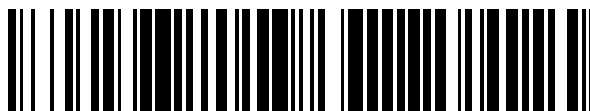


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 657**

51 Int. Cl.:

<b>C07H 21/02</b>	(2006.01)	<b>A61K 38/19</b>	(2006.01)
<b>C07H 1/00</b>	(2006.01)		
<b>C07H 15/08</b>	(2006.01)		
<b>C07H 15/12</b>	(2006.01)		
<b>C07K 1/107</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/535</b>	(2006.01)		
<b>C07K 9/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/56</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/61</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2005 E 05711345 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 1765853**

54 Título: **Glicosilación con unión en O de péptidos G-CSF**

30 Prioridad:

**08.01.2004 US 535284 P**  
**12.02.2004 US 544411 P**  
**20.02.2004 US 546631 P**  
**23.03.2004 US 555813 P**  
**12.05.2004 US 570891 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.02.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DEFREES, SHAWN;**  
**ZOPF, DAVID A.;**  
**WANG, ZHI-GUANG y**  
**CLAUSEN, HENRIK**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 560 657 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Glicosilación con unión en O de péptidos G-CSF

5 **Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud está relacionada con la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 60/535.284, presentada el 8 de enero de 2004, la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 60/544.411, presentada el 12 de febrero de 2004; la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 60/546.631, presentada el 20 de febrero de 2004; la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 60/555.813, presentada el 23 de marzo de 2004; y la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 60/570.891, presentada el 12 de mayo de 2004.

**Campo de la invención**

15 La presente invención se refiere a glicopéptidos glicosilados con unión en O, en particular, a péptidos terapéuticos y mutantes de péptidos que incluyen sitios de glicosilación unidos en O que no están presentes en el péptido de tipo silvestre.

20 La administración de péptidos glicosilados y no glicosilados para generar una determinada respuesta fisiológica es bien conocida en las técnicas medicinales. Por ejemplo, la hGH tanto recombinante como purificada se usa para el tratamiento de afecciones y enfermedades asociadas con la deficiencia de hGH, por ejemplo, con el enanismo infantil; el interferón tiene actividad antiviral conocida y el factor de estimulación de colonias de granulocitos estimula la producción de glóbulos blancos.

25 Un factor principal que ha limitado el uso de los péptidos terapéuticos es la dificultad inherente de la obtención por ingeniería genética de un sistema de expresión para expresar un péptido que tenga el patrón de glicosilación del péptido de tipo silvestre. Como es sabido en la técnica, los péptidos glicosilados de forma incorrecta o incompleta pueden ser inmunogénicos, conduciendo a la neutralización del péptido y/o al desarrollo de una respuesta alérgica. Otras deficiencias de los glicopéptidos producidos de forma recombinante incluyen la potencia y las tasas de  
30 eliminación rápida subóptimas.

Una metodología para resolver los problemas inherentes a la producción de agentes terapéuticos peptídicos glicosilados ha sido modificar los péptidos *en vitro* tras su expresión. La modificación *en vitro* posterior a la expresión se ha usado tanto para modificar las estructuras de glicano como para introducir glicanos en sitios nuevos. Se ha  
35 obtenido una caja de herramientas completa de glicosiltransferasas eucariotas recombinantes, haciendo posible la síntesis enzimática *en vitro* de glicoconjugados de mamíferos con patrones de glicosilación y estructuras de glicosilo diseñados a la medida. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.876.980; 6.030.815; 5.728.554; 5.922.577; y los documentos WO/9831826; US2003180835; y WO 03/031464.

40 Además de la manipulación de la estructura de grupos glicosilo en los polipéptidos, los glicopéptidos se pueden preparar con uno o más grupos modificadores no sacáridos, tales como polímeros hidrosolubles. Un ejemplo de polímero que se ha conjugado con péptidos es el poli(etilenglicol) ("PEG"). El uso de PEG para derivatizar agentes terapéuticos peptídicos ha demostrado reducir la inmunogenicidad de los péptidos. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.179.337 (Davis *et al.*) desvela polipéptidos no inmunogénicos, tales como enzimas y hormonas peptídicas acopladas a polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol. Además de la inmunogenicidad reducida, el tiempo de eliminación en circulación se prolonga debido al aumento de tamaño del conjugado de PEG de los polipéptidos en cuestión.

50 El principal modo de unión de PEG y sus derivados a péptidos es la unión no específica a través de un resto de aminoácido peptídico (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.088.538, la patente de EE.UU. n.º 4.496.689, la patente de EE.UU. n.º 4.414.147, la patente de EE.UU. n.º 4.055.635 y el documento PCT WO 87/00056). Otro modo de unión de PEG a péptidos es a través de la oxidación no específica de restos de glicosilo de un glicopéptido (véase, por ejemplo, el documento WO 94/05332).

55 En dichos métodos no específicos, el poli(etilenglicol) se añade de una manera aleatoria, no específica, a restos reactivos en una cadena principal peptídica. Como es evidente, la adición aleatoria de moléculas de PEG tiene sus inconvenientes, que incluyen una falta de homogeneidad del producto final y la posibilidad de que se reduzca la actividad biológica o enzimática del péptido. Por lo tanto, para la producción de péptidos terapéuticos, es muy deseable una estrategia de derivatización que genere la formación de un producto marcado específicamente,  
60 fácilmente caracterizable y sustancialmente homogéneo.

Es posible producir *en vitro* agentes terapéuticos peptídicos homogéneos, marcados específicamente, mediante la acción de las enzimas. A diferencia de los métodos no específicos comunes para la unión de un polímero sintético u otro marcador a un péptido, las síntesis basadas en enzimas tienen las ventajas de la regioselectividad y la estereoselectividad. Dos clases principales de enzimas para su uso en la síntesis de péptidos marcados son las glicosiltransferasas (por ejemplo, sialiltransferasas, oligosacariltransferasas, N-acetilglucosamiltransferasas) y

glicosidasas. Estas enzimas se pueden usar para la unión específica de azúcares que posteriormente se pueden modificar para que comprendan una fracción terapéutica. Como alternativa, se pueden usar glicosiltransferasas y glicosidasas modificadas para transferir directamente azúcares modificados a una cadena principal peptídica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.399.336 y las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20030040037, 20040132640, 20040137557, 20040126838 y 20040142856). También se conocen métodos que combinan elementos sintéticos tanto químicos como enzimáticos ((véase, por ejemplo Yamamoto *et al. Carbohydr. Res.* 305: 415-422 (1998) y publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20040137557).

Los hidratos de carbono se unen a glicopéptidos de varias formas de las que la unión en N a asparagina y la unión en O de tipo mucina a serina y treonina son las más relevantes para los agentes terapéuticos de glicoproteína recombinante. Por desgracia, no todos los polipéptidos comprenden un sitio de glicosilación con unión en N o en O como parte de su secuencia de aminoácidos primaria. En otros casos, un sitio de glicosilación existente puede ser un inconveniente para la unión de un grupo modificador (por ejemplo, polímeros hidrosolubles o no hidrosolubles, fracciones terapéuticas y/o biomoléculas) al polipéptido, o la unión de dichas fracciones en ese sitio puede causar una reducción no deseada de la actividad biológica del polipéptido. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de métodos que permitan tanto la creación precisa de sitios de glicosilación como la capacidad de dirigir con precisión la modificación de esos sitios.

### Sumario de la invención

Es un descubrimiento de la presente invención que las reacciones de glicoconjugación enzimáticas se pueden dirigir específicamente a sitios de glicosilación con unión en O y a restos de glicosilo que se unen a sitios de glicosilación con unión en O. Los sitios de glicosilación con unión en O diana pueden ser sitios naturales de un péptido de tipo silvestre o, como alternativa, se pueden introducir en un péptido por mutación. Por consiguiente, la presente invención proporciona polipéptidos que comprenden sitios mutados adecuados para la glicosilación con unión en O y composiciones farmacéuticas de los mismos. Además, la presente invención proporciona métodos de fabricación de dichos polipéptidos y el uso de dichos polipéptidos y/o composiciones farmacéuticas de los mismos para tratamientos terapéuticos.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de péptido mutante, en el que la secuencia de péptido mutante codifica un sitio de glicosilación con unión en O que no existe en el correspondiente polipéptido de tipo silvestre.

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. El polipéptido aislado es un polipéptido G-CSF.

En una realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante con la fórmula de  $M^1X_nTPLGP$  o  $M^1B_oPZ_mX_nTPLGP$ . En dicha realización, el superíndice 1 indica la primera posición de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de G-CSF de tipo silvestre (SEC ID N.º: 3), los subíndices n y m son números enteros seleccionados entre 0 a 3 y al menos uno de X y B es treonina o serina y cuando más de uno de X y B es treonina o serina, la identidad de estas fracciones se selecciona de manera independiente. También en dicha realización, Z se selecciona entre glutamato, cualquier aminoácido no cargado o combinación dipeptídica que incluye MQ, GQ y MV. En particular, en dicha realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante seleccionada entre las secuencias que consisten en MVTPLGP, MQTPLGP, MIATPLGP, MATPLGP, MPTQGAMPLGP, MVQTPLGP, MQSTPLGP, MGQTPLGP, MAPTSSSPLGP y MAPTPLGPA.

En otra realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante con la fórmula de  $M^1TPXBO.P$ . En dicha realización, el superíndice 1 indica la primera posición de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de G-CSF de tipo silvestre (SEC ID N.º: 3) y el subíndice r es un número entero seleccionado entre 0 a 3 y al menos uno de X, B y O es treonina o serina y cuando más de uno solo de X, B y O es treonina o serina, la identidad de estas fracciones se selecciona de manera independiente. En particular, en dicha realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante seleccionada entre las secuencias que consisten en: MTPTLGP, MTPTQLGP, MTPTSLGP, MTPTQGP, MTPTSSP,  $M^1TPQTP$ ,  $M^1TPTGP$ ,  $M^1TPLTP$ ,  $M^1TPNTGP$ ,  $M^1TPLGP$ ,  $M^1TPVTP$ ,  $M^1TPMVTP$  y  $MT^1P^2TQGL^3G^4P^5A^6S^7$ .

En otra realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante con la fórmula de LGSTLGI.

En otra realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante con la fórmula de  $P^{129}Z_nJ_qO.X_nPT$ , en la que el superíndice indica la posición del aminoácido en la secuencia de aminoácidos de G-CSF de tipo silvestre y Z, J, O y X se seleccionan de manera independiente entre treonina o serina y m, q, r y n son números enteros seleccionados de manera independiente entre 0 a 3. En particular, en dicha realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante seleccionada entre las secuencias que consisten en:  $P^{129}ATQPT$ ,  $P^{129}TLGPT$ ,  $P^{129}TQGPT$ ,  $P^{129}TSSPT$ ,  $P^{129}TQGAPT$ ,  $P^{129}NTGPT$ ,  $PALQPTQT$ ,  $P^{129}ALTPT$ ,  $P^{129}MVTPT$ ,  $P^{129}ASSTPT$ ,  $P^{129}TTQP$ ,  $P^{129}NTLP$ ,  $P^{129}TLQP$ ,  $MAP^{129}ATQPTQGAM$  y  $MP^{129}ATTQPTQGAM$ .

En otra realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante con la fórmula de  $PZ_mU_sJ_qP^{61}O_rX_nB_oC$ , en la que el superíndice indica la posición del aminoácido en la secuencia de aminoácidos de

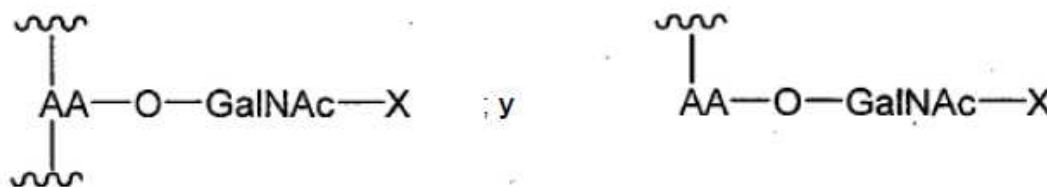
G-CSF de tipo silvestre y al menos uno de Z, J, O y U se selecciona entre treonina o serina y cuando más de uno de Z, J, O y U es treonina o serina, cada uno se selecciona de manera independiente, X y B son cualquier aminoácido sin carga o glutamato y m, s, q, r, n y o son números enteros seleccionados de manera independiente entre 0 a 3. En particular, en dicha realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante seleccionada entre las secuencias que consisten en: P<sup>61</sup>TSSC, P<sup>61</sup>TSSAC, LGIPTA P<sup>61</sup>LSSC, LGIPTQ P<sup>61</sup>LSSC, LGIPTQG P<sup>61</sup>LSSC, LGIPQT P<sup>61</sup>LSSC, LGIPTS P<sup>61</sup>LSSC, LGIPTS P<sup>61</sup>LSSC, LGIPTQP<sup>61</sup>LSSC, LGTPWAP<sup>61</sup>LSSC, LGTPFA P<sup>61</sup>LSSC, P<sup>61</sup>FTP y SLGAP<sup>68</sup>TAP<sup>61</sup>LSS.

En otra realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante con la fórmula de  $\emptyset_a G_p J_q O_r P^{175} X_n B_o Z_m U_s \psi_t$ , en la que el superíndice indica la posición del aminoácido en SEC ID N°: 3 y al menos uno de Z, U, O, J, G,  $\emptyset$ , B y X es treonina o serina y cuando más de uno de Z, U, O, J, G,  $\emptyset$ , B y X son treonina o serina, se seleccionan de manera independiente.  $\emptyset$  es opcionalmente R y G es opcionalmente H. El símbolo  $\psi$  representa cualquier resto de aminoácido sin cargar o glutamato y a, p, q, r, n, o, m, s y t son números enteros seleccionados de manera independiente entre 0 a 3. En particular, en dicha realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante seleccionada entre las secuencias que consisten en: RHLAQTP<sup>175</sup>, RHLAQTP<sup>175</sup>, QP<sup>175</sup>TQGAMP, RHLAQTP<sup>175</sup>AM, QP<sup>175</sup>TSSAP, QP<sup>175</sup>TSSAP, QP<sup>175</sup>TQGAMP, QP<sup>175</sup>TQGAM, QP<sup>175</sup>TQGA, QP<sup>175</sup>TVM, QP<sup>175</sup>NTGP y QP<sup>175</sup>QTLTLP.

En otra realización, el polipéptido G-CSF comprende una secuencia de péptido mutante seleccionada entre las secuencias P<sup>133</sup>TQTAMP<sup>139</sup>, P<sup>133</sup>TQGTMP, P<sup>133</sup>TQGTNP, P<sup>133</sup>TQGTLP y PALQP<sup>133</sup>TQTAMPA.

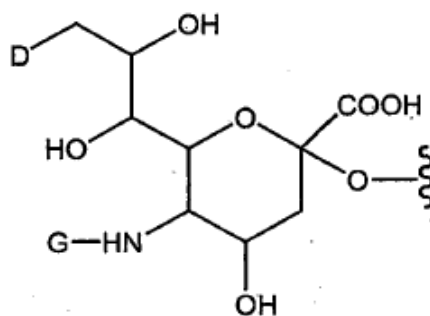
En un segundo aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de péptido mutante de la invención, en el que la secuencia del péptido mutante codifica un sitio de glicosilación con unión en O que no existe en el correspondiente polipéptido de tipo silvestre. En una realización, el ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de péptido mutante está comprendido dentro de un casete de expresión. En otra realización relacionada, la presente invención proporciona una célula que comprende el ácido nucleico de la presente invención.

En un tercer aspecto, el polipéptido aislado de la invención que comprende una secuencia de péptido mutante, que codifica un sitio de glicosilación con unión en O que no existente en el polipéptido de tipo silvestre correspondiente, tiene una fórmula seleccionada de:



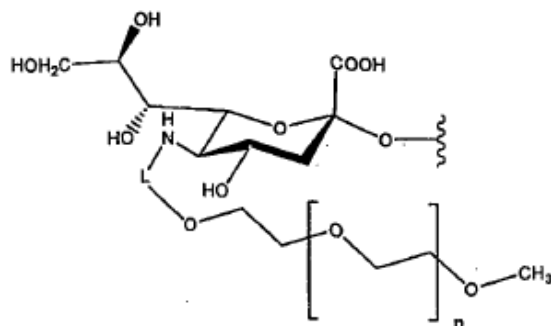
en las que AA es una cadena lateral de aminoácidos que comprende una fracción hidroxilo que está dentro de la secuencia de polipéptido mutante; y X es un grupo modificador o una fracción sacarilo. En una realización, X comprende un grupo seleccionado entre fracciones sialilo, galactosilo y Gal-Sia, en el que al menos uno de dichos sialilo, galactosilo y Gal-Sia comprende un grupo modificador.

