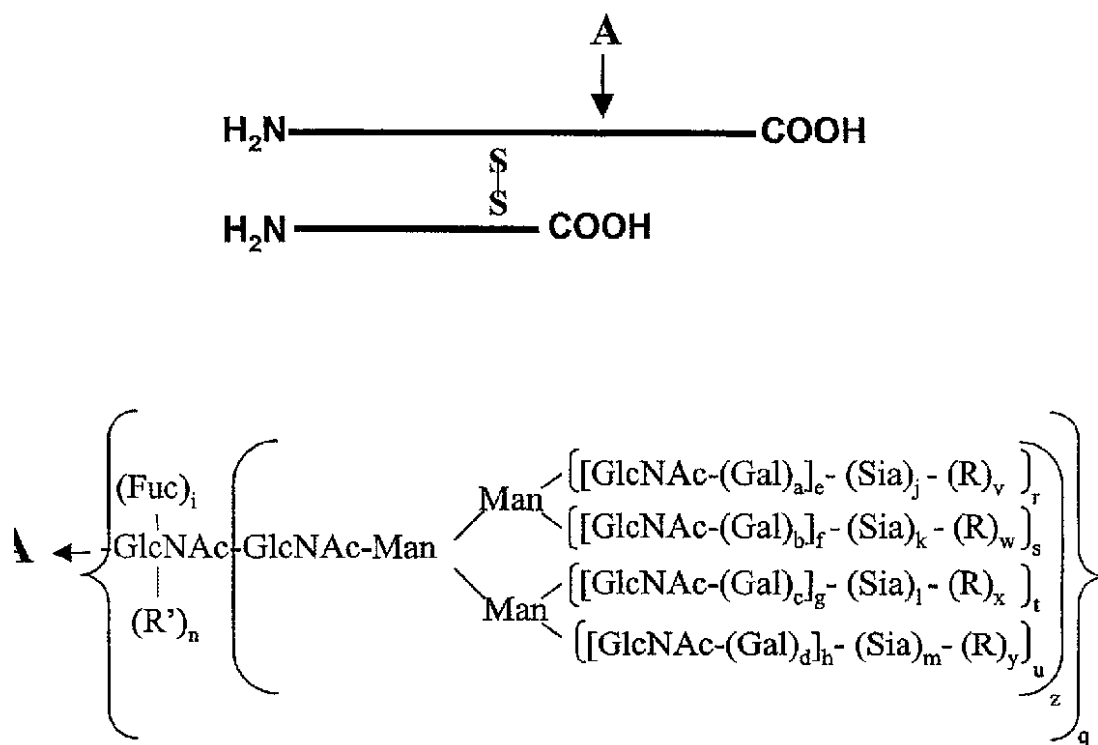
a-d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0; q, z = 1.

1. Endo-H
2. Galactosiltransferasa, UDP-Gal
3. Complejo CMP-SA- isotopo ST3Gal3

a-m, r-z= 0; q, n = 1;

R' = -Complejo - Gal - Sia - isotopo radioactivo

FIG. 49D



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
 n, v-y = 0; z = 0 o 1;
 R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.
 R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador,
 glicoconjugado.

FIG. 50A

Reopro expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
 a-m, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 n = 0; v-y = 0; z = 1.



1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-m, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 v-y (seleccionado independientemente) = 1,
 cuando j-m (seleccionado independientemente) es 1;
 n = 0; R = PEG; z = 1.

FIG. 50B

Reopro expresado en células de insecto
 a-h, j-n, s-y = 0; i, r (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 z = 1.



1. GNT's 1&2, UDP-GlcNAc-PEG

a-d, f, h, j-n, s, u, w, y = 0;
 e, g, i, r, t, v, x (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 v, x (seleccionado independientemente) = 1,
 cuando e, g (seleccionado independientemente) es 1;
 z = 1; R = PEG.

FIG. 50C

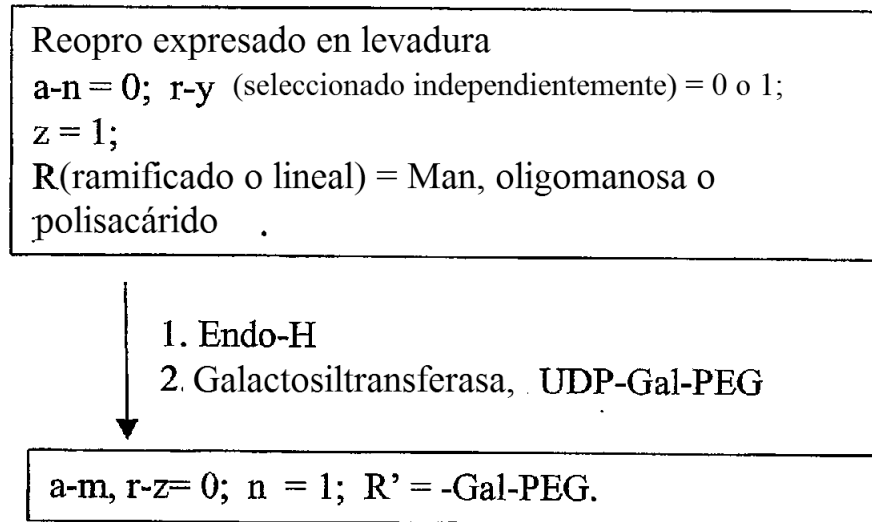
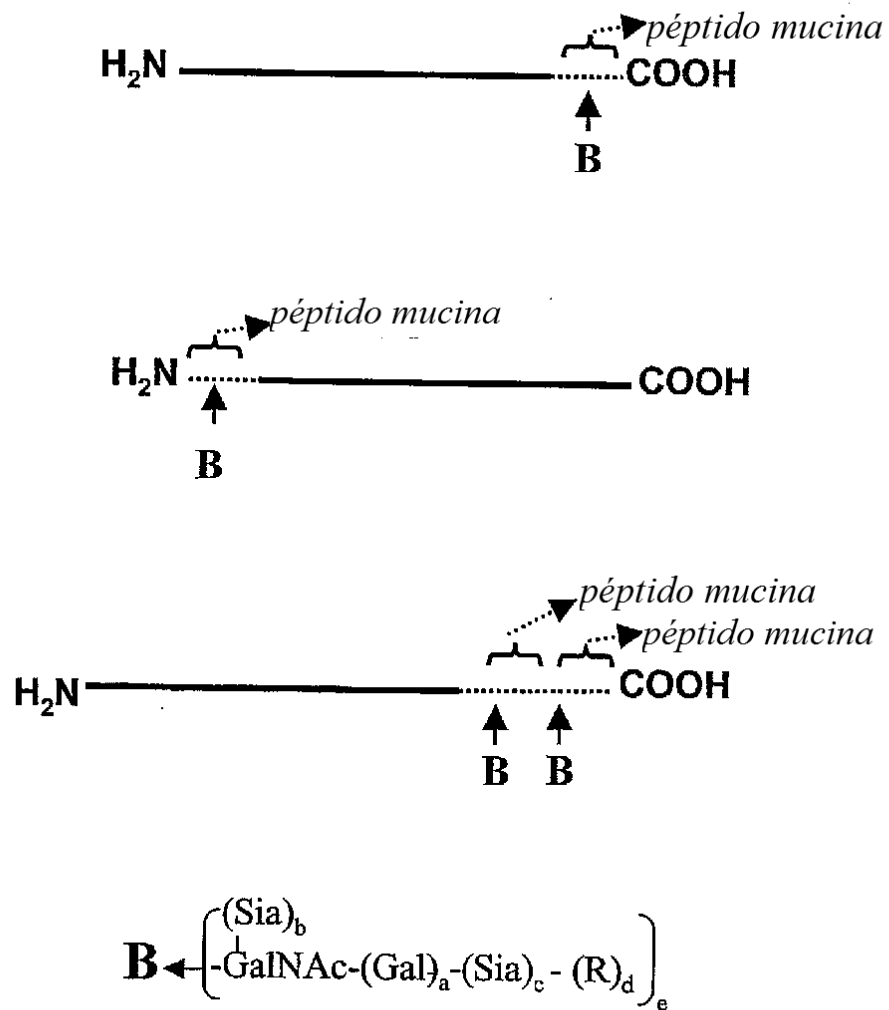


FIG. 50D



a-c, e (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
d = 0; R = polímero

FIG. 50E

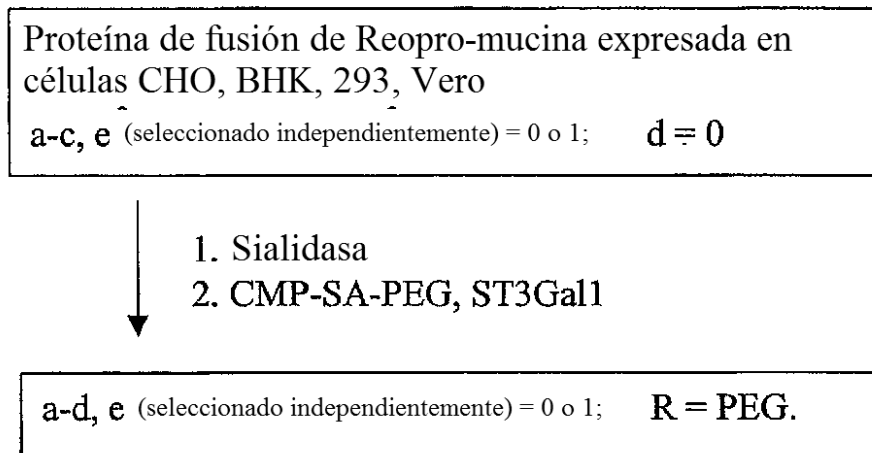


FIG. 50F

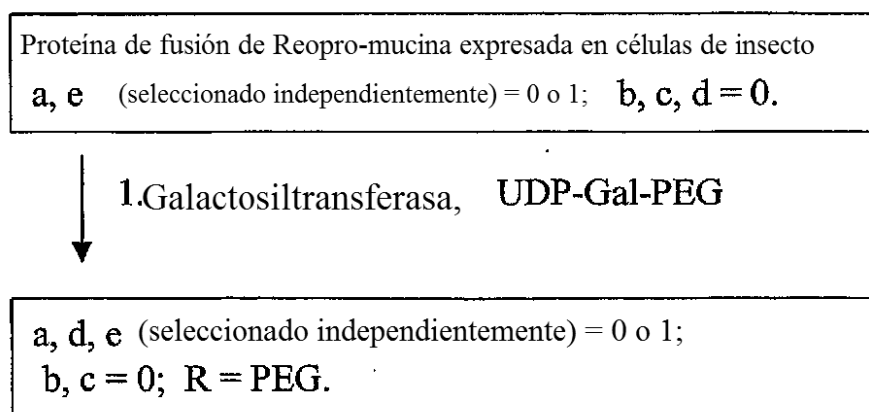


FIG. 50G

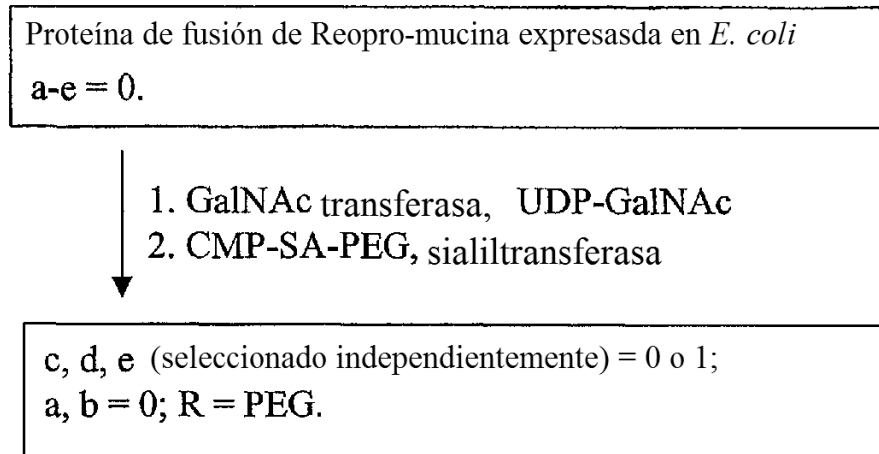
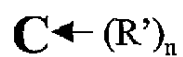
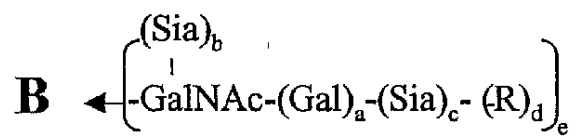
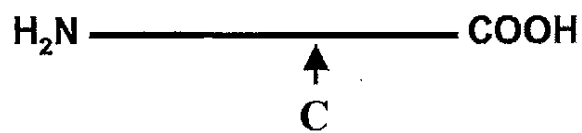
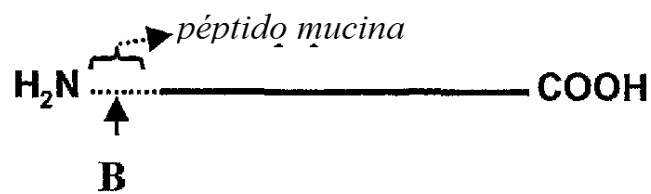
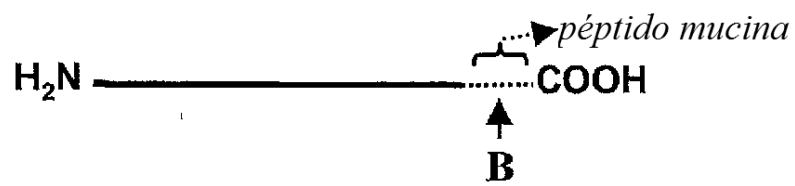


FIG. 50H



a-c, e (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
d = 0; R =] polímero, engarce

FIG. 50I

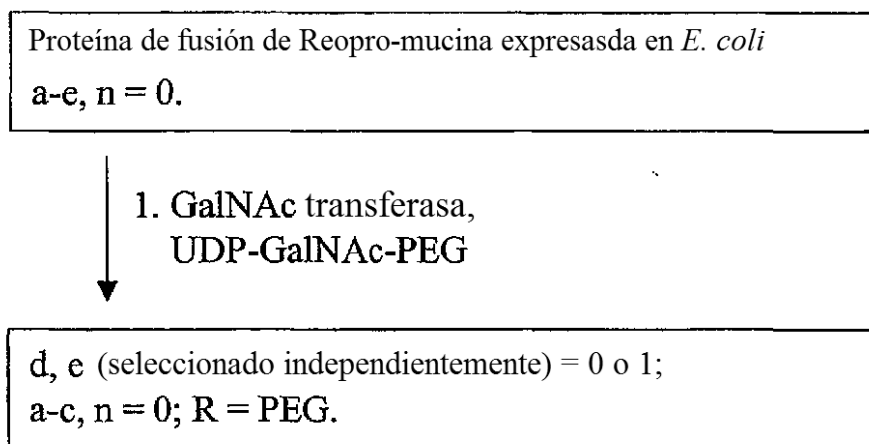


FIG. 50J

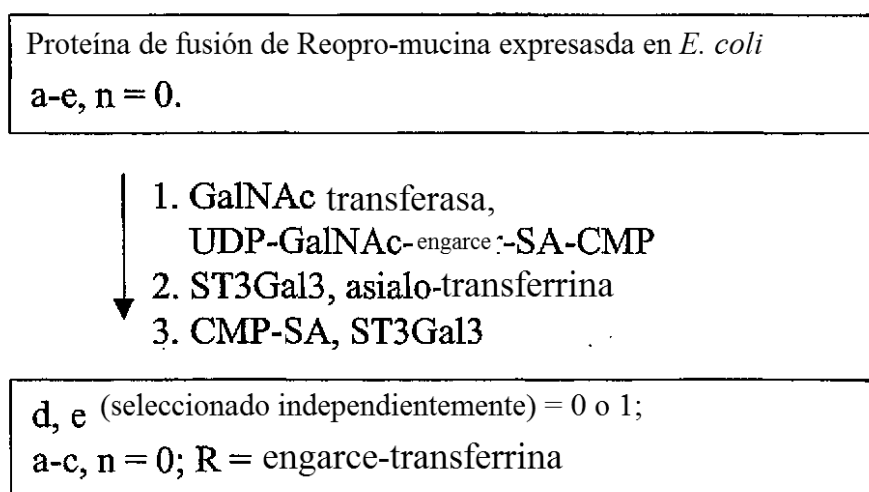


FIG. 50K

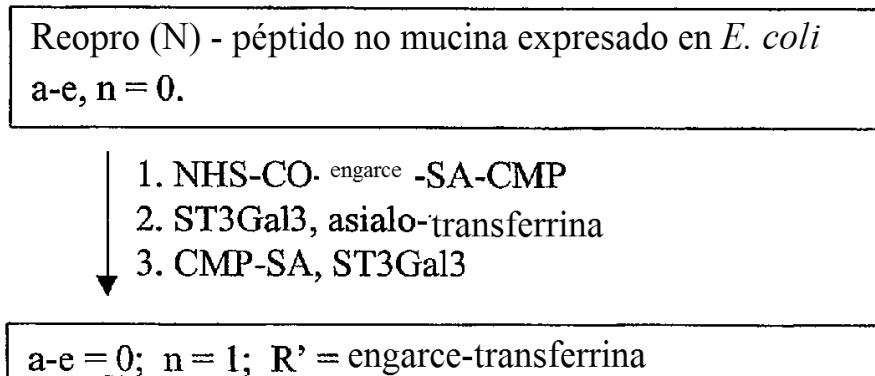
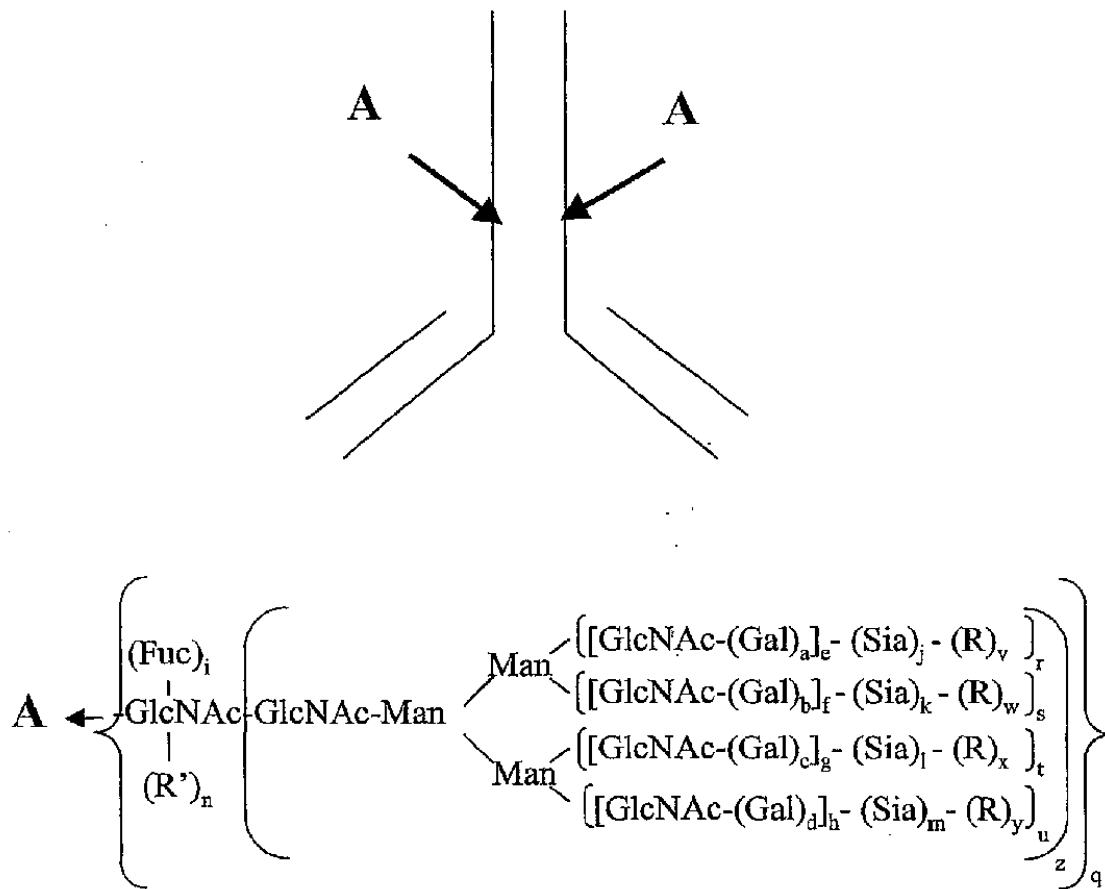


FIG. 50L



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.
j-m (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
n, v-y = 0; z = 0 o 1; R = polímero, toxina, complejo
de isotopo radioactivo, fármaco, glicoconjugado
R' = H, azúcar, glicoconjugado

z

FIG. 51A

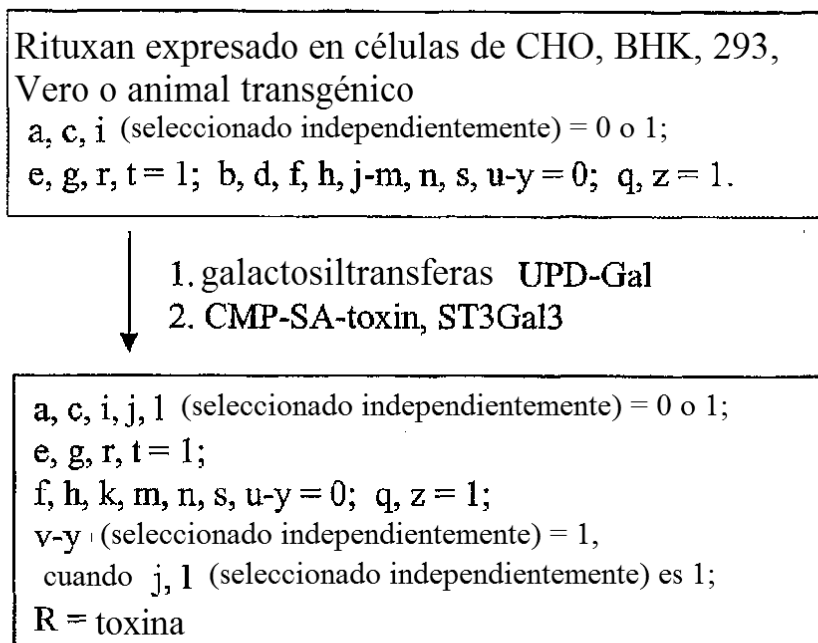


FIG. 51B

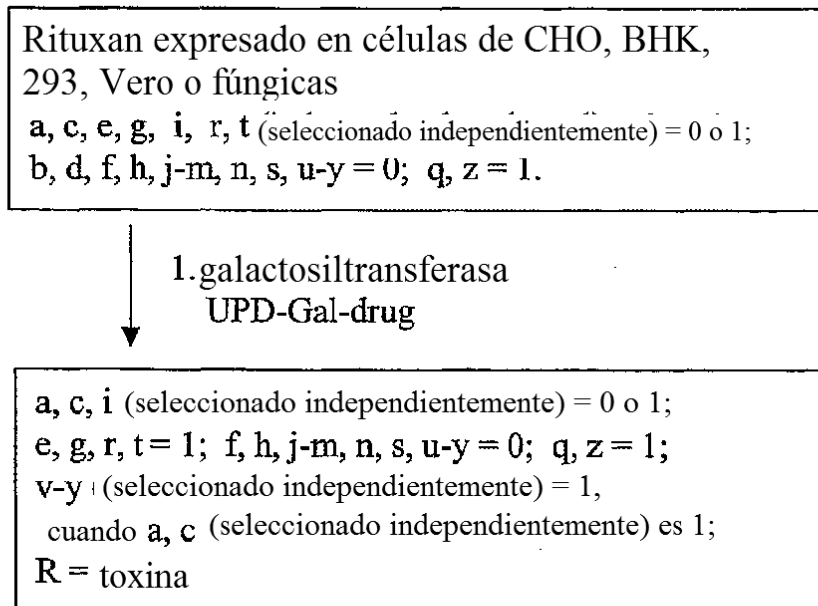


FIG. 51C

Rituxan expresado en hongos

e, g, i, r, t (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

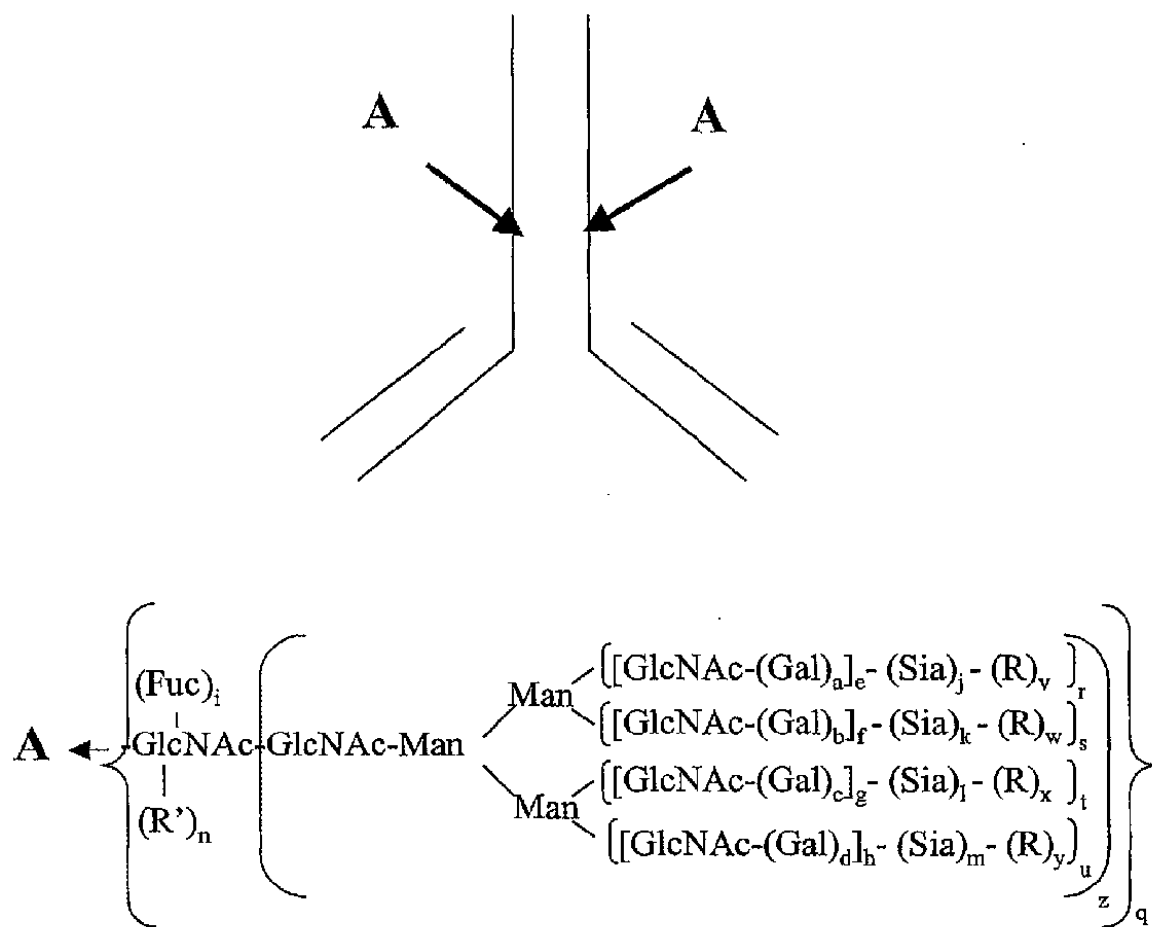
a-d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0; q, z = 1.

1. Endo-H
2. Galactosyltransferase, UDP-Gal
- ↓ 3. Complejo de CMP-SA-isotopo radioactivo, ST3Gal3

a-m, r-z = 0; q, n = 1;

R' = Complejo Gal-Sia-isotopo radioactivo

FIG. 51D



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 4.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

$$n, v-y=0; z=0 \text{ o } 1;$$

R =polímero, toxina, complejo de isótopo radioactivo, fármaco, glicoconjugado, manosa, oligo-manosa

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador, glicoconjugado.

FIG. 51E

Rituxan expresado en células de CHO, BHK, 293, Vero o animal transgénico

a, c, i (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e, g, r, t = 1; b, d, f, h, j-m, n, s, u-y = 0;
q, z = 1.



1. galactosiltransferasa, UDP-Gal
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a, c, i, j, l (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
e, g, r, t = 1; f, h, k, m, n, s, u-y = 0;
q, z = 1; v-y (seleccionado independientemente) = 1,
cuando j, l (seleccionado independientemente) es 1;
R = PEG.

FIG. 51F

Rituxan expresado en hongos, levaduras o CHO

e, g, i, r, t, v, x (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
a-d, f, h, j-m, n, s, u, w, y = 0; q, z = 1;
R (seleccionado independientemente) = manosa, oligomanosa,
polimánosa



1. manosidasas (alfa y beta)
2. GNT-I,II, UDP-GlcNAc
3. Galactosiltransferasa, UDP-Gal-isotopo radioactivo

a-m, r-z = 0; q, n = 1;
R' = Complejo Gal-isotopo radioactivo

FIG. 51G

FIG. 52A

ACCCCCCTGGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAT
 GCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAG
 GAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGT
 GCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTG
 CCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATA
 GCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCT
 CCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCG
 ACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCC
 CCTGCCCTGCAGCCCAACCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCT
 TTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAG
 CTTCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCCCTG
 A

FIG. 52B

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu
 Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr
 Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro
 Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser
 Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
 Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe
 Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro
 Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val
 Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His
 Leu Ala Gln Pro

FIG. 53A

GCGCCTCTTATGTACCCACAAAAATCTATTTTCAAAAAAGTTGCTCTA
 AGAATATAGTTATCAAGTTAAGTAAAAATGTCAATAGCCTTTTAATTTA
 ATTTTAAATTGTTTTATCATTCTTTGCAATAATAAAACATTAACCTTTAT
 ACTTTTAAATTTAATGTATAGAATAGAGATATACATAGGATATGTAAA
 TAGATACACAGTGTATATGTGATTAAAAATATAATGGGAGATTCAATC
 AGAAAAAAGTTTCTAAAAAGGCTCTGGGGTAAAAGAGGAAGGAAAC
 AATAATGAAAAAAATGTGGTGAGAAAAACAGCTGAAAACCCATGTA
 AAGAGTGTATAAAGAAAGCAAAAAGAGAAGTAGAAAGTAACACAGG
 GGCATTTGGAAAAATGTAAACGAGTATGTTCCCTATTTAAGGCTAGGC
 ACAAAGCAAGGTCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCAC
 CCATTTCAACCAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACAATGGCCTTGA
 CCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCTGCAAGTCAAGCT
 GCTCTGTGGGCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGG
 AGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCC
 TGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCTCCAGGAGGAGTTTGG
 CAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCCTCCATGAGATGA
 TCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTT
 GGGATGAGACCTCCTAGACAAATTCTACACTGAACTCTACCAGCAG
 CTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGA
 GACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACT
 TCCAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGT
 GCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTCTTTGTCA
 ACAAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAATGAAAACCTGGTTCA
 ACATGGAAATGATTTTCATTGATTCGTATGCCAGCTCACCTTTTTATG
 ATCTGCCATTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTATGACCATGACACGATT
 TAAATCTTTTCAAATGTTTTTAGGAGTATTAATCAACATTGTATTCAG
 CTCTTAAGGCACTAGTCCCTTACAGAGGACCATGCTGACTGATCCATT
 ATCTATTTAAATATTTTTAAAATATTATTTAATTTAACTATTTATAAAC
 AACTTATTTTTGTTTCATATTATGTCATGTGCACCTTTGCACAGTGGTIA
 ATGTAATAAAATGTGTTCTTTGTATTTGGTAAATTTATTTTGTGTTGTT
 CATTGAACCTTTTGCTATGGAACCTTTTGTACTTGTATTCTTTAAAATG
 AAATTCCAAGCCTAATTGTGCAACCTGATTACAGAATAACTGGTACA
 CTTCATTTGTCCATCAATATTATATTCAAGATATAAGTAAAAATAAAC
 TTTCTGTAAACCAAGTTGTATGTTGTACTCAAGATAACAGGGTGAACC
 TAACAAATACAATTCTGCTCTCTTGTGTATTTGATTTTTGTATGAAAA
 AAATAAAAATGGTAATCATACTTAATTATCAGTTATGGTAAATGGT
 ATGAAGAGAAGAAGGAACG

FIG. 53B

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys Lys Ser
 Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr
 Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala
 Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr
 Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu
 Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
 Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe
 Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
 Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu
 Arg Ser Lys Glu

FIG. 54A

ATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCC
 ACTACAGCTCTTTCCATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTCTACAAAGA
 AGCAGCAATTTTCAGTGTGAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAG
 GCTTGAATATTGCCTCAAGGACAGGATGAACTTTGACATCCCTGAGG
 AGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGCATTGACC
 ATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCA
 TCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAA
 TGTCTATCATCAGATAAACCATCTGAAGACAGTCCTGGAAGAAAAAC
 TGGAGAAAGAAGATTTTACCAGGGGAAACTCATGAGCAGTCTGCAC
 CTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGA
 GTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAATCCTAAGGA
 ACTTTTACTTCATTAACAGACTTACAGGTTACCTCCGAAACTGAAGAT
 CTCCTAGCCTGTCCCTCTGGGACTGGACAATTGCTTCAAGCATTCTTC
 AACCAGCAGATGCTGTTTAAAGTGACTGATGGCTAATGTACTGCAAAT
 GAAAGGACACTAGAAGATTTTGAAATTTTATTAAATTATGAGTTATT
 TTTATTTAT TTAAATTTTATTTTGGAATAAAATTATTTTGGTGC

FIG. 54B

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser Thr Thr Ala
 Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly ArgLeu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp
 Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu
 Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln
 Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp
 Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val
 Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

FIG. 55A

ATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCAG
 GGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGT
 CCTGCACCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGC
 CGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGA
 GGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTC
 TGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCA
 GAATGGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCT
 GCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATGAC
 CAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG
 TGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACT
 CTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCA
 TGTGGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCA
 AGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGGAGTGTCCA
 TGGCAGGTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGGGGGGAC
 CCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCCACTGTTTCGACAA
 AATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGAC
 CTCAGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGG
 TCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACCAACCAACGACATC
 GCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTGGTG
 CCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTC
 GTGCGCTTCTCATTTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGG
 CGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTGCTCAACGTGCCCCGGCTGATGA
 CCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAAT
 ATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
 CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGG
 GCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCA
 ACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCCAGTACATCGA
 GTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCCAGGAGTCCTCC
 TCGAGCCCCATTTCCC

FIG. 55B

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln Gly Cys
 Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg
 Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys
 Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys
 Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
 Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val
 Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg
 Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro
 Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln
 Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
 Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile
 Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp
 Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu
 Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser
 Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu
 Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg
 Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp
 Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg
 Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met
 Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro

FIG. 56A

ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAAGCCTCATCAC
 CATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTT
 GATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAA
 TTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAAT
 GTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAACCACGAGAAGTTTTTGAA
 AACACTGAAAAGACAACCTGAATTTTGGAAGCAGTATGTTGATGGAGA
 TCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATG
 ACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGA
 ACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAG
 CAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACT
 GAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGT
 GCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCAC
 CCGTGCTGAGGCTGTTTTTCCTGATGTGGACTATGTAAATCCTACTGA
 AGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAGGCACCCAATCATTTA
 ATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAA
 TTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGA
 GGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTGTGCTGCCCACTGTGTT
 GAAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTGCGCAGGTGAACATAATATTGA
 GGAGACAGAACATAACAGAGCAAAAAGCGAAATGTGATTTCGAGCAATT
 ATTCCTCACCACAACCTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGA
 CATTGCCCTTCTGGAACTGGACGAACCTTAGTGCTAAACAGCTACG
 TTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCA
 AATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGCAAGAGTCTTCCACAAA
 GGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGAC
 CGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTACCATCTATAACAACAT
 GTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAG
 ATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTA
 ACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATA
 TGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAA
 AAACAAAGCTCACTTAATGAAAGATGGATTTCCAAGGTTAATTCATT
 GGAATTGAAAATTAACAG

FIG. 56B

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Ser Leu Ile Thr Ile Cys Leu
 Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala
 Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe
 Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu
 Pro Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr
 Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys
 Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn
 Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys
 Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu
 Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser
 Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr
 Val Asn Pro Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Gly Thr Gln Ser
 Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val
 Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr
 Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn
 Val Ile Arg Ala Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn
 His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr
 Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly
 Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln
 Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe
 Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu
 Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr
 Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

FIG. 57A

ATGGATTACTACAGAAAATATGCAGCTATCTTTCTGGTCACATTGTCG
GTGTTTCTGCATGTTCTCCATTCCGCTCCTGATGTGCAGGATTGCCCCA
GAATGCACGCTACAGGAAAACCCATTCTTCTCCCAGCCGGGTGCCCC
AATACTTCAGTGCATGGGCTGCTGCTTCTCTAGAGCATATCCCCTCC
ACTAAGGTCCAAGAAGACGATGTTGGTCCAAAAGAACGTCACCTCAG
AGTCCACTTGCTGTGTAGCTAAATCATATAACAGGGTCCACAGTAATG
GGGGGTTTCAAAGTGGAGAACCACACGGCGTGCCACTGCAGTACTTG
TTATTATCACAAATCTTAAATGTTTTACCAAGTGCTGTCTTGATGACT
GCTGATTTTCTGGAATGGAAAATTAAGTTGTTTAGTGTTTATGGCTTT
GTGAGATAAACTCTCCTTTTCCTTACCATAACCACTTTGACACGCTTC
AAGGATATACTGCAGCTTTACTGCCTTCCTCCTTATCCTACAGTACAA
TCAGCAGTCTAGTTCTTTTCATTGGAATGAATACAGCATTAAAGCTTG
TTCCACTGCAAATAAAGCCTTTTAAATCATC

FIG. 57B

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser Val Phe Leu
His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu
Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe
Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn
Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met
Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His
Lys Ser

FIG. 57C

ATGAAGACACTCCAGTTTTTCTTCCTTTTCTGTTGCTGGAAAGCAATC
 TGCTGCAATAGCTGTGAGCTGACCAACATCACCATTGCAATAGAGAA
 AGAAGAATGTCGTTTCTGCATAAGCATCAACACCACTTGGTGTGCTG
 GCTACTGCTACACCAGGGATCTGGTGTATAAGGACCCAGCCAGGCCC
 AAAATCCAGAAAACATGTACCTTCAAGGAACTGGTATATGAAACAGT
 GAGAGTGCCCCGGCTGTGCTCACCATGCAGATTTCCTTGTATACATACCC
 AGTGGCCACCCAGTGTCACTGTGGCAAGTGTGACAGCGACAGCACTG
 ATTGTACTGTGCGAGGCCTGGGGCCCAGCTACTGCTCCTTTGGTGAAA
 TGAAAGAATAA

FIG. 57D

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile Cys Cys
 Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu Glu Cys Arg Phe
 Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val
 Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val
 Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr
 Pro Val Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
 Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu

FIG. 58A

CCCGGAGCCGGACCGGGGCCACCGCGCCCGCTCTGCTCCGACACCGC
 GCCCCCTGGACAGCCGCCCTCTCCTCCAGGCCCGTGGGGCTGGCCCT
 GCACCGCCGAGCTTCCCGGGATGAGGGCCCCCGGTGTGGTCACCCGG
 CGCGCCCCAGGTCGCTGAGGGACCCCGGCCAGGCGCGGAGATGGGG
 GTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTCG
 CTCCTCTGGGGCTCCCAGTCCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCTGT
 GACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGAGGGCCAAGGAGGCCG
 AGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAAT
 ATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGAT
 GGAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTG
 CTGTCGGAAGCTGTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCC
 CAGCCGTGGGAGCCCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCAGTGG
 CCTTCGCAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGCGAGCCCAGAAGG
 AAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACA
 ATCACTGCTGACACTTTCCGCAAACCTCTTCCGAGTCTACTCCAATTC
 CTCCGGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAG
 GGGACAGATGACCAGGTGTGTCCACCTGGGCATATCCACCACCTCCC
 TCACCAACATTGCTTGTGCCACACCCTCCCCCGCCACTCCTGAACCCC
 GTCGAGGGGGCTCTCAGCTCAGCGCCAGCCTGTCCCATGGACACTCCA
 GTGCCAGCAATGACATCTCAGGGGCCAGAGGAACCTGTCCAGAGAGC
 AACTCTGAGATCTAAGGATGTCACAGGGCCAACCTTGAGGGCCCAGAG
 CAGGAAGCATTTCAGAGAGCAGCTTTAAACTCAGGGACAGAGCCATG
 CTGGGAAGACGCCTGAGCTCACTCGGCACCCTGCAAAATTTGATGCC
 AGGACACGCTTTGGAGGCGATTTACCTGTTTTTCGCACCTACCATCAGG
 GACAGGATGACCTGGAGAACTTAGGTGGCAAGCTGTGACTTCTCCAG
 GTCTCACGGGCATGGGCACTCCCTTGGTGGCAAGAGCCCCCTTGACA
 CCGGGGTGGTGGGAACCATGAAGACAGGATGGGGGGCTGGCCTCTGG
 CTCTCATGGGGTCCAAGTTTTGTGTATTCTTCAACCTCATTGACAAGA
 ACTGAAACCACCAAAAAAAAAAAAAAA

FIG. 58B

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser
Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr
Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys
Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val
Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu
Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Gln Lys Glu Ala Ile
Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe
Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg

FIG. 59A

ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCAT
 CTCTGCACCCGCCCCGCTCGCCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGC
 ATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGA
 GACACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAAT
 GTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGCTGT
 ACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCCCTTG
 ACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGA
 AACTTCCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGA
 ACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAG
 TCCAGGAGTGA

FIG. 59B

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile Ser Ala Pro
 Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu
 Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr
 Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg
 Leu Glu Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro
 Leu Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
 Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu
 Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu

FIG. 60A

ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCTCTGCATCGTTTTG
GGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCATATGTAAAAGAAGCAGA
AAACCTTAAGAAATATTTTAATGCAGGTCATTCAGATGTAGCGGATA
ATGGAACCTCTTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGT
GACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCCTTTTACTTCAAAC
TTTTAAAACTTTAAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGA
CCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAGTTTTTCAATAGCAACAAAAAG
AAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTAACTGACTT
GAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACTCATCCAAGTGATGGCTG
AACTGTGCGCCAGCAGCTAAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCAGAT
GCTGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCCAGTAA

FIG. 60B

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu Gly Ser Leu
Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr
Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser
Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val
Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys
Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln
Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys
Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln

FIG. 61A

CTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCT
 CCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGGA
 TCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCCACCATGATC
 AGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTC
 GCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAA
 TATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTC
 CCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGA
 ATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTC
 CAGGAACCTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCT
 GACCACCGGCAATGGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGG
 ATAAGTTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTC
 ACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACG
 ATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAG
 GAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTT
 AAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAG
 AGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATG
 AAGCGTTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAG
 CTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCT
 TCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAATGAACTCACC
 CACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGC
 CAGCTTACATTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAA
 GAGCGTCCTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGG
 CTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAG
 GCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGC
 TGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCCCCGA
 GGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATAC
 CAAGTCTCCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAAAAT
 AACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCC
 CTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGG

FIG. 61B

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys Cys Leu Val
 Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser
 His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe
 Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe
 Ser Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp
 Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala
 Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln
 Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val
 Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val
 Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys
 Gly Thr Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val
 Phe Ala LeuVal Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val
 Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val Lys Val
 Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser
 Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro
 Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys
 Phe Leu Glu Asn Glu AspArg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile
 Thr Gly Thr Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe
 Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu Ser Lys
 Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala
 Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro
 Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val
 Val Asn Pro Thr Gln Lys

FIG. 62A-1

GCTAACCTAGTGCCTATAGCTAAGGCAGGTACCTGCATCCTTGTTTTT
 GTTTAGTGGATCCTCTATCCTTCAGAGACTCTGGAACCCCTGTGGTCT
 TCTCTTCATCTAATGACCCTGAGGGGATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCA
 GAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGGC
 AGCCTCACAGGTTTGCTTCTACTTCAGGCAGTGTCGTGGGCATCAGGT
 GCCCCGCCCTGCATCCCTAAAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGT
 GTCTGCAATGCCACATACTGTGACTCCTTTGACCCCCCGACCTTTCCT
 GCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGACG
 GATGGAGCTGAGTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGACACAG
 GCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAGAACAGAAGTTCCAGAAAGTGAAG
 GGATTTGGAGGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCC
 CTGTCACCCCCTGCCCAAATTTGCTACTTAAATCGTACTTCTCTGAA
 GAAGGAATCGGATATAACATCATCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGA
 CTTCTCCATCCGCACCTACACCTATGCAGACACCCCTGATGATTTCCA
 GTTGCACAACITCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATAC
 CCCTGATTACCCGAGCCCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCCGTTTCACTCC
 TTGCCAGCCCCTGGACATCACCCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGCG
 GTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAGGGACAGCCCGGAGACATCTACC
 ACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTG
 AGCACAAGTTACAGTTCTGGGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCT
 GCTGGGCTGTTGAGTGGATACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCT
 GAACATCAGCGAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGTCCTACCCTCGCC
 AACAGTACTCACCACAATGTCCGCCTACTCATGCTGGATGACCAACGC
 TTGCTGCTGCCCCACTGGGCAAAGGTGGTACTGACAGACCCAGAAGC
 AGCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTTCT
 GGCTCCAGCCAAAGCCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCCA
 ACACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCTGGG
 AGCAGAGTGTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGC
 CACAGCATCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCCGGCTGGACCGAC
 TGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCCAATTGGGTGCGTAA
 CTTTGTGACAGTCCCATCATTGTAGACATCACCAAGGACACGTTTTTA
 CAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTTCAGCAAGTTCATTCC
 TGAGGGCTCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACC
 TGGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCTG
 TGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTGCCTCTTACCATCAAGGATCCTG
 CTGTGGGCTTCCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTACACCT
 ACCTGTGGCATCGCCAGTGATGGAGCAGATACTCAAGGAGGCACTGG
 GCTCAGCCTGGGCATTAAAGGGACAGAGTCAGCTCACACGCTGTCTG
 TGAATAAGAGGGCACAGCAGGGCCAGTGTGAGCTTACAGCGACGT

FIG. 62A-2

AAGCCCAGGGGCAATGGTTTGGGTGACTCACTTTCCCCTCTAGGTGGT
 GCCCAGGGGCTGGAGGCCCTAGAAAAAGATCAGTAAGCCCCAGTGTG
 CCCCCAGCCCCCATGCTTATGTGAACATGCGCTGTGTGCTGCTTGCTT
 TGGAAACT

FIG. 62B

Met Glu Phe Ser Ser Pro Ser Arg Glu Glu Cys Pro Lys Pro Leu Ser Arg Val Ser
 Ile Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln Ala Val Ser Trp Ala Ser
 Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys Val Cys
 Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro Ala Leu Gly Thr
 Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly
 Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln
 Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu
 Asn Ile Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser
 Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe Ser
 Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu His Asn Phe Ser
 Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu
 Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys
 Thr Asn Gly Ala Val Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile
 Tyr His Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu
 His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
 Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln Arg Asp
 Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr His His Asn Val Arg
 Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val
 Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu
 Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro
 Asn Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser
 Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile Thr Asn
 Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu
 Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr
 Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys
 Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu
 Asp Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn
 Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu Glu
 Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp His Arg Gln

FIG. 63A

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGG
 AGCAGTCTTCGTTTCGCCCAGCCAGGAAATCCATGCCCCGATTCAGAA
 GAGGAGCCAGATCTTACCAAGTGATCTGCAGAGATGAAAAAACGCA
 GATGATATAACCAGCAACATCAGTCATGGCTGCGCCCTGTGCTCAGAA
 GCAACCGGGTGGAATATTGCTGGTGCAACAGTGGCAGGGCACAGTGC
 CACTCAGTGCCTGTCAAAAGTTGCAGCGAGCCAAGGTGTTTCAACGG
 GGGCACCTGCCAGCAGGCCCTGTACTTCTCAGATTTTCGTGTGCCAGTG
 CCCCGAAGGATTTGCTGGGAAGTGCTGTGAAATAGATAACCAGGGCCA
 CGTGCTACGAGGACCAGGGCATCAGCTACAGGGGGCACGTGGAGCAC
 AGCGGAGAGTGGCGCCGAGTGCACCAACTGGAACAGCAGCGCGTTG
 GCCCAGAAGCCCTACAGCGGGCGGAGGCCAGACGCCATCAGGCTGG
 GCCTGGGGAACCACAACACTACTGCAGAAACCCAGATCGAGACTCAA
 GCCCTGGTGCTACGTCTTTAAGGCGGGGAAGTACAGCTCAGAGTTCT
 GCAGCACCCCTGCCTGCTCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGG
 AATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCACAGCCTCACCAGTCGGGTGC
 CTCCTGCCTCCCGTGGAATTCCATGATCCTGATAGGCAAGGTTTACAC
 AGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATAATT
 ACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTG
 AAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTC
 CACCTGCGGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAG
 GAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCT
 TTGCCAAGCACAGGAGGTTCGCCGGGAGAGCGGTTCTGTGCGGGGGC
 ATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCGCCCACTGCTTCCAG
 GAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAACATA
 CCGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAA
 TACATTGTCCATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACAT
 TGCCTGCTGCAGCTGAAATCGGATTCGTCCCGCTGTGCCAGGAGA
 GCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCCGGCGGACCTGCAGCTG
 CCGGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAGGC
 CTTGTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGACT
 GTACCCATCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAACAGAACAG
 TCACCGACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGAGCGGCGGGCCC
 CAGGCAAACCTTGACGACGCCTGCCAGGGCGATTTCGGGAGGCCCCCT
 GGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGGCATCATCAGCT
 GGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGTGTGTACACCAAG
 GTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGACCGTGACC
 AGGAACACCCGACTCCTCAAAGCAAATGAGATCC

FIG. 63B

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly Ala Val
 Phe Val Ser Pro Ser Gln Glu Ile His Ala Arg Phe Arg Arg Gly Ala Arg Ser Tyr
 Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp
 Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly
 Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn
 Gly Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro
 Glu Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu
 Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu Cys
 Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp
 Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp
 Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser
 Thr Pro Ala Cys Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr
 Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met
 Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu
 Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His
 Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser
 Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe
 Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser
 Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser
 Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly
 Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys
 Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu
 Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg
 Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu
 Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys
 Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn
 Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro
 Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
 Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly
 Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg
 Asp Asn Met

FIG. 64A

ATCACTCTCTTTAATCACTACTCACATTAACCTCAACTCCTGCCACAA
 TGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAATTCTTGCACCTG
 TCACAAACAGTGCACCTACTTCAAGTTCGACAAAGAAAACAAAGAAA
 ACACAGCTACAACCTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTG
 AATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCCAACTCACCAGGATGCTCAC
 ATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACAGCTTC
 AGTGTCTAGAAGAAGAAGCTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTGAATTTA
 GCTCAAAGCAAAAACCTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAA
 TATCAACGTAATAGTTCTGGAAGCTAAAGGGATCTGAAACAACATTCA
 TGTGTGAATATGCAGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAAC
 AGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACTTGATAA
 TTAAGTGCTTCCCACTTAAAACATATCAGGCCTTCTATTTATTTATTTA
 AATATTTAAATTTTATATTTATTGTTGAATGTATGGTTGCTACCTATTG
 TAACTATTATTCTTAATCTTAAAGCTATAAATATGGATCTTTTATGAT
 TCTTTTGTAAAGCCCTAGGGGCTCTAAATGGTTTACCTTATTTATCC
 CAAAAATATTTATTATTATGTTGAATGTTAAATATAGTATCTATGTAG
 ATTGGTTAGTAAAGCTATTTAATAAATTTGATAAATATAAAAAAAAAA
 AAACAAAAAAAAAAAAA

FIG. 64B

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu Val Thr Asn
 Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
 Glu Leu Lys Gln Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser
 Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
 Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys
 Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

FIG. 65A-1

ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCT
 GCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAAGTGTCA
 TGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAG
 ATTTCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCCATTCAACACCTCAGTCGT
 GTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTACGGATCACCTTTTCAACAT
 CGCTAAGCCAAGGCCACCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCCTACCATCC
 AGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCT
 TCCCATCCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCT
 TCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAG
 AAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAGCCATACATATGTCTGGCAG
 GTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTAC
 CTACTCATATCTTTCTCATGTGGACCTGGTAAAAGACTTGAATTCAGG
 CCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGGAGTCTGGCCAAGG
 AAAAGACACAGACCTTGCACAAATTTATACTACTTTTTGCTGTATTTG
 ATGAAGGGAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCA
 GGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAATGCACACAG
 TCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACA
 GGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCACTCCTGAA
 GTGCACTCAATATTCCTCGAAGGTCACACATTTCTTGAGGAACCAT
 CGCCAGGCGTCCTTGGAATCTCGCCAATAACTTTCCTTACTGCTCAA
 ACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGTATATCTCTT
 CCCACCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGT
 CCAGAGGAACCCCAACTACGAATGAAAAATAATGAAGAAGCGGAAG
 ACTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTG
 ATGATGACAACTCTCCTTCCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGA
 AGCATCCTAAAACCTTGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGAC
 TGGGACTATGCTCCCTTAGTCCTCGCCCCGATGACAGAAGTTATAAA
 AGTCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAA
 AAAAGTCCGATTTATGGCATAACAGATGAAACCTTTAAGACTCGTG
 AAGCTATTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGG
 AAGTTGGAGACACACTGTTGATTATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGA
 CCATATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGTAT
 TCAAGGAGATTACCAAAAGGTGTAAAACATTTGAAGGATTTTCCAAT
 TCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATAAATGGACAGTGACTGTAGAAG
 ATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTA
 GTTTTCGTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTC
 TCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAGAGGAAACCAGATA
 ATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAAC
 CGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAACGCTTTCTCCCAATCCA
 GCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCAT
 GCACAGCATCAATGGCTATGTTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGTTTG
 TTTGCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGA
 CTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGATATACCTTCAAACACAAAAT

FIG. 65A-2

GGTCTATGAAGACACACTCACCTATTCCCATTCTCAGGAGAAACTGT
 CTTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACA
 ACTCAGACTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCT
 AGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTATTACGAGGACAGTTATGAAGA
 TATTTTCAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAA
 GCTTCTCCCAGAATTCAAGACACCGTAGCACTAGGCAAAAGCAATTT
 AATGCCACCACAATTCCAGAAAATGACATAGAGAAGACTGACCCTTG
 GTTGCACACAGAACACCTATGCCTAAAATACAAAATGTCTCCTCTA
 GTGATTTGTTGATGCTCTTGCGACAGAGTCCTACTCCACATGGGCTAT
 CCTTATCTGATCTCCAAGAAGCCAAATATGAGACTTTTTCTGATGATC
 CATCACCTGGAGCAATAGACAGTAATAACAGCCTGTCTGAAATGACA
 CACTTCAGGCCACAGCTCCATCACAGTGGGGACATGGTATTTACCCC
 TGAGTCAGGCCTCCAATTAAGATTAAATGAGAAACTGGGGACAACCTG
 CAGCAACAGAGTTGAAGAAACTTGATTTCAAAGTTTCTAGTACATCA
 AATAATCTGATTTCAACAATTCCATCAGACAATTTGGCAGCAGGTACT
 GATAATACAAGTTCCTTAGGACCCCCAAGTATGCCAGTTCATTATGAT
 AGTCAATTAGATACCACTCTATTTGGCAAAAAGTCATCTCCCCTTACT
 GAGTCTGGTGGACCTCTGAGCTTGAGTGAAGAAAATAATGATTCAAA
 GTTGTTAGAATCAGGTTTAATGAATAGCCAAGAAAGTTCATGGGGAA
 AAAATGTATCGTCAACAGAGAGTGGTAGGTTATTTAAAGGGGAAAAGA
 GCTCATGGACCTGCTTTGTTGACTAAAGATAATGCCTTATTCAAAGTT
 AGCATCTCTTTGTTAAAGACAAACAAAACCTTCCAATAATTCAGCAACT
 AATAGAAAGACTCACATTGATGGCCCATCATTATTAATTGAGAATAG
 TCCATCAGTCTGGCAAAATATATTAGAAAGTGACACTGAGTTTAAAA
 AAGTGACACCTTTGATTCATGACAGAATGCTTATGGACAAAAATGCT
 ACAGCTTTGAGGCTAAATCATATGTCAAATAAAACTACTTCATCAAA
 AAACATGGAAATGGTCCAACAGAAAAAAGAGGGCCCCATTCCACCA
 GATGCACAAAATCCAGATATGTCGTTCTTTAAGATGCTATTCTTGCCA
 GAATCAGCAAGGTGGATACAAAGGACTCATGGAAAGAACTCTCTGAA
 CTCTGGGCAAGGCCCCAGTCCAAAGCAATTAGTATCCTTAGGACCAG
 AAAAATCTGTGGAAGGTCAGAATTTCTTGTCTGAGAAAAACAAAGTG
 GTAGTAGGAAAGGGTGAATTTACAAAGGACGTAGGACTCAAAGAGA
 TGGTTTTTCCAAGCAGCAGAAACCTATTTCTTACTAACTTGGATAATT
 TACATGAAAATAATACACACAATCAAGAAAAAATAATTCAGGAAGA
 AATAGAAAAGAAGGAAACATTAATCCAAGAGAATGTAGTTTTGCCTC
 AGATACATACAGTGACTGGCACTAAGAATTTTCATGAAGAACCTTTTC
 TTAAGTACTGAGCACTAGGCAAAATGTAGAAGGTTTCATATGACGGGGCATA
 TGCTCCAGTACTTCAAGATTTTGGTTCATTAAATGATTCAACAAATAG
 AACAAAGAAACACACAGCTCATTTCTCAAAAAAAGGGGAGGAAGAA
 AACTTGGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAGCAAATTGTAGAGAAATAT
 GCATGCACCACAAGGAATATCTCCTAATACAAGCCAGCAGAATTTTG
 TCACGCAACGTAGTAAGAGAGCTTTGAAACAATTCAGACTCCCACTA