En otra realización, X comprende la fracción:



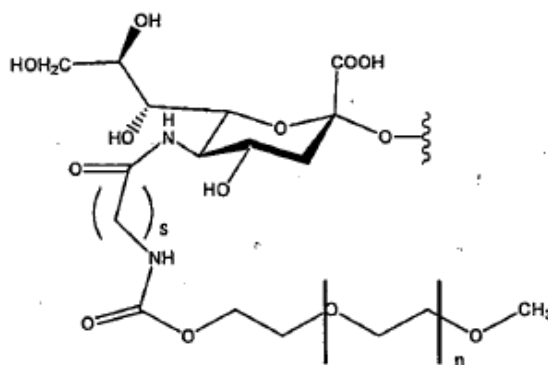
en la que D es un miembro seleccionado entre -OH y R<sup>1</sup>-L-HN-; G es un miembro seleccionado entre R<sup>1</sup>-L- y -C(O)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); R<sup>1</sup> es una fracción que comprende un miembro seleccionado entre una fracción que comprende un resto de poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificado; y L es un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido, de modo que cuando D es OH, G es R<sup>1</sup>-L- y cuando G es -C(O)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), D es R<sup>1</sup>-L-NH.

En otra realización, X comprende la estructura:



5 en la que L es un grupo alquilo sustituido o no sustituido, o un grupo heteroalquilo sustituido o no sustituido; y n se selecciona entre los números enteros de 0 a aproximadamente 500.

En otra realización, X comprende la estructura:



10 en la que s se selecciona entre los números enteros de 0 a 20.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método de fabricación de un glicoconjugado de un polipéptido aislado de la invención que comprende una secuencia de péptido mutante que codifica un sitio de glicosilación con unión en O que no existe en el polipéptido de tipo silvestre correspondiente, que comprende las etapas de:

- 15
- (a) producir de manera recombinante el polipéptido mutante y
  - (b) glicosilar enzimáticamente el polipéptido mutante con un azúcar modificado en dicho sitio de glicosilación con unión en O.

20 En un quinto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica de un polipéptido aislado de la invención que comprende una secuencia de péptido mutante, en la que la secuencia del péptido mutante codifica un sitio de glicosilación con unión en O que no existe en el polipéptido de tipo silvestre correspondiente.

25 En una realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de un polipéptido G-CSF de la invención glicoconjugado con un azúcar modificado. En una realización relacionada, el azúcar modificado se modifica con un miembro seleccionado entre poli(etilenglicol) y metoxi-poli(etilenglicol) (m-PEG).

30 En un sexto aspecto, la invención proporciona el polipéptido de la invención para su uso en un método para proporcionar terapia a un sujeto en necesidad de dicha terapia, en el que el método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención. En una realización, la terapia proporcionada es terapia con G-CSF.

A partir de la descripción detallada que figura más adelante, serán evidentes aspectos, ventajas y objetos adicionales de la presente invención.

35

**Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 es un gráfico de la absorbancia frente a la concentración de G-CSF para G-CSF no modificado y análogos glico-PEGilados en un ensayo de proliferación de células NSF-60.

La FIG. 2 es un gráfico de los recuentos por minuto (CPM) frente al tiempo para un estudio farmacocinético en ratas usando G-CSF radioyodado y derivados glicol-PEGilados del mismo.

5 La FIG. 3 es un gráfico de los  $\mu\text{g/ml}$  de G-CSF en sangre frente al tiempo (h) para un estudio farmacocinético en ratas usando G-CSF radioyodado y derivados glicol-PEGilados del mismo.

La FIG. 4 es un gráfico que representa la inducción de glóbulos blancos en ratones usando G-CSF no modificado y G-CSF glicol-PEGilado y PEGilado químicamente.

10 La FIG. 5 es un gráfico de los resultados de un ensayo de agregación tras la radioyodación con el reactivo de Bolton-Hunter.

La FIG. 6 es un gráfico de los resultados de un estudio de estabilidad acelerada de G-CSF glicol-PEGilado.

15 La FIG. 7 es una vista ampliada de la FIG. 6.

La FIG. 8 es un gráfico de los resultados de un estudio farmacocinético IV de ratas usando el proceso de radiomarcaje de Bolton Hunter (proteína plasmática precipitada).

20 La FIG. 9 es un gráfico de los resultados de un estudio farmacocinético IV de ratas usando G-CSF sin marcar y G-CSF glicol-PEGilado y PEGilado químicamente detectado por ELISA.

La FIG. 10 muestra sialiltransferasas representativas de uso en la presente invención.

## 25 Descripción detallada de la invención

### Abreviaturas

30 PEG, poli(etilenglicol); m-PEG, metoxi-poli(etilenglicol); PPG, poli(propilenglicol); m-PPG, metoxi-poli(propilenglicol); Fuc, fucosilo; Gal, galactosilo; GalNAc, N-acetilgalactosaminilo; Glc, glucosilo; GlcNAc, N-acetilglucosaminilo; Man, manosilo; ManAc, acetato de manosaminilo; Sia, ácido siálico; y NeuAc, N-acetilneuraminilo.

### Definiciones

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

50 Todos los oligosacáridos descritos en el presente documento se describen con el nombre o la abreviatura para el sacárido no reductor (es decir, Gal), seguido de la configuración del enlace glicosídico ( $\alpha$  o  $\beta$ ), el enlace del anillo (1 o 2), la posición del anillo del sacárido reductor implicado en el enlace (2, 3, 4, 6 u 8) y, a continuación, el nombre o la abreviatura del sacárido de reducción (es decir, GlcNAc). Cada sacárido es preferentemente una piranosa. Para una revisión de la nomenclatura convencional de glicobiología, véase, por ejemplo, "Essentials of Glycobiology", Varki *et al.* eds. CSHL Press (1999).

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

60 La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos en forma bien monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, la expresión engloba ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una forma similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otro modo, una determinada secuencia de  
65 ácidos nucleicos también engloba implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la

secuencia indicada explícitamente. En concreto, las sustituciones de codones degenerados se pueden realizar generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o de todos) está sustituida con restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); y Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). La expresión ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen.

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

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

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono  $\alpha$  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. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. "Miméticos de aminoácidos" se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

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

En el presente documento, los aminoácidos se pueden indicar bien por los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Del mismo modo, los nucleótidos, se pueden indicar mediante sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

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

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales de un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteínas que altera, añade o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservadora", en la que la modificación genera la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas de manera conservadora se suman a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.

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

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

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

En el presente documento, los aminoácidos se pueden indicar bien por los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Del mismo modo, los nucleótidos, se pueden indicar mediante sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

En la presente solicitud, los restos de aminoácido se numeran de acuerdo con sus posiciones con respecto al resto más N-terminal, que se numera con 1, de una secuencia de polipéptido de tipo silvestre sin modificar.

"Péptido" se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí a través de enlaces de amida. Los péptidos de la presente invención pueden variar de tamaño, por ejemplo, de dos aminoácidos a cientos o miles de aminoácidos, lo que, como alternativa, se denomina polipéptido. Además, también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo,  $\beta$ -alanina, fenilglicina y homoarginina. También se pueden usar en la presente invención aminoácidos que no estén codificados por genes. Por otro lado, también se pueden usar en la invención aminoácidos que se hayan modificado para que incluyan grupos reactivos, sitios de glicosilación, polímeros, fracciones terapéuticas, biomoléculas y similares. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser isómeros D o L. En general, se prefiere el isómero L. Además, en la presente invención también son útiles otros peptidomiméticos. Como se usa en el presente documento, "péptido" se refiere tanto a péptidos glicosilados como no glicosilados. Además, se incluyen polipéptidos que están glicosilados de forma incompleta por un sistema que expresa el polipéptido. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., en "CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS", B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983).

En la presente solicitud, los restos de aminoácido se numeran de acuerdo con sus posiciones con respecto al extremo N, por ejemplo, con el resto situado más a la izquierda, que se numera con 1, de una secuencia de péptido.

La expresión "polipéptido mutante" o "muteína" se refiere a una forma de un péptido que difiere de su forma de tipo silvestre correspondiente o forma de origen natural. Un péptido mutante puede contener una o más mutaciones, por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación, etc., que dé lugar al péptido mutante.

La expresión "conjugado de péptido", se refiere a especies de la invención en las que un péptido está gliconjugado con un azúcar modificado según lo expuesto en el presente documento. En un ejemplo representativo, el péptido es un péptido mutante que tiene un sitio de glicosilación con unión en O no presente en el péptido de tipo silvestre.

"Próximo a un resto de prolina" como se usa en el presente documento, se refiere a un aminoácido que tiene menos de aproximadamente 10 aminoácidos eliminados de un resto de prolina, preferentemente, menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos eliminados de un resto de prolina, más preferentemente, menos de aproximadamente 4, 3, 2 o 1 restos eliminados de un resto de prolina. El "resto de prolina próximo al" aminoácido puede estar en el extremo C o N del resto de prolina.

La expresión "ácido siálico" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve átomos de carbono. El miembro más común de la familia del ácidos siálicos es el ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-gicolilneuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia de ácidos siálicos es el ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano *et al.*, (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 11550-11557; Kanamori *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 21811-21819 (1990)). Además, se incluyen ácidos siálicos sustituidos en la posición 9 tales como un 9-O-acil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Neu5Ac tal como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para una revisión de la familia de ácidos siálicos, 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 el uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación se divulgan en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.



Como se usa en el presente documento, la expresión "azúcar modificado" se refiere a un hidrato de carbono de origen natural o no natural que es añadido enzimáticamente a un aminoácido o un resto de glicosilo de un polipéptido usando un proceso de la invención. El azúcar modificado se selecciona entre una serie de sustratos enzimáticos que incluyen, pero sin limitación, nucleótidos de azúcar (mono, di y trifosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo) y azúcares que ni están activados ni son nucleótidos. El "azúcar modificado" se funcionaliza covalentemente con un "grupo modificador". Los grupos modificadores útiles incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles, fracciones terapéuticas, fracciones de diagnóstico, biomoléculas y similares. El grupo modificador preferentemente no es un hidrato de carbono de origen natural o sin modificar. El sitio de funcionalización con el grupo modificador se selecciona de modo que no impida que el "azúcar modificado" se añada enzimáticamente a un péptido.

El término "hidrosoluble" se refiere a fracciones que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. Los métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de polímeros hidrosolubles incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mixtas o estar compuestos de un solo aminoácido, por ejemplo, poli(lisina). Un polisacárido ilustrativo es el poli(ácido siálico). Un poli(éter) ilustrativo es el poli(etilenglicol), por ejemplo, m-PEG. La poli(etilenimina) es una poliamina ilustrativa y el ácido poli(acrílico) es un poli(ácido carboxílico) ilustrativo.

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

La cadena principal polimérica puede ser lineal o ramificada. Las cadenas principales poliméricas ramificadas se conocen en general en la técnica. Normalmente, un polímero ramificado tiene una fracción de núcleo ramificado central y una pluralidad de cadenas poliméricas lineales unidas al núcleo de la ramificación central. El PEG se usa comúnmente en formas ramificadas que se pueden preparar mediante la adición de óxido de etileno a diversos polioles tales como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. La fracción de la ramificación central también se puede obtener de varios aminoácidos tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado se puede representar de forma general como R-(PEG-OH)<sub>m</sub> en la que R representa la fracción del núcleo, tal como glicerol o pentaeritritol y m representa el número de ramificaciones. Las moléculas de PEG con múltiples ramificaciones, tales como las que se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.932.462, también se pueden usar como la cadena principal polimérica.

También son adecuados para la invención otros muchos polímeros. Las estructuras principales poliméricas que son no peptídicas e hidrosolubles, con de 2 a aproximadamente 300 extremos, son particularmente útiles en la invención. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, otros poli(alquilenglicoles) tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli(α-hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolina, poli(N-acrilolmorfolina), tal como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.629.384, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, así como copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos. Aunque el peso molecular de cada cadena de la cadena principal polimérica puede variar, normalmente está en el intervalo de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 100.000 Da, a menudo de aproximadamente 6.000 Da a aproximadamente 80.000 Da.

El término "glicoconjugación", como se usa en el presente documento, se refiere a la conjugación mediada enzimáticamente de una especie de azúcar modificado a un aminoácido o resto de glicosilo de un polipéptido, por ejemplo, una hormona de crecimiento humano mutante de la presente invención. Un subgénero de "glicoconjugación" es la "glicol-PEGilación", en la que el grupo modificador del azúcar modificado es poli(etilenglicol) y un derivado de alquilo (por ejemplo, m-PEG) o un derivado reactivo (por ejemplo, H<sub>2</sub>N-PEG, HOOC-PEG) del mismo.

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

La expresión, "grupo de unión a glicosilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto de glicosilo al que se une covalentemente un grupo modificador (por ejemplo, fracción de PEG, fracción terapéutica, biomolécula); el grupo de unión de glicosilo une el grupo modificador al resto del conjugado. En los métodos de la invención, el "grupo de unión a glicosilo" se une de forma covalente a un péptido glicosilado o no glicosilado, uniendo de este modo el agente a un resto de aminoácido y/o de glicosilo del péptido. Un "grupo de unión a glicosilo" se deriva generalmente de un "azúcar modificado" mediante la unión enzimática del "azúcar modificado" a un resto de aminoácido y/o de glicosilo del péptido. El grupo de unión a glicosilo puede ser una estructura derivada de sacárido que se degrada durante la formación de un casete de azúcar modificado por un grupo modificador (por

ejemplo, oxidación→formación de bases de Schiff→reducción), o el grupo de enlace a glicosilo puede estar intacto. Un "grupo de unión a glicosilo intacto" se refiere a un grupo de unión que se deriva de una fracción de glicosilo en el que el monómero sacárido que une el grupo modificador y al resto del conjugado no se degrada, por ejemplo, se oxida, por ejemplo, con metaperyodato sódico. Los "grupos de unión a glicosilo intactos" de la invención se pueden derivar de un oligosacárido de origen natural mediante la adición de una o más unidades de glicosilo o mediante la eliminación de una o más unidades de glicosilo de una estructura de sacárido precursora.

La expresión "fracción de dirección", como se usa en el presente documento, se refiere a especies que se localizarán selectivamente en un tejido o una región del cuerpo en particular. La localización está mediada por el reconocimiento específico de determinantes moleculares, el tamaño molecular del agente diana o conjugado, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y similares. Hay otros mecanismos de dirección de un agente a un tejido o una región en particular conocidos por los expertos en la materia. Las fracciones de dirección ilustrativas incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, transferrina, HS-glicoproteína, factores de coagulación, proteínas séricas,  $\beta$ -glicoproteína, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO y similares.

Como se usa en el presente documento, "fracción terapéutica" significa cualquier agente útil para terapia incluyendo, pero sin limitación, antibióticos, agentes antiinflamatorios, fármacos antitumorales, citotoxinas y agentes radiactivos. "Fracción terapéutica" incluye profármacos de agentes bioactivos, construcciones en las que más de una fracción terapéutica está unida a un vehículo, por ejemplo, agentes polivalentes. La fracción terapéutica también incluye proteínas y construcciones que incluyen proteínas. Las proteínas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, la eritropoyetina (EPO), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos (G-MCSF), interferón (por ejemplo, interferón  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), interleucina (por ejemplo, interleucina II), proteínas séricas (por ejemplo, Factores VII, VIII, VIII, IX y X), gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona de estimulación de folículos (FSH) y hormona luteinizante (LH) y proteínas de fusión a anticuerpos (por ejemplo, receptor del factor de necrosis tumoral (proteína de fusión de (TNFR)/dominio Fc)).

Las proteínas de la invención son proteínas G-CSF.

Como se usa en el presente documento, "fármaco antitumoral" significa cualquier agente útil para combatir el cáncer incluyendo, pero sin limitación, citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes de alquilación, antraciclinas, antibióticos, agentes antimetabólicos, procarbazona, hidroxiaurea, asparaginasa, corticosteroides, interferones y agentes radiactivos. Además, en el alcance de la expresión "fármaco antitumoral", se incluyen conjugados de péptidos con actividad antitumoral, por ejemplo, TNF- $\alpha$ . Los conjugados incluyen, pero sin limitación, los formados entre una proteína terapéutica y una glicoproteína de la invención. Un conjugado representativo es el formado entre PSGL-1 y TNF- $\alpha$ .

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

Como se usa en el presente documento, "un agente radiactivo" incluye cualquier radioisótopo que sea eficaz para el diagnóstico o la destrucción de un tumor. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, indio-111, cobalto-60. Además, los elementos radiactivos de origen natural tales como uranio, radio y torio, que en general representan mezclas de radioisótopos, son ejemplos adecuados de un agente radiactivo. Los iones metálicos normalmente están quelados con una fracción quelante orgánica.

En la técnica se conocen muchos grupos quelantes útiles, éteres corona, criptandos y similares (por ejemplo, EDTA, DTPA, DOTA, NTA, HDTA, etc. y sus análogos de fosfonato tales como DTPP, EDTP, HDTP, NTP, etc.). Véase, por ejemplo, Pitt *et al.*, "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, Nueva York, 1989 y las referencias contenidas en los mismos.

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

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que,

cuando se combina con el conjugado, conserva la actividad del conjugado y no es reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos habituales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos que incluyen comprimidos recubiertos y cápsulas. Por lo general, dichos vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales del mismo, estearato de magnesio o de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Dichos vehículos también pueden incluir aditivos aromatizantes y colorantes y otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos.

Como se usa en el presente documento, "administración" significa administración oral, administración en forma de un supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional o subcutánea, administración por inhalación, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una bomba mini-osmótica, al sujeto. La administración puede ser mediante cualquier vía, incluyendo parenteral y transmucosa (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica), particularmente por inhalación. La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraarteriolar, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Además, cuando la inyección es para tratar un tumor, por ejemplo, para inducir la apoptosis, la administración puede ser directamente en el tumor y/o en los tejidos que rodean al tumor. Otros modos de administración incluyen, pero sin limitación, el uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

La expresión "que mejora" o el término "mejorar" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento de una patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como alivio, remisión o disminución de los síntomas o una mejora en el bienestar físico o mental de un paciente. La mejoría de los síntomas se puede basar en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico y/o una evaluación psiquiátrica.

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

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

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

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

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

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

"Homogeneidad" se refiere a la consistencia estructural en una población de fraccionesceptoras a las que se conjugan los azúcares modificados. Por lo tanto, en un conjugado de péptido de la invención en el que cada resto de azúcar modificado se conjuga a un sitio aceptor que tiene la misma estructura que el sitio aceptor al que se conjugan todos los demás azúcares modificados, se dice que el conjugado peptídico tiene una homogeneidad del

aproximadamente 100 %. La homogeneidad normalmente se expresa en forma de un intervalo. El límite inferior del intervalo de homogeneidad para los conjugados de péptidos es del aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 % y el límite superior del intervalo de pureza es del aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o más del aproximadamente 90 %.

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

15 "Glicoforma sustancialmente uniforme" o un "patrón de glicosilación sustancialmente uniforme", cuando se refiere a una especie de glicopéptido, se refiere al porcentaje de fraccionesceptoras que son glicosiladas por la glicosiltransferasa de interés (por ejemplo, fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de una  $\alpha$ 1,2 fucosiltransferasa, existe un patrón de fucosilación sustancialmente uniforme si sustancialmente todos (como se define a continuación) los Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc-R y los análogos sialilados de los mismos están fucosilados en un conjugado peptídico de la invención. Un experto en la materia entenderá que el material de partida puede contener fraccionesceptoras glicosiladas (por ejemplo, fracciones de Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc-R fucosiladas). Por lo tanto, el porcentaje de glicosilación calculado incluirá las fraccionesceptoras que se glicosilan mediante los métodos de la invención, así como aquellas fraccionesceptoras ya glicosiladas en el material de partida.

25 El término "sustancialmente" de las definiciones anteriores de "sustancialmente uniforme", en general, significa que al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de las fraccionesceptoras para una glicosiltransferasa particular están glicosiladas.

30 Cuando se especifican grupos sustituyentes con sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, incluyen igualmente los sustituyentes químicamente idénticos, que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, -CH<sub>2</sub>O- también pretende referirse a -OCH<sub>2</sub>-.

35 El término "alquilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa, a menos que se indique de otro modo, un radical de hidrocarburo cíclico, o de cadena lineal o ramificada, o combinaciones de los mismos, que pueden estar totalmente saturados, mono- o poliinsaturados y pueden incluir radicales di- y polivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> significa de uno a diez átomos de carbono). Los ejemplos de radicales de hidrocarburo saturado incluyen, pero sin limitación, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es aquel que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturado incluyen, pero sin limitación, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique de otro modo, también pretende incluir los derivados de alquilo que se definen con más detalle a continuación, tales como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se limitan a grupos de hidrocarburo se denominan "homoalquilo".

50 El término "alquileo" por sí mismo o como parte de otros sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, según lo ilustrado, pero sin limitación, por -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y además incluye los grupos que se describen a continuación como "heteroalquileo". Por lo general, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, prefiriéndose en la presente invención los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Un "alquilo inferior" o "alquileo inferior" es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, que en general tiene ocho o menos átomos de carbono.

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

60 El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique de otro modo, un radical de hidrocarburo cíclico, o de cadena lineal o ramificada estable, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número de átomos de carbono indicado y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S y en el que los átomos de nitrógeno y de azufre se pueden oxidar opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno se puede cuaternizar opcionalmente. El/los heteroátomo/s de O, N y S y Si se pueden colocar en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH=CH- O-CH<sub>3</sub>, -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH=N-

OCH<sub>3</sub> y -CH=CH-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>. Pueden ser consecutivos hasta dos heteroátomos, tales como, por ejemplo, -CH<sub>2</sub>-NH-OCH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. De forma análoga, el término "heteroalquileo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, según lo ilustrado, pero sin limitación, por -CH<sub>2</sub>-NH-OCH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Para los grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino y similares). Además, para los grupos de unión de alquileo y heteroalquileo, ninguna orientación del grupo de unión está implicada por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de unión. Por ejemplo, la fórmula -C(O)<sub>2</sub>R' representa tanto -C(O)<sub>2</sub>R' como -R'C(O)<sub>2</sub>.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique de otro modo, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Además, para el heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero sin limitación, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidro-tien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares.

Los términos "halo" o "halógeno," por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique de otro modo, a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Además, los términos tales como "haloalquilo" pretenden incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)" pretende incluir, pero sin limitación, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo y similares.

El término "arilo" significa, a menos que se indique de otro modo, un sustituyente aromático, poliinsaturado, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (preferentemente de 1 a 3 anillos), que se condensan entre sí o se unen covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en los que los átomos de nitrógeno y azufre se oxidan opcionalmente y el/los átomo/s de nitrógeno se cuaternizan opcionalmente. Un grupo heteroarilo se puede unir al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-benzoimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalino, 5-quinoxalino, 3-quinolilo, tetrazolilo, benzo[b]furanilo, benzo[b]tienilo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-ilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos de arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables que se describen a continuación.

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

Cada uno de los términos anteriormente mencionados (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") pretende incluir formas tanto sustituidas como no sustituidas del radical indicado. A continuación, se proporcionan sustituyentes preferidos para cada tipo de radical.

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo los grupos normalmente denominados como alquileo, alqueno, heteroalquileo, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno y heterocicloalqueno), en general, se denominan "sustituyentes del grupo alquilo" y pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados entre, pero sin limitación: arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R' -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', =NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''N'', -NR''C(O)<sub>2</sub>R', -NR-C(NR''R''')=NR''', -NR-C(NR''R''')=NR''', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR''R'', -NRSO<sub>2</sub>R', -CN y -NO<sub>2</sub> en un número que varía de cero a (2m'+1), en el que m' es el número total de átomos de carbono de dicho radical. Cada uno de R', R'', R''' y R'''' se refiere preferentemente de forma independiente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona de manera independiente como se hace para cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando hay presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' se unen al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir, pero sin limitación, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la descripción anterior de los sustituyentes, un experto en la materia entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos que no son grupos de hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, CF<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> y similares).

Al igual que los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo, en general, se denominan "sustituyentes del grupo arilo". Los sustituyentes se seleccionan entre, por ejemplo: halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR''-C(O)NR''R''', -NR''C(O)<sub>2</sub>R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -NRSO<sub>2</sub>R', -CN y -NO<sub>2</sub>, -R', -N<sub>3</sub>, -CH(Ph)<sub>2</sub>, fluoroalcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y fluoroalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y en los que R', R'', R''' y R'''' se seleccionan preferentemente de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona de manera independiente como se hace para cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando hay presente más de uno de estos grupos.

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo se pueden sustituir opcionalmente con un sustituyente de fórmula-T-C(O)-(CRR')<sub>q</sub>-U-, en la que T y U son de manera independiente -NR-, -O-, -CRR'- o un enlace sencillo y q es un número entero de 0 a 3. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo se pueden sustituir opcionalmente con un sustituyente de fórmula -A-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-B-, en la que A y B son de manera independiente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NR'- o un enlace sencillo y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo formado de este modo se puede sustituir opcionalmente con un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes de átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo se pueden sustituir opcionalmente con un sustituyente de fórmula -(CRR')<sub>s</sub>-X-(CR''R''')<sub>d</sub>-, en la que s y d son de manera independiente números enteros de 0 a 3 y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>- o -S(O)<sub>2</sub>NR'-. Los sustituyentes R, R', R'' y R''' se seleccionan preferentemente de forma independiente entre hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido o no sustituido.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" pretende incluir oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

### Introducción

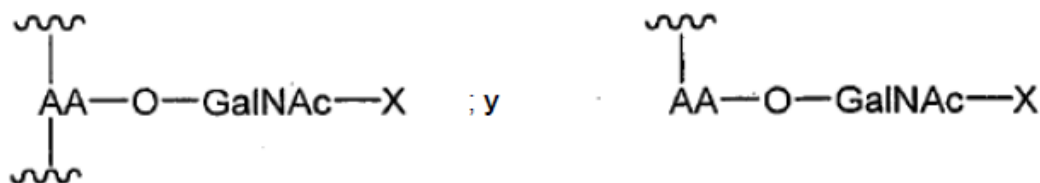
La presente invención proporciona conjugados de glicopéptidos en los que una fracción de azúcar modificado está unida directa o indirectamente (por ejemplo, a través de e interpuesta en un resto de glicosilo) a un sitio de glicosilación con unión en O del péptido. También se proporcionan métodos de producción de los conjugados de la invención.

En general, el sitio de glicosilación con unión en O es la cadena lateral de hidroxilo de un aminoácido natural (por ejemplo, serina, treonina) o no natural (por ejemplo, 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina). Los ejemplos de restos de sacarilo con unión en O incluyen N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa.

Los métodos de la invención se pueden poner en práctica en cualquier péptido que tenga un sitio de glicosilación con unión en O. Por ejemplo, los métodos son de uso para producir glicoconjugados con unión en O en los que la fracción de glicosilo está unida a un sitio de glicosilación con unión en O que está presente en el péptido de tipo silvestre. Por consiguiente, la presente invención proporciona glicoconjugados de péptidos de tipo silvestre que incluyen un sitio de glicosilación con unión en O. Los péptidos de acuerdo con la presente descripción son péptidos G-CSF.

En realizaciones ilustrativas, la invención también proporciona nuevos péptidos mutantes que incluyen uno o más sitios de glicosilación con unión en O que no están presentes en el péptido de tipo silvestre correspondiente. El polipéptido mutante es un polipéptido de G-CSF. También se proporcionan versiones glicosiladas con unión en O de los péptidos mutantes y métodos de preparación de péptidos mutantes glicosilados con unión en O. Otros métodos incluyen la elaboración, el recorte y/o la modificación del resto de glicosilo con unión en O y de restos de glicosilo con unión en N en lugar de en O.

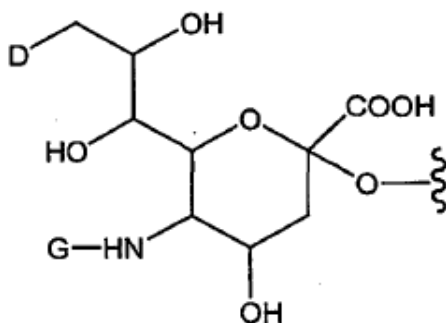
En un aspecto ilustrativo, la invención proporciona un péptido mutante que tiene la fórmula:



en las que AA es un aminoácido con una cadena lateral que incluye una fracción de hidroxilo. Son hidroxiaminoácidos ilustrativos la treonina y la serina. La fracción de GalNAc está enlazada a AA a través del átomo de oxígeno de la fracción de hidroxilo. El AA puede estar presente en el péptido de tipo silvestre o, como alternativa, añadirse o trasladarse mediante la mutación de la secuencia del péptido de tipo silvestre. X es un grupo modificador,

una fracción de sacarilo, por ejemplo, los grupos de sialilo, galactosilo y Gal-SIA, o una fracción de sacarilo y un grupo modificador. En una realización ilustrativa, en la que X es una fracción de sacarilo, incluye un grupo modificador, como se ha descrito en el presente documento. El aminoácido glicosilado puede estar en el extremo N o C del péptido o interno a la secuencia de péptido.

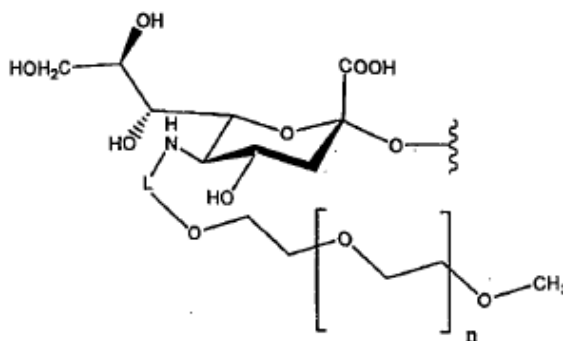
5 En una realización ilustrativa, X comprende un grupo seleccionado entre fracciones de sialilo, galactosilo y Gal-Sia, en las que al menos uno de dichos sialilo, galactosilo y Gal-Sia comprende un grupo modificador. En una realización ilustrativa adicional, X comprende la fracción:



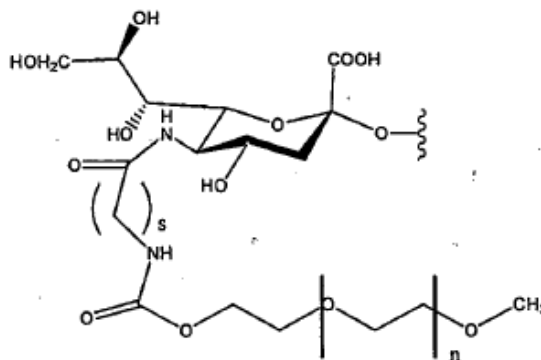
10 en la que D es un miembro seleccionado entre -OH y R<sup>1</sup>-L-NH-; G es un miembro seleccionado entre R<sup>1</sup>-L- y -C(O)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); R<sup>1</sup> es una fracción que comprende un miembro seleccionado entre una fracción que comprende un resto de poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificado; y L es un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido, de modo que cuando D es OH, G es R<sup>1</sup>-L- y cuando G es -C(O)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), D es R<sup>1</sup>-L-NH.

15

En otra realización ilustrativa, X comprende la estructura:



20 en la que L es un grupo alquilo sustituido o no sustituido, o un grupo heteroalquilo sustituido o no sustituido; y n se selecciona entre los números enteros de 0 a aproximadamente 2.500. En otra realización ilustrativa más, X comprende la estructura:



25 en la que s se selecciona entre los números enteros de 0 a 20.

En otra realización ilustrativa, AA se encuentra dentro de un segmento rico en prolina del péptido mutante y/o está próximo a un resto de prolina. Las secuencias apropiadas que forman sitios de glicosilación con unión en O se determinan fácilmente interrogando a la glicosilación enzimática con unión en O de péptidos cortos que contienen uno o más sitios de glicosilación con unión en O putativos.

Los conjugados de la invención se forman entre péptidos y especies diversas tales como polímeros hidrosolubles, fracciones terapéuticas, fracciones de diagnóstico, fracciones de dirección y similares. También se proporcionan conjugados que incluyen dos o más péptidos unidos entre sí a través de un brazo enlazador, es decir, conjugados multifuncionales; siendo al menos un péptido glicosilado con unión en O o que incluye un sitio de glicosilación con unión en O mutante. Los conjugados multifuncionales de la invención pueden incluir dos o más copias del mismo péptido o una colección de diversos péptidos con diferentes estructuras y/o propiedades. En los conjugados ilustrativos de acuerdo con dicha realización, el enlazador entre los dos péptidos está unido a al menos uno de los péptidos a través de un resto de glicosilo con unión en O, tal como un grupo enlazador de un glicosilo intacto con unión en O.

Los conjugados de la invención se forman mediante la unión enzimática de un azúcar modificado al péptido glicosilado o no glicosilado. El azúcar modificado se añade directamente a un sitio de glicosilación con unión en O o a un resto de glicosilo unido ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, a través de uno o más restos de glicosilo) a un sitio de glicosilación con unión en O. La invención también proporciona un conjugado de un péptido glicosilado con unión en O en el que un azúcar modificado está unido directamente a un sitio con unión en N, o a un resto de glicosilo unido directa o indirectamente a un sitio de glicosilación con unión en N.

El azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido (o resto de glicosilo) y el grupo modificador en el azúcar, se convierte en lo que se denomina en el presente documento "un grupo enlazador de glicosilo intacto". Con el uso de la exquisita selectividad de enzimas tales como las glicosiltransferasas, el presente método proporciona péptidos que portan un grupo deseado en una o más ubicaciones específicas. Así pues, de acuerdo con la presente invención, un azúcar modificado está unido directamente a un locus seleccionado de la cadena peptídica o, como alternativa, el azúcar modificado se añade a una fracción de hidrato de carbono de un glicopéptido. Los péptidos en los que los azúcares modificados se unen a tanto un hidrato de carbono glicopeptídico como directamente a un resto de aminoácido de la cadena principal peptídica también pertenecen al alcance de la presente invención.