FIG. 65A-3

GAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAATTGTGGATGACACCTCAAC
 CCAGTGGTCCAAAAACATGAAACATTTGACCCCGAGCACCTCACAC
 AGATAGACTACAATGAGAAGGAGAAAGGGGCCATTACTCAGTCTCCC
 TTATCAGATTGCCTTACGAGGAGTCATAGCATCCCTCAAGCAAATAGA
 TCTCCATTACCCATTGCAAAGGTATCATCATTTCCATCTATTAGACCTA
 TATATCTGACCAGGGTCCTATTCCAAGACAACCTCTTCTCATCTTCCAG
 CAGCATCTTATAGAAAGAAAGATTCTGGGGTCCAAGAAAGCAGTCAT
 TTCTTACAAGGAGCCAAAAAAAATAACCTTTCTTTAGCCATTCTAACC
 TTGGAGATGACTGGTGATCAAAGAGAGGTTGGCTCCCTGGGGACAAG
 TGCCACAAATTCAGTCACATACAAGAAAGTTGAGAACACTGTTCTCCC
 GAAACCAGACTTGCCCAAAACATCTGGCAAAGTTGAATTGCTTCCAA
 AAGTTCACATTTATCAGAAGGACCTATTCCTACGGAACTAGCAATG
 GGTCTCCTGGCCATCTGGATCTCGTGGAAGGGAGCCTTCTTCAGGGAA
 CAGAGGGAGCGATTAAAGTGGAATGAAGCAAACAGACCTGGAAAAGT
 TCCCTTTCTGAGAGTAGCAACAGAAAGCTCTGCAAAGACTCCCTCCAA
 GCTATTGGATCCTCTTGCTTGGGATAACCACTATGGTACTCAGATACC
 AAAAGAAGAGTGGAATCCCAAGAGAAGTCACCAGAAAAAACAGCT
 TTTAAGAAAAAGGATACCATTTTGTCCCTGAACGCTTGTGAAAGCAAT
 CATGCAATAGCAGCAATAAATGAGGGACAAAATAAGCCCGAAATAG
 AAGTCACCTGGGCAAAGCAAGGTAGGACTGAAAGGCTGTGCTCTCAA
 AACCCACCAGTCTTGAAACGCCATCAACGGGAAATAACTCGTACTAC
 TCTTCAGTCAGATCAAGAGGAAATTGACTATGATGATACCATATCAGT
 TGAAATGAAGAAGGAAGATTTTGACATTTATGATGAGGATGAAAATC
 AGAGCCCCCGCAGCTTTCAAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTG
 CAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCCACATGTT
 CTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGT
 TGTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGT
 GGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCCTGGGGCCATATATAAGAGC
 AGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACCTTTCAGAAATCAGGCCTCTC
 GTCCCTATTCCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATGAGGAAGATCAGAG
 GCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAACTTTGTCAAGCCTAATGAAACCA
 AAACCTTACTTTTGGAAAGTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGAT
 GAGTTTGACTGCAAAGCCTGGGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGAA
 AAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTCTGCCACACT
 AACACACTGAACCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATT
 TGCTCTGTTTTTACCATCTTTGATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACT
 GAAAATATGGAAAGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGA
 AGATCCCCTTTTAAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTA
 CATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGA
 TTCGATGGTATCTGCTCAGCATGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCT
 ATTCATTTCAAGTGACATGTGTTCACTGTACGAAAAAAAGAGGAGTA
 TAAAATGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTTGAGACAGTGGA

FIG. 65A-4

AATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGCGGGTGGAATGCCTTATTGG
 CGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTTCTGGTGTACAGCAA
 TAAGTGTGAGACTCCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTT
 TCAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGGCCCCAAAGCTGG
 CCAGACTTCATTATTCCGGATCAATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAG
 CCTTTTCTTGGATCAAGGTGGATCTGTTGGCACCAATGATTATTCAC
 GGCATCAAGACCCAGGGTGCCCGTCAGAAGTCTCCAGCCTCTACAT
 CTCTCAGTTTATCATCATGTATAGTCTTGATGGGAAGAAGTGGCAGA
 CTTATCGAGGAAATTCCTGGAACCTTAATGGTCTTCTTTGGCAATG
 TGGATTCACTCTGGGATAAAACACAATATTTTAAACCCTCCAATTATTG
 CTCGATACATCCGTTTGCACCCAACCTCATTATAGCATTTCGCAGCACTC
 TTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATTAAATAGTTGCAGCATGCCAT
 TGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTTCA
 TCCTACTTTACCAATATGTTTGCCACCTGGTCTCCTTCAAAGCTCGA
 CTTACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAA
 TCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCA
 CAGGAGTAACTACTCAGGGAGTAAATCTCTGCTTACCAGCATGTAT
 GTGAAGGAGTTCCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGAC
 TCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAGGTTTTTCAGGGAAATCAAGA
 CTCCTTCACACCTGTGGTGAACCTCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCG
 CTACCTTCGAATTCACCCCCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAG
 GATGGAGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACCTCTACTGAGGGTGGC
 CACTGCAGCACCTGCCACTGCCGTCACCTCTCCCTCCTCAGCTCCAGG
 GCAGTGTCCCTCCCTGGCTTGCCCTTCTACCTTTGTGCTAAATCCTAGC
 AGACACTGCCTTGAAGCCTCCTGAATTAACCTATCATCAGTCCTGCATT
 TCTTTGGTGGGGGGGCCAGGAGGGTGCATCCAATTTAACTTAACTCTTA
 CCTATTTTCTGCAGCTGCTCCCAGATTACTCCTTCCTTCCAATATAACT
 AGGCAAAAAGAAGTGAGGAGAAACCTGCATGAAAGCATTCTTCCCTG
 AAAAGTTAGGCCTCTCAGAGTCACCACTTCCTCTGTTGTAGAAAAACT
 ATGTGATGAAACTTTGAAAAAGATATTTATGATGTTAACATTTTCAGGT
 TAAGCCTCATACGTTTAAAAATAAACTCTCAGTTGTTTATTATCCTGA
 TCAAGCATGGAACAAAGCATGTTTCAGGATCAGATCAATACAATCTT
 GGAGTCAAAGGCAAATCATTTGGACAATCTGCAAAATGGAGAGAA
 TACAATAACTACTACAGTAAAGTCTGTTTCTGCTTCCTTACACATAGA
 TATAATTATGTTATTTAGTCATTATGAGGGGCACATTCTTATCTCCAA
 AACTAGCATTCTTAAACTGAGAATTATAGATGGGGTTCAAGAATCCC
 TAAGTCCCCTGAAATTATATAAGGCATTCTGTATAAATGCAAATGTGC
 ATTTTTCTGACGAGTGTCCATAGATATAAAGCCATTTGGTCTTAATTCT
 GACCAATAAAAAAATAAGTCAGGAGGATGCAATTGTTGAAAGCTTTG
 AAATAAAATAACAATGTCTTCTTGAAATTTGTGATGGCCAAGAAAGA
 AAATGATGA

FIG. 65B-1

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe Cys Phe Ser
 Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr Met Gln Ser
 Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe
 Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His
 Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile
 Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro
 Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr
 Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly
 Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro
 Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn
 Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys
 Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser
 Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg
 Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu
 Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro
 Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln
 Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp
 Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu
 Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn
 Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val
 Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys
 Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr
 Ala Pro Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro
 Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
 Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg
 Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile
 Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg
 Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser
 Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn
 Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg
 Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln
 Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys
 His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val
 Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe
 Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr
 Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn
 Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Arg Ser Thr Arg Gln
 Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp

FIG. 65B-2

Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu
 Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu
 Ala Lys Tyr Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
 Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly Thr Thr
 Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu
 Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu
 Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly
 Lys Lys Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn
 Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp Gly
 Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys Arg Ala His Gly
 Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu
 Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp
 Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser
 Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser
 Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala
 Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg
 Trp Ile Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro
 Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe Leu
 Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly
 Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp
 Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile
 Glu Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr
 Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg Gln
 Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg
 Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys
 Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val
 Glu Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe
 Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu Glu
 Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn
 Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu
 Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile
 Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser Ile
 Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro
 Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu
 Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr
 Gly Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr
 Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr Ser
 Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro
 Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu

FIG. 65B-3

Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys
 Val Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu
 Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu Glu
 Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile
 Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly
 Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg
 Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg
 Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
 Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg
 Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp
 Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val
 Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro
 Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg
 Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro
 Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu
 Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr
 Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu
 Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
 Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
 Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr
 Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro
 Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly
 Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys
 Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr
 Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu
 His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr
 Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln
 Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala
 Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile
 Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
 Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly
 Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
 Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr
 His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn
 Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr
 Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu
 His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
 Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln
 Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser
 Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
 Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu
 Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His

FIG.65B-4

Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu
Ala Gln Asp Leu Tyr

FIG. 66A

TCCACCTGTCCCCGCAGCGCCGGCTCGCGCCCTCCTGCCGCAGCCACC
 GAGCCGCCGTCTAGCGCCCCGACCTCGCCACCATGAGAGCCCTGCTG
 GCGCGCCTGCTTCTCTGCGTCCTGGTTCGTGAGCGACTCCAAAGGCAGC
 AATGAACTTCATCAAGTTCCATCGAACTGTGACTGTCTAAATGGAGGA
 ACATGTGTGTCCAACAAGTACTTCTCCAACATTCACTGGTGCAACTGC
 CCAAAGAAATTCGGAGGGCAGCACTGTGAAATAGATAAGTCAAAAAC
 CTGCTATGAGGGGAATGGTCACTTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTG
 ACACCATGGGCGCGCCCTGCCTGCCCTGGAACCTTGCCACTGTCCTTC
 AGCAAACGTACCATGCCCACAGATCTGATGCTCTTCAGCTGGGCCTGG
 GGAAACATAATTACTGCAGGAACCCAGACAACCGGAGGCGACCCTGG
 TGCTATGTGCAGGTGGGCCTAAAGCCGCTTGTCCAAGAGTGCATGGT
 GCATGACTGCGCAGATGGAAAAAAGCCCTCCTCTCCTCCAGAAGAAT
 TAAAATTTCAGTGTGGCCAAAAGACTCTGAGGCCCCCGCTTTAAGATTA
 TTGGGGGAGAATTCACCACCATCGAGAACCAGCCCTGGTTTGCGGCC
 ATCTACAGGAGGCACCGGGGGGGGCTCTGTACCTACGTGTGTGGAGG
 CAGCCTCATCAGCCCTTGCTGGGTGATCAGCGCCACACACTGCTTCAT
 TGATTACCCAAAGAAGGAGGACTACATCGTCTACCTGGGTGCTCAA
 GGCTTAACCTCCAACACGCAAGGGGAGATGAAGTTTGAGGTGGAAAAC
 CTCATCCTACACAAGGACTACAGCGCTGACACGCTTGCTCACCACAAC
 GACATTGCCTTGCTGAAGATCCGTTCCAAGGAGGGCAGGTGTGCGCA
 GCCATCCCGGACTATACAGACCATCTGCCTGCCCTCGATGTATAACGA
 TCCCCAGTTTGGCACAAGCTGTGAGATCACTGGCTTTGGAAAAGAGA
 ATTCTACCGACTATCTCTATCCGGAGCAGCTGAAGATGACTGTTGTGA
 AGCTGATTTCCCACCGGGAGTGTCAGCAGCCCCACTACTACGGCTCTG
 AAGTCACCACCAAAATGCTGTGTGCTGCTGACCCACAGTGGAAAACA
 GATTCCTGCCAGGGAGACTCAGGGGGACCCCTCGTCTGTTCCCTCCAA
 GGCCGCATGACTTTGACTGGAATTGTGAGCTGGGGCCGTGGATGTGC
 CCTGAAGGACAAGCCAGGCGTCTACACGAGAGTCTCACACTTCTTAC
 CCTGGATCCGCAGTCACACCAAGGAAGAGAATGGCCTGGCCCTCTGA
 GGGTCCCCAGGGAGGAAACGGGCACCACCCGCTTTCTTGCTGGTTGTC
 ATTTTTCAGTAGAGTCATCTCCATCAGCTGTAAGAAGAGACTGGGA
 AGAT

FIG. 66B

Met Arg Ala Leu Leu Ala Arg Leu Leu Leu Cys Val Leu Val Val Ser Asp Ser
 Lys Gly Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp Cys Leu Asn Gly
 Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys
 Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn
 Gly His Phe Tyr Arg Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro
 Trp Asn Ser Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu
 Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg Arg Arg
 Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln Glu Cys Met Val His
 Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln Cys
 Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile
 Glu Asn Gln Pro Trp Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr
 Tyr Val Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr His Cys
 Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu Gly Arg Ser Arg Leu
 Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu Val Glu Asn Leu Ile Leu His Lys
 Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala His His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg
 Ser Lys Glu Gly Arg Cys Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro
 Ser Met Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys
 Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val Val Lys
 Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly Ser Glu Val Thr Thr
 Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp
 Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val
 Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser
 His Phe Leu Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu

FIG.67A

TCCTGCACAGGCAGTGCCTTGAAGTGCTTCTTCAGAGACCTTTCTTCA
 TAGACTACTTTTTTTTTCTTTAAGCAGCAAAAGGAGAAAATTGTCATCA
 AGGATATTCCAGATTCTTGACAGCATTCTCGTCATCTCTGAGGACATC
 ACCATCATCTCAGGATGAGGGGCGATGAAGCTGCTGGGGGGCGCTGCTG
 GCACTGGCGGGCCCTACTGCAGGGGGGCCGTGTCCCTGAAGATCGCAGC
 CTTCAACATCCAGACATTTGGGGAGACCAAGATGTCCAATGCCACCCT
 CGTCAGCTACATTGTGCAGATCCTGAGCCGCTATGACATCGCCCTGGT
 CCAGGAGGTCAGAGACAGCCACCTGACTGCCGTGGGGAAGCTGCTGG
 ACAACCTCAATCAGGATGCACCAGACACCTATCACTACGTGGTCAGT
 GAGCCACTGGGACGGAACAGCTATAAGGAGCGCTACCTGTTTCGTGTA
 CAGGCCTGACCAGGTGTCTGCGGTGGACAGCTACTACTACGATGATG
 GCTGCGAGCCCTGCGGGAACGACACCTTCAACCGAGAGCCAGCCATT
 GTCAGGTTCTTCTCCCGGTTACAGAGGTCAGGGAGTTTGCCATTGTT
 CCCCTGCATGCGGCCCCGGGGGACGCAGTAGCCGAGATCGACGCTCT
 CTATGACGTCTACCTGGATGTCCAAGAGAAATGGGGCTTGGAGGACG
 TCATGTTGATGGGCGACTTCAATGCGGGCTGCAGCTATGTGAGACCCT
 CCCAGTGGTCATCCATCCGCCTGTGGACAAGCCCCACCTTCCAGTGGC
 TGATCCCCGACAGCGCTGACACCACAGCTACACCCACGCACTGTGCCT
 ATGACAGGATCGTGGTTGCAGGGATGCTGCTCCGAGGCGCCGTTGTTT
 CCGACTCGGCTCTTCCCTTTAACTTCCAGGCTGCCTATGGCCTGAGTG
 ACCAACTGGCCCAAGCCATCAGTGACCACTATCCAGTGGAGGTGATG
 CTGAAGTGAGCAGCCCCCTCCCCACACCAGTTGAACTGCAG

FIG. 67B

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Gln
 Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys
 Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile
 Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu
 Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro
 Leu Gly Arg Asn Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln
 Val Ser Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn
 Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe Thr Glu Val
 Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile
 Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp
 Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln
 Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser
 Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly
 Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn Phe Gln
 Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser Asp His Tyr Pro Val
 Glu Val Met Leu Lys

FIG. 68A

GCTGCATCAGAAGAGGCCATCAAGCACATCACTGTCCTTCTGCCATGG
 CCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTGGG
 GACCTGACCCAGCCGCAGCCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCAC
 ACCTGGTGGAAGCTCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCT
 ACACACCCAAGACCCGCCGGGAGGCAGAGGACCTGCAGGTGGGGCA
 GGTGGAGCTGGGCGGGGGGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTGG
 CCCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGT
 ACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAGACG
 CAGCCCGCAGGCAGCCCCCACC CGCCGCCTCCTGCACCGAGAGAGA
 TGGAATAAAGCCCTTGAACCAGC

FIG. 68B

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Trp Gly
 Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val
 Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile
 Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

FIG. 69A

ATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGACAAGGCATGGGGACGAATCT
 TTCTGTTCCCAATCCTCTGGGATTCTTTCCCGATCACCAGTTGGACCCT
 GCGTTCGGAGCCAACTCAAACAATCCAGATTGGGACTTCAACCCCAA
 CAAGGATCACTGGCCAGAGGCAATCAAGGTAGGAGCGGGAGACTTC
 GGGCCAGGGTTACCCCCACCACACGGCGGTCTTTTGGGGTGGAGCCC
 TCAGGCTCAGGGCATATTGACAACAGTGCCAGCAGCGCCTCCTCCTG
 TTTCCACCAATCGGCAGTCAGGAAGACAGCCTACTCCCATCTCTCCAC
 CTCTAAGAGACAGTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAACCTCCACAACA
 TTCCACCAAGCTCTGCTAGATCCCAGAGTGAGGGGGCCTATATTTTCCT
 GCTGGTGGCTCCAGTTCCGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACTACTGTC
 TCACCCATATCGTCAATCTTCTCGAGGACTGGGGACCCTGCACCGAAC
 ATGGAGAGCACAACATCAGGATTCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACA
 GGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGTCT
 AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGGAGCACCCACGTG
 TCCTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTC
 TTGTCCTCCAATTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
 ATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTC
 TTCTGGACTACCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTACTTCCAGGAA
 CATCAACTACCAGCACGGGACCATGCAAGACCTGCACGATTCCCTGCT
 CAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCTTGTTGCTGTACAAAACCTTCGGAC
 GGAAACTGCACTTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGCAAGA
 TTCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTA
 GTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGCAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTT
 CAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAACATCT
 TGAGTCCCTTTTTACCTCTATTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATAC
 ATTTGA

FIG. 69B

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro
 Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn
 Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Ile
 Lys Val Gly Ala Gly Asp Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu
 Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro
 Val Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg
 Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu
 Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val
 Asn Pro Val Pro Thr Thr Val Ser Pro Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr Gly Asp
 Pro Ala Pro Asn Met Glu Ser Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu
 Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser
 Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser
 Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr
 Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu
 Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu
 Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala
 Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn
 Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp
 Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Ala
 Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro
 Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu
 Trp Val Tyr Ile

FIG. 70A

CGAACCCTCAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCTAGCTGCAATGGCTA
 CAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGC
 CCTGGCTTCAAGAGGGCAGTGCCTTCCCAACCATTCCTTATCCAGGC
 CTTTGTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCT
 TTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAG
 AAGTATTCATTCTGTCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGTTTCTCAGAG
 TCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAA
 CCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGGCTGGA
 GCGCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGG
 CGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAG
 GCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACT
 GGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAAACTCACA
 CAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAG
 GAAGGACATGGCAAGGTTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCG
 CTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGCTGCCCCGGGTGGCATCCCTG
 TGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGT
 GCCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATC

FIG. 70B

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys Leu
 Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Pro Phe Asp
 Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln
 Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
 Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr
 Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala
 Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu
 Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr
 Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly
 Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile
 Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

FIG. 71A

ATGGCGCCCGTCGCCGTCTGGGCGCGCTGGCCGTCGGACTGGAGCT
 CTGGGCTGCGGCGCACGCCTTGCCCGCCCAGGTGGCATTACACCCTA
 CGCCCCGGAGCCCGGGAGCACATGCCGGCTCAGAGAATACTATGACC
 AGACAGCTCAGATGTGCTGCAGCAAATGCTCGCCGGGGCCAACATGCA
 AAAGTCTTCTGTACCAAGACCTCGGACACCGTGTGTGACTCCTGTGAG
 GACAGCACATACACCCAGCTCTGGAAGTGGGTTCGCGAGTGCTTGAG
 CTGTGGCTCCCGCTGTAGCTCTGACCAGGTGGAACTCAAGCCTGCAC
 TCGGGAACAGAACCGCATCTGCACCTGCAGGCCCGGCTGGTACTGCG
 CGCTGAGCAAGCAGGAGGGGTGCCGGCTGTGCGCGCCGCTGCGCAAG
 TGCCGCCCCGGGCTTCGGCGTGGCCAGACCAGGAACTGAAACATCAGA
 CGTGGTGTGCAAGCCCTGTGCCCCGGGGACGTTCTCCAACACGACTTC
 ATCCACGGATATTTGCAGGCCCCACCAGATCTGTAACGTGGTGGCCAT
 CCCTGGGAATGCAAGCATGGATGCAGTCTGCACGTCCACGTCCCCCA
 CCCGGAGTATGGCCCCAGGGGCAGTACACTTACCCAGCCAGTGTC
 ACACGATCCCAACACACGCAGCCAACTCCAGAACCCAGCACTGCTCC
 AAGCACCTCCTTCCTGCTCCCAATGGGCCCCAGCCCCCAGCTGAAGG
 GAGCACTGGCGACTTCGCTCTTCCAGTTGGACTGATTGTGGGTGTGAC
 AGCCTTGGGTCTACTAATAATAGGAGTGGTGAAGTGTGTCATCATGAC
 CCAGGTGAAAAAGAAGCCCTTGTGCCTGCAGAGAGAAGCCAAGGTGC
 CTCACTTGCCCTGCCGATAAGGCCCGGGGTACACAGGGCCCCGAGCAG
 CAGCACCTGCTGATCACAGCGCCGAGCTCCAGCAGCAGCTCCCTGGA
 GAGCTCGGCCAGTGCGTTGGACAGAAGGGCGCCCACTCGGAACCAGC
 CACAGGCACCAGGCGTGGAGGCCAGTGGGGCCGGGGAGGCCCGGGC
 CAGCACCGGGAGCTCAGATTCTTCCCCTGGTGGCCATGGGACCCAGG
 TCAATGTCACCTGCATCGTGAACGTCTGTAGCAGCTCTGACCACAGCT
 CACAGTGCTCCTCCCAAGCCAGCTCCACAATGGGAGACACAGATTCC
 AGCCCCCTCGGAGTCCCCGAAGGACGAGCAGGTCCCCTTCTCCAAGGA
 GGAATGTGCCTTTCGGTCACAGCTGGAGACGCCAGAGACCCTGCTGG
 GGAGCACCGAAGAGAAGCCCCCTGCCCTTGGAGTGCCTGATGCTGGG
 ATGAAGCCCAGTTAACCAGGCCGGTGTGGGCTGTGTCGTAGCCAAGG
 TGGGCTGAGCCCTGGCAGGATGACCCTGCGAAGGGGGCCCTGGTCCTT
 CCAGGC

FIG. 71B

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu Trp Ala Ala
 Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
 Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys
 Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys
 Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys
 Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln
 Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
 Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr
 Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val
 Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr
 Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln
 His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro
 Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly
 Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val
 Ile Met Thr Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro
 His Leu Pro Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
 Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu Asp Arg
 Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly
 Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln
 Val Asn Val Thr Cys Ile Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys
 Ser Ser Gln Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
 Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser Gln Leu Glu
 Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro Leu Gly Val Pro
 Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser

FIG. 72A

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

FIG. 72B

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr
 Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

FIG. 73A

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr
 Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp
 Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp
 Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
 Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

FIG. 73B

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

FIG. 74A

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGA
 GAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGTTCGTTGGCTCAAGC
 ATCCACTGGTATCAGCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATA
 AAGTATGCTTCTGAGTCTATGTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTGGC
 AGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACACTGTGGAGTCT
 GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTCATAGCTGGCCATTC
 ACGTTCGGCTCGGGGACAAATTTGGAAGTAAAAGAAGTGAAGCTTGA
 GGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCT
 CCTGTGTTGCCTCTGGATTCAATTTTCAGTAACCACTGGATGAACTGGG
 TCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGA
 TCAAAATCTATTAATTCTGCAACACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGG
 AGGTTCAACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTGCTGTCTACCTGCAA
 ATGACCGACTTAAGAAGTGAAGACACTGGCGTTTATTACTGTTCCAGG
 AATTACTACGGTAGTACCTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTC
 ACAGTCTCC

FIG. 74B

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val
 Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln
 Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly
 Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
 Thr Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro
 Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
 Phe Ile Phe Ser Asn His Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
 Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Ile Asn Ser Ala Thr His Tyr Ala Glu
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ala Val Tyr
 LeuGln Met Thr Asp Leu Arg Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
 Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

FIG. 75A

ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTC
 GGTTCCACTGGTGACGTCAGGCGAGGGCCCCGGAGCCTGCGGGGCAG
 GGACGCGCCAGCCCCACGCCCTGCGTCCCGGCCGAGTGCTTCGACC
 TGCTGGTCCGCCACTGCGTGGCCTGCGGGCTCCTGCGCACGCCGCGGC
 CGAAACCGGCCGGGGCCAGCAGCCCTGCGCCAGGACGGCGCTGCAG
 CCGCAGGAGTCGGTGGGCGCGGGGGCCGGCGAGGCGGGCGGTGAC
 AACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
 CCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC
 TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
 CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
 CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA
 TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
 GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
 CCCTGTCTCCCGGGAAATGA

FIG. 75B

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser
 Thr Gly Asp Val Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala
 Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys Val Ala
 Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro
 Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Val
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

FIG. 76

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val
Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Asp Gly Ile Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

FIG. 77

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly Pro Gly Thr Ser Val Arg
 Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys
 Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly
 Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
 Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 Cys Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
 Leu Val Thr Val Ser Ala

FIG. 78

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu
Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys

FIG. 79

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
 Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly
 Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser
 Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 Phe Cys Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

FIG. 80

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu
Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

FIG. 81

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
 Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly
 Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser
 Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 Phe Cys Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

FIG. 82A

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCA
 GTCATAATGTCCAGAGGGCAAATTGTTCTCTCCCAGTCTCCAGCAATC
 CTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAG
 CTCAAGTGTAAGTTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGATCCTC
 CCCCAAACCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCC
 TGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAAT
 CAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGT
 GGACTAGTAACCCACCCACGTTCTGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATC
 AAA

FIG. 82B

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser
 Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu
 Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln
 Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn
 Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

FIG. 83A

ATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTACGCGTG
 TCCTGTCCCAGGTACAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAG
 CCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTT
 ACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGTCGGGGCCT
 GGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCCTACAA
 TCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCA
 GCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCG
 GTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTC
 AATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCA

FIG. 83B

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg Val Leu Ser
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys
 Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp
 Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ala

FIG. 84A

CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTG
 ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG
 AGCTGGGTACGTCCTCACATTCAGTGATCAGCACTGAACACAGACCC
 GTCGACATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTA
 CGCGTGTCGCTAGCACCAAGGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT
 CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
 AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGC
 CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG
 ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
 CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA
 AGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
 TGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC
 CTCTTCCCCCCTAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
 CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
 CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
 GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGACTACAA
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
 TCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTG
 CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAGGAACCAGGTACGCCTGACCTG
 CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
 TAAATGAGGATCCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTG
 ACAACATGCGGCCGTGATATCTACGTATGATCAGCCTCGACTGTGCCT
 TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGA
 CCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA
 TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGG
 TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA
 TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTCGACAGC
 GCTGGATCTCCCGATCCCCAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATA
 ATGAGAAAAAAGGAAAATTAATTTTAACACCAATTCAGTAGTTGAT
 TGAGCAAATGCGTTGCCAAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTTCTCT
 GCACAGATAAGGACAAACATTATTCAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAG
 ACTCCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTT
 GTCATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGGTAAGGGCC
 AATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCAT
 ATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACATAG
 TTGTGTTGGGAGCTTGGATAGCTTGGACAGCTCAGG

FIG. 84B

CAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTG
 ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG
 AGCTGGGTACGTCCTCACATTCACTGATCAGCACTGAACACAGACCC
 GTCGACATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTA
 CGCGTGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT
 CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
 AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGC
 CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG
 ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
 CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA
 AGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
 TGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC
 CTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
 CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
 CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
 GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGACTACAA
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
 TCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
 CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAGGAACCAGGTGAGCCTGACCTG
 CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
 TAAATGAGGATCCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCGTG
 ACAACATGCGGCCGTGATATCTACGTATGATCAGCCTCGACTGTGCCT
 TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCCTTCCTTGA
 CCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA
 TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGG
 TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA
 TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTCGACAGC
 GCTGGATCTCCCGATCCCCAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATA
 ATGAGAAAAAAAGGAAAATTAATTTTAACACCAATTCAGTAGTTGAT
 TGAGCAAATGCGTTGCCAAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTTCTCT
 GCACAGATAAGGACAAACATTATTCAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAG
 ACTCCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTT
 GTCATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGGTAAGGGCC
 AATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCAT
 ATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACATAG
 TTGTGTTGGGAGCTTGGATAGCTTGGACAGCTCAGG