A diferencia de las estrategias de elaboración de péptidos químicas y enzimáticas conocidas, los métodos de la invención hacen posible montar péptidos y glicopéptidos que tengan un patrón de derivatización sustancialmente homogéneo; las enzimas usadas en la invención, en general, son selectivas de un resto de aminoácido particular o de una combinación de restos de aminoácidos del péptido. Los métodos también son prácticos para la producción a gran escala de péptidos y glicopéptidos modificados. Por lo tanto, los métodos de la invención proporcionan un medio práctico para la preparación a gran escala de glicopéptidos que tienen patrones de derivatización uniformes preseleccionados. Los métodos son particularmente adecuados para la modificación de péptidos terapéuticos, incluyendo pero sin limitación, glicopéptidos que se glicosilan de forma incompleta durante la producción en células de cultivo celular (por ejemplo, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, células fúngicas, células de levadura o células procarióticas), o plantas o animales transgénicos.

Los métodos de la invención también proporcionan conjugados de péptidos glicosilados y no glicosilados con una mayor semivida terapéutica debido a, por ejemplo, la reducción de la tasa de eliminación o la reducción de la tasa de captación por el sistema inmune o reticuloendotelial (RES). Además, los métodos de la invención proporcionan un medio para enmascarar los determinantes antigénicos en los péptidos, reduciendo o eliminando de este modo una respuesta inmune del hospedador contra el péptido. La unión selectiva de agentes de dirección a un péptido usando un azúcar modificado adecuado también se puede usar para dirigir un péptido a un determinado receptor tisular o de la superficie celular que sea específico para el agente de dirección en particular. Además, se proporciona una clase de péptidos que se modifican específicamente con una fracción terapéutica conjugada a través de un grupo enlazador de glicosilo.

### **Glicosilación con unión en O**

La presente invención proporciona péptidos glicosilados con unión en O, conjugados de estas especies y métodos de formación de péptidos glicosilados con unión en O que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada ("un sitio de glicosilación con unión en O"). Son de particular interés los péptidos mutantes que incluyen un sitio de glicosilación con unión en O que no está presente en el péptido de tipo silvestre correspondiente. El sitio de glicosilación con unión en O es un locus para la unión de un resto de glicosilo que porta un grupo modificador.

La glicosilación con unión en O de tipo mucina, una de las formas más abundantes de glicosilación de proteínas, se encuentra en glicoproteínas secretadas y asociadas con la superficie celular de todas las células eucariotas. Existe una gran diversidad en estructuras creadas por glicosilación con unión en O (cientos de posibles estructuras), que son producidas por la actividad catalítica de cientos de enzimas glicosiltransferasas que residen en el complejo de Golgi. Existe diversidad en el nivel de la estructura de glicano y en posiciones de unión de O-glicanos de cadenas principales proteicas. A pesar del alto grado de diversidad potencial, está claro que la glicosilación con unión en O es



un proceso altamente regulado que muestra un alto grado de conservación entre los organismos multicelulares.

La primera etapa de la glicosilación con unión en O de tipo mucina está catalizada por uno o más miembros de una gran familia de UDP-GalNAc: las N-acetilgalactosaminiltransferasas polipeptídicas (GalNAc-transferasas) (EC 2.4.1.41), que transfieren GalNAc a sitios aceptores de serina y de treonina (Hassan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275: 38197-38205 (2000)). Hasta la fecha, se han identificado y caracterizado doce miembros de la familia de GalNAc-transferasa de mamíferos (Schwientek *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277: 22623-22638 (2002)) y se han predicho varios supuestos miembros adicionales de esta familia genética a partir del análisis de bases de datos del genoma. Las isoformas de la GalNAc-transferasa tienen diferentes propiedades cinéticas y muestran patrones de expresión diferenciales temporal y espacialmente, lo que sugiere que tienen funciones biológicas distintas (Hassan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275: 38197-38205 (2000)). El análisis de secuencias de GalNAc-transferasas ha conducido a la hipótesis de que estas enzimas contienen dos subunidades distintas: una unidad catalítica central y una unidad C-terminal con similitud en la secuencia con la de la lectina ricina vegetal, denominada "dominio de lectina" (Hagen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 6797-6803 (1999); Hazes, *Protein Eng.* 10: 1353-1356 (1997); Breton *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 563-571 (1999)). Experimentos previos que implican mutagénesis específica del sitio de restos conservados seleccionados confirmaron que mutaciones en el dominio catalítico eliminaban la actividad catalítica. Por el contrario, las mutaciones en el "dominio de lectina" no tenían efectos significativos en la actividad catalítica de la isoforma de GalNAc-transferasa, GalNAc-T1 (Tenno *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277(49): 47088-96 (2002)). Por lo tanto, se creía que el "dominio de lectina" C-terminal no era funcional y no desempeñaba papeles para las funciones enzimáticas de las GalNAc-transferasas (Hagen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 6797-6803 (1999)).

No obstante, pruebas recientes demuestran que algunas GalNAc-transferasas presentan actividades únicas con glicopéptidos parcialmente GalNAc-glicosilados. Las acciones catalítica de al menos tres isoformas de GalNAc-transferasa, GalNAc-T4, -T7 y -T10, actúan selectivamente en los glicopéptidos que corresponden a dominios de repetición en tándem de mucina en los que solamente algunas de las secuencias de glicosilación potencial agrupadas han sido glicosiladas con GalNAc por otras GalNAc-transferasas (Bennett *et al.*, *FEBS Letters* 460: 226-230 (1999); Ten Hagen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276: 17395-17404 (2001); Bennett *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 30472-30481 (1998); Ten Hagen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 27867-27874 (1999)). GalNAc-T4 y -T7 reconocen diferentes polipéptidos glicosilados con GalNAc y catalizan la transferencia de GalNAc a sitios de sustrato aceptor además de los que se han utilizado anteriormente. Se predice que una de las funciones de dichas actividades de GalNAc-transferasa representa una etapa de control de la densidad de ocupación de O-glicano en mucinas y en glicoproteínas de tipo mucina con alta densidad de glicosilación con unión en O.

Un ejemplo de ello es la glicosilación de la mucina asociada con el cáncer MUC1. La MUC1 contiene una región glicosilada con unión en O de repetición en tándem de 20 restos (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA) con cinco posibles sitios de glicosilación con unión en O. GalNAc-T1, -T2 y -T3 pueden iniciar la glicosilación de la repetición en tándem de MUC1 y se pueden incorporar solamente en tres sitios (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, se subrayan los sitios de unión a GalNAc). La GalNAc-T4 es única en que es la única isoforma de GalNAc-transferasa identificada hasta el momento que puede completar la unión del glicano con unión en O a los cinco sitios aceptores en la secuencia de repetición en tándem de 20 aminoácidos de la mucina asociada con el cáncer de mama. MUC1. GalNAc-T4 transfiere GalNAc a al menos dos sitios no usados por otras isoformas de GalNAc-transferasa en el glicopéptido GalNAc<sub>4</sub>TAP24 (TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP, los sitios de unión a GalNAc-T4 únicos están en negrita) (Bennett *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 30472-30481 (1998)). Parece que una actividad tal como la que presenta GalNAc-T4 es necesaria para la producción de la glicofoma de MUC1 expresada por células cancerosas cuando todos los sitios potenciales están glicosilados (Muller *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 18165-18172 (1999)). La MUC1 normal de las glándulas mamarias lactantes tiene aproximadamente 2,6 glicanos con unión en O por repetición (Muller *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272: 24780-24793 (1997)) y la MUC1 derivada de la línea celular de cáncer T47D tiene 4,8 glicanos con unión en O por repetición (Muller *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 18165-18172 (1999)). La forma de MUC1 asociada al cáncer está asociada, por tanto, con una mayor densidad de ocupación de glicano con unión en O y esto se consigue mediante una actividad de GalNAc-transferasa idéntica o similar a la de GalNAc-T4.

Las GalNAc-transferasas polipeptídicas, que no han presentado especificidades aparentes hacia GalNAc-glicopéptido, también parecen estar moduladas por sus supuestos dominios de lectina (documento PCT WO 01/85215 A2). Recientemente, se encontró que las mutaciones en el supuesto dominio de lectina de GalNAc-T1, al igual que las que se han analizado anteriormente en GalNAc-T4 (Hassan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275:38197-38205 (2000)), modificaban la actividad de la enzima de una forma similar a GalNAc-T4. Por lo tanto, aunque la GalNAc-T1 de tipo silvestre añadía múltiples restos de GalNAc consecutivos a un sustrato peptídico con múltiples sitios aceptores, la GalNAc-T1 mutada no añadía más de un resto de GalNAc al mismo sustrato (Tenno *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277(49): 47088-96 (2002)).

Dado que se ha demostrado que las mutaciones de las GalNAc transferasas se pueden utilizar para producir patrones de glicosilación que sean distintos de los producidos por las enzimas de tipo silvestre, la utilización de una o más GalNAc-transferasas mutantes en la preparación de los péptidos glicosilados con unión en O de la invención pertenece al alcance de la presente invención.

**Péptidos mutantes con sitios de glicosilación con unión en O**

Los péptidos proporcionados por la presente invención incluyen una secuencia de aminoácidos que es reconocida como un aceptor de GalNac por una o más GalNac transferasas mutantes o de tipo silvestre. La secuencia de aminoácidos del péptido bien es de tipo silvestre, para aquellos péptidos que incluyen un sitio de glicosilación con unión en O, una secuencia mutante en la que se introduce un sitio de glicosilación con unión en O no natural o un polipéptido que comprende sitios de glicosilación con unión en O tanto naturales como no naturales. Los péptidos ilustrativos con los que se pone en práctica la presente invención incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), por ejemplo, tipos silvestres de 175 y 178 aminoácidos (con o sin restos de metionina N-terminales). Cualquier número en el superíndice de un aminoácido indica la posición del aminoácido con respecto a la metionina N-terminal del polipéptido. Estos números se pueden ajustar fácilmente para reflejar la ausencia de metionina N-terminal si el extremo N del polipéptido comienza sin una metionina. Se entiende que los extremos N de los péptidos ilustrativos pueden comenzar con o sin una metionina. Además, los expertos entenderán que la estrategia establecida en el presente documento para la preparación de análogos glicoconjugados con unión en O de péptidos de tipo silvestre y mutantes es aplicable a cualquier péptido.

En una realización ilustrativa, el péptido es un G-CSF mutante biológicamente activo que incluye una o más mutaciones en un sitio seleccionado a partir del extremo N, adyacente a o que abarca H, P<sup>61</sup>, P<sup>129</sup>, P<sup>133</sup> y p<sup>175</sup> según lo definido en las reivindicaciones. Los G-CSF mutantes biológicamente activos de la presente invención incluyen cualquier polipéptido G-CSF, en parte o en su totalidad, con una o más mutaciones que no produzcan una pérdida sustancial ni total de su actividad biológica, medida mediante cualquier ensayo funcional adecuado conocido por un experto en la materia. En una realización, las mutaciones en los G-CSF mutantes biológicamente activos de la presente invención se encuentran dentro de uno o más sitios de glicosilación con unión en O que no existen de forma natural en el G-CSF de tipo silvestre. En otra realización, las mutaciones de los G-CSF mutantes biológicamente activos de la presente invención residen dentro y fuera de uno o más sitios de glicosilación con unión en O de los G-CSF mutantes.

Los polipéptidos G-CSF de tipo silvestre y mutantes representativos tienen secuencias que se seleccionan entre:

**SEC ID N°: 1 (tipo silvestre de 178 aminoácidos)**

**mtp<sub>1</sub>l<sub>2</sub>g<sub>3</sub>pass<sub>4</sub>lp<sub>5</sub> q<sub>6</sub>s<sub>7</sub>fl<sub>8</sub>lk<sub>9</sub>cle<sub>10</sub>q<sub>11</sub> vr<sub>12</sub>ki<sub>13</sub>q<sub>14</sub>gd<sub>15</sub>g<sub>16</sub>aa<sub>17</sub> l<sub>18</sub>q<sub>19</sub>ek<sub>20</sub>lv<sub>21</sub>se<sub>22</sub>ca<sub>23</sub> ty<sub>24</sub>kl<sub>25</sub>ch<sub>26</sub>pe<sub>27</sub>el  
v<sub>28</sub>ll<sub>29</sub>gh<sub>30</sub>sl<sub>31</sub>g<sub>32</sub>ip<sub>33</sub> w<sub>34</sub>ap<sub>35</sub>l<sub>36</sub>ss<sub>37</sub>c<sub>38</sub>ps<sub>39</sub>sq<sub>40</sub> al<sub>41</sub>q<sub>42</sub>lag<sub>43</sub>cls<sub>44</sub>sq<sub>45</sub> lh<sub>46</sub>sg<sub>47</sub>lf<sub>48</sub>ly<sub>49</sub>q<sub>50</sub>g<sub>51</sub> ll<sub>52</sub>q<sub>53</sub>ale<sub>54</sub>gis<sub>55</sub>p  
el<sub>56</sub>g<sub>57</sub>pt<sub>58</sub>ld<sub>59</sub>tl<sub>60</sub>q<sub>61</sub> ld<sub>62</sub>v<sub>63</sub>ad<sub>64</sub>f<sub>65</sub>atti<sub>66</sub> w<sub>67</sub>q<sub>68</sub>q<sub>69</sub>me<sub>70</sub>el<sub>71</sub>g<sub>72</sub>ma<sub>73</sub> pa<sub>74</sub>l<sub>75</sub>q<sub>76</sub>pt<sub>77</sub>q<sub>78</sub>gam<sub>79</sub> pa<sub>80</sub>fa<sub>81</sub>sa<sub>82</sub>f<sub>83</sub>q<sub>84</sub>rr  
agg<sub>85</sub>vl<sub>86</sub>v<sub>87</sub>ash<sub>88</sub>l<sub>89</sub> q<sub>90</sub>s<sub>91</sub>f<sub>92</sub>lev<sub>93</sub>sy<sub>94</sub>rv<sub>95</sub> lr<sub>96</sub>h<sub>97</sub>la<sub>98</sub>q<sub>99</sub>p<sub>100</sub>;**

**SEC ID N°: 2 (tipo silvestre de 178 aminoácidos sin metionina N-terminal)**

**tp<sub>1</sub>l<sub>2</sub>g<sub>3</sub>pass<sub>4</sub>lp<sub>5</sub> q<sub>6</sub>s<sub>7</sub>fl<sub>8</sub>lk<sub>9</sub>cle<sub>10</sub>q<sub>11</sub> vr<sub>12</sub>ki<sub>13</sub>q<sub>14</sub>gd<sub>15</sub>g<sub>16</sub>aa<sub>17</sub> l<sub>18</sub>q<sub>19</sub>ek<sub>20</sub>lv<sub>21</sub>se<sub>22</sub>ca<sub>23</sub> ty<sub>24</sub>kl<sub>25</sub>ch<sub>26</sub>pe<sub>27</sub>el  
v<sub>28</sub>ll<sub>29</sub>gh<sub>30</sub>sl<sub>31</sub>g<sub>32</sub>ip<sub>33</sub> w<sub>34</sub>ap<sub>35</sub>l<sub>36</sub>ss<sub>37</sub>c<sub>38</sub>ps<sub>39</sub>sq<sub>40</sub> al<sub>41</sub>q<sub>42</sub>lag<sub>43</sub>cls<sub>44</sub>sq<sub>45</sub> lh<sub>46</sub>sg<sub>47</sub>lf<sub>48</sub>ly<sub>49</sub>q<sub>50</sub>g<sub>51</sub> ll<sub>52</sub>q<sub>53</sub>ale<sub>54</sub>gis<sub>55</sub>p  
el<sub>56</sub>g<sub>57</sub>pt<sub>58</sub>ld<sub>59</sub>tl<sub>60</sub>q<sub>61</sub> ld<sub>62</sub>v<sub>63</sub>ad<sub>64</sub>f<sub>65</sub>atti<sub>66</sub> w<sub>67</sub>q<sub>68</sub>q<sub>69</sub>me<sub>70</sub>el<sub>71</sub>g<sub>72</sub>ma<sub>73</sub> pa<sub>74</sub>l<sub>75</sub>q<sub>76</sub>pt<sub>77</sub>q<sub>78</sub>gam<sub>79</sub> pa<sub>80</sub>fa<sub>81</sub>sa<sub>82</sub>f<sub>83</sub>q<sub>84</sub>rr  
agg<sub>85</sub>vl<sub>86</sub>v<sub>87</sub>ash<sub>88</sub>l<sub>89</sub> q<sub>90</sub>s<sub>91</sub>f<sub>92</sub>lev<sub>93</sub>sy<sub>94</sub>rv<sub>95</sub> lr<sub>96</sub>h<sub>97</sub>la<sub>98</sub>q<sub>99</sub>p<sub>100</sub>;**

SEC ID N°: 3 (tipo silvestre de 175 aminoácidos)

mtpigpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklca tyklchpeel  
vllghslgip waplsscpsq alqlagclsq lhsglflyqg llqalegisp  
elgptldtlq ldvadfatti wqqmeelgma palqptqgam pafasafqrr  
aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqp;

SEC ID N°: 4 (tipo silvestre de 175 aminoácidos sin metionina N-terminal)

mtpigpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklca tyklchpeel  
vllghslgip waplsscpsq alqlagclsq lhsglflyqg llqalegisp  
elgptldtlq ldvadfatti wqqmeelgma palqptqgam pafasafqrr  
aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqp;

SEC ID N°: 5

mvtpigpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklca tyklchpeel  
vllghslgip waplsscpsq alqlagclsq lhsglflyqg llqalegisp  
elgptldtlq ldvadfatti wqqmeelgma palqptqgam pafasafqrr  
aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqp;

SEC ID N°: 6

mvtpigpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklca tyklchpeel  
vllghtlgip waplsscpsq alqlagclsq lhsglflyqg llqalegisp  
elgptldtlq ldvadfatti wqqmeelgma palqptqgam pafasafqrr  
aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqp;

SEC ID N°: 7

mtpIgpasSlp qSflIkcleq vrkiqgdgaa lqeklca tyklchpeel  
vllghIlgIp waplsscpsq alqlagclsq lhsglflyqg llqalegisp  
elgptldtlq ldvadfatti wqqmeelgma palqptqgam pafasafqrr  
aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqp;

SEC ID N°: 8

mvtplgpasSlp qSflIkcleq vrkiqgdgaa lqeklca tyklchpeel  
vllgsslgIp waplsscpsq alqlagclsq lhsglflyqg llqalegisp

elgptldtlq ldvadfatti wqqmeelgma palqptqgam pafasafqrr  
aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqp;

SEC ID N°: 9

mqtplgpasSlp qSflIkcleq vrkiqgdgaa lqeklca tyklchpeel  
vllghslgIp waplsscpsq alqlagclsq lhsglflyqg llqalegisp  
elgptldtlq ldvadfatti wqqmeelgma palqptqgam pafasafqrr  
aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqp;

SEC ID N°: 10

mtpIgpasSlp qSflIkcleq vrkiqgdgaa lqeklca tyklchpeel  
vllghslgIp waplsscpsq alqlagclsq lhsglflyqg llqalegisp  
elgptldtlq ldvadfatti wqqmeelgma palqptqgam pafasafqrr  
aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqptqgamp; √

**SEC ID N°: 11**

mipglpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklca tyklchpeel  
vlgsslgip wapllscpsq alqlagclsq lhsglflyqg llqalegisp  
elgptldtlq ldvadfatti wqqmeelgma palqptqgam pafasafqrr  
aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqp

**SEC ID N°: 12**

maitplgpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklcatyk lchpeelvll  
ghslgipwap lsscpsqalq lagclsqlhs gflyqgllq alegispelg  
ptldtlqldv adfattiwqq meelgmapal qptqgampaf asafqrragg  
vlvashlqsf levsyrvrh laqp

**SEC ID N°: 13**

mgvtetplgpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklcatyk  
lchpeelvll ghslgipwap lsscpsqalq lagclsqlhs gflyqgllq  
alegispelg ptldtlqldv adfattiwqq meelgmapal qptqgampaf  
asafqrragg vlvashlqsf levsyrvrh laqp

**SEC ID N°: 14**

maplplgpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklcatyk lchpeelvll  
ghslgipwap lsscpsqalq lagclsqlhs gflyqgllq alegispelg

ptldtlqldv adfattiwqq meelgmapal qptqgampaf asafqrragg  
vlvashlqsf levsyrvrh laqp

**SEC ID N°: 15**

Mtpqglgpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklcatyk lchpeelvll  
ghslgipwap lsscpsqalq lagclsqlhs gflyqgllq alegispelg  
ptldtlqldv adfattiwqq meelgmapal qptqgampaf asafqrragg  
vlvashlqsf levsyrvrh laqp

SEC ID N°: 16

mtpIgpasSlp qSflIkcleq vrkiqgdgaa lqekIcatyk IchpeelvlI  
 ghslgIpwap lsscpSqaIq lagclsqIhs glflyqglIq alegIspelg  
 ptdtlqIdv adfattiwqq meelgmapatqptqgampaf asafqrragg  
 vlvashIqsf levsyrvlrh laqp

SEC ID N°: 17

MtpIgpasSlp qSflIkcleq vrkiqgdgaa lqekIcatyk IchpeelvlI  
 ghslgIpftp lsscpSqaIq lagclsqIhs glflyqglIq alegIspelg  
 ptdtlqIdv adfattiwqq meelgmapaL qptqgampaf asafqrragg  
 vlvashIqsf levsyrvlrh laqp

SEC ID N°: 18

mtpIgpasSlpqSflIkcleqvrkiqgdgaaIqekIcatyklchpeelvlIghslgI  
 pwaplsscpSqaIqlagclsqIhsglflyqglIqalegIspelgptIdtlqIdvadfa  
 ttiwqqmeelgmapalqptqtampafasafqrraggvlvashIqsfIevsyrvlr  
 hlaqp.

**Adquisición de secuencias de codificación de péptidos**

**5 Tecnología recombinante general**

La presente invención se basa en técnicas habituales en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que desvelan los métodos generales de uso en la presente invención incluyen Sambrook y Russell, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (3ª ed. 2001); Kriegler, "Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual" (1990); y Ausubel *et al.*, eds., "Current Protocols in Molecular Biology" (1994).

Para los ácidos nucleicos, los tamaños se dan en kilobases (kb) o en pares de bases (pb). Estos son los cálculos derivados de la electroforesis en gel de agarosa o de acrilamida, a partir de ácidos nucleicos secuenciados o a partir de secuencias de ADN publicadas. Para las proteínas, los tamaños se dan en kilodalton (kDa) o en números de restos de aminoácidos. Los tamaños de las proteínas se calculan a partir de electroforesis en gel, a partir de proteínas secuenciadas, a partir de secuencias de aminoácidos derivadas o a partir de secuencias de proteínas publicadas.

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

La secuencia de los genes clonados del péptido de tipo silvestre, péptidos mutantes que codifican polinucleótidos y oligonucleótidos sintéticos se puede verificar tras la clonación usando, por ejemplo, el método de terminación de cadenas para la secuenciación de moldes bicatenarios de Wallace *et al.*, "Gene" 16: 21-26 (1981).

30

*Clonación y subclonación de una secuencia de codificación de péptidos de tipo silvestre*

Se han determinado numerosas secuencias de polinucleótidos que codifican los péptidos de tipo silvestre y se encuentran disponibles en proveedores comerciales, por ejemplo, la hormona de crecimiento humano, por ejemplo, n.º de acceso del GenBank NM 000515, NM 002059, NM 022556, NM 022557, NM 022558, NM 022559, NM 022560, NM 022561 y NM 022562.

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

Como alternativa, se puede aislar una secuencia de ácido nucleico que codifique un péptido a partir de una biblioteca de ADNc humano o ADN genómico usando técnicas de clonación convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que a menudo se pueden obtener cebadores basados en la homología de una secuencia de ácido nucleico conocida que codifique un péptido. Las técnicas usadas más habitualmente para este fin se describen en textos convencionales, por ejemplo, Sambrook y Russell, *supra*.

Las bibliotecas de ADNc adecuadas para obtener una secuencia de codificación para un péptido de tipo silvestre pueden estar disponibles en el mercado o se pueden construir. Se conocen bien los métodos generales para aislar ARNm, fabricar ADNc por transcripción inversa, unir ADNc en un vector recombinante, transfectar en un hospedador recombinante para su propagación, detección y clonación (véase, por ejemplo, Gubler y Hoffman, "Gene", 25: 263-269 (1983); Ausubel *et al.*, *supra*). Tras la obtención de un segmento amplificado de secuencia de nucleótidos mediante PCR, el segmento se puede usar además como una sonda para aislar la secuencia polinucleotídica de longitud completa que codifica al péptido de tipo silvestre a partir de la biblioteca de ADNc. En Sambrook y Russell, *supra*, se puede encontrar una descripción general de métodos apropiados.

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

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

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

*Introducción de mutaciones en una secuencia peptídica*

A partir de una secuencia polinucleotídica codificante, se puede determinar la secuencia de aminoácidos de un péptido de tipo silvestre. Posteriormente, se puede modificar esta secuencia de aminoácidos para alterar el patrón de glicosilación de la proteína, mediante la introducción de sitio/s de glicosilación adicional/es en diversas ubicaciones de la secuencia de aminoácidos.

En la técnica, se conocen bien varios tipos de sitios de glicosilación de proteínas. Por ejemplo, en eucariotas, la glicosilación con unión en N se produce en la asparagina de la secuencia consenso Asn-X<sub>aa</sub>-Ser/Thr, en la que X<sub>aa</sub> es cualquier aminoácido excepto prolina (Kornfeld *et al.*, *Ann Rev Biochem* 54: 631-664 (1985); Kukuruzinska *et al.*,

5 *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 84: 2145-2149 (1987); Herscovics *et al.*, *FASEB J* 7: 540-550 (1993); y Orlean, "Saccharomyces", Vol. 3 (1996)). La glicosilación con unión en O se produce en restos de serina o treonina (Tanner *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 906: 81-91 (1987); y Hounsell *et al.*, *Glycoconj. J.* 13: 19-26 (1996)). Se forman otros patrones de glicosilación uniendo glicosilfosfatidilinositol al grupo carboxilo del extremo carboxilo de la proteína (Takeda *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 20: 367-371 (1995); y Udenfriend *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 64: 593-591 (1995). Basándose en este conocimiento, se pueden introducir de este modo mutaciones adecuadas en una secuencia de péptido de tipo silvestre para formar nuevos sitios de glicosilación.

10 Aunque la modificación directa de un resto de aminoácido dentro de una secuencia peptídica puede ser adecuada para introducir un nuevo sitio de glicosilación con unión en N o con unión en O, más frecuentemente, la introducción de un nuevo sitio de glicosilación se consigue mediante la mutación de la secuencia polinucleotídica que codifica un péptido. Esto se puede conseguir usando cualquier método de mutagénesis conocido, alguno de los cuales se describen a continuación. Las modificaciones ilustrativas a un péptido G-CSF incluyen las ilustradas en las SEC ID N°: 5-18.

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

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

25 Otros métodos de generación de mutaciones incluyen la reparación de desapareamientos puntuales (Kramer *et al.*, *Cell*, 38: 879-887 (1984)), mutagénesis usando cepas de hospedadores con reparación deficiente (Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13: 4431-4443 (1985)), mutagénesis de eliminación (Eghtedarzadeh y Henikoff, *Nucl. Acids Res.*, 14: 5115 (1986)), restricción-selección y restricción-purificación (Wells *et al.*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 317: 415-423 (1986)), mutagénesis por síntesis total de genes (Nambiar *et al.*, *Science*, 223: 1299-1301 (1984)), reparación de la ruptura bicatenaria (Mandecki, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 83: 7177-7181 (1986)), mutagénesis mediante métodos de terminación de cadena de polinucleótidos (patente de EE.UU. n.º 5.965.408) y PCR propensa al error (Leung *et al.*, *Biotechniques*, 1: 11-15 (1989)).

#### *Modificación de ácidos nucleicos para el uso del codón preferido en un organismo hospedador*

40 La secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido mutante se puede modificar además para que coincida con el uso del codón preferido de un determinado hospedador. Por ejemplo, se puede utilizar el uso del codón preferido de una cepa de células bacterianas para obtener un polinucleótido que codifique un péptido mutante de la invención e incluya los codones favorecidos por dicha cepa. La frecuencia de uso del codón preferido presentada por una célula hospedadora se puede calcular calculando la media de la frecuencia de uso del codón preferido en un gran número de genes expresados por la célula hospedadora (por ejemplo, el servicio de cálculo está disponible en el sitio Web del Instituto de Investigación de ADN Kazusa, Japón). Este análisis se limita preferentemente a genes que son expresados a un alto nivel por la célula hospedadora. La patente de EE.UU. n.º 5.824.864, por ejemplo, proporciona la frecuencia de uso de codones por genes expresados a un alto nivel mostrada por plantas dicotiledóneas y plantas monocotiledóneas.

50 Al finalizarse la modificación, las secuencias de codificación de péptidos mutantes se verifican por secuenciación y, a continuación, se subclonan en un vector de expresión adecuado para la producción recombinante de la misma manera que los péptidos de tipo silvestre.

#### **Expresión y purificación del péptido Mutante**

55 Tras la verificación de las secuencias, se puede producir el péptido mutante de la presente invención usando técnicas habituales en el campo de la genética recombinante que se basan en las secuencias polinucleotídicas que codifican el polipéptido desvelado en el presente documento.

#### *Sistemas de expresión*

60 Para obtener la expresión de alto nivel de un ácido nucleico que codifique un péptido mutante de la presente invención, por lo general, se subclona un polinucleótido que codifica el péptido mutante en un vector de expresión que contiene un promotor potente para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción y un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son bien conocidos en la



técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell, *supra* y Ausubel *et al.*, *supra*. Los sistemas de expresión bacteriana para expresar el péptido mutante o de tipo silvestre están disponibles en, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus* sp., *Salmonella* y *Caulobacter*. Los kits para dichos sistemas de expresión están disponibles en el mercado. Los sistemas de expresión eucariota para células de mamífero, levadura y células de insecto se conocen bien en la técnica y también están disponibles en el mercado. En una realización, el vector de expresión eucariota es un vector adenoviral un vector adeno-asociado o un vector retroviral.

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

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

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

El vector de expresión usado en particular para transportar la información genética a la célula no es de importancia fundamental. Se puede usar cualquiera de los vectores convencionales usados para la expresión en células eucariotas o procariotas. Los vectores de expresión bacteriana convencionales incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D y sistemas de expresión de fusión tales como GST y LacZ. Además, se pueden añadir marcadores de epítipo a las proteínas recombinantes para proporcionar métodos convenientes de aislamiento, por ejemplo, c-myc.

Por lo general, se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas en vectores de expresión eucariota, por ejemplo, vectores de SV40, vectores del virus del papiloma y vectores derivados del virus Epstein-Barr. Otros vectores eucariotas ilustrativos incluyen pMSG, pAV009/A<sup>+</sup>, pMTO10/A<sup>+</sup>, pMAMneo-5, pDSVE baculovirus y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas en la dirección del promotor temprano de SV40, promotor tardío de SV40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor de mama murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina u otros promotores que se han mostrado eficaces para la expresión en células eucariotas.

En algunas realizaciones ilustrativas, el vector de expresión se selecciona entre pCWin1, pCWin2, pCWin2/MBP, pCWin2-MBP-SBD (pMS<sub>39</sub>) y pCWin2-MBP-MCS-SBD (pMXS<sub>39</sub>) según lo desvelado en la solicitud de patente de EE.UU. del mismo propietario que la presente, presentada el 9 de abril de 2004.

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

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

Cuando se desea la expresión periplásmica de una proteína recombinante (por ejemplo, un mutante hgh de la presente invención), el vector de expresión comprende además una secuencia que codifica una señal de secreción, tal como la señal de secreción OppA (proteína de unión a oligopéptidos periplásmicos) de *E. coli* o una versión modificada de la misma, que se conecta directamente a 5' de la secuencia de codificación de la proteína que se va a expresar. Dichas secuencia señal dirige la proteína recombinante producida en el citoplasma a través de la

membrana celular en el espacio periplásmico. El vector de expresión puede comprender además una secuencia de codificación para la señal peptidasa 1, que es capaz de escindir enzimáticamente la secuencia señal cuando la proteína recombinante está entrando en el espacio periplásmico. Una descripción más detallada de la producción periplásmica de una proteína recombinante se puede encontrar, por ejemplo, en Gray *et al.*, *Gene* 39: 247-254 (1985), patentes de EE.UU. n.º 6.160.089 y 6.436.674.

Como se ha descrito anteriormente, un experto en la materia reconocerá que se pueden realizar diversas sustituciones conservativas a cualquier péptido de tipo silvestre o mutante, o a su secuencia de codificación mientras se mantenga la actividad biológica del péptido. Además, también se pueden realizar modificaciones en una secuencia de codificación polinucleotídica para adaptar el uso del codón preferido en un hospedador de expresión en particular sin alterar la secuencia de aminoácidos resultante.

#### *Métodos de transfección*

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

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

#### *Detección de la expresión de péptido mutante en células hospedadoras*

Tras introducir el vector de expresión en células hospedadoras apropiadas, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión de péptido mutante. A continuación, las células se exploran para la expresión del polipéptido recombinante, que posteriormente se extrae del cultivo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Scopes, "Protein Purification: Principles and Practice (1982)"; patente de EE.UU. n.º 4.673.641; Ausubel *et al.*, *supra*; y Sambrook y Russell, *supra*).