FIG. 84C

GCTGCGATTTTCGCGCCAAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTG
 GTAGGATTTTATCCCCGCTGCCATCATGGTTCGACCATTGAACCTGCAT
 CGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTAC
 CCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACC
 ACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAG
 GAAAACCTGGTTCTCCATTCTGAGAACAAATCGACCTTTAAAGGACA
 GAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCACGAGGA
 GCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGACTTATTGAA
 CAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGG
 CAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTTAGACT
 CTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCC
 AGAAATTGATTTGGGGAAATATAAACTTCTCCCAGAATACCCAGGCG
 TCCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAA
 GTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAGTTCTCTGC
 TCCCTCCTAAAGTCATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTG
 GCTTTAGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
 TTGCCCCCTCCCCCGTGCCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC
 TGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
 GTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGG
 AGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
 ATGGAACCAGCTGGGGCTCGAGCTACTAGCTTTGCTTCTCAATTTCTT
 ATTTGCATAATGAGAAAAAAAGGAAAATTAATTTTAACACCAATTCA
 GTAGTTGATTGAGCAAATGCGTTGCCAAAAGGATGCTTTAGAGACA
 GTGTTCTCTGCACAGATAAGGACAAACATTATTCAGAGGGAGTACCC
 AGAGCTGAGACTCCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGA
 AATATGCTTGTCATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGG
 TAAGGGCCAATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGG
 CAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTC
 TGACATAGTTGTGTTGGGAGCTTGGATCGATCCTCTATGGTTGAACAA
 GATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTC
 GGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGT
 GTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGA
 CCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTAT
 CGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTG
 TCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGG
 CAGGATCTCCTGTCTCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATC
 ATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGC
 CCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCG
 GATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATC
 AGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATG
 CCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCG

FIG. 84D

AATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGC
 CGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCG
 TGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGT
 GCTTTACGGTATCGCCGCTTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATC
 GCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGAC
 CGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCG
 CCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCG
 GCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCC
 ACCCCAACCTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATA
 GCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTT
 GTGGTTTGTCCAAACTCATCAATCTATCTTATCATGTCTGGATCGCGG
 CCGCGATCCCGTCGAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC
 TGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACACACATACGAGCCGG
 AGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAC
 ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTC
 GTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTT
 TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC
 GGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA
 TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA
 GCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGC
 TGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATC
 GACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAC
 CAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACC
 CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTG
 GCGCTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTC
 GTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGAC
 CGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
 CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAG
 AGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTA
 ACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
 AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAA
 CAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATT
 ACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC
 GGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGG
 TCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
 AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTG
 ACAGTIACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTC
 TATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTAC
 GATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGC
 GAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCA
 GCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTC
 CATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCG

FIG. 84E

CAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGG
 TGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAAC
 GATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT
 AGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTG
 TTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
 CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCAT
 TCTGAGAATAGTGTATGCGGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAA
 TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATC
 ATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTG
 TTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCA
 GCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGG
 CAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAA
 TACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA
 TTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACA
 AATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT

FIG. 85A

GACGTCGCGGCCGCTCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCT
 GGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAA
 AAAATTAGTCAGCCATGCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAAGTGGGCG
 GAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCT
 GACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCT
 GGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGC
 ATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGA
 CACACATTCCACAGAATTAATTCCCCTAGTTATTAATAGTAATCAATT
 ACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAA
 CTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCC
 ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
 CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACT
 TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACG
 TCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCT
 TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA
 TTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAACC
 GGTTTGACTCACGCGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATG
 GGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTA
 ACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG
 GAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTGAACCGTCAGATCGCCTG
 GAGACGCCATCACAGATCTCTCACTATGGATTTTCAGGTGCAGATTAT
 CAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAAT
 TGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAA
 GGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATCCACT
 GGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACCCTGGATTTATGCCA
 CATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGT
 CTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATG
 CTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCACGTTTCG
 GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT
 GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTACC
 TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA
 CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG
 TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA
 CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
 TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT
 CAACAGGGGAGAGTGTTGAATTCAGATCCGTTAACGGTTACCAACTA
 CCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGGCCGTGATATCTACGTATGAT
 CAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTC
 CCGGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCC

FIG. 85B

TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCT
 ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
 AAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCA
 GCTGGGGCTCGACAGCTATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG
 ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG
 ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
 GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTG
 ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTT
 TGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCACAAAATGTCGTAACAAC
 CCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC
 TATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCCCTCACATTCAGTGATCAGCACTGA
 ACACAGACCCGTCGACATGGGTGGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGT
 CGCTGTTGCTACGCGTGTCTGTCCAGGTACAACGTCAGCAGCCTGG
 GGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGG
 CTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAACAGA
 CACCTGGTTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAAT
 GGTGATACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGAC
 TGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGA
 CATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACG
 GCGGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACC
 GTCTCTGCAGCTAGCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
 TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
 CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCG
 CCCTGACCAGCGGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAG
 GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
 GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAAAGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC
 ATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT
 CCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC
 TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
 TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
 ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
 CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACC
 ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
 GCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
 AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
 GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
 GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
 AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAATGAGGATCCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGT

FIG. 85C

GACAACATGCGGCCGTGATATCTACGTATGATCAGCCTCGACTGTGCC
 TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTG
 ACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGCCTTTCCTAATAAAATGAGGAA
 ATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG
 GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGC
 ATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGGCTCGACAG
 CGCTGGATCTCCCGATCCCCAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCAT
 AATGAGAAAAAAAGGAAAATTAATTTTAAACACCAATTCAGTAGTTGA
 TTGAGCAAATGCGTTGCCAAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTTCTCT
 GCACAGATAAGGACAAACATTATTCAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAG
 ACTCCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTT
 GTCATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGGTAAGGGCC
 AATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCAT
 ATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACATAG
 TTGTGTTGGGAGCTTGGATAGCTTGGACAGCTCAGGGCTGCGATTTTCG
 CGCCAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATC
 CCCGCTGCCATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCC
 CAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCT
 CAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAG
 TGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC
 TCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTT
 CTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGC
 CAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGG
 CAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGTTCTGTTTACC
 AGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTTAGACTCTTTGTGACAAGG
 ATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTTG
 GGGAAATATAAACTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTCCTCTCTGA
 GGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGA
 AGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAGTTCTCTGCTCCCCCTCCTAA
 AGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCA
 GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCC
 CCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGCCTTTCCTA
 ATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTAT
 TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA
 GACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGC
 TGGGGCTCGAGCTACTAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATAATG
 AGAAAAAAAGGAAAATTAATTTTAAACACCAATTCAGTAGTTGATTGA
 GCAAATGCGTTGCCAAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTTCTCTGCA
 CAGATAAGGACAAACATTATTCAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAGACT
 CCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTTGTG
 ATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGGTAAGGGCCAAT
 CTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCATATA
 AGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACATAGTTG

FIG. 85D

TGTTGGGAGCTTGGATCGATCCTCTATGGTTGAACAAGATGGATTGCA
 CGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTG
 GGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTC
 AGCGCAGGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGC
 CCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCA
 CGACGGGCGTTCCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGG
 GAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTG
 TCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCA
 ATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCAC
 CAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGG
 TCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGGCTCGCGC
 CAGCCGAACGTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAG
 GATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTG
 GAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTG
 GCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGA
 AGAGCTTGCGGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTAT
 CGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGA
 GTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGAC
 GCCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGA
 AAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCT
 CCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTT
 TATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT
 CACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAA
 ACTCATCAATCTATCTTATCATGTCTGGATCGCGGCCGCGATCCCGTC
 GAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGT
 TATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
 TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT
 GCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCA
 TTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGC
 GCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTCCGGCT
 GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCA
 CAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA
 GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
 ATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGT
 CAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCC
 CCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC
 CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCA
 ATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAA
 GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTT
 ATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATC

FIG. 85E

GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG
 TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
 ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC
 TTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGC
 TGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA
 AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
 TCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC
 AAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAA
 ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG
 CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCC
 ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
 CTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTC
 ACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCG
 AGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTA
 ATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC
 GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGT
 TTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA
 CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTC
 CGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTA
 TGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCT
 TTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTA
 TGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACC
 GCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCT
 TCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCG
 ATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCA
 CCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA
 AAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCT
 TTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG
 ATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGC
 GCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT

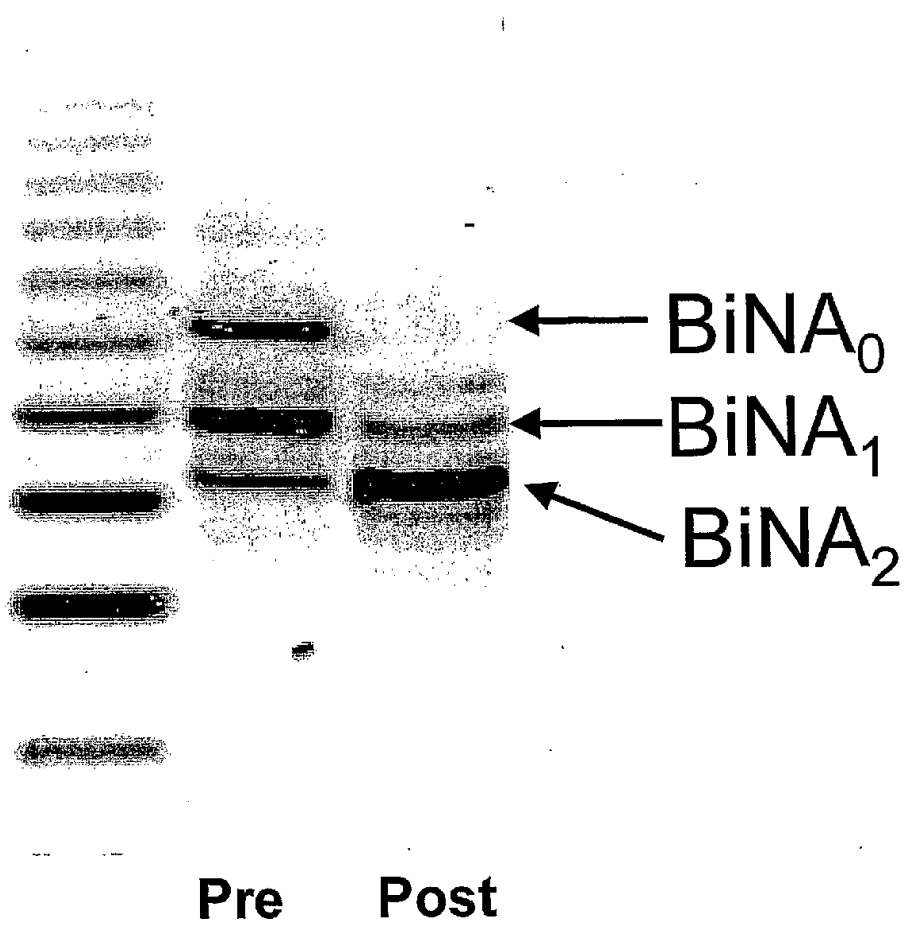


FIG. 86

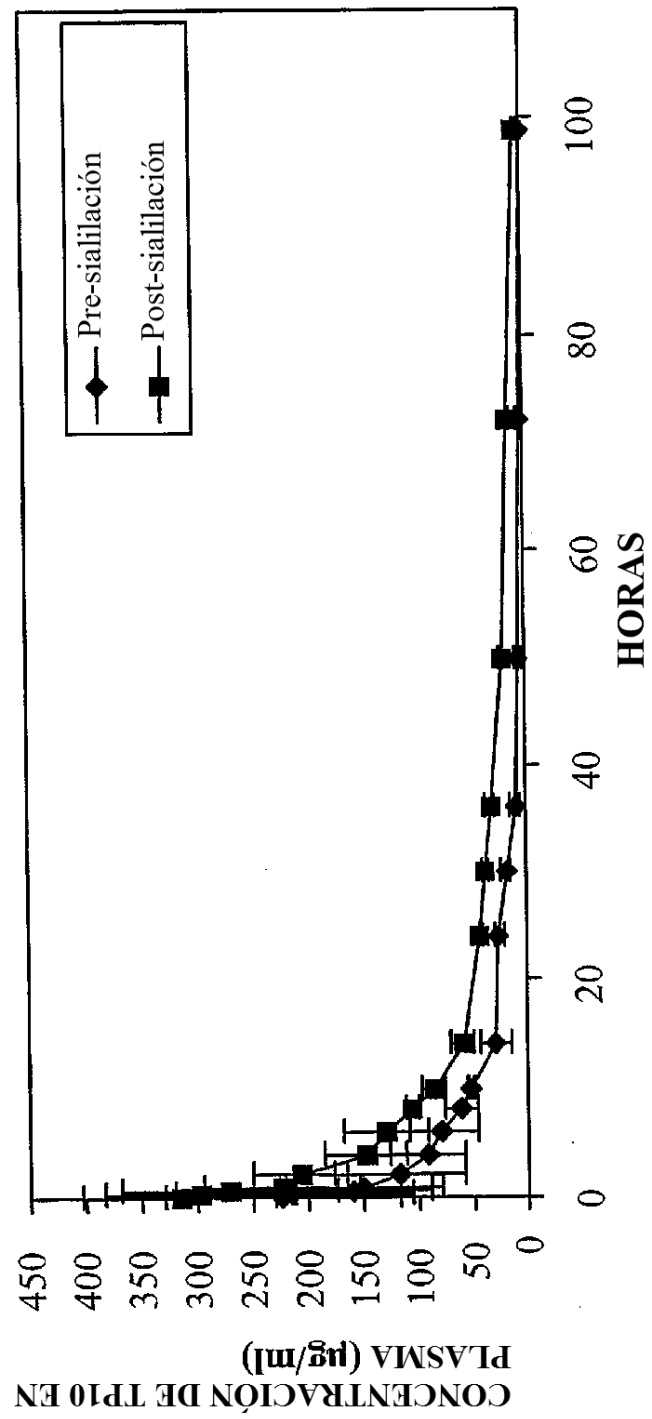


FIG. 87

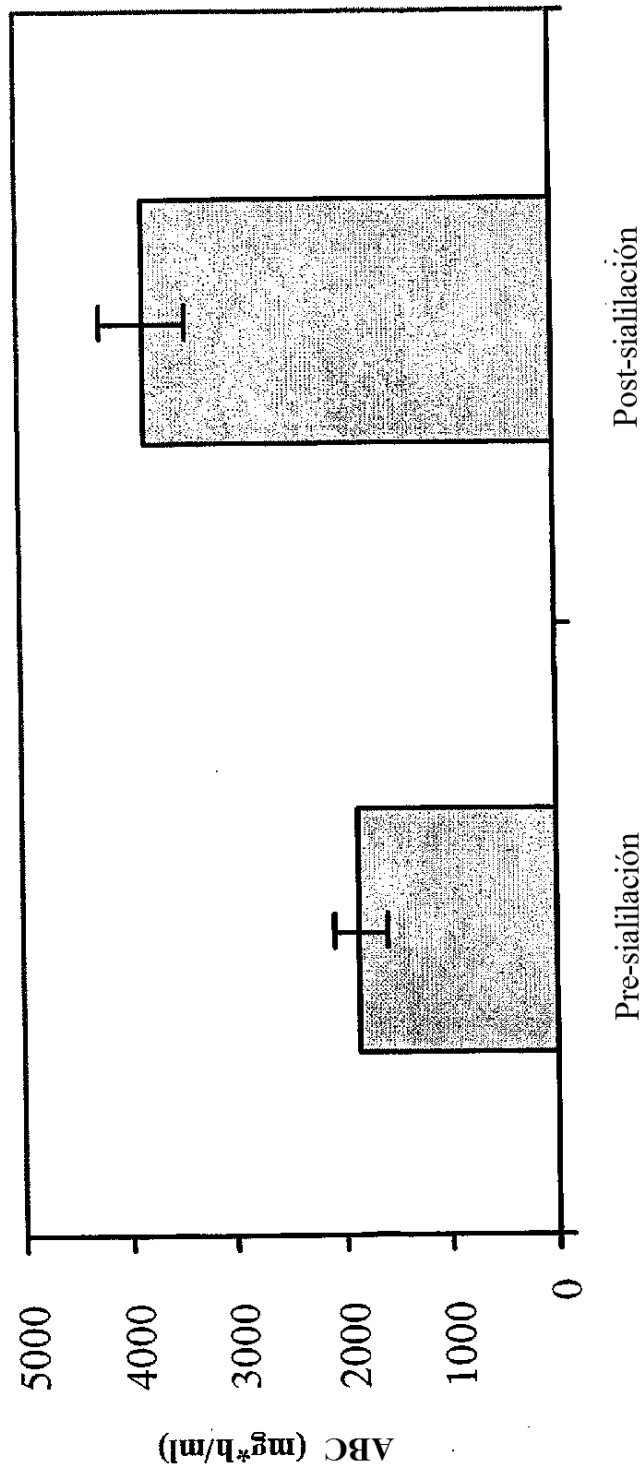
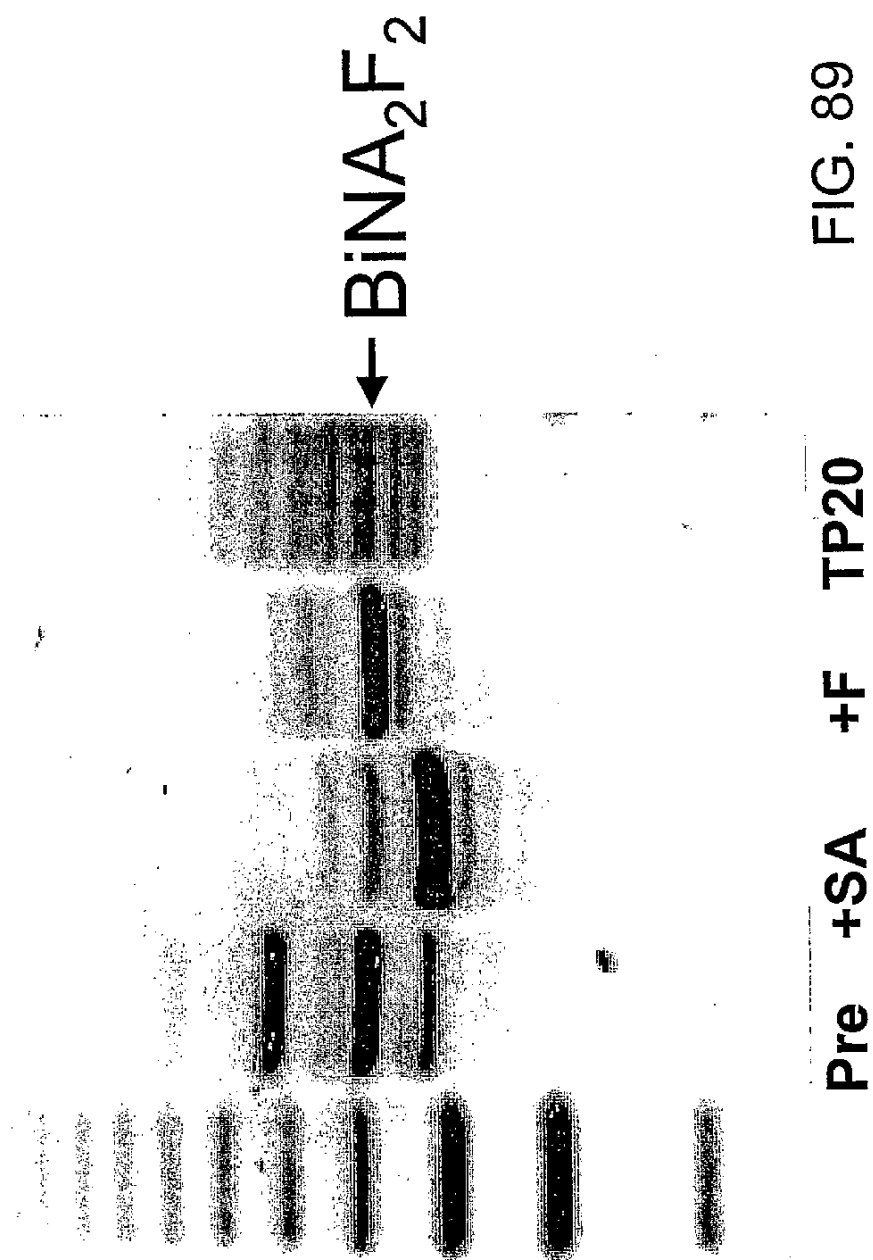