Los expertos en la materia conocen bien varios métodos generales de detección de la expresión genética. En primer lugar, la expresión genética se puede detectar a nivel del ácido nucleico. Comúnmente, se usa una variedad de métodos específicos de medición del ADN y ARN usando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (por ejemplo, Sambrook y Russell, *supra*). Algunos métodos implican una separación electroforética (por ejemplo, transferencia Southern para detectar el ADN y transferencia Northern para detectar el ARN), pero la detección del ADN o del ARN también se puede llevar a cabo sin electroforesis (tal como mediante transferencia puntual). También se puede detectar la presencia de ácido nucleico que codifique un péptido mutante en células transfectadas mediante PCR o RT-PCR usando cebadores específicos de secuencias.

En segundo lugar, la expresión genética se puede detectar al nivel del polipéptido. Los expertos en la materia usan de forma habitual diversos ensayos inmunológicos para medir el nivel de un producto genético, usando particularmente anticuerpos policlonales o monoclonales que reaccionen específicamente con un péptido mutante de la presente invención tal como un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 1-7 (por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", Capítulo 14, Cold Spring Harbor, 1988; Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975)). Dichas técnicas requieren la preparación del anticuerpo mediante la selección de anticuerpos con una especificidad elevada frente al péptido mutante o una parte antigénica del mismo. Los métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales están bien establecidos y sus descripciones se pueden encontrar en la bibliografía, véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*; Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511-519 (1976). En una sección posterior, se proporcionan descripciones más detalladas para preparar anticuerpos frente al péptido mutante de la presente invención y realizar ensayos inmunológicos que detecten el péptido mutante.

#### *Purificación de péptido mutante producido de forma recombinante*

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

### 1. Purificación de péptido mutante producido de forma recombinante a partir de bacterias

5 Cuando los péptidos mutantes de la presente invención se producen de forma recombinante mediante bacterias transformadas en grandes cantidades, normalmente tras la inducción del promotor, aunque la expresión puede ser constitutiva, las proteínas pueden formar agregados insolubles. Existen varios protocolos que son adecuados para la purificación de cuerpos de inclusión proteicos. Por ejemplo, la purificación de proteínas agregadas (denominadas de aquí en adelante en el presente documento cuerpos de inclusión) normalmente implica la extracción, separación y/o purificación de cuerpos de inclusión mediante la alteración de células bacterianas, por ejemplo, por incubación en un tampón de aproximadamente 100-150  $\mu\text{g/ml}$  de lisozima y Nonidet P40 al 0,1 %, un detergente no iónico. La suspensión celular se puede triturar usando un triturador Polytron (Brinkman Instruments, Westbury, NY). Como alternativa, las células se pueden someter a ultrasonidos en hielo. En Ausubel *et al.* y Sambrook y Russell, ambos mencionados anteriormente, se describen métodos alternativos para lisar bacterias y serán evidentes para los expertos en la materia.

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

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

40 Como alternativa, se pueden purificar polipéptidos recombinantes, por ejemplo, un péptido mutante, a partir de periplasma bacteriano. Cuando la proteína recombinante se exporta al periplasma de la bacteria, la fracción periplásmica de la bacteria se puede aislar mediante choque osmótico en frío además de otros métodos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *supra*). Para aislar proteínas recombinantes del periplasma, se centrifugan las células bacterianas para formar un sedimento. El sedimento se vuelve a suspender en un tampón que contiene sacarosa al 20 %. Para lisar las células, se centrifugan las bacterias y el sedimento se vuelve a suspender en  $\text{MgSO}_4$  5 mM enfriado con hielo y se mantiene en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. Se centrifuga la suspensión celular y el sobrenadante se decanta y se guarda. Las proteínas recombinantes presentes en el sobrenadante se pueden separar a partir de las proteínas hospedadoras mediante técnicas de separación convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

### 50 2. Técnicas convencionales de separación de proteínas para la purificación

55 Cuando un polipéptido recombinante, por ejemplo, el péptido mutante de la presente invención, se expresa en células hospedadoras en una forma soluble, su purificación puede seguir el procedimiento de purificación de proteínas convencional descrito más adelante.

#### i. Fraccionamiento de la solubilidad

60 A menudo, como una etapa inicial y si la mezcla de proteínas es compleja, un fraccionamiento inicial de sales puede separar muchas de las proteínas de las células hospedadoras no deseadas (o proteínas derivadas de los medios de cultivo celular) de la proteína recombinante de interés, por ejemplo, un péptido mutante de la presente invención. La sal preferida es el sulfato de amonio. El sulfato de amonio precipita proteínas reduciendo de forma eficaz la cantidad de agua en la mezcla de proteínas. A continuación, las proteínas precipitan basándose en su solubilidad. Cuanto más hidrófoba es una proteína, más probable es que precipite a concentraciones de sulfato de amonio inferiores. Un protocolo habitual es añadir sulfato de amonio saturado a una solución de proteínas de modo que la concentración resultante de sulfato de amonio esté entre un 20-30 %. Esto hará precipitar a las proteínas más hidrófobas. El precipitado se desecha (a menos que la proteína de interés sea hidrófoba) y se añade sulfato de amonio al

sobrenadante hasta una concentración conocida por hacer precipitar la proteína de interés. A continuación, se solubiliza el precipitado en tampón y se retira el exceso de sal si fuera necesario, a través de diálisis o diafiltración. Otros métodos que dependen de la solubilidad de las proteínas, tales como precipitación en etanol frío, son bien conocidos por los expertos en la materia y se pueden usar para fraccionar mezclas complejas de proteínas.

5

### *ii. Filtración diferencial por tamaño*

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

10

15

### *iii. Cromatografía en columna*

Las proteínas de interés (tales como el péptido mutante de la presente invención) también se pueden separar de otras proteínas basándose en su tamaño, carga de superficie neta, hidrofobicidad o afinidad por ligandos. Además, se pueden conjugar anticuerpos generados frente a péptidos a matrices de columna, e inmunopurificarse el péptido. Todos estos métodos son bien conocidos en la técnica.

20

25

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

### *Inmunoensayos para la detección de la expresión de péptidos mutantes*

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

30

### *Producción de anticuerpos frente al péptido mutante*

35

Los métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con un inmunógeno de interés son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Coligan, "Current Protocols in Immunology", Wiley/Greene, NY, 1991; Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, NY, 1989; Stites *et al.* (eds.) "Basic and Clinical Immunology" (4ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA y referencias citadas en dicho documento; Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice" (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY, 1986; y Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497, 1975). Dichas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos mediante la selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares (véase, Huse *et al.*, *Science* 246: 1275-1281, 1989; y Ward *et al.*, *Nature* 341: 544-546, 1989).

40

45

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

50

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

55

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

60

65

5 aumentar mediante diversas técnicas, incluyendo la inyección en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado.

Además, también se pueden producir de forma recombinante anticuerpos monoclonales tras la identificación de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo con una especificidad deseada o un fragmento de unión de dicho anticuerpo mediante la exploración de una biblioteca de ADNc de linfocitos B humanos de acuerdo con el protocolo general resumido en Huse *et al.*, *supra*. Los principios y los métodos generales de producción de polipéptidos recombinantes descrita anteriormente son aplicables para la producción de anticuerpos mediante métodos recombinantes.

10 Cuando se desee, los anticuerpos capaces de reconocer específicamente un péptido mutante de la presente invención se pueden ensayar para determinar su reactividad cruzada frente al péptido de tipo silvestre y de este modo poderse distinguir de los anticuerpos frente a la proteína de tipo silvestre. Por ejemplo, los antisueros obtenidos a partir de un animal inmunizado con un péptido mutante se pueden generar a través de una columna en la que se inmoviliza un péptido de tipo silvestre. La parte de los antisueros que pasa a través de la columna solo reconoce al péptido mutante y no al péptido de tipo silvestre. De igual manera, los anticuerpos monoclonales frente a un péptido mutante también se pueden explorar para determinar su exclusividad en el reconocimiento solamente del mutante y no del péptido de tipo silvestre.

15 Los anticuerpos policlonales o monoclonales que solo reconocen específicamente al péptido mutante de la presente invención y no al péptido de tipo silvestre son útiles para aislar la proteína mutante de la proteína de tipo silvestre, por ejemplo, mediante la incubación de una muestra con un anticuerpo policlonal o monoclonal específico del péptido mutante inmovilizado en un soporte sólido.

#### 25 **Inmunoensayos de detección de la expresión de péptidos mutantes**

Una vez que los anticuerpos específicos de un péptido mutante de la presente invención están disponibles, se puede medir la cantidad del polipéptido de una muestra, por ejemplo, un lisado celular, mediante una diversidad de métodos de inmunoensayo que proporcionan resultados cualitativos y cuantitativos a un experto en la materia. Para una revisión de los procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo en general véase, por ejemplo, Stites, *supra*; patentes de EE.UU. n.º 4.366.241; n.º 4.376.110; n.º 4.517.288; y n.º 4.837.168.

#### 30 *Marcaje en inmunoensayos*

Los inmunoensayos suelen utilizar un agente de marcaje para unirse específicamente a y para marcar el complejo de unión formado por el anticuerpo y la proteína diana. El agente de marcaje puede ser en sí mismo una de las fracciones que comprenden el complejo de anticuerpo/proteína diana, o puede ser una tercera fracción, tal como otro anticuerpo, que se une específicamente al complejo de anticuerpo/proteína diana. Un marcador se puede detectar por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>32</sup>P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como perlas de oro coloidal, o de vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

45 En algunos casos, el agente de marcaje es un segundo anticuerpo que porta un marcador detectable. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede carecer de un marcador, pero a su vez, estar unido por un tercer anticuerpo marcado específico de anticuerpos de las especies de las que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo se puede modificar con un resto detectable tal como biotina, al que se puede unir específicamente una tercera molécula marcada, tal como estreptavidina marcada con enzima.

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

#### 55 *Formatos de inmunoensayo*

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

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

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

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

**Los conjugados**

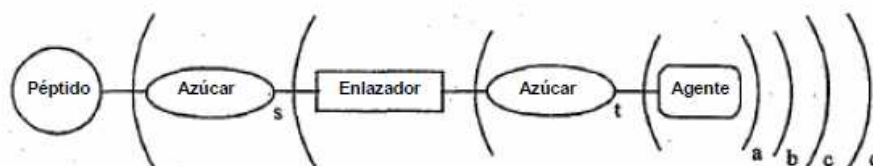
En un aspecto representativo, la presente invención proporciona un glicoconjugado entre un péptido y un grupo modificador seleccionado, en el que el grupo modificador está conjugado con el péptido a través de un grupo enlazador de glicosilo, por ejemplo, un grupo enlazador de glicosilo intacto. El grupo enlazador de glicosilo se une directamente a un sitio de glicosilación con unión en O del péptido o, como alternativa, se une a un sitio de glicosilación con unión en O a través de uno o más restos de glicosilo adicionales. Los métodos de preparación de conjugados se exponen en el presente documento y en las patentes de EE.UU. n.º 5.876.980; 6.030.815; 5.728.554; 5.922.577; y los documentos WO 98/31826; US2003180835; y WO 03/031464. Los conjugados de la invención se definen en las reivindicaciones.

Los péptidos ilustrativos incluyen un resto de GalNAc con unión en O que se une al sitio de glicosilación con unión en O a través de la acción de una GalNAc transferasa. La propia GalNAc puede ser el grupo enlazador de glicosilo intacto. La GalNAc también se puede elaborar adicionalmente mediante, por ejemplo, un resto de Gal o Sia, pudiendo cualquiera de los cuales actuar como el grupo enlazador de glicosilo intacto. En realizaciones representativas, el resto de sacarilo con unión en O es GalNAc-X, GalNAc-Gal-Sia-X o GalNAc-Gal-Gal-Sia-X, en el que X es un grupo modificador.

En una realización ilustrativa, el péptido es un péptido mutante que incluye un sitio de glicosilación con unión en O que no está presente en el péptido de tipo silvestre. El péptido es preferentemente O-glicosilado en el sitio mutado con un resto de GalNAc. La descripción inmediatamente anterior relativa a la estructura de la fracción de sacarilo también es relevante en este caso.

El enlace entre el péptido y la fracción seleccionada incluye un grupo enlazador de glicosilo intacto interpuesto entre el péptido y la fracción modificadora. Como se describe en el presente documento, la fracción seleccionada es esencialmente cualquier especie que se pueda unir a una unidad de sacárido, dando como resultado un "azúcar modificado" que sea reconocido por una enzima transferasa apropiada, que añade el azúcar modificado al péptido. El componente de sacárido del azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido y una fracción seleccionada, se vuelve un "grupo enlazador de glicosilo intacto". El grupo enlazador de glicosilo se forma a partir de cualquier mono- u oligo-sacárido que, tras la modificación con una fracción seleccionada, sea un sustrato para una transferasa adecuada.

Por lo general, 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 bien 0 o un número entero positivo. El "agente" es un agente terapéutico, un agente bioactivo, un marcador detectable, una fracción hidrosoluble o similar. El "agente" puede ser un péptido, por ejemplo, enzima, anticuerpo, antígeno, etc. El

enlazador puede ser cualquiera de una amplia selección de grupos enlazadores, *infra*. Como alternativa, el enlazador puede ser un enlace sencillo o un "enlazador de orden cero". La identidad del péptido es como se ha definido en las reivindicaciones.

5 En una realización ilustrativa, la fracción seleccionada es un polímero hidrosoluble, por ejemplo, PEG, m-PEG, PPG, m-PPG, etc. El polímero hidrosoluble se une covalentemente al péptido a través de un grupo enlazador de glicosilo. El grupo enlazador de glicosilo se une covalentemente bien a un resto de aminoácido o a un resto de glicosilo del péptido. Como alternativa, el grupo enlazador de glicosilo se une a una o más unidades de glicosilo de un glicopéptido. La invención también proporciona conjugados en los que el grupo enlazador de glicosilo (por ejemplo, GalNAc) se une a un resto de aminoácido (por ejemplo, Thr o Ser).

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

20 Además de proporcionar los conjugados que se forman a través de un grupo enlazador de glicosilo intacto añadido enzimáticamente, la presente invención proporciona conjugados que son altamente homogéneos en sus patrones de sustitución. Usando los métodos de la invención, es posible formar conjugados de péptidos en los que sustancialmente todas las fracciones de azúcar modificado en la población de conjugados de la invención se unen a un resto de aminoácido o de glicosilo estructuralmente idéntico. Por lo tanto, en un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado de péptido que tiene una población de fracciones poliméricas hidrosolubles, que están unidas covalentemente al péptido a través de un grupo enlazador de glicosilo. En otro conjugado de la invención, esencialmente cada miembro de la población se une a través del grupo enlazador de glicosilo a un resto de glicosilo del péptido y cada resto de glicosilo del péptido al que se une el grupo enlazador de glicosilo tiene la misma estructura.

30 También se proporciona un conjugado de péptido que tiene una población de fracciones poliméricas hidrosolubles unidas covalentemente al mismo a través de un grupo enlazador de glicosilo. En otra realización, esencialmente cada miembro de la población de fracciones poliméricas hidrosolubles se une a un resto de aminoácido del péptido a través de un grupo enlazador de glicosilo intacto y cada resto de aminoácido que tiene un grupo enlazador de glicosilo intacto unido al mismo tiene la misma estructura.

35 La presente invención también proporciona conjugados análogos a los descritos anteriormente en los que el péptido se conjuga con una fracción terapéutica, fracción de diagnóstico, fracción de dirección, fracción de toxina o similar a través de un grupo enlazador de glicosilo. Cada una de las fracciones citadas anteriormente puede ser una molécula pequeña, un polímero natural (por ejemplo, polipéptido) o un polímero sintético.

40 En una realización adicional más, la invención proporciona conjugados que se localizan selectivamente en un determinado tejido debido a la presencia de un agente de dirección como un componente del conjugado. En una realización ilustrativa, el agente de dirección es una proteína. Las proteínas ilustrativas incluyen la transferrina (cerebro, grupo sanguíneo), HS-glicoproteína (hueso, cerebro, grupo sanguíneo), anticuerpos (cerebro, tejido con el antígeno específico del anticuerpo, grupo sanguíneo), factores de coagulación V-XII (tejido dañado, coágulos, cáncer, grupo sanguíneo), proteínas séricas, por ejemplo, glicoproteína ácida  $\alpha$ , fetuina, proteína fetal  $\alpha$  (cerebro, grupo sanguíneo),  $\beta$ 2-glicoproteína (hígado, placas de aterosclerosis, cerebro, grupo sanguíneo), G-CSF, GM-CSF, M-CSF y EPO (estimulación inmune, cánceres, grupo sanguíneo, sobreproducción de glóbulos rojos, neuroprotección), albúmina (aumento de la semivida), IL-2 e IFN- $\alpha$ .

50 Los conjugados de la invención pueden incluir grupos enlazadores de glicosilo que sean mono- o multi-valentes (por ejemplo, estructuras antenarias). Por lo tanto, los conjugados de la invención incluyen ambas especies en las que una fracción seleccionada está unida a un péptido a través de un grupo enlazador de glicosilo monovalente. También se incluyen dentro de la invención los conjugados en los que más de una fracción seleccionada está unida a un péptido a través de un grupo enlazador multivalente.

## Métodos

60 Además de los conjugados descritos anteriormente, la presente invención proporciona métodos de preparación de estos y otros conjugados. Además, la invención proporciona métodos de prevención, curación o mejoría de una patología mediante la administración de un conjugado de la invención a un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad o a un sujeto que tenga la enfermedad. Además, la invención proporciona métodos de dirección de los conjugados de la invención a un determinado tejido o a una determinada región del organismo.

65 Por lo tanto, la invención proporciona un método de formación de un conjugado covalente entre una fracción seleccionada y un péptido. En realizaciones ilustrativas, se forma el conjugado entre un polímero hidrosoluble, una

fracción terapéutica, una fracción de dirección o una biomolécula y un péptido glicosilado o no glicosilado. El polímero, la fracción terapéutica o la biomolécula se conjuga con el péptido a través de un grupo enlazador de glicosilo, que se interpone entre y se une covalentemente tanto al péptido como al grupo modificador (por ejemplo, polímero hidrosoluble).

El método incluye poner en contacto el péptido con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una glicosiltransferasa para los que el azúcar modificado es un sustrato. La reacción se realiza en condiciones apropiadas para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido. La fracción de azúcar del azúcar modificado se selecciona preferentemente entre azúcares de nucleótidos, azúcares activados y azúcares, que no son ni nucleótidos ni activados.

Por lo general, el péptido aceptor (O-glicosilado o no glicosilado) se sintetiza *de novo* o se expresa de forma recombinante en una célula procariota (por ejemplo, célula bacteriana tal como *E. coli*) o en una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, levadura, insecto, hongo o vegetal. El péptido puede ser bien una proteína de longitud completa o un fragmento. Además, el péptido puede ser un péptido de tipo silvestre o mutado. En una realización ilustrativa, el péptido incluye una mutación que añade uno o más sitios de glicosilación con unión en N o en O a la secuencia peptídica.

En una realización ilustrativa, el péptido es O-glicosilado y funcionalizado con un polímero hidrosoluble de la siguiente manera. El péptido bien se produce con un sitio de glicosilación de aminoácidos disponible o, si está glicosilado, se recorta la fracción de glicosilo hasta dejar el aminoácido al descubierto. Por ejemplo, se añade GalNAc a una serina o treonina y se sialila el péptido galactosilado con un casete de grupo modificador de ácido siálico usando ST6Gal-1. Como alternativa, el péptido galactosilado se galactosila usando Núcleo-1-GalT-1 y el producto se sialila con un casete de grupo modificador de ácido siálico usando ST3GalT1. Un conjugado ilustrativo de acuerdo con dicho método tiene los siguientes enlaces: Thr- $\alpha$ -1-GalNAc- $\beta$ -1,3-Gal- $\alpha$ 2,3-Sia\*, en los que Sia\* es el casete del grupo modificador de ácido siálico.

En los métodos de la invención, tales como los expuestos anteriormente, con el uso de múltiples enzimas y donantes de sacarilo, las etapas individuales de glicosilación se pueden realizar por separado o combinadas en una reacción "de un solo recipiente". Por ejemplo, en la reacción de tres enzimas expuesta anteriormente, la GalNAc transferasa, GalT y SiaT y sus donantes se pueden combinar en un solo recipiente. Como alternativa, la reacción de GalNAc se puede realizar sola y añadirse tanto la GalT y SiaT como los donantes de sacarilo apropiados en una sola etapa. Otro modo de realizar las reacciones implica la adición de cada enzima y un donante apropiado secuencialmente y la realización de la reacción en un motivo de "un solo recipiente". Las combinaciones de cada uno de los métodos expuestos anteriormente son de uso en la preparación de los compuestos de la invención.

En los conjugados de la invención, el casete de grupo modificador de Sia se puede enlazar a la Gal en un enlace  $\alpha$ -2,6 o  $\alpha$ -2, 3.

Por ejemplo, en una realización, G-CSF se expresa en un sistema de mamífero y se modifica mediante el tratamiento de sialidasa para recortar de nuevo los restos de ácido siálico terminales, seguido de la PEGilación usando ST3Gal3 y un donante de ácido siálico-PEG.

El método de la invención también proporciona la modificación de péptidos glicosilados de manera incompleta que se producen de manera recombinante. Muchas glicoproteínas producidas de forma recombinante se glicosilan de forma incompleta, dejando al descubierto los restos de hidratos de carbono que pueden tener propiedades no deseadas, por ejemplo, inmunogenicidad, el reconocimiento por el RES. Con el empleo de un azúcar modificado en un método de la invención, el péptido se puede glicosilar más simultáneamente y derivatizar con, por ejemplo, un polímero hidrosoluble, agente terapéutico o similares. La fracción de azúcar del azúcar modificado puede ser el resto que se conjuga adecuadamente con el aceptor en un péptido totalmente glicosilado u otra fracción de azúcar con propiedades no deseadas.

Los péptidos modificados mediante los métodos de la invención pueden ser péptidos sintéticos o de tipo silvestre, o pueden ser péptidos mutados producidos mediante métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis dirigida. Por lo general, la glicosilación de péptidos es con unión en N o en O. Una unión en N ilustrativa es la unión del azúcar modificado a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido a excepción de prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de una fracción de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación con unión en O se refiere a la unión de un azúcar (por ejemplo, N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa) a la cadena lateral hidroxilo de un hidroxiaminoácido, preferentemente serina o treonina, aunque se pueden usar aminoácidos poco habituales o no naturales como, por ejemplo, 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Por otra parte, además de péptidos, los métodos de la presente invención se pueden poner en práctica con otras estructuras biológicas (por ejemplo, glicolípidos, lípidos, esfingoides, ceramidas, células enteras y similares, que



contengan un sitio de glicosilación con unión en O). El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones.

La adición de sitios de glicosilación a un péptido u otra estructura se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga uno o más sitios de glicosilación. La adición también se puede realizar mediante la incorporación de una o más especies que presenten un grupo-OH, preferentemente restos de serina o treonina, dentro de la secuencia peptídica (para sitios de glicosilación con unión en O). La adición se puede realizar por mutación o por síntesis química completa del péptido. La secuencia de aminoácidos del péptido se altera preferentemente a través de cambios a nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el péptido en bases preseleccionadas de manera que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La/s mutación/es de ADN se realizan preferentemente usando métodos conocidos en la técnica.

En una realización ilustrativa, el sitio de glicosilación se añade por barajado de polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican un péptido candidato se pueden modular con los protocolos de barajado de ADN. El barajado de ADN es un proceso de recombinación y mutación recursivas, realizado por fragmentación aleatoria de un grupo de genes relacionados, seguido por el reensamblaje de los fragmentos mediante un proceso similar a la reacción en cadena de la polimerasa. Véase, por ejemplo, Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:10747-10751 (1994); Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994); y las patentes de EE.UU. n.º 5.605.793; 5.837.458; 5.830.721 y 5.811.238.

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

La adición o la eliminación de cualquier resto de hidrato de carbono presente en el glicopéptido se realiza bien química o enzimáticamente. Preferentemente, la desglicosilación química se realiza mediante la exposición de la variante polipeptídica al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o todos los azúcares a excepción del azúcar enlazador (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el péptido intacto. La desglicosilación química se describe por Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 (1987) y por Edge *et al.*, *Anal. Biochem.* 118: 131 (1981). La escisión enzimática de fracciones de hidrato de carbono en las variantes polipeptídicas se puede realizar mediante el uso de una variedad de endo-y exo-glicosidasas según lo descrito por Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* 138: 350 (1987).

La adición química de fracciones de glicosilo se lleva a cabo mediante cualquier método reconocido en la técnica. La adición enzimática de fracciones de azúcar se consigue preferentemente usando una modificación de los métodos expuestos en el presente documento, sustituyendo unidades de glicosilo naturales para los azúcares modificados usados en la invención. Otros métodos de adición de fracciones de azúcar se desvelan en las patentes de EE.UU. n.º 5.876.980; 6.030.815; 5.728.554 y 5.922.577.

Los puntos de unión ilustrativos para el resto de glicosilo seleccionado incluyen, pero sin limitación: (a) sitios de consenso para la glicosilación con unión en N y sitios para la glicosilación con unión en O; (b) fracciones de glicosilo terminales que son aceptoras de 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 serina, treonina o hidroxiprolina; (g) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (h) el grupo amida de la glutamina. Los métodos ilustrativos 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).

También se desvela un método de unión de dos o más péptidos a través de un grupo enlazador. El grupo enlazador es de cualquier estructura útil y se puede seleccionar entre estructuras lineales y de cadena ramificada. Preferentemente, cada extremo del enlazador, que está unido a un péptido, incluye un azúcar modificado (es decir, un grupo enlazador de glicosilo intacto emergente).

En un método ilustrativo, dos péptidos se unen entre sí a través de una fracción enlazadora que incluye un enlazador de PEG. La construcción se ajusta a la estructura general expuesta en la imagen anteriormente. Como se describe en el presente documento, la construcción de la invención incluye dos grupos enlazadores de glicosilo intactos (es decir,  $s + t = 1$ ). El enfoque en un enlazador de PEG que incluye dos grupos de glicosilo tiene el fin de aclarar y no debe interpretarse como limitante de la identidad de las ramificaciones enlazadoras de uso en dicha realización de la invención.

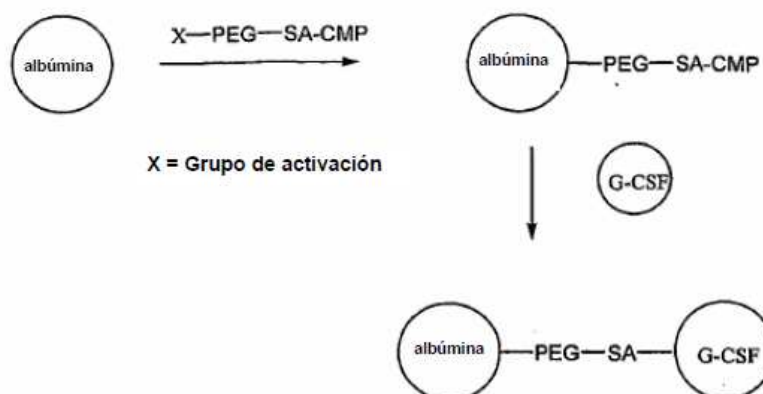
Por lo tanto, se funcionaliza una fracción de PEG en un primer extremo con una primera unidad de glicosilo y en un segundo extremo con una segunda unidad de glicosilo. La primera y segunda unidad de glicosilo son preferentemente sustratos para diferentes transferasas, lo que permite la unión ortogonal del primer y segundo

péptido a la primera y segunda unidad de glicosilo, respectivamente. En la práctica, el enlazador de (glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup> se pone en contacto con el primer péptido y una primera transferasa para la que la primera unidad de glicosilo es un sustrato, formándose así (péptido)<sup>1</sup>-(glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup>. A continuación, se retira opcionalmente la transferasa y/o el péptido sin reaccionar de la mezcla de reacción. El segundo péptido y la segunda transferasa para la que la segunda unidad de glicosilo es un sustrato se añade al conjugado de (péptido)<sup>1</sup>-(glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup>, formando el (péptido)<sup>1</sup>-(glicosilo)<sup>1</sup>-PEG-(glicosilo)<sup>2</sup>-(péptido)<sup>2</sup>; al menos uno de los restos de glicosilo se enlaza en O bien directa o indirectamente. Los expertos en la materia apreciarán que el método resumido 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.

El uso de derivados reactivos de PEG (u otros enlazadores) para unir una o más fracciones peptídicas al enlazador está dentro del ámbito de la presente invención. La invención no está limitada por la identidad del análogo de PEG reactivo. En el mercado y en la bibliografía, hay disponibles muchos derivados activados de poli(etilenglicol). Están dentro de las capacidades de un experto en la materia la selección y la síntesis, si fuera necesario, de un derivado de PEG activado apropiado con el que preparar un sustrato útil en la presente invención. Véase, Abuchowski *et al.* *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984); Abuchowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 252: 3582-3586 (1977); Jackson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 165: 114-127 (1987); Koide *et al.*, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 111: 659-667 (1983), tresilato (Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol.*, 104: 56-69 (1984); Delgado *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12: 119-128 (1990)); ésteres activos derivados de N-hidroxisuccinimida (Buckmann *et al.*, *Makromol. Chem.*, 182: 1379-1384 (1981); Joppich *et al.*, *Makromol. Chem.*, 180: 1381-1384 (1979); Abuchowski *et al.*, *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984); Katre *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 84: 1487-1491 (1987); Kitamura *et al.*, *Cancer Res.*, 51: 4310-4315 (1991); Boccu *et al.*, *Z. Naturforsch.*, 38C: 94-99 (1983), carbonatos (Zalipsky *et al.*, "POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL Y BIOMEDICAL APPLICATIONS", Harris, Ed., Plenum Press, Nueva York, 1992, pág. 347-370; Zalipsky *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15: 100-114 (1992); Veronese *et al.*, *Appl. Biochem. Biotech.*, 11: 141-152 (1985)), formiatos de imidazolilo (Beauchamp *et al.*, *Anal. Biochem.*, 131: 25-33 (1983); Berger *et al.*, *Blood*, 71: 1641-1647 (1988)), 4-ditiopiridinas (Woghiren *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 4: 314-318 (1993)), isocianatos (Byun *et al.*, *ASAIO Journal*, M649-M-653 (1992)) y epóxidos (patente de EE.UU. n.º 4.806.595, concedida a Noishiki *et al.*, (1989). Otros grupos enlazadores incluyen el enlace de uretano entre grupos amino y PEG activado. Véase, Veronese, *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11: 141-152 (1985).

En otra realización ilustrativa en la que se utiliza un derivado de PEG reactivo, la invención proporciona un método para prolongar la semivida en la circulación en sangre de un péptido seleccionado, en esencia dirigiendo el péptido al grupo sanguíneo, mediante la conjugación del péptido con un polímero sintético o natural de un tamaño suficiente para retrasar la filtración de la proteína por los glomérulos (por ejemplo, albúmina). Véase el Esquema 3. Dicha realización de la invención se ilustra en el Esquema, en el que el G-CSF se conjuga con la albúmina a través de un enlazador de PEG usando una combinación de modificaciones químicas y enzimáticas.

Esquema 3



Por lo tanto, como se muestra en el Esquema 3, se modifica un resto (por ejemplo, cadena lateral de aminoácido) de albúmina con un derivado de PEG reactivo, tal como X-PEG-(CMP-ácido siálico), en el que X es un grupo de activación (por ejemplo, éster activo, isotiocianato, etc.). El derivado de PEG y G-CSF se combinan y se ponen en contacto con una transferasa para la que CMP-ácido siálico es un sustrato. En una realización ilustrativa adicional, se hace reaccionar una ε-amina de lisina con el éster de N-hidroxisuccinimida del enlazador de PEG para formar el conjugado de albúmina. El CMP-ácido siálico del enlazador se conjuga enzimáticamente con un resto apropiado en GCSF, por ejemplo, Gal o GalNAc, formando de ese modo el conjugado. Los expertos en la materia observarán que el método que se ha descrito anteriormente no se limita a los patrones de reacción que se exponen. Además, el método se puede poner en práctica para formar conjugados que incluyan más de dos fracciones de proteína, por ejemplo, mediante la utilización de un enlazador ramificado que tenga más de dos extremos.

**Azúcares modificados**

Las especies donantes de glicosilo modificado ("azúcares modificados") se seleccionan preferentemente entre nucleótidos de azúcar modificado, azúcares modificados activados y azúcares modificados que son sacáridos simples que no son ni nucleótidos ni están activados. Se puede añadir cualquier estructura deseada de hidrato de carbono a un péptido usando los métodos de la invención. Por lo general, la estructura será un monosacárido, pero la presente invención no se limita al uso de azúcares monosacáridos modificados; también son útiles los oligosacáridos y polisacáridos.

El grupo modificador se une a una fracción de azúcar por medios enzimáticos, medios químicos o una combinación de los mismos, produciendo de este modo un azúcar modificado. Los azúcares se sustituyen en cualquier posición que permita la unión de la fracción modificadora, lo que aún así permite que el azúcar funcione como un sustrato para la enzima usada para unir el azúcar modificado con el péptido. En otra realización, cuando el ácido siálico es el azúcar, el ácido siálico se sustituye con el grupo modificador, bien en la posición 9 de la cadena lateral de piruvilo o en la posición 5 de la fracción de amina que normalmente está acetilada en el ácido siálico.

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

La invención también proporciona métodos de síntesis de un péptido modificado usando un azúcar modificado, por ejemplo, galactosa, fucosa, GalNAc y ácido siálico modificados. Cuando se usa un ácido siálico modificado, se puede usar bien una sialiltransferasa o una trans-sialidasa (solo para ácido siálico unido en  $\alpha$ -2,3) en estos métodos.