FIG. 88



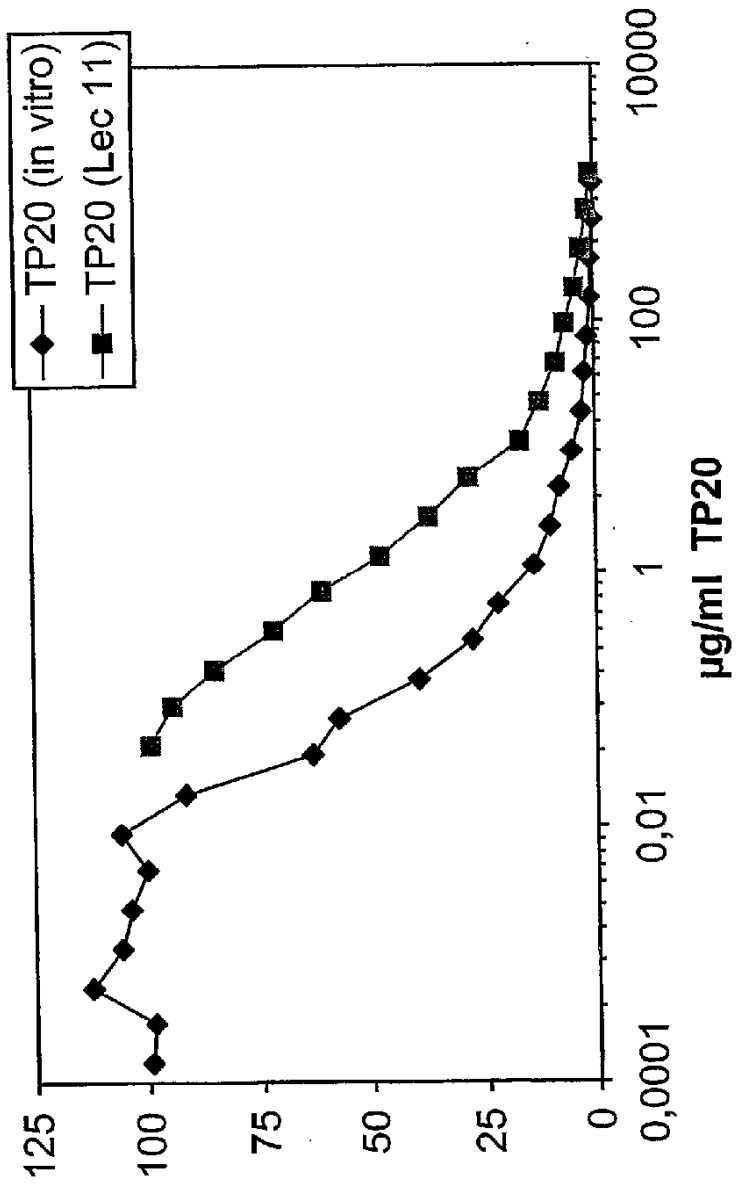


FIG. 90

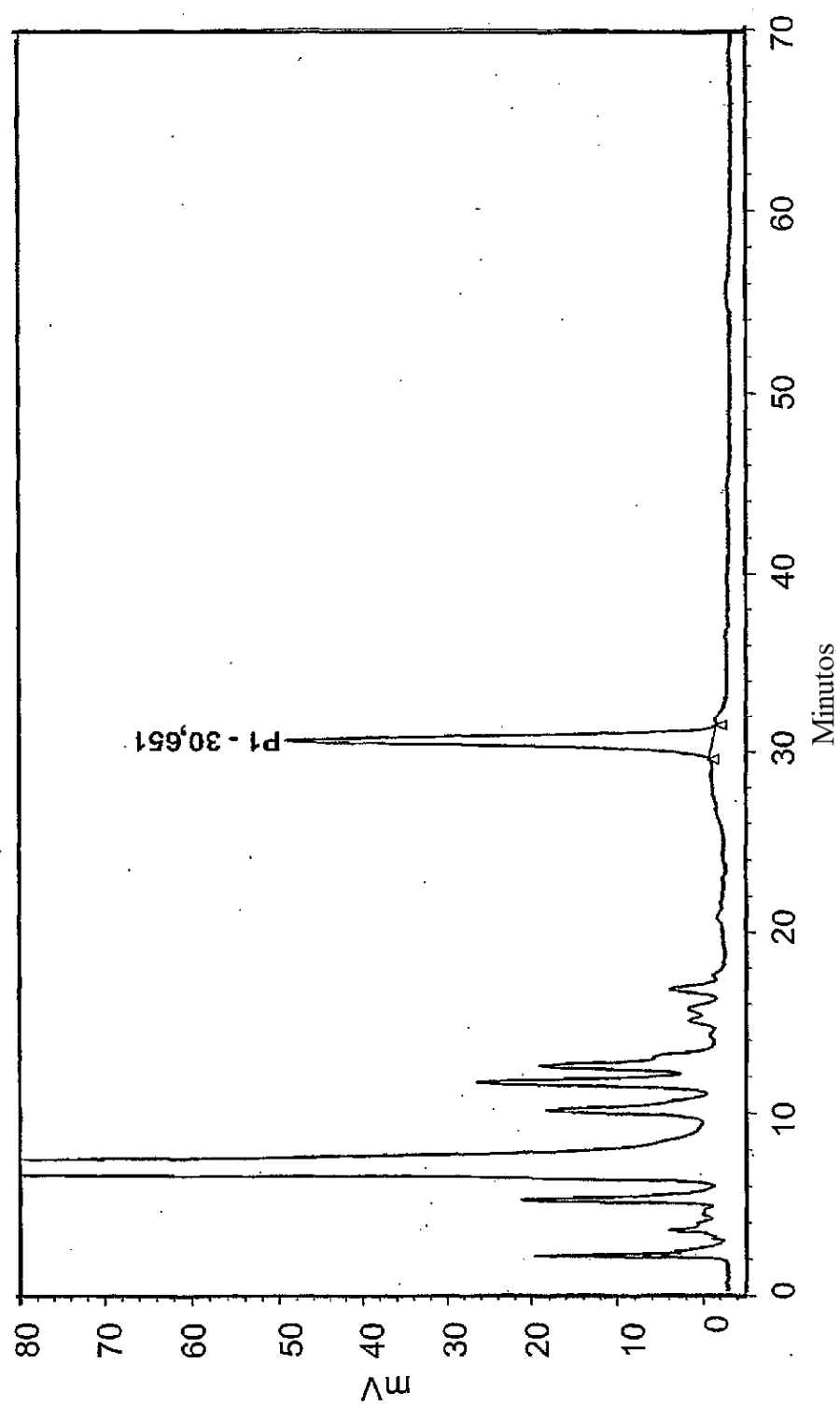


FIG. 91

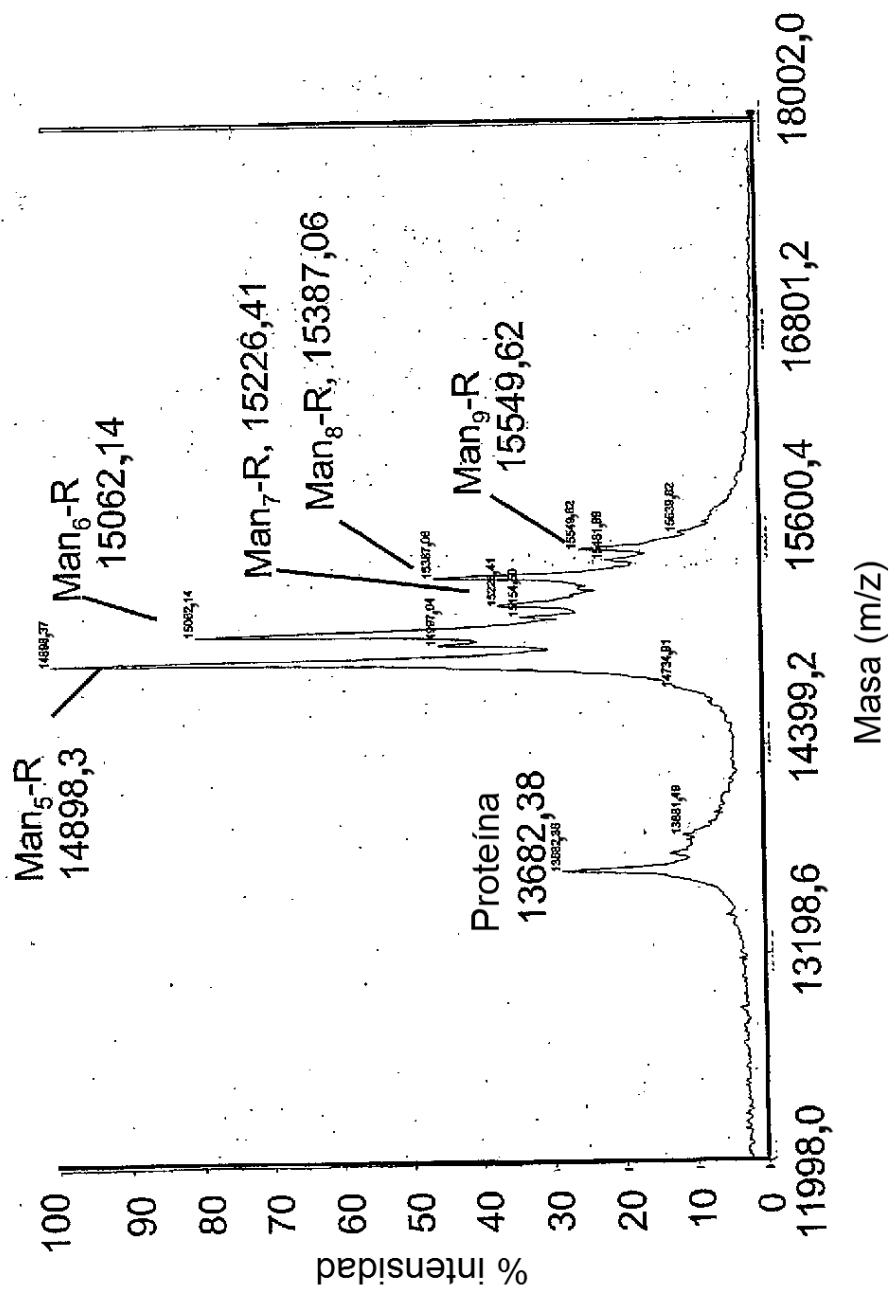


FIG. 92A

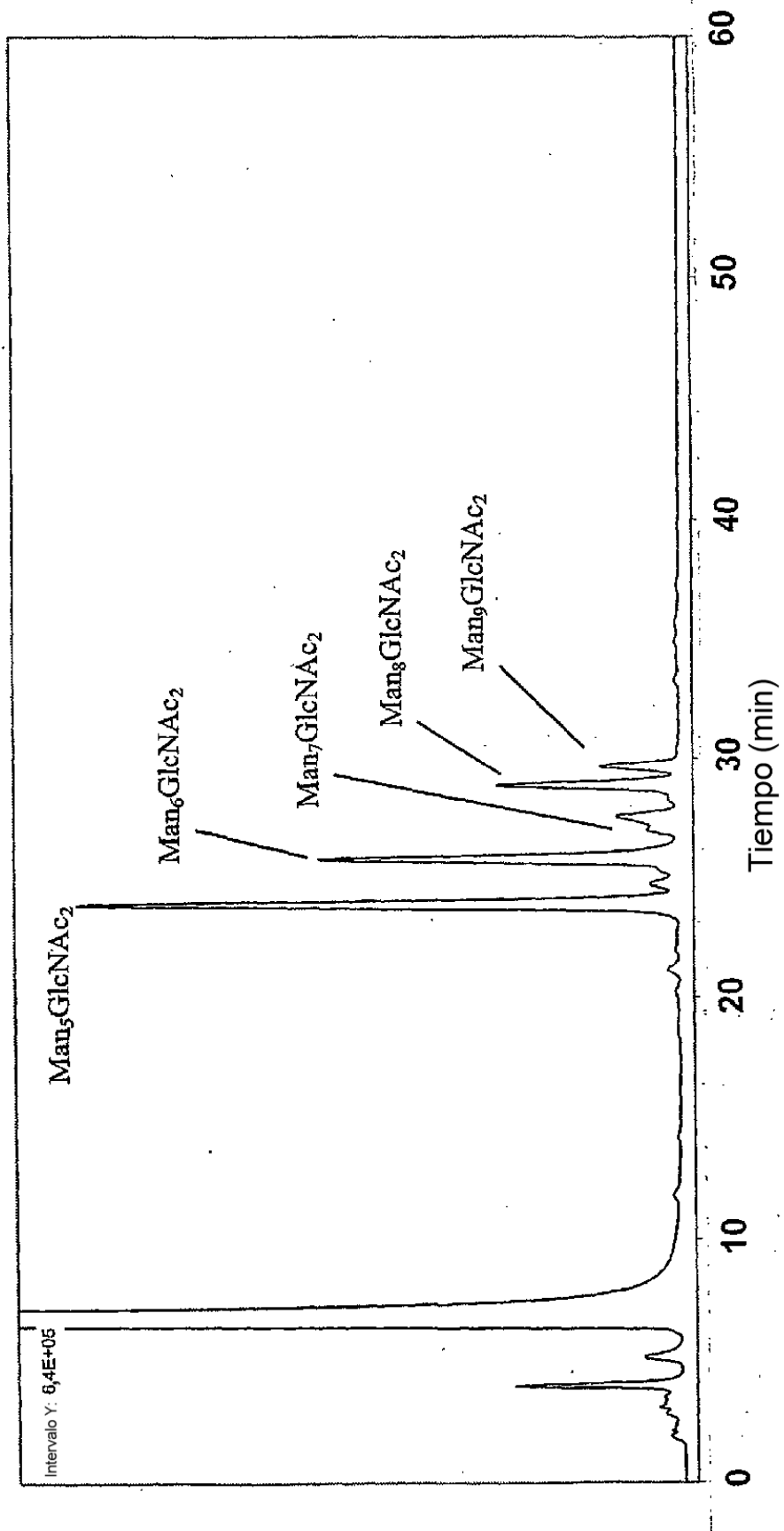


FIG. 92B

N-glicanos híbridos
bisectriz

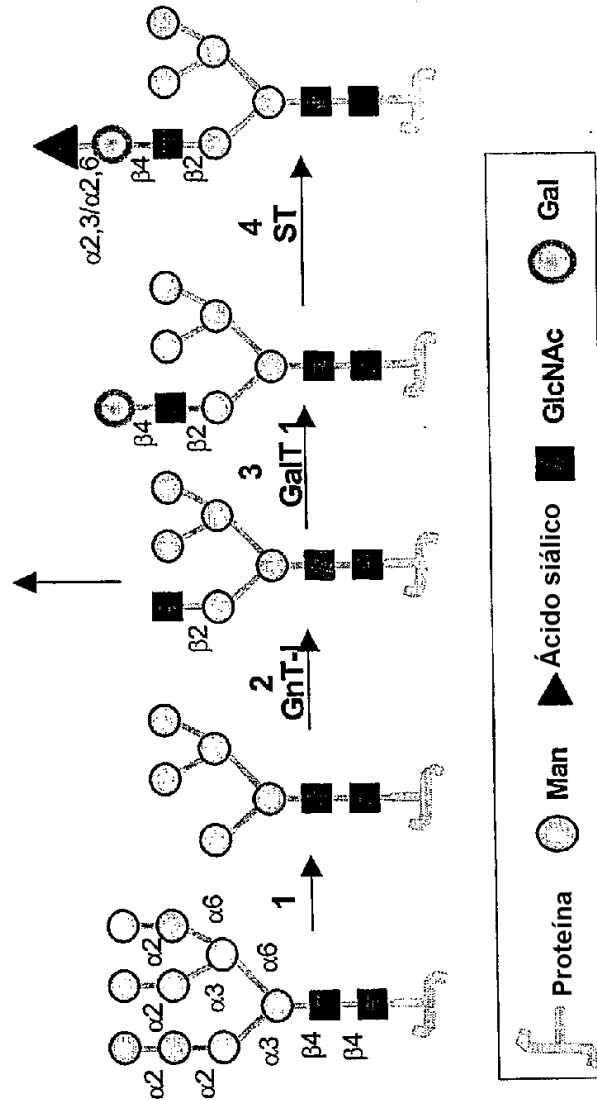


FIG. 93

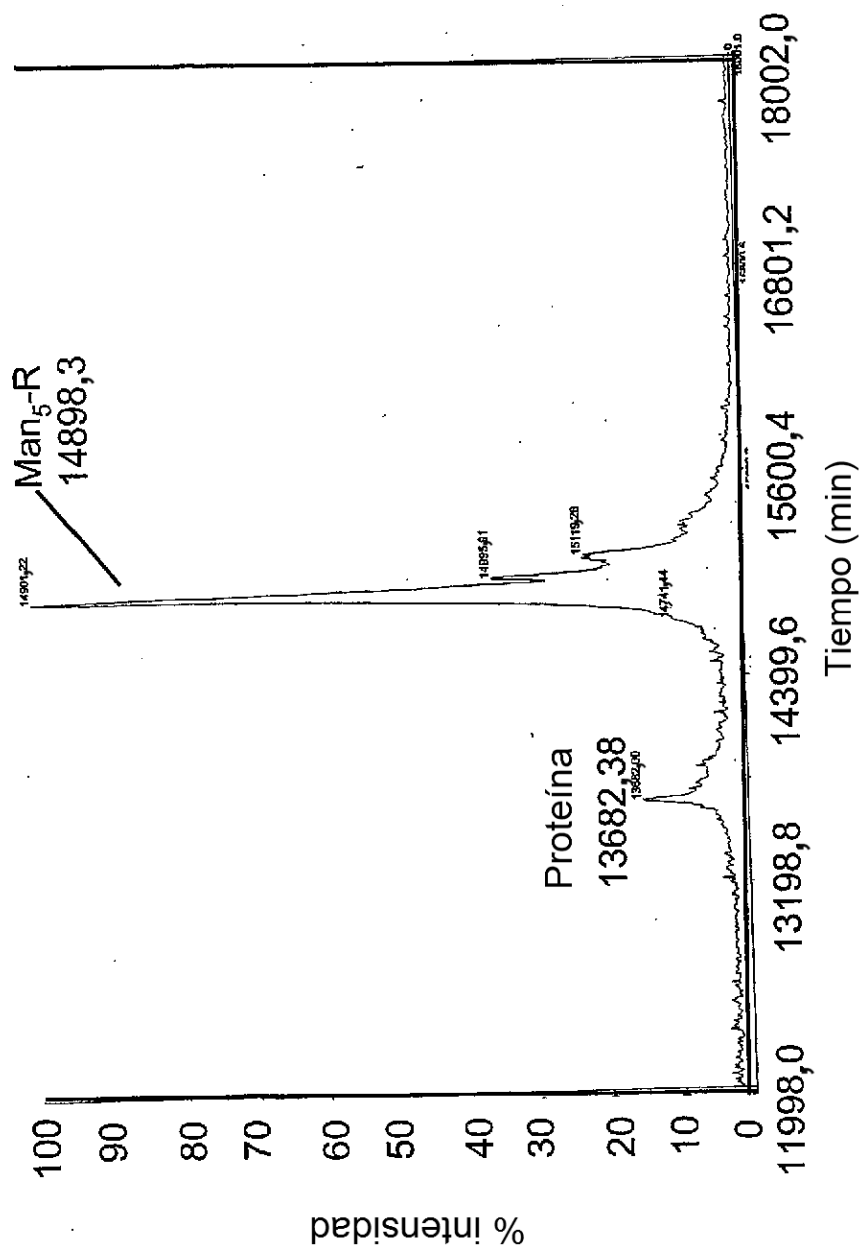


FIG. 94A

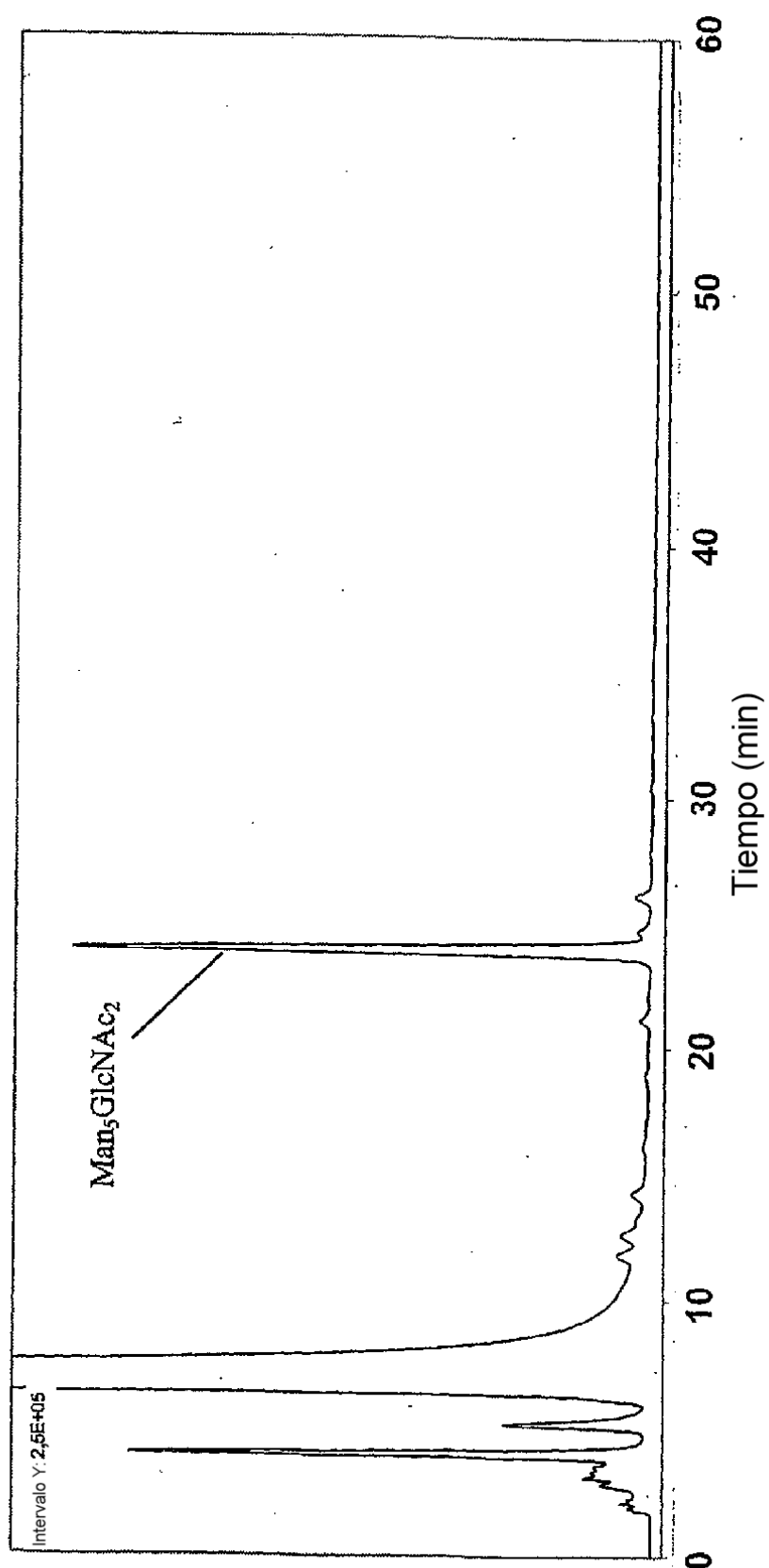


FIG. 94B

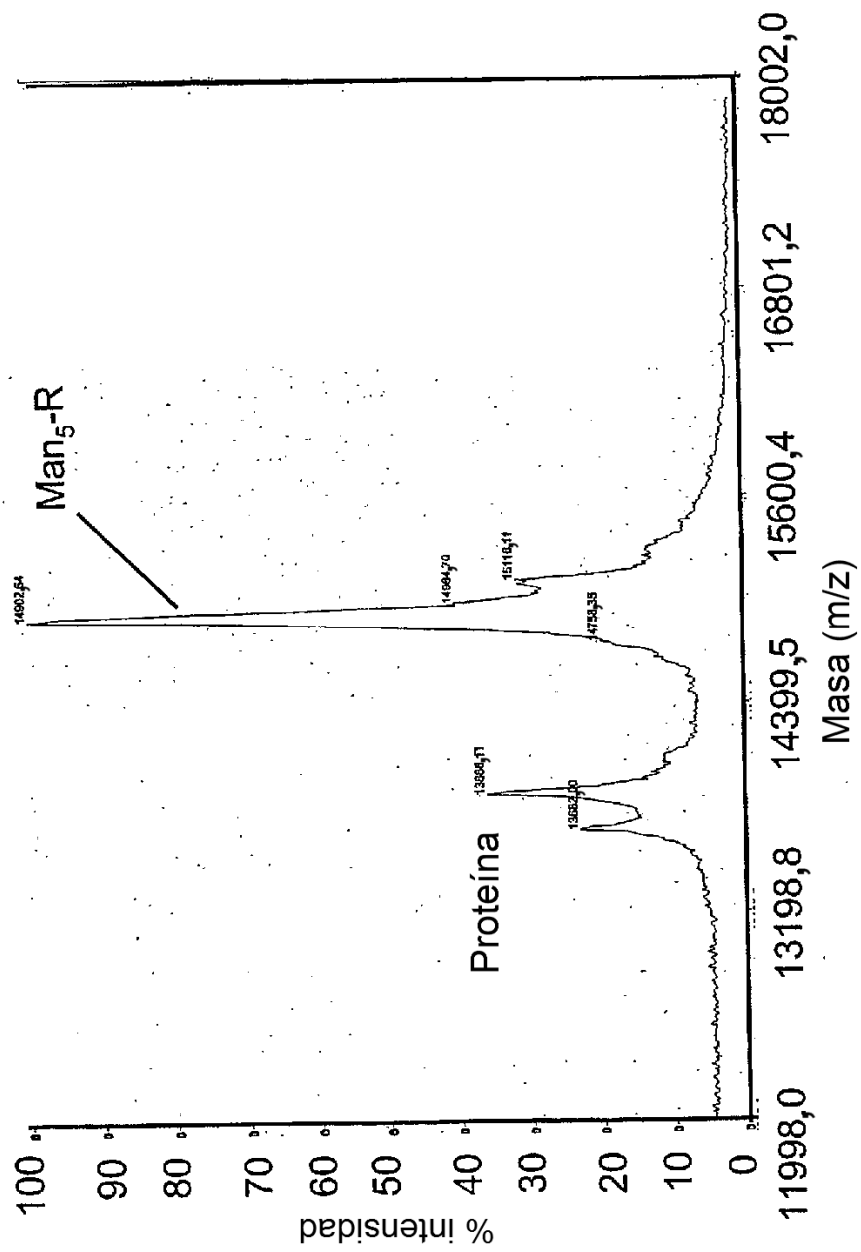


FIG. 95

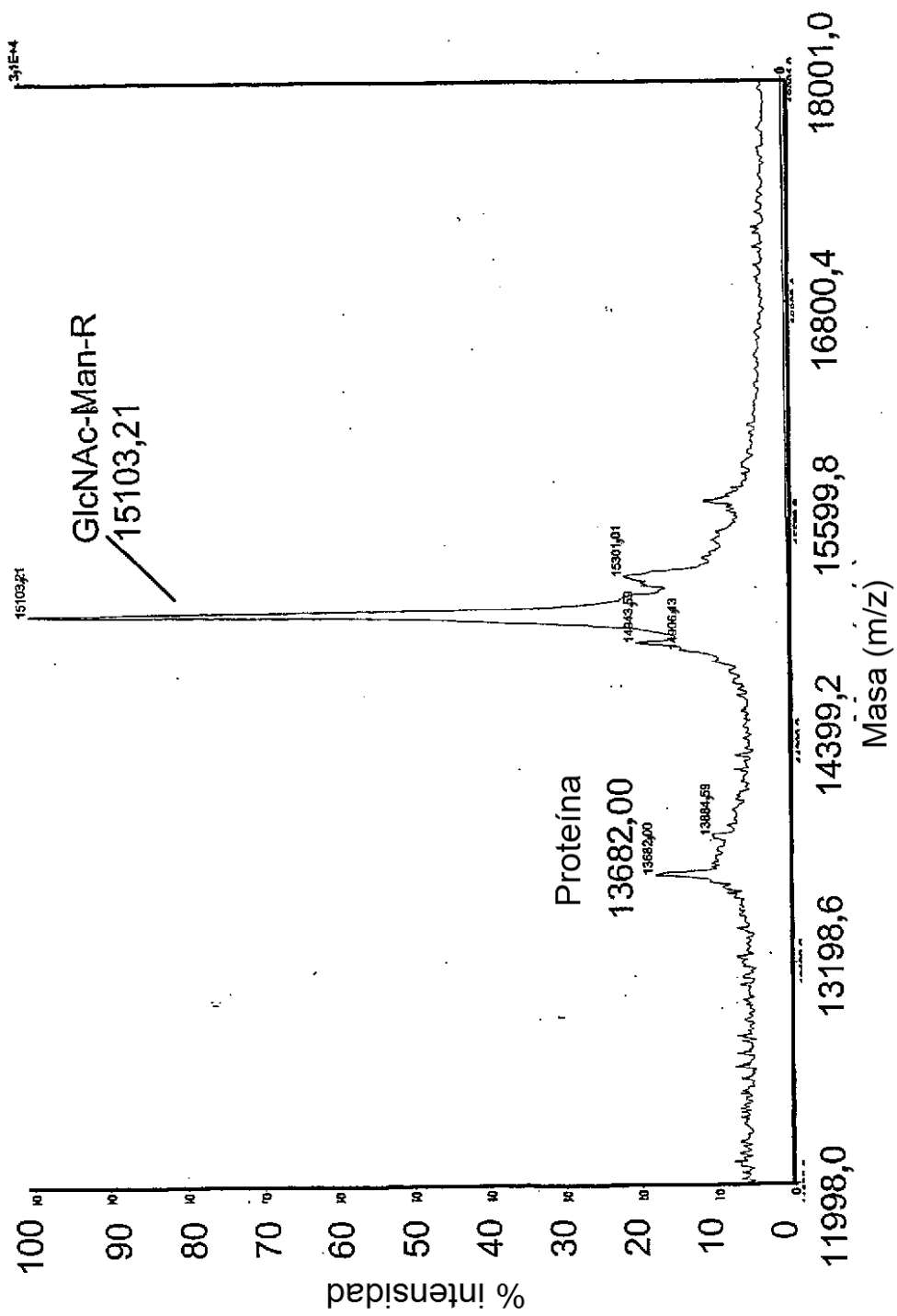


FIG. 96

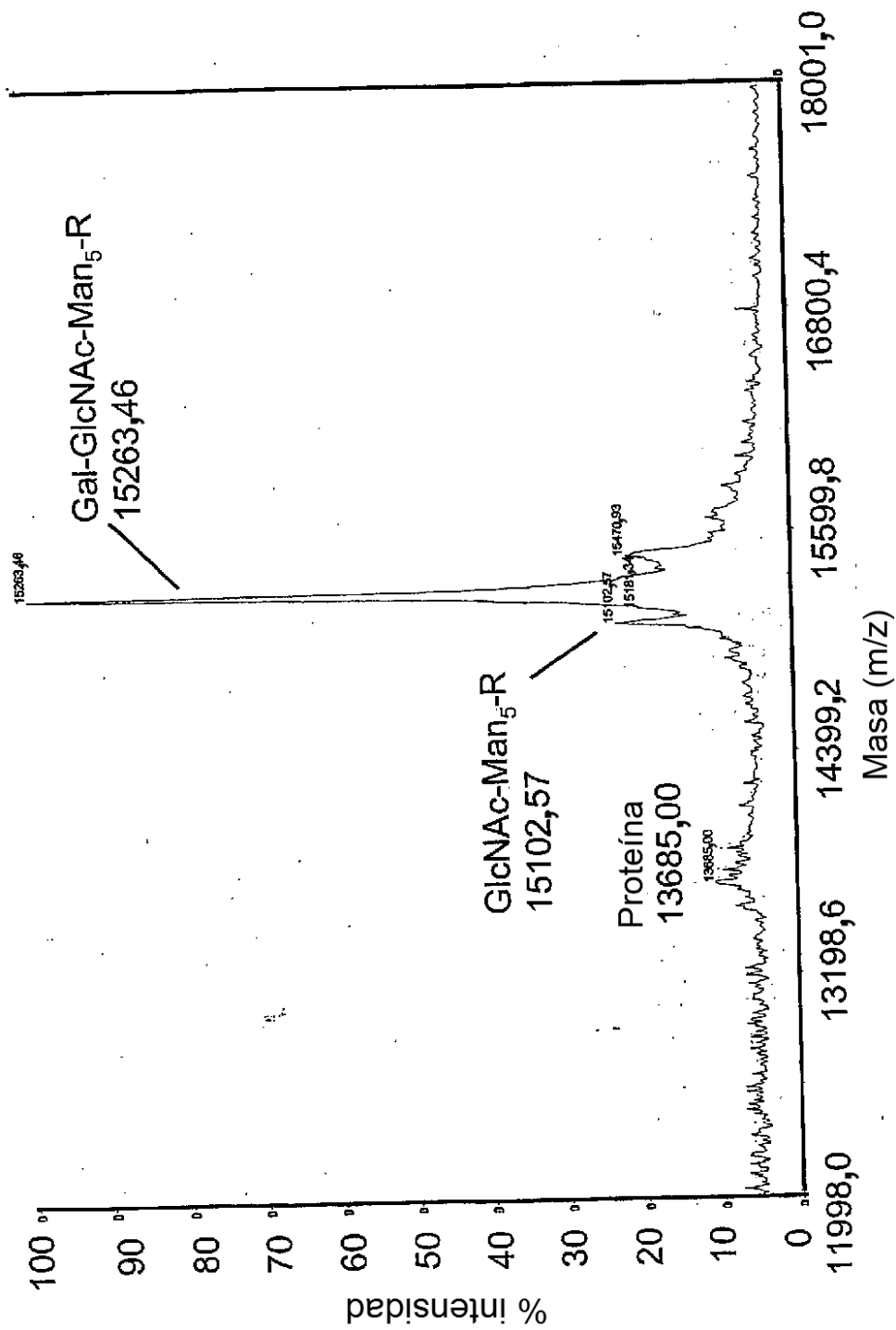


FIG. 97

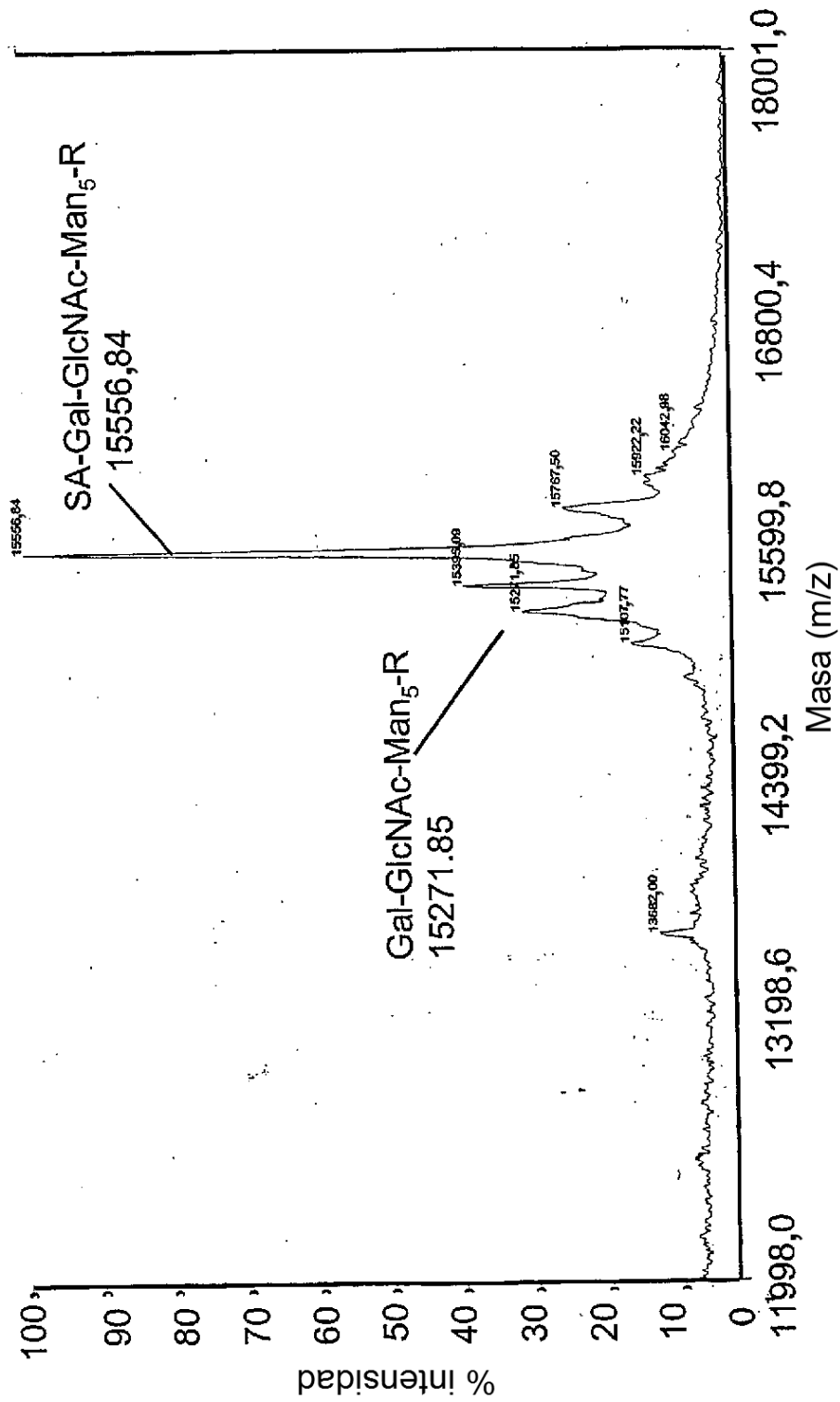


FIG. 98

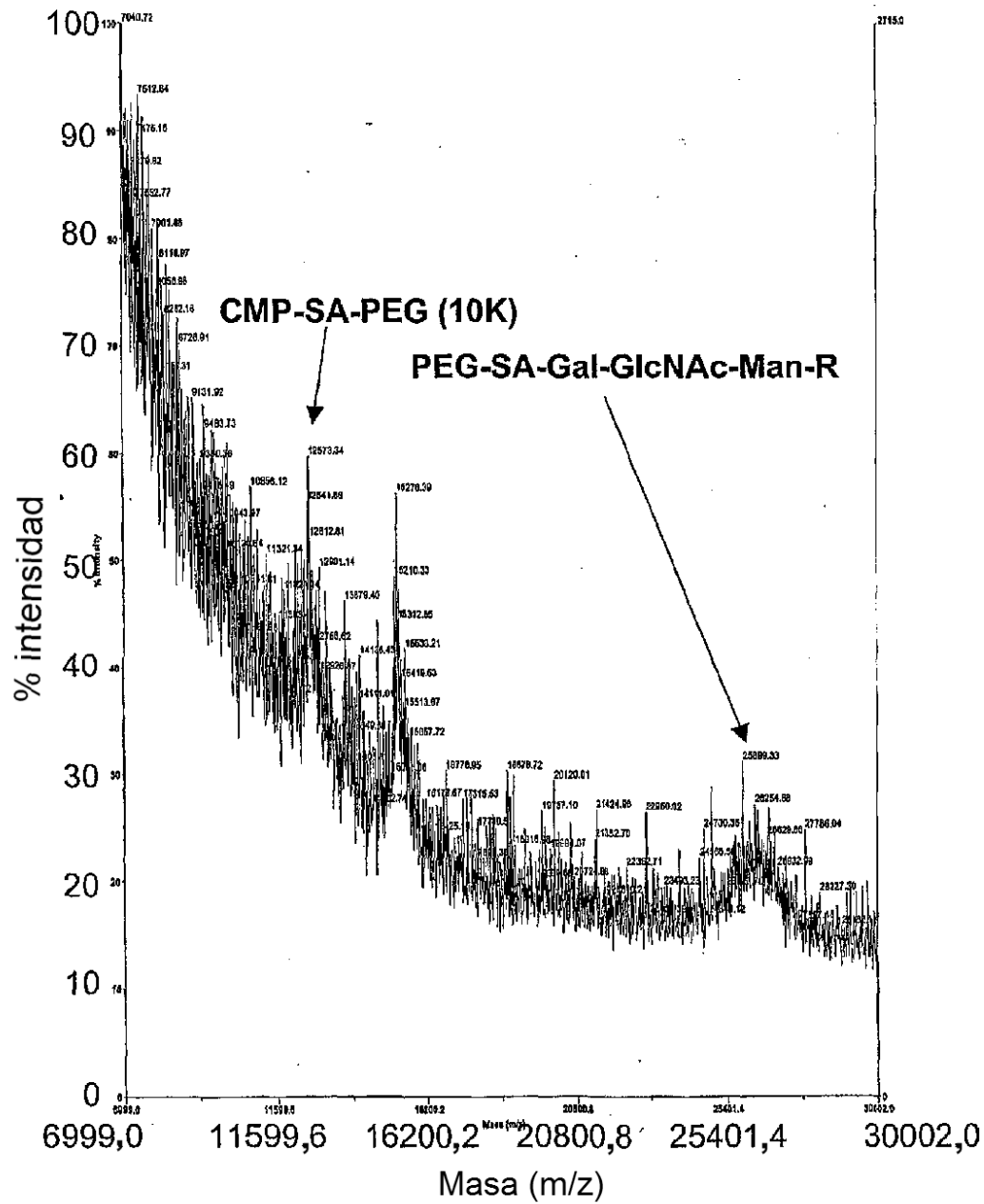


FIG. 99A

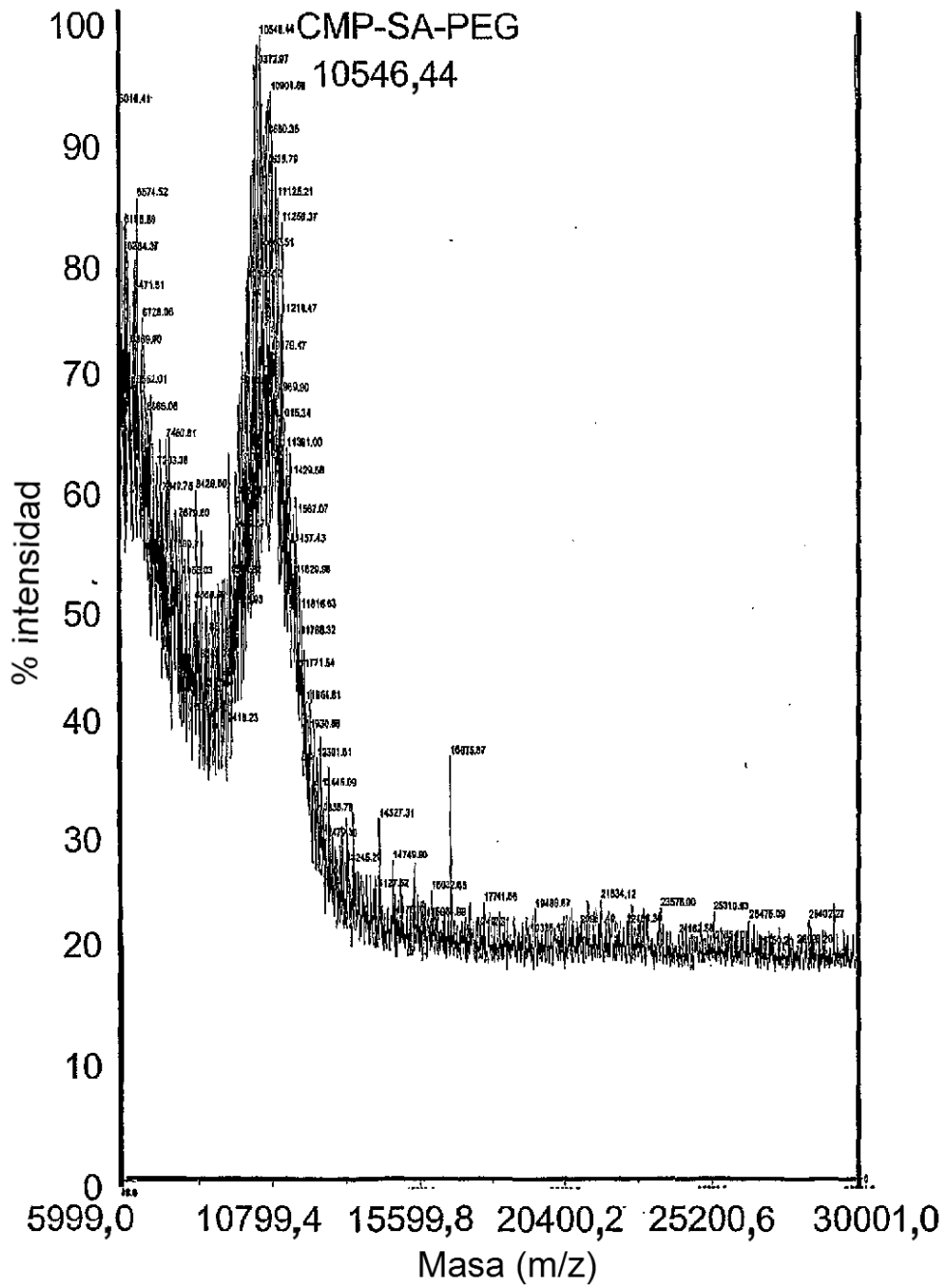


FIG. 99B

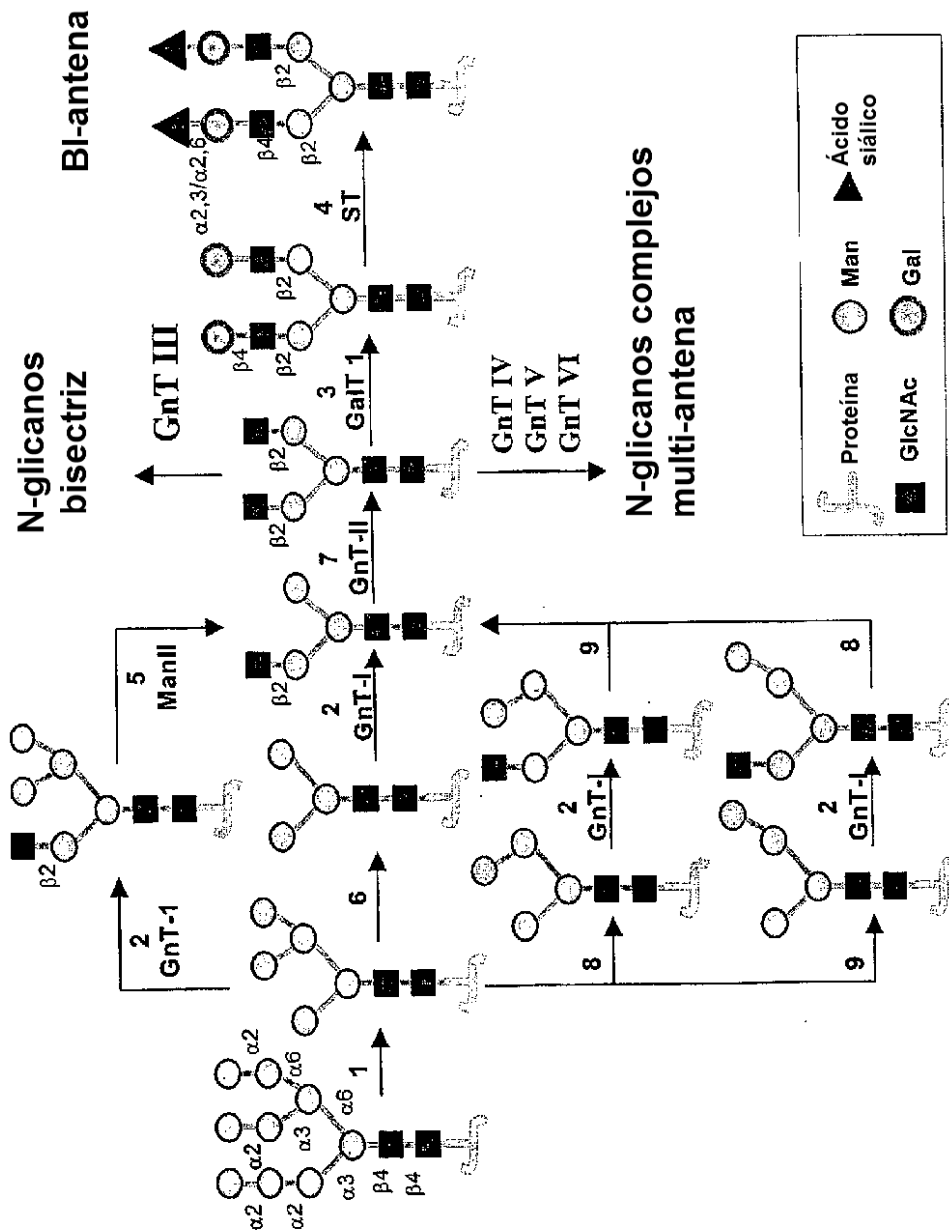


FIG. 100

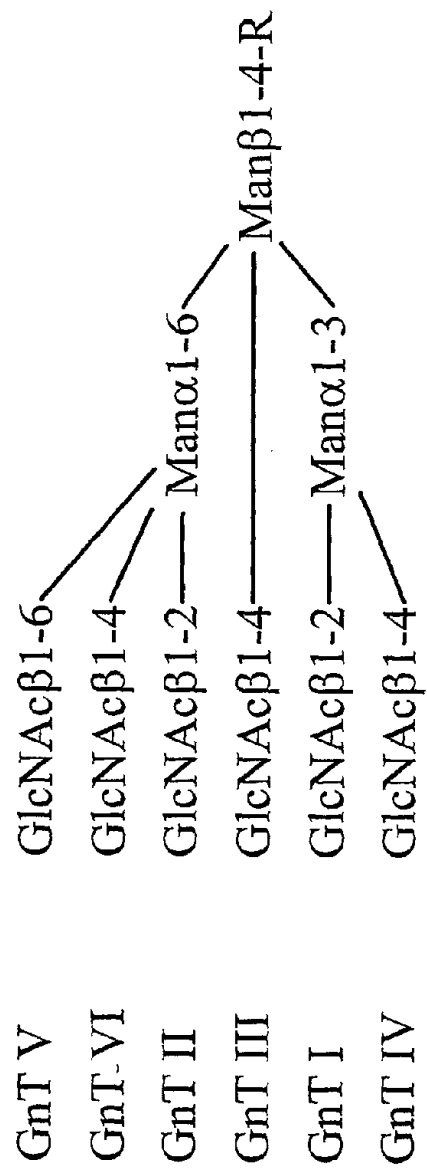


FIG. 101

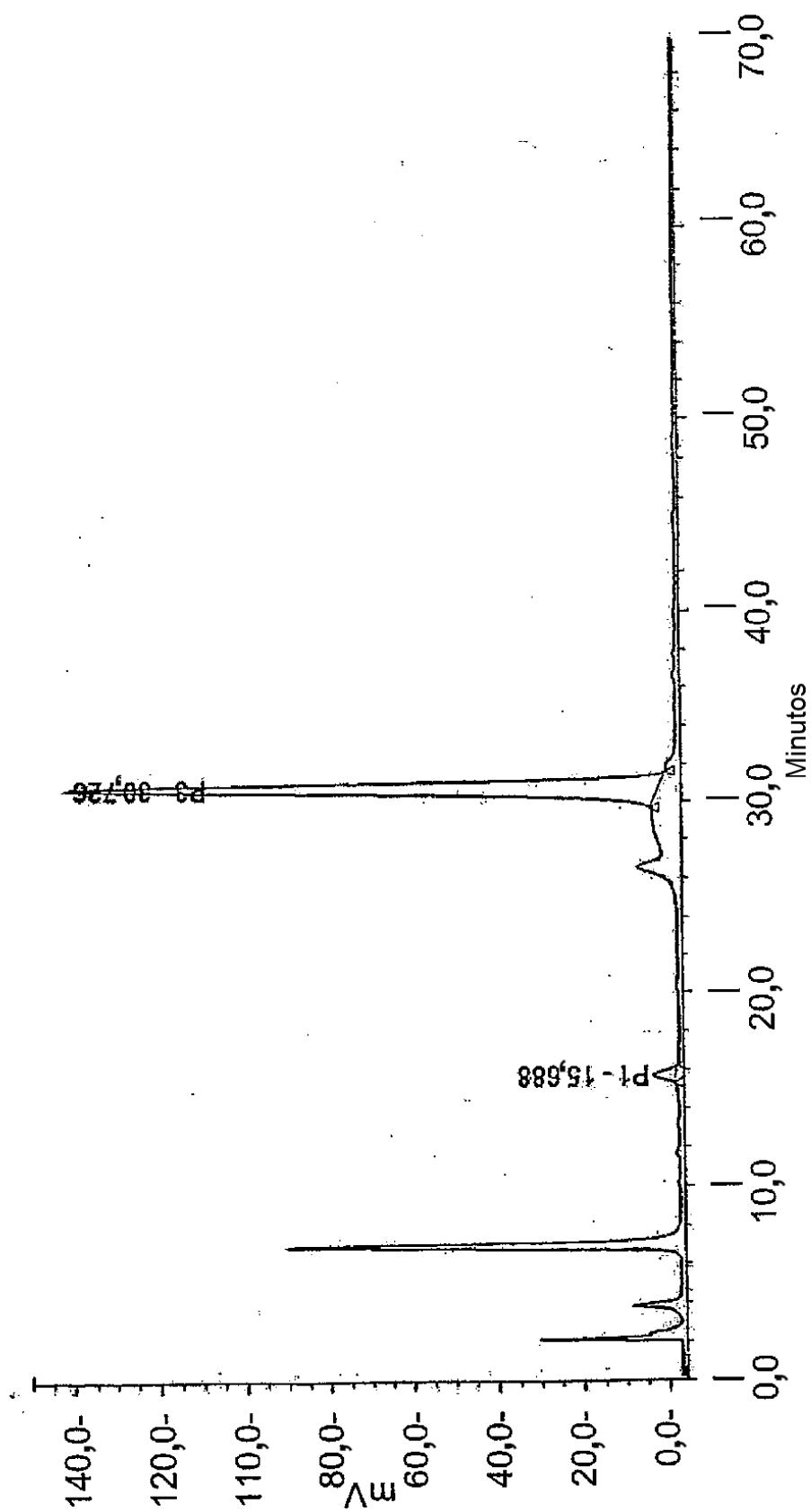


FIG. 102A

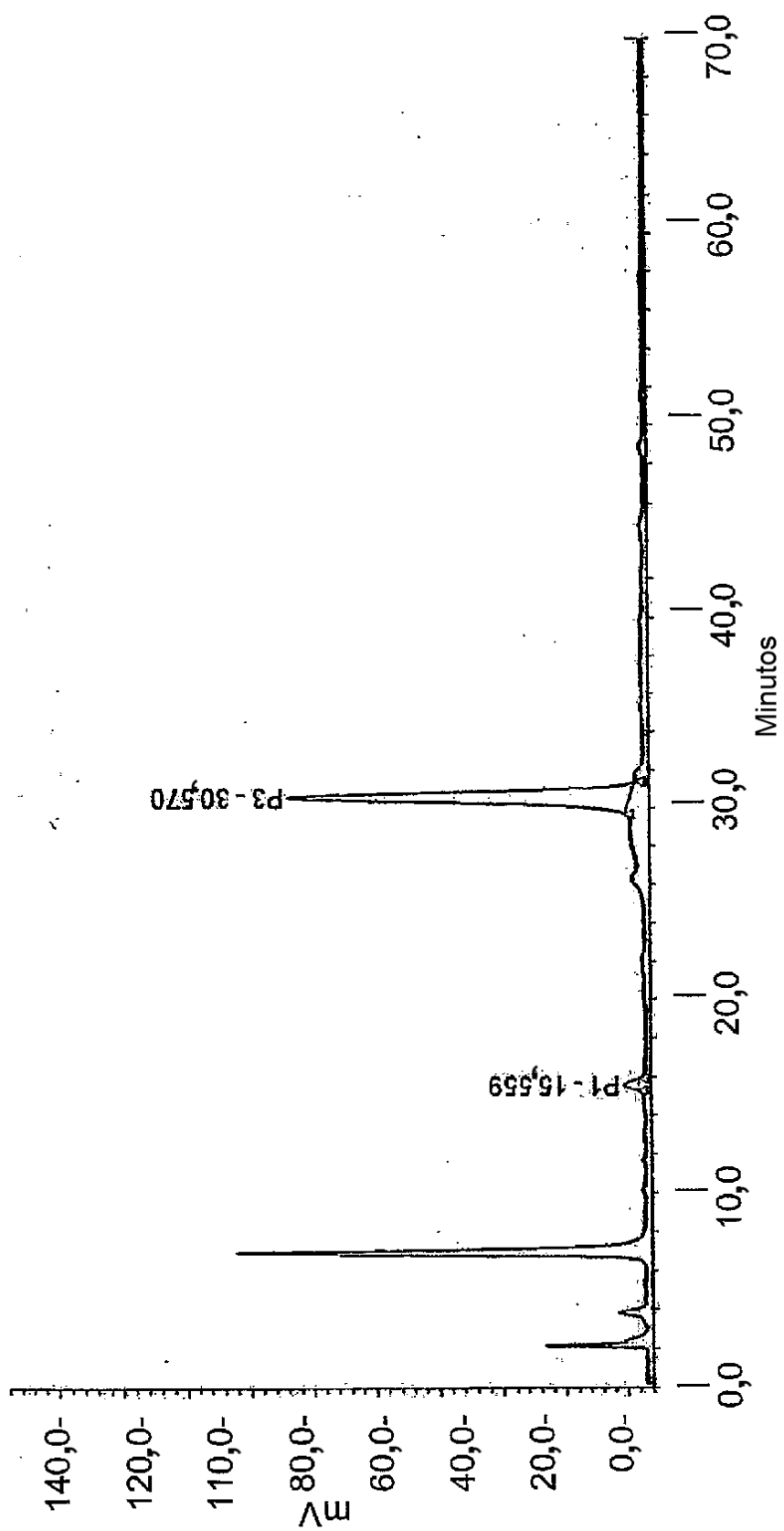


FIG. 102B

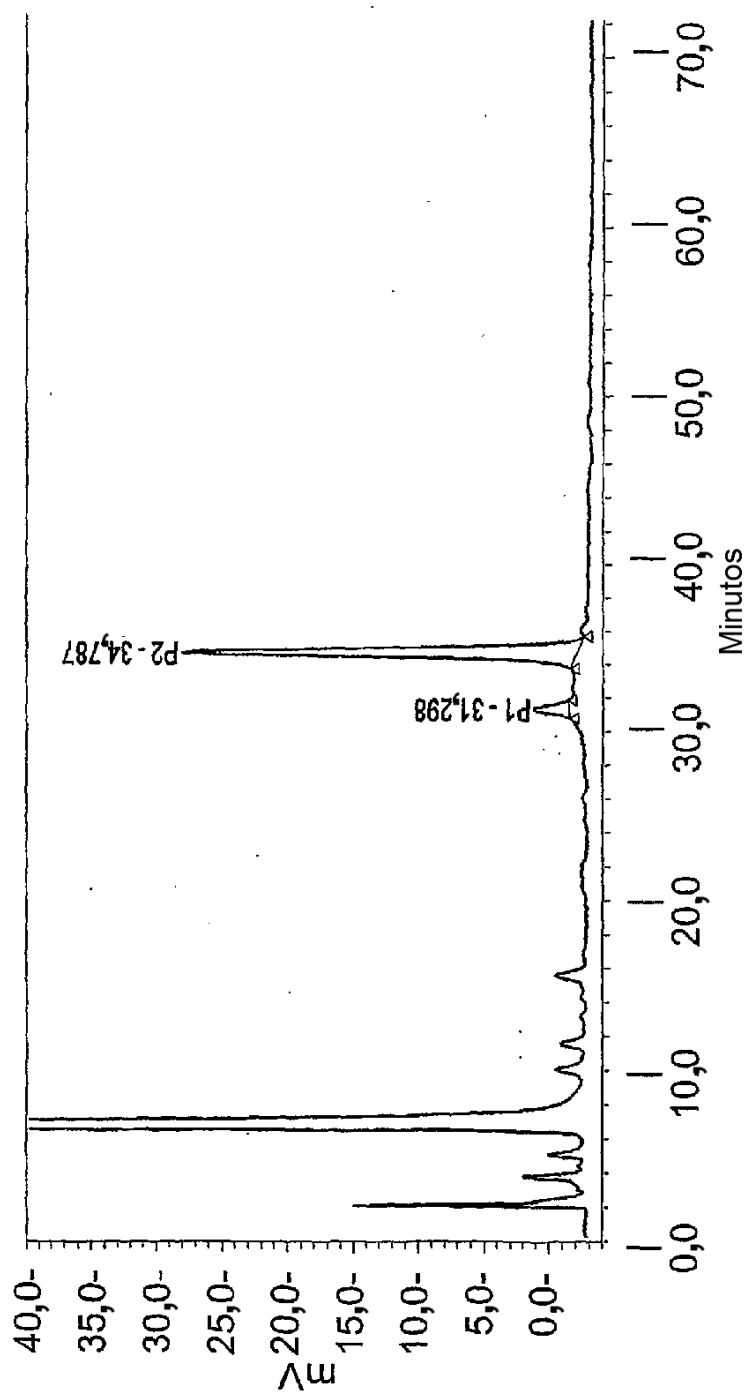


FIG. 103

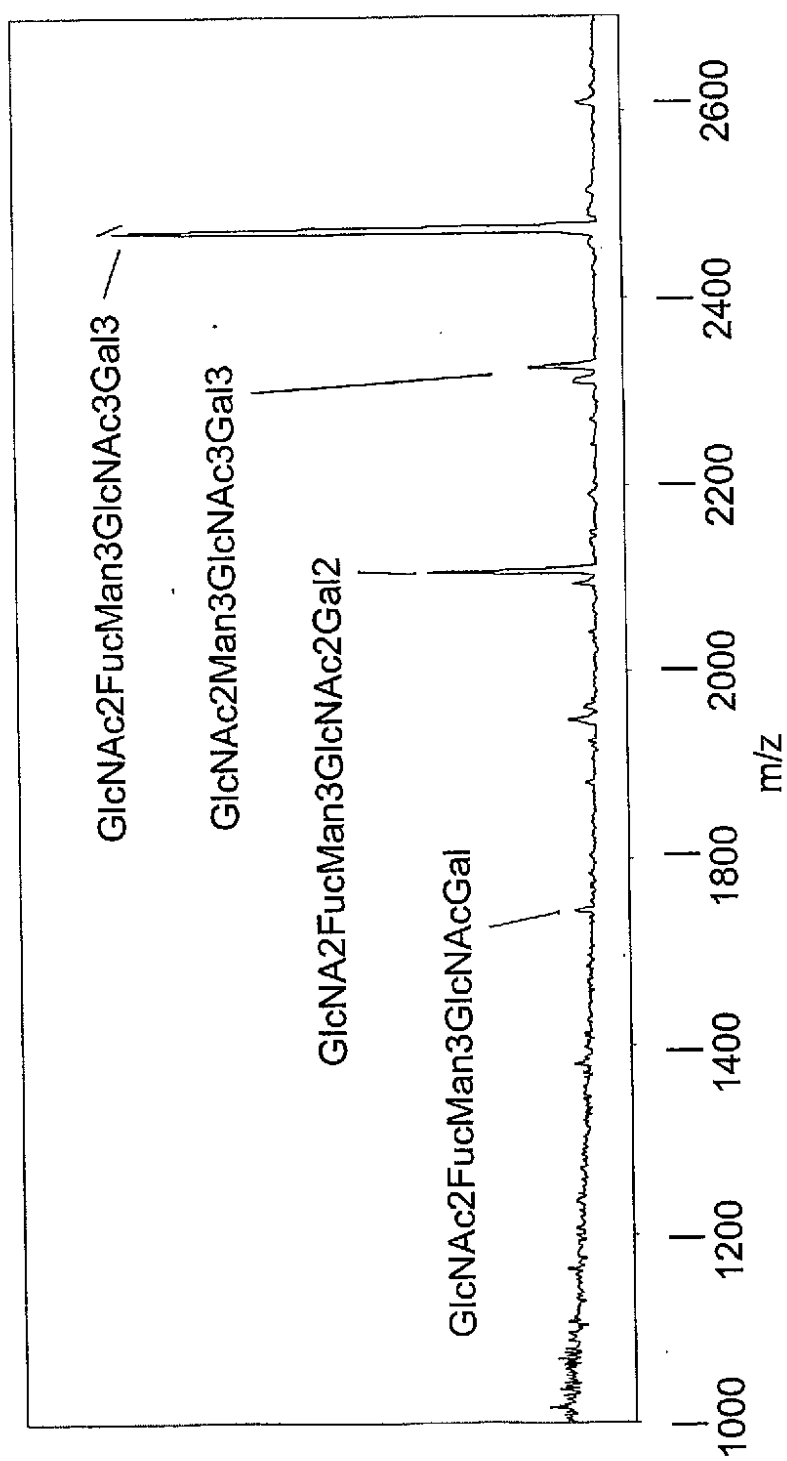


FIG. 104

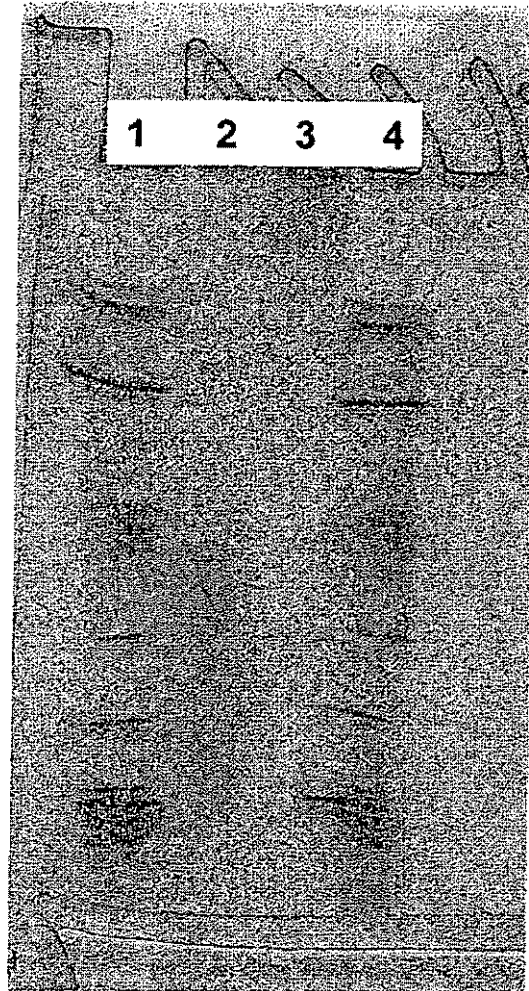


FIG. 105

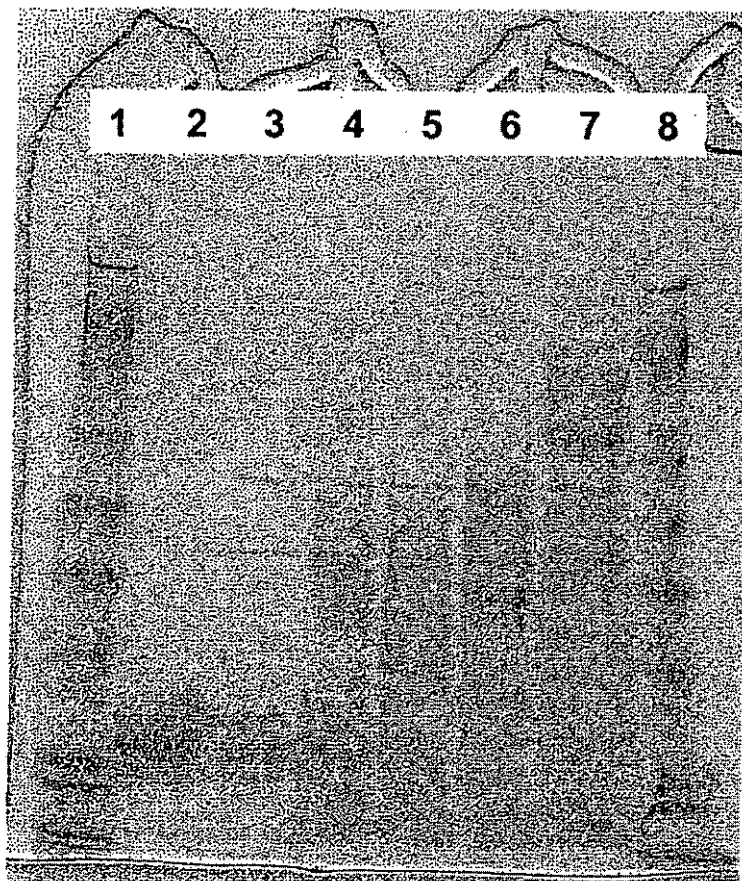