En otras realizaciones, el azúcar modificado es un azúcar activado. Los azúcares modificados activados que son útiles en la presente invención, en general, son glucósidos que se han modificado sintéticamente para incluir un grupo saliente activado. Como se usa en el presente documento, "grupo saliente activado" se refiere a aquellas fracciones que se desplazan fácilmente en reacciones de sustitución nucleófila reguladas por enzimas. En la técnica, se conocen muchos azúcares activados. Véase, por ejemplo, Vocadlo *et al.*, en "CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOLOGY", Vol. 2, Ernst *et al.* Ed., Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Alemania, 2000; Kodama *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 34: 6419 (1993); Loughheed, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 37717 (1999).

Los ejemplos de grupos de activación (grupos salientes) incluyen flúor, cloro, bromo, éster de tosilato, éster de mesilato, éster de triflato y similares. Los grupos salientes activados preferidos, para su uso en la presente invención, son aquellos que no cargan estéricamente de forma significativa la transferencia enzimática del glicósido al aceptor. Por consiguiente, las realizaciones preferidas de derivados de glicósido 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 el fluoruro de  $\alpha$ -galactosilo, fluoruro de  $\alpha$ -manosilo, fluoruro de  $\alpha$ -glucosilo, fluoruro de  $\alpha$ -fucosilo, fluoruro de  $\alpha$ -xilosilo, fluoruro de  $\alpha$ -sialilo, fluoruro de  $\alpha$ -N-acetilglucosaminilo, fluoruro de  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminilo, fluoruro de  $\beta$ -galactosilo, fluoruro de  $\beta$ -manosilo, fluoruro de  $\beta$ -glucosilo, fluoruro de  $\beta$ -fucosilo, fluoruro de  $\beta$ -xilosilo, fluoruro de  $\beta$ -sialilo, fluoruro de  $\beta$ -N-acetilglucosaminilo y fluoruro de  $\beta$ -N-acetilgalactosaminilo.

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

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

En una realización ilustrativa adicional, el azúcar modificado es un oligosacárido que tiene una estructura antenaria. En otra realización, uno o más de los extremos de las antenas portan la fracción modificadora. Cuando se une más de una fracción modificadora a un oligosacárido que tiene una estructura antenaria, el oligosacárido es útil para "amplificar" la fracción modificadora; cada unidad de oligosacárido conjugada con el péptido une múltiples copias del grupo modificador al péptido. La estructura general de un conjugado común de la invención como se ha expuesto en

la figura anterior incluye especies polivalentes resultantes de la preparación de un conjugado de la invención utilizando una estructura antenaria. En la técnica se conocen muchas estructuras de sacáridos antenarios y el presente método se puede poner en práctica con ellos sin limitación.

5 A continuación, se describen grupos modificadores ilustrativos. Los grupos modificadores se pueden seleccionar por su capacidad para conferir a un péptido una o más propiedades deseables. Las propiedades ilustrativas incluyen, pero sin limitación, mejor farmacocinética, mejor farmacodinámica, mejor biodistribución, el suministro de una especie polivalente, mejor hidrosolubilidad, mayor o menor lipofilia y dirección al tejido .

#### 10 **Polímeros hidrosolubles**

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

20 Se pueden encontrar métodos de activación de polímeros en el documento WO 94/17039, la patente de EE.UU. n.º 5.324.844, documento WO 94/18247, documento WO 94/04193, patente de EE.UU. n.º 5.219.564, patente de EE.UU. n.º 5.122.614, documento WO 90/13540, patente de EE.UU. n.º 5.281.698 y además en el documento WO 93/15189 y para la conjugación entre polímeros activados y péptidos, por ejemplo, Factor de coagulación VIII (documento WO 94/15625), hemoglobina (documento WO 94/09027), molécula portadora de oxígeno (patente de EE.UU. n.º 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese *et al.*, *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-45 (1985)).

Los polímeros hidrosolubles preferidos son aquellos en los que una proporción sustancial de las moléculas del polímero de una muestra del polímero tienen aproximadamente el mismo peso molecular; dichos polímeros son "homodispersos".

La presente invención se ilustra además por referencia a un conjugado de poli(etilenglicol). Hay disponibles varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG. Véase, por ejemplo, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995); y Bhadra, *et al.*, *Pharmazie*, 57: 5-29 (2002). En la técnica, se conocen vías de preparación de moléculas reactivas de PEG y de formación de conjugados usando las moléculas reactivas. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.672.662 desvela un conjugado de un éster activo hidrosoluble y que se puede aislar de un polímero ácido seleccionado entre poli(óxidos de alquileo) lineales o ramificados, poli(polioloxietilados), poli(alcoholes olefinicos) y poli(acrilomorfolina).

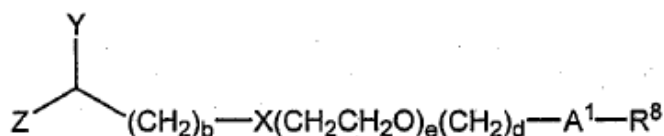
La patente de EE.UU. n.º 6.376.604 expone un método de preparación de un éster de 1-benzotriazolilcarbonato hidrosoluble de un polímero hidrosoluble y no peptídico mediante la reacción de un hidroxilo terminal del polímero con carbonato de di(1-benzotriazolilo) en un disolvente orgánico. El éster activo se usa para formar conjugados con un agente biológicamente activo tal como una proteína o un péptido.

El documento WO 99/45964 describe un conjugado que comprende un agente biológicamente activo y un polímero hidrosoluble activado que comprende una cadena principal polimérica que tiene al menos un extremo unido a la cadena principal polimérica a través de un enlace estable, en el que al menos un extremo comprende una fracción de ramificación que tiene grupos reactivos proximales unidos a la fracción de ramificación, en el que el agente biológicamente activo está unido a al menos uno de los grupos reactivos proximales. Otros poli(etilenglicoles) ramificados se describen en el documento WO 96/21469, La patente de EE.UU. n.º 5.932.462 describe un conjugado formado con una molécula de PEG ramificado que incluye un extremo ramificado que incluye grupos funcionales reactivos. Los grupos reactivos libres están disponibles para reaccionar con una especie biológicamente activa, tal como una proteína o un péptido, formando conjugados entre el poli(etilenglicol) y las especies biológicamente. La patente de EE.UU. n.º 5.446.090 describe un enlazador de PEG bifuncional y su uso en la formación de conjugados que tienen un péptido en cada uno de los extremos del enlazador de PEG.

Los conjugados que incluyen enlaces de PEG degradables se describen en el documento WO 99/34833; y en el documento WO 99/14259, así como en la patente de EE.UU. n.º 6.348.558. Dichos enlaces degradables se aplican en la presente invención.

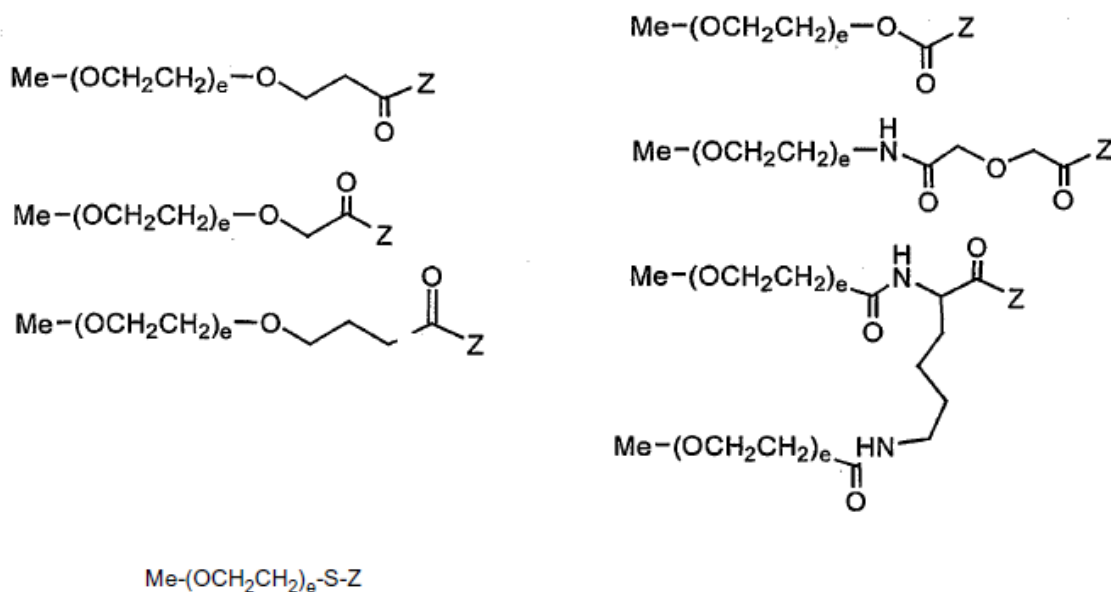
Los métodos reconocidos en la técnica de activación de polímeros que se han expuesto anteriormente son de uso en el contexto de la presente invención en la formación de los polímeros ramificados que se exponen en el presente documento y además para la conjugación de estos primeros ramificados con otras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

Las moléculas de poli(etilenglicol) ilustrativas de uso en la invención incluyen, pero sin limitación, las que tienen la fórmula:

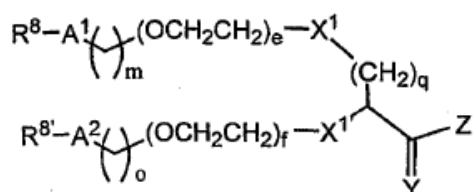


- 5 en la que R<sup>8</sup> es H, OH, NH<sub>2</sub>, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, acetal, OHC-, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-, HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>C(Y)Z<sup>1</sup>. El índice "e" representa un número entero de 1 a 2.500. Los índices b, d y q representan, de manera independiente, números enteros de 0 a 20. Los símbolos Z y Z<sup>1</sup> representan, de manera independiente, OH, NH<sub>2</sub>, grupos salientes, por ejemplo, imidazol, p-nitrofenilo, HOBT, tetrazol, haluro, S-R<sup>9</sup>, la parte de alcohol de ésteres activados; -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>C(Y<sup>1</sup>)V o -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>U(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>C(Y<sup>1</sup>)<sub>v</sub>. El símbolo Y representa H(2), =O, =S, =N-R<sup>10</sup>. Los símbolos X y y<sup>1</sup>, A<sup>1</sup> y U representan, de manera independiente, las fracciones O, S, N-R<sup>11</sup>. El símbolo V representa OH, NH<sub>2</sub>, halógeno, S-R<sup>2</sup>, el componente de alcohol de ésteres activados, el componente de amina de amidas activadas, nucleótidos de azúcar y proteínas. Los índices p, q, s y v son miembros seleccionados de manera independiente entre los números enteros de 0 a 20. Los símbolos R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> representan, de manera independiente, H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido.

En otras realizaciones ilustrativas, la molécula de poli(etilenglicol) se selecciona entre las siguientes:



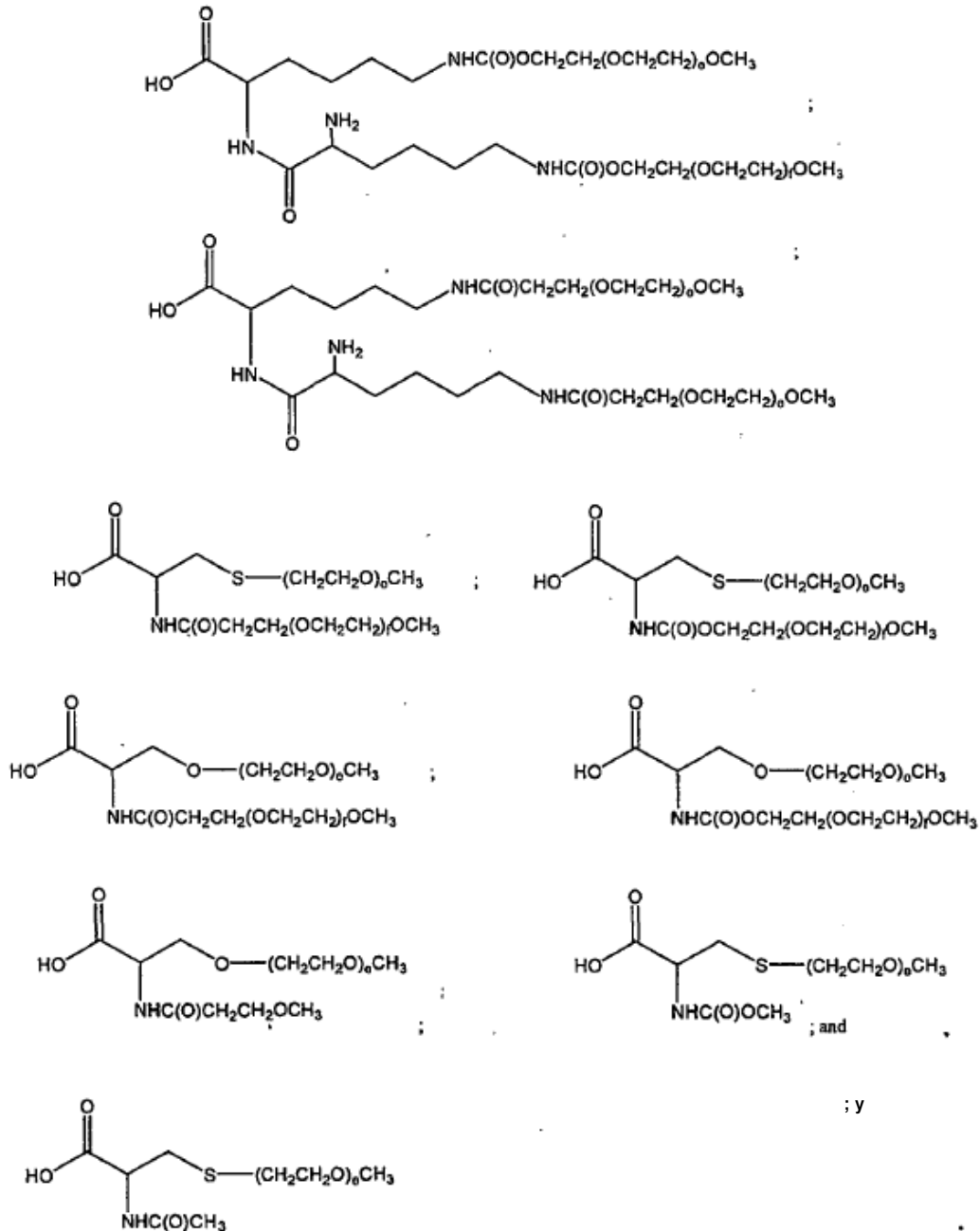
- 20 El poli(etilenglicol) útil en la formación del conjugado de la invención es bien lineal o ramificado. Las moléculas de poli(etilenglicol) ramificado adecuadas para su uso en la invención incluyen, pero sin limitación, las que se describen mediante la fórmula siguiente:



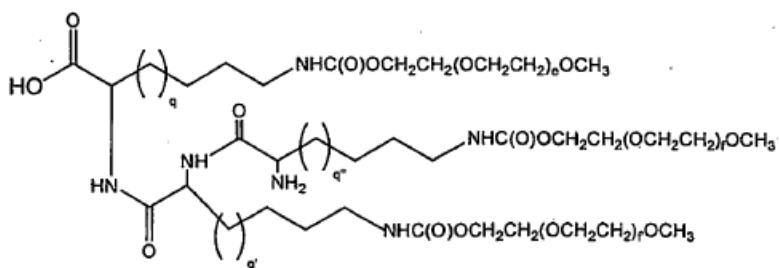
25

en la que R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son miembros seleccionados de manera independiente de los grupos definidos para R<sup>8</sup> anterior. A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> son miembros seleccionados, de manera independiente, de los grupos definidos para A<sup>1</sup> anterior. Los índices e, f, o y q son como se han descrito anteriormente. Z e Y son como se han descrito anteriormente. X<sup>1</sup> y X<sup>1'</sup> son miembros seleccionados de manera independiente entre S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH y NHC(O)O, OC(O)NH.

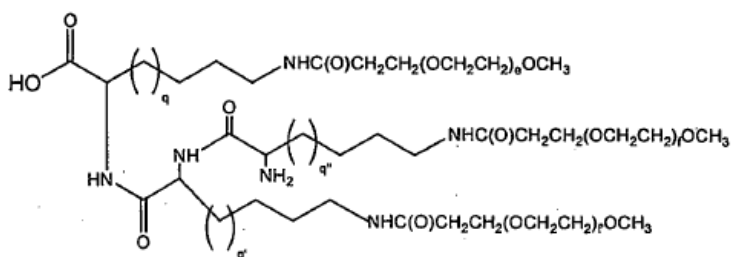
5 En otras realizaciones ilustrativas, el PEG ramificado se basa en un núcleo de cisteína, serina o di-lisina. Así pues, otros PEG ramificados ilustrativos incluyen:



10 En otra realización más, la fracción de PEG ramificado se basa en un péptido de tri-lisina. La tri-lisina puede estar mono-, di-, tri- o tetra-PEGilada. Las especies ilustrativas de acuerdo con dicha realización tienen las fórmulas:



y

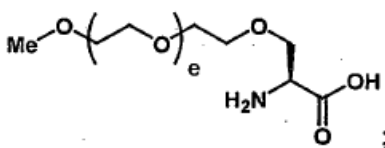