FIG. 106

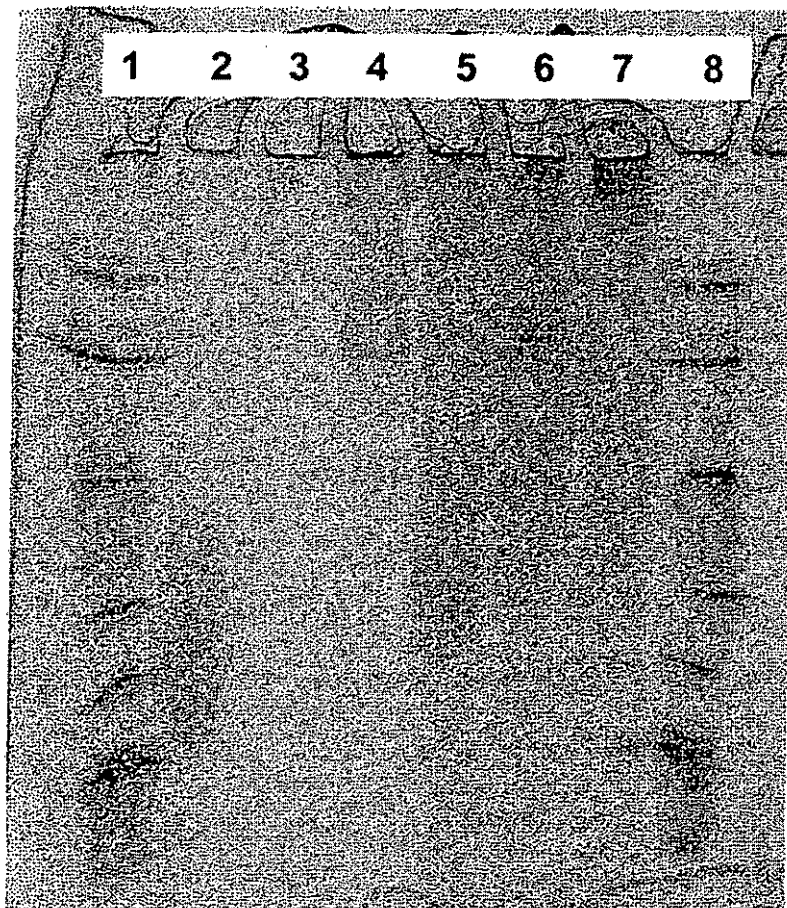


FIG. 107

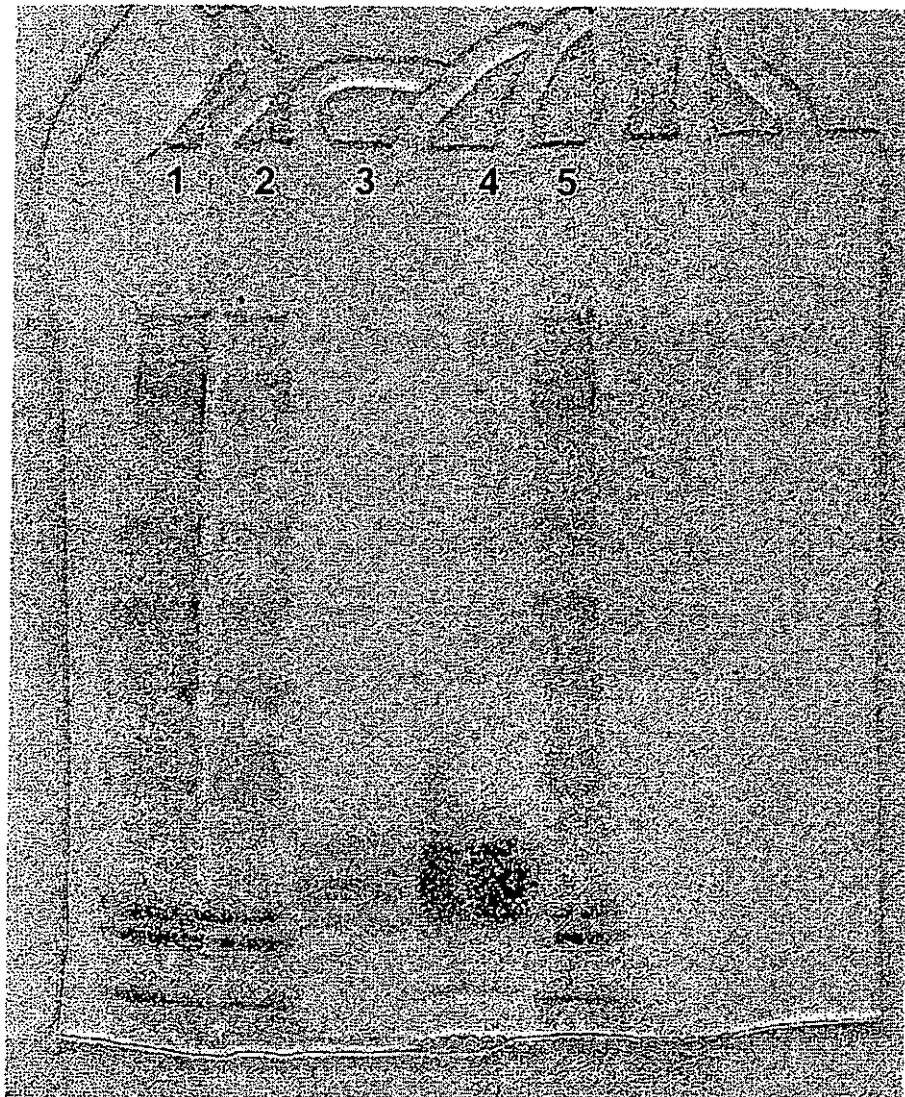


FIG. 108

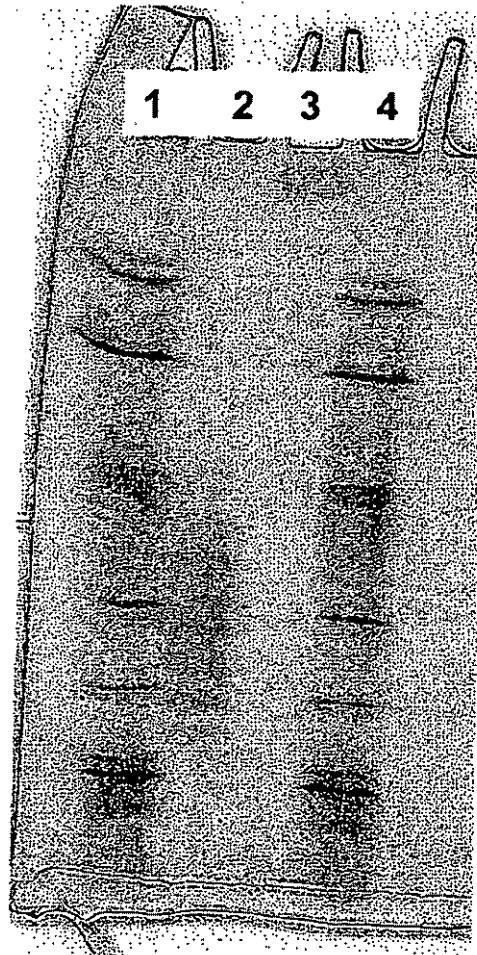


FIG. 109

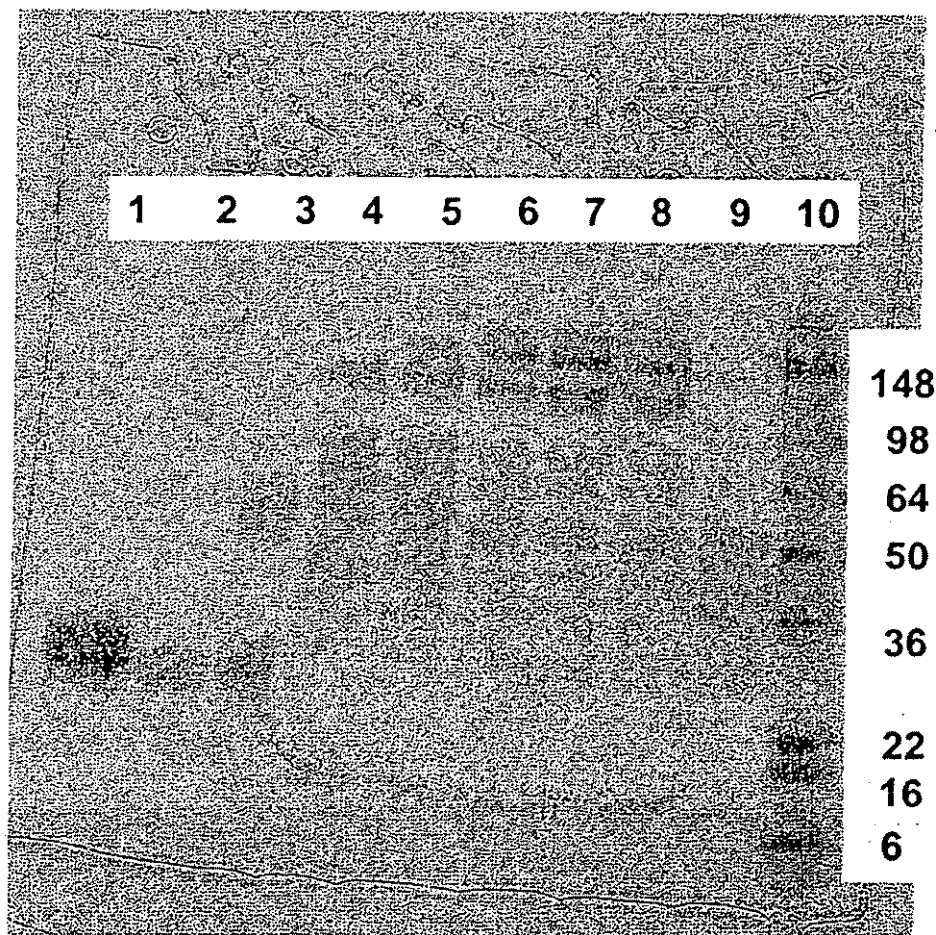


FIG. 110

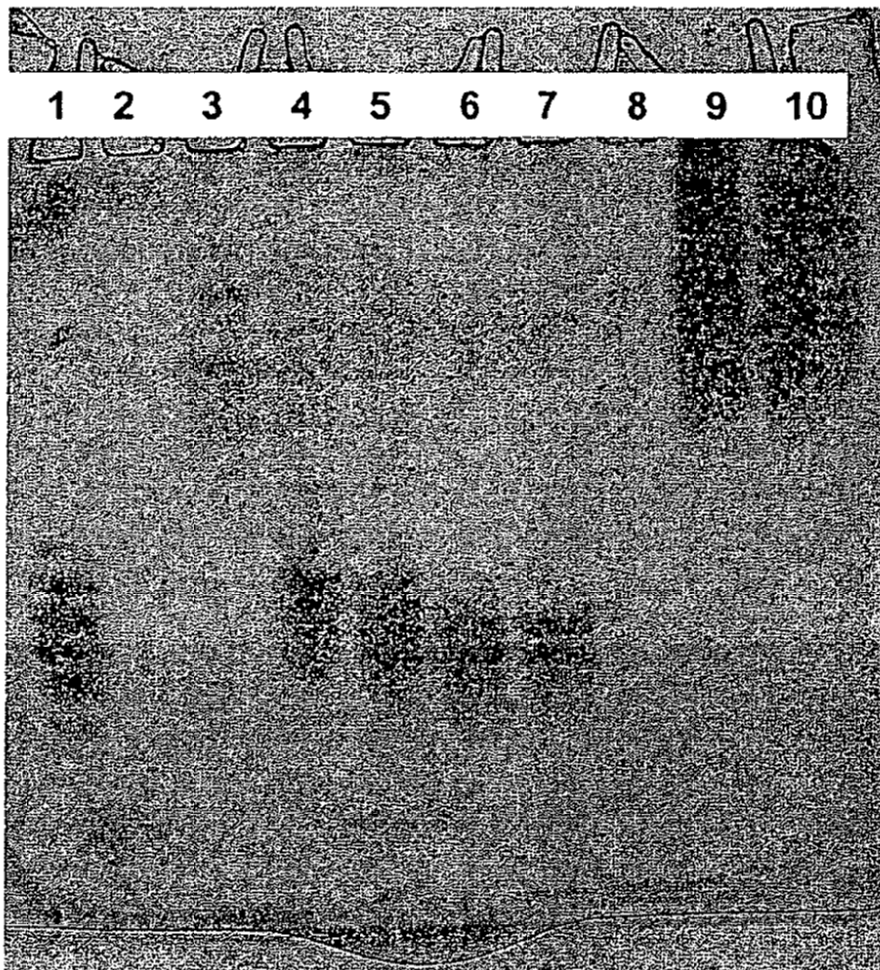


FIG. 111

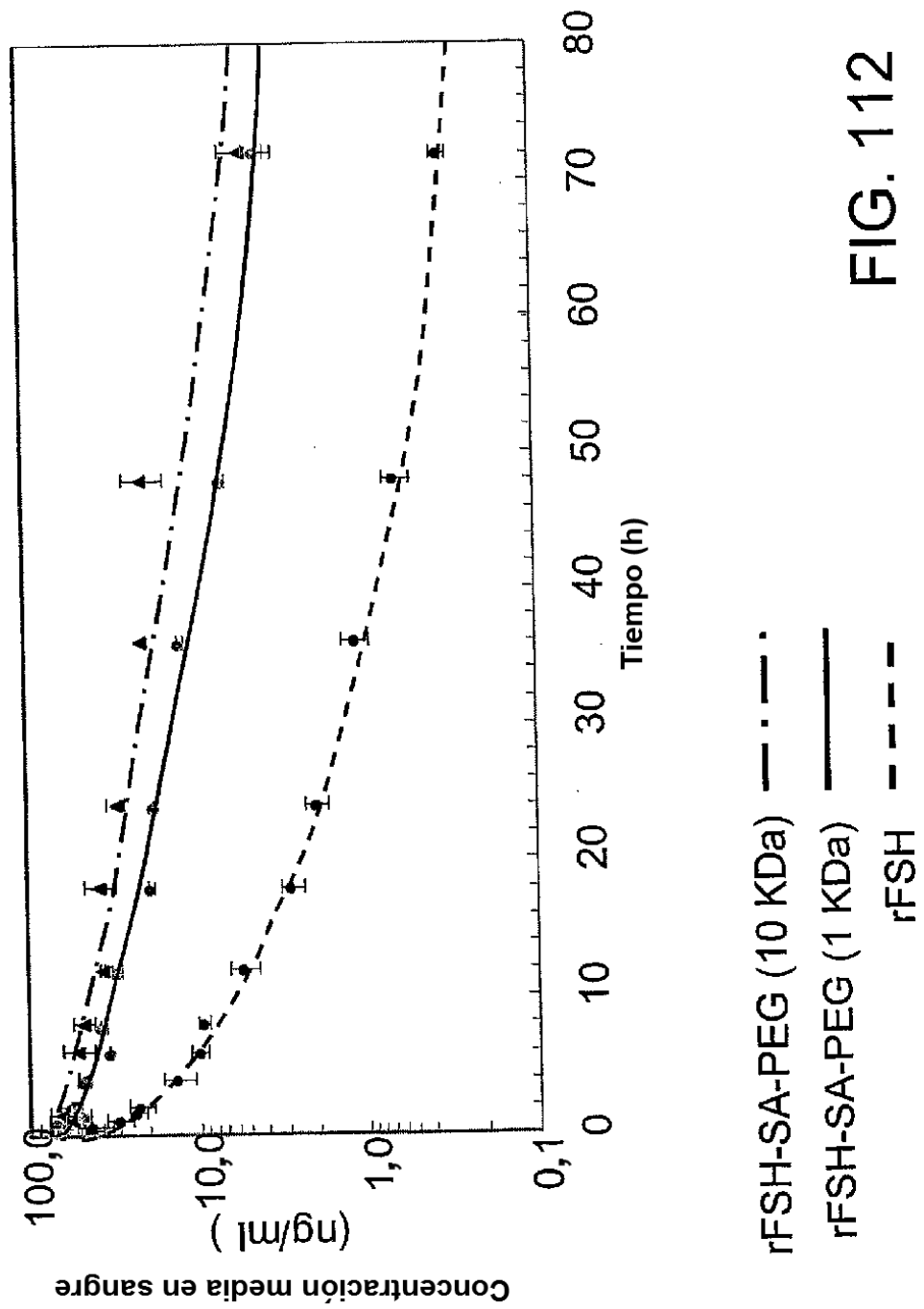


FIG. 112

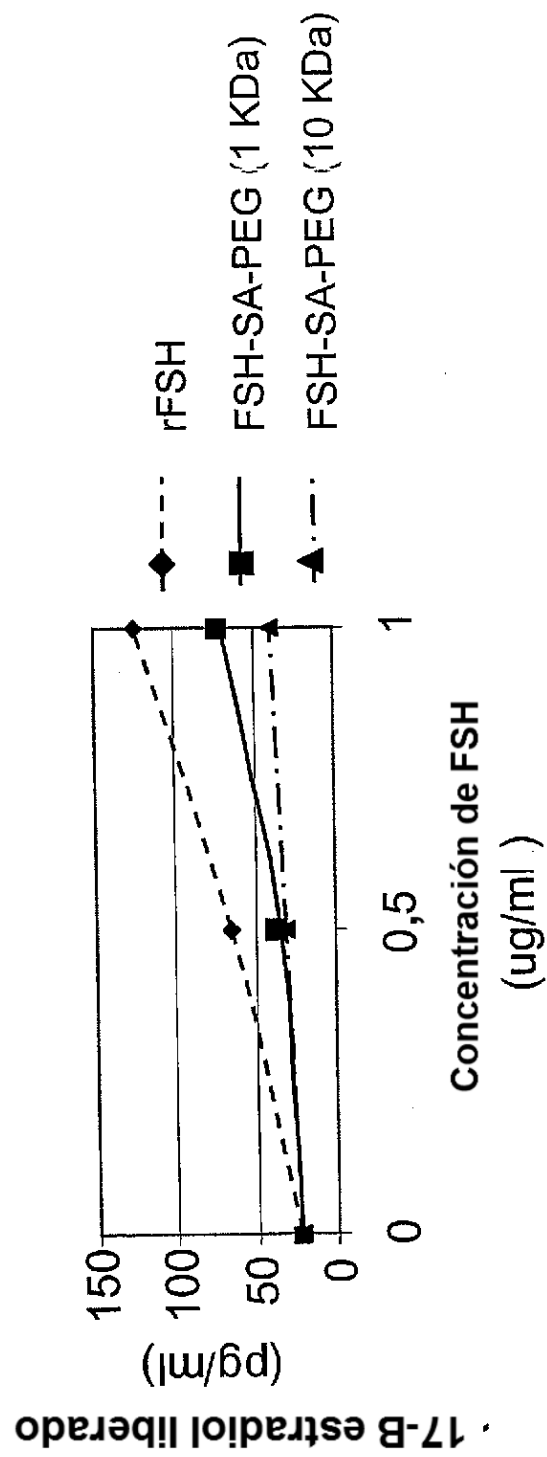


FIG. 113

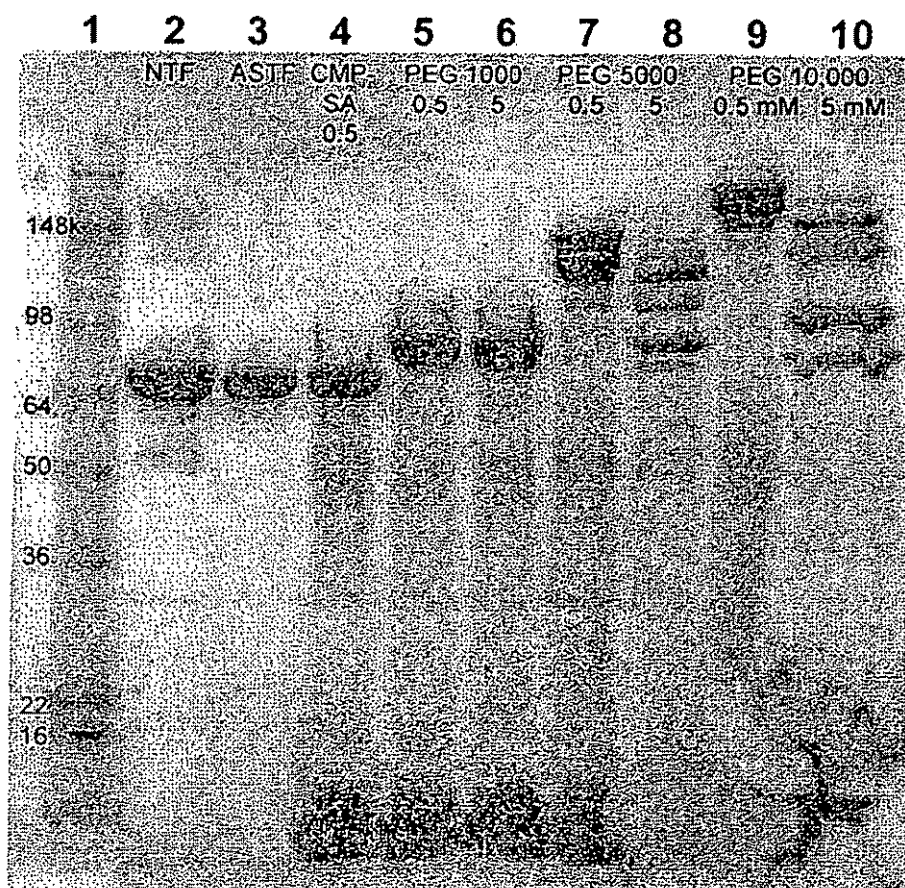


FIG. 114

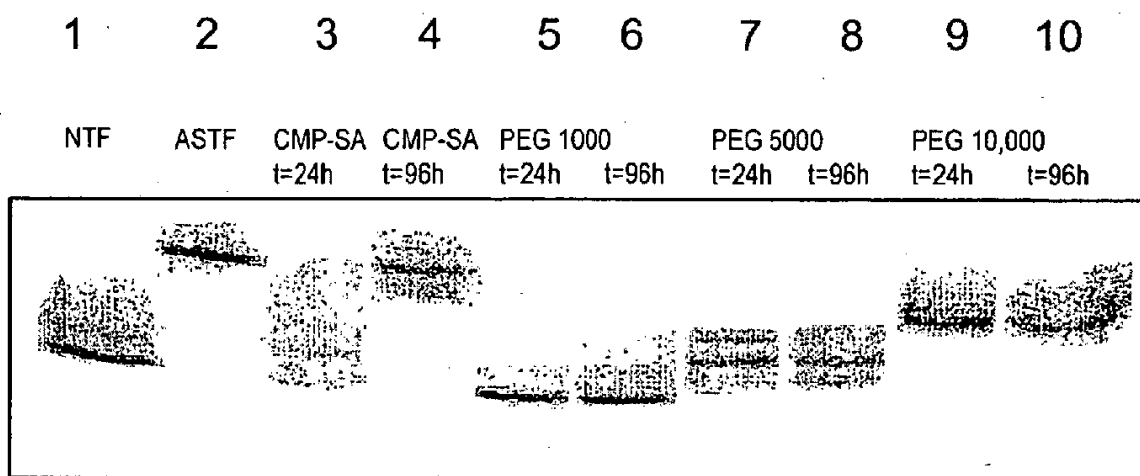


FIG. 115

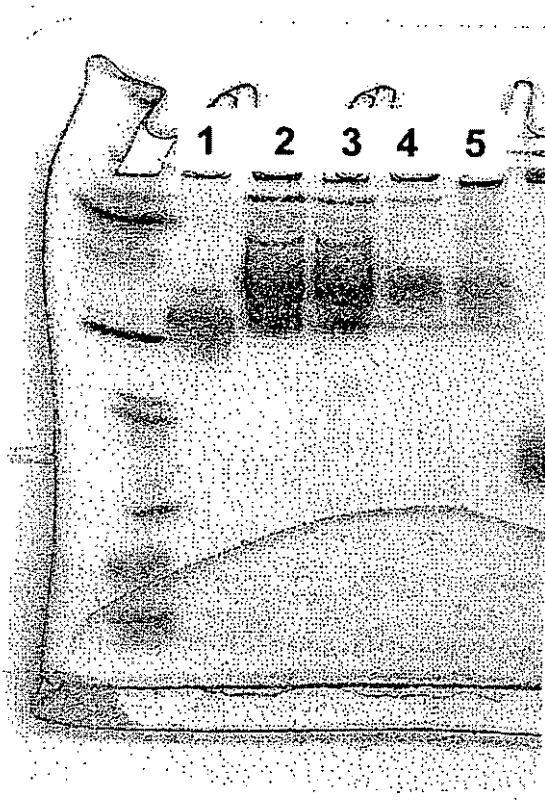
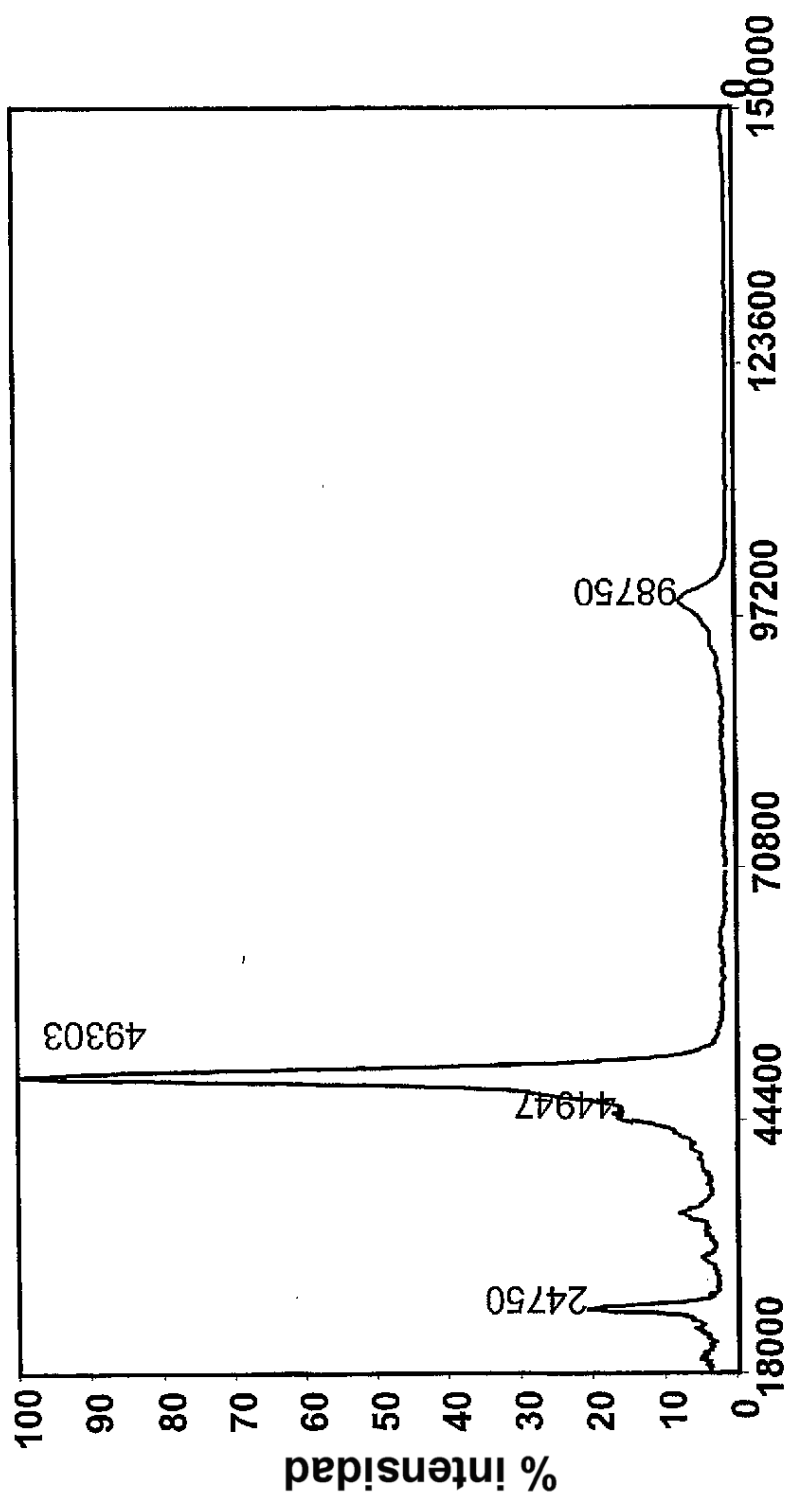


FIG. 116



Masa (m/z)
FIG. 117

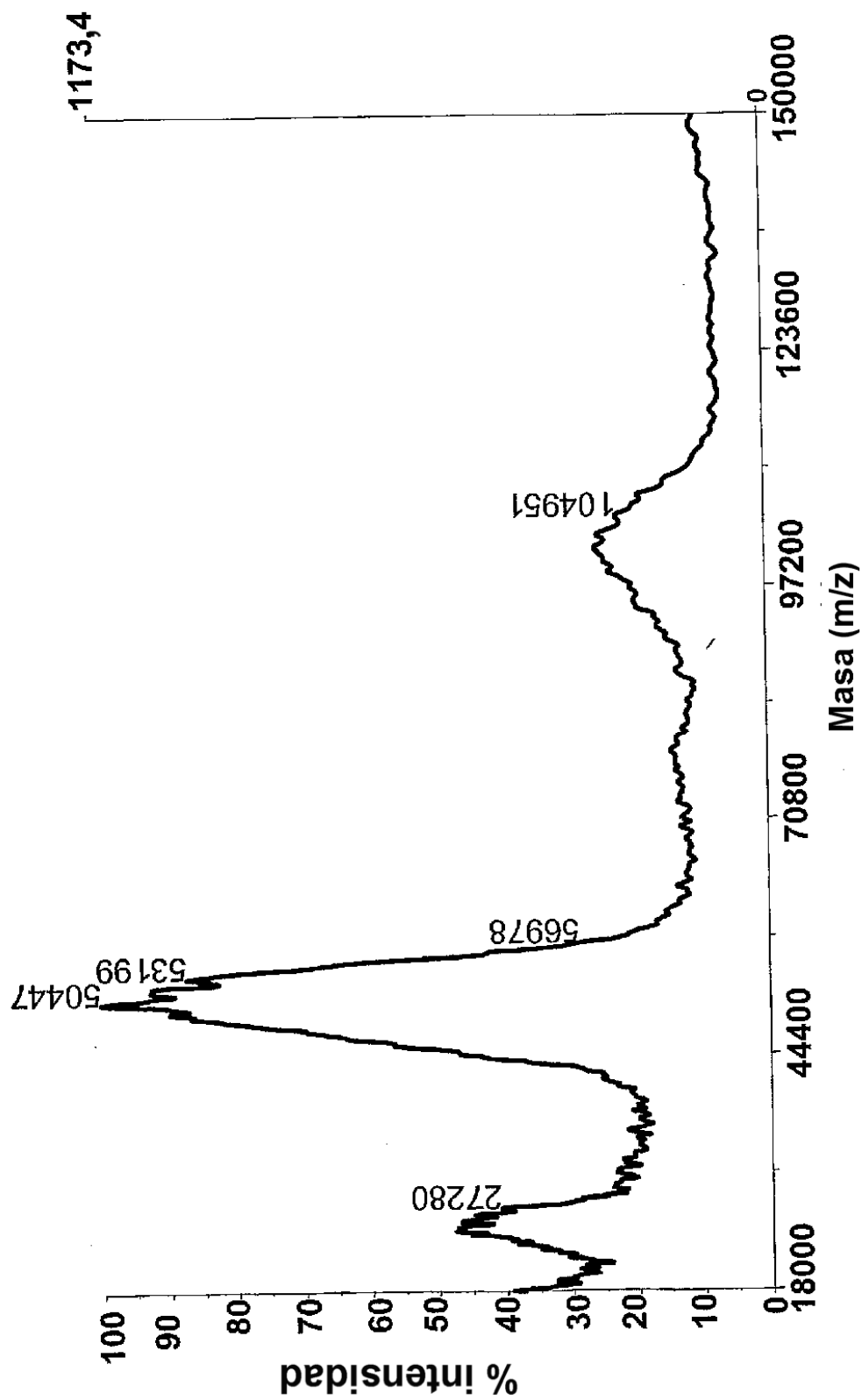


FIG. 118

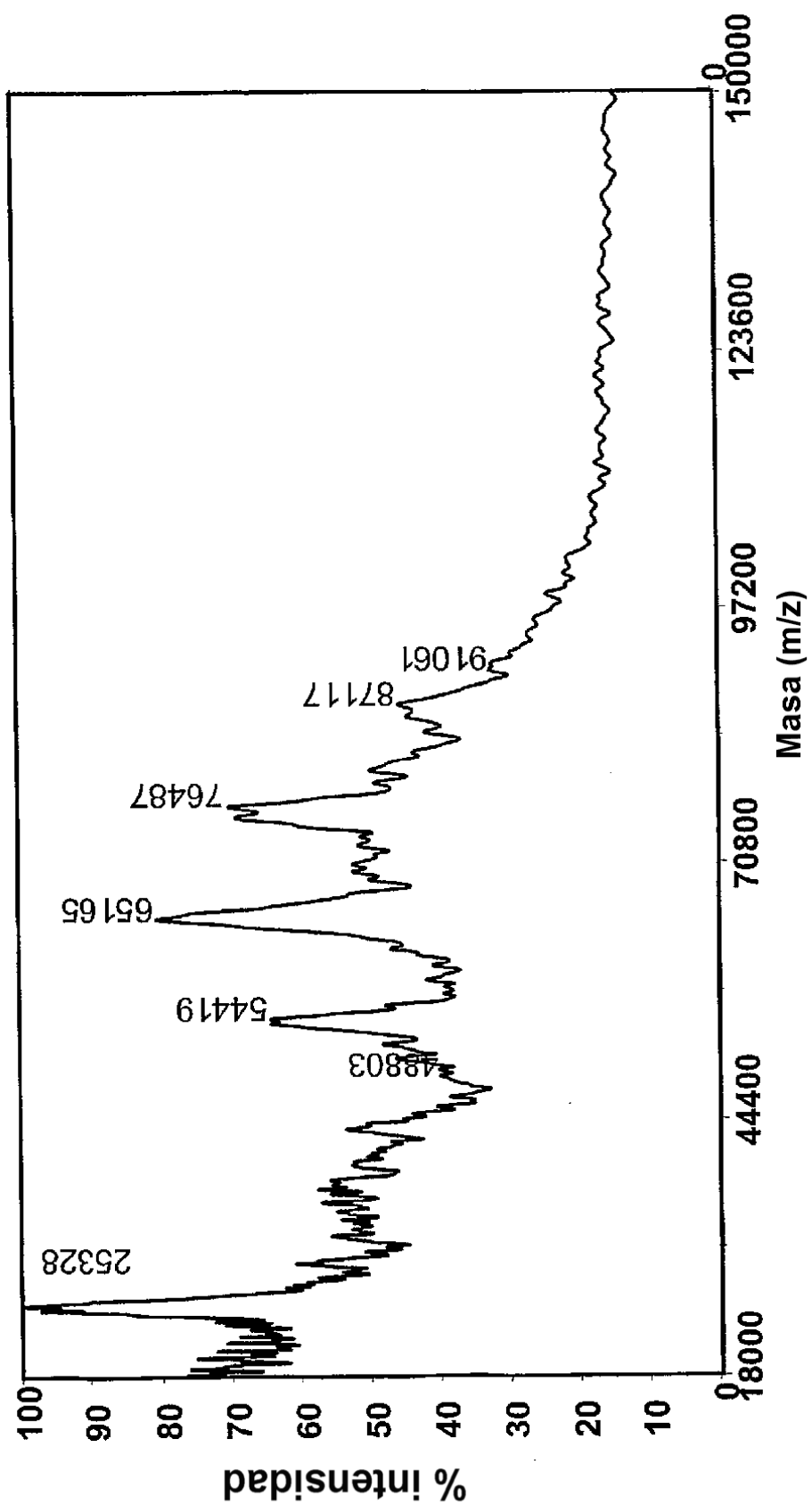


FIG. 119

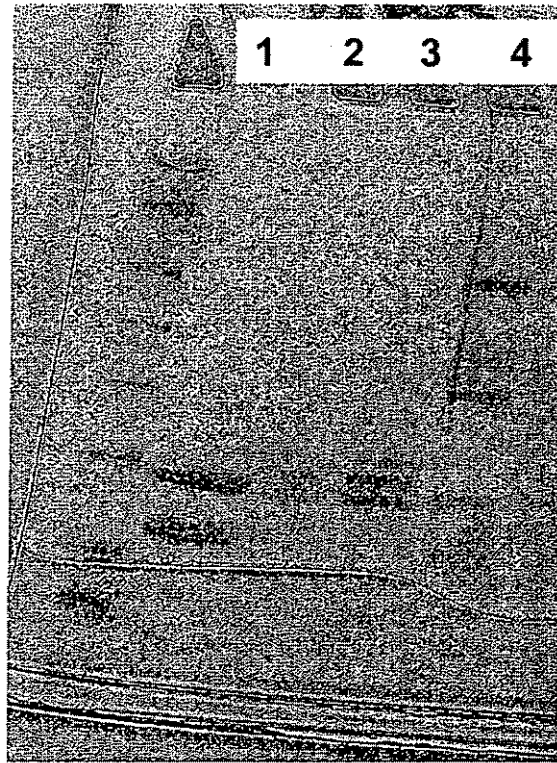


FIG. 120

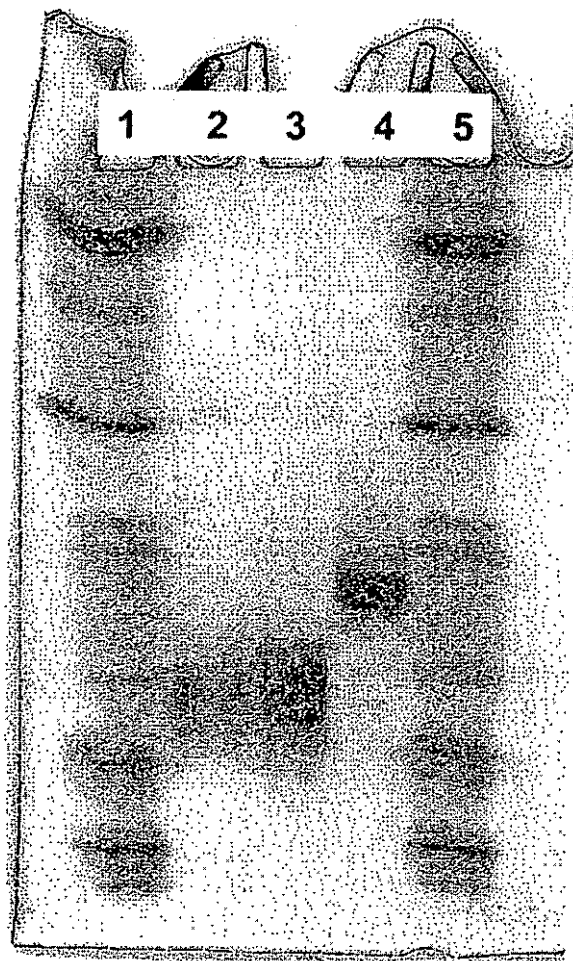


FIG. 121

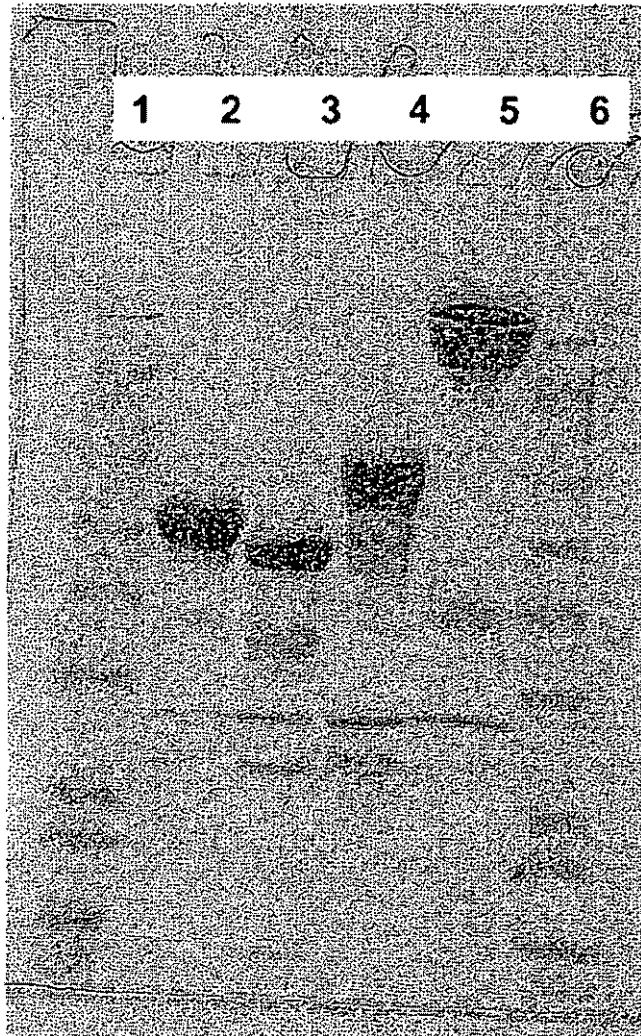


FIG. 122

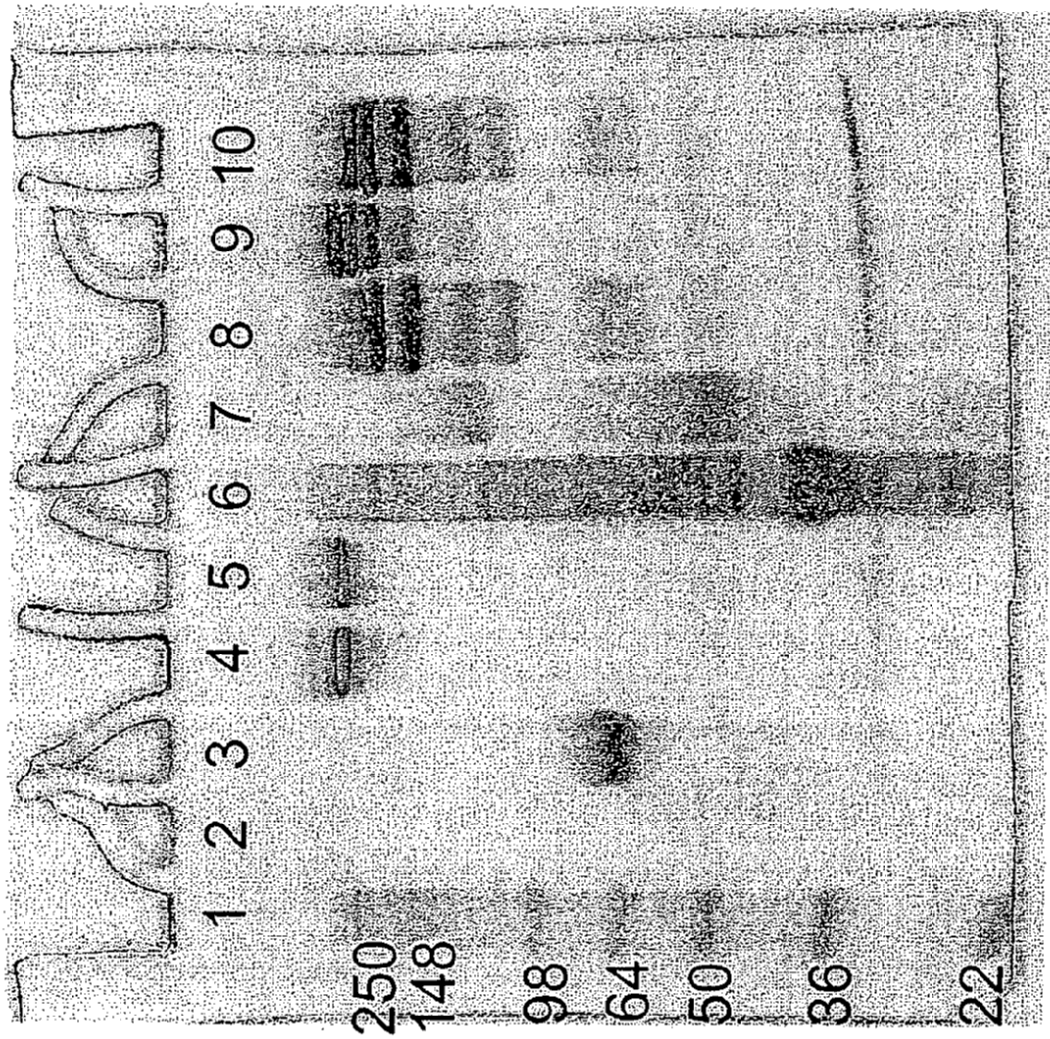


FIG. 123

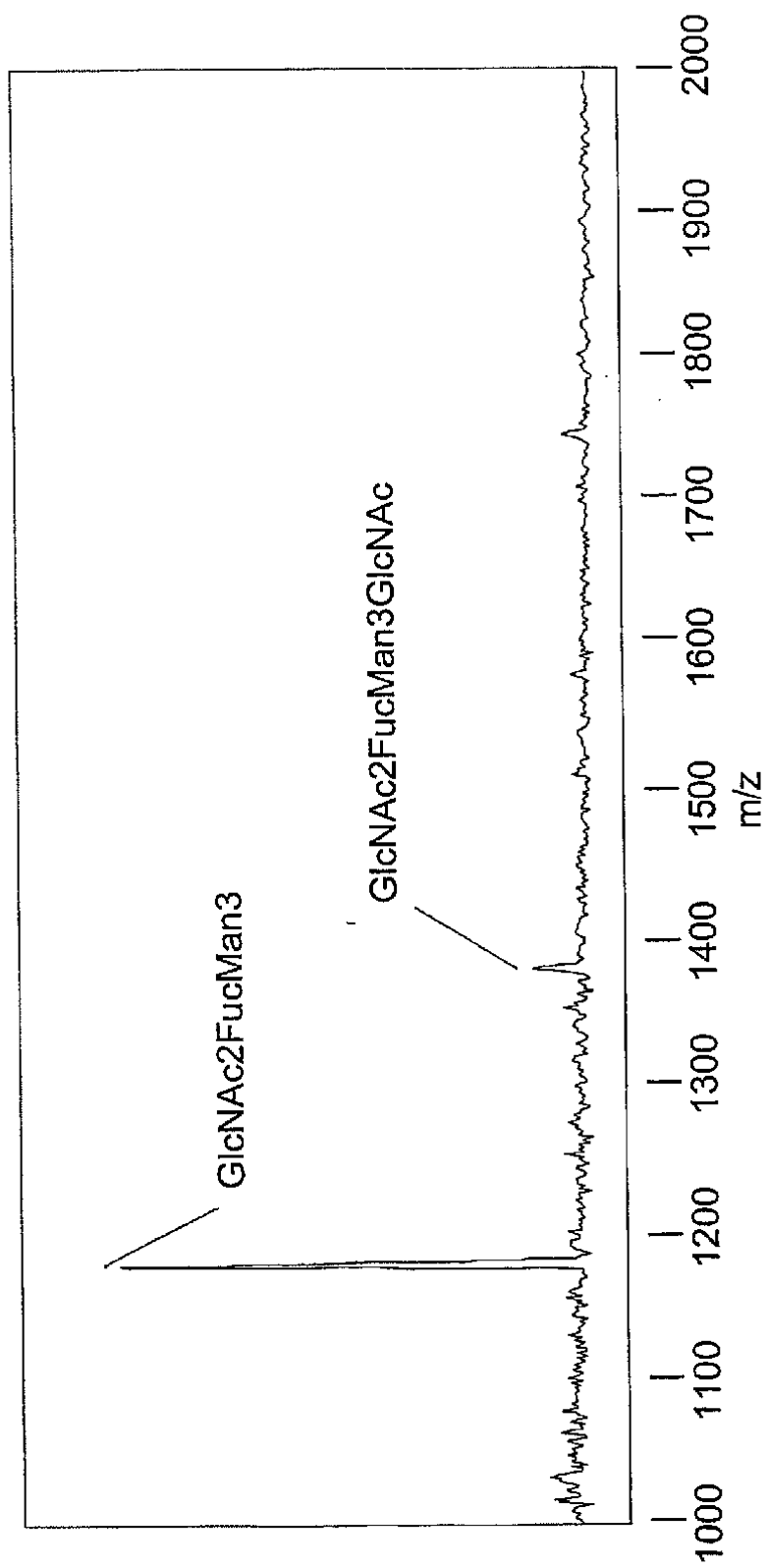


FIG. 124

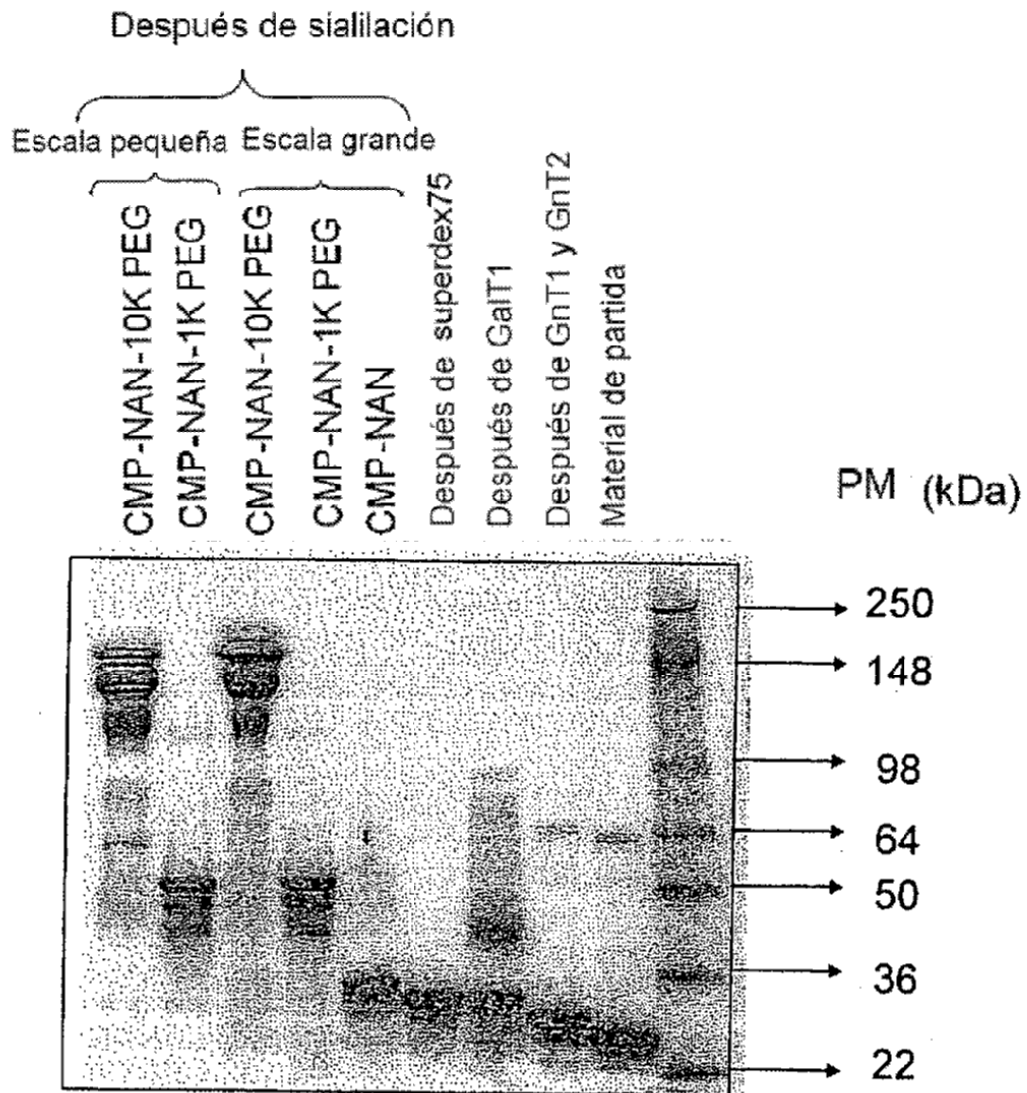


FIG. 125

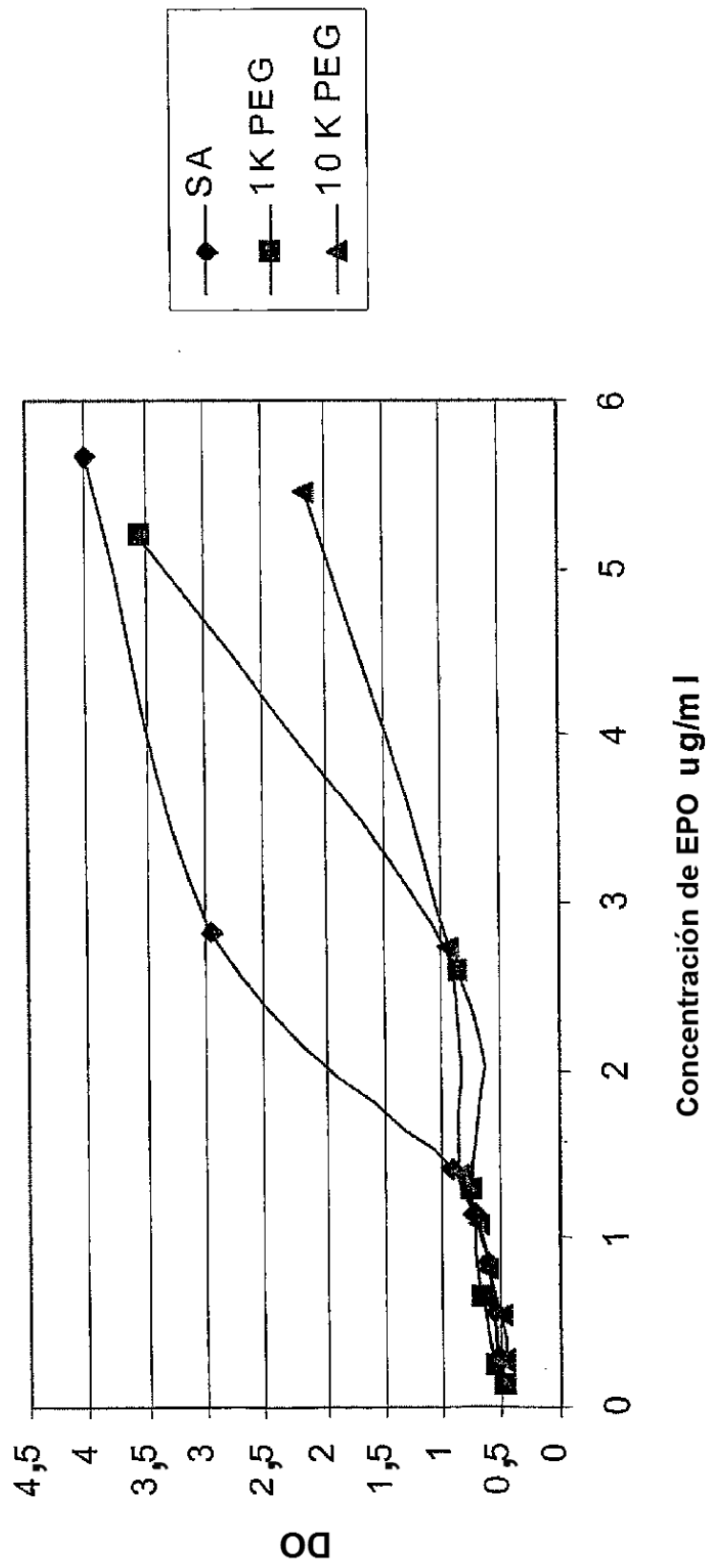


FIG. 126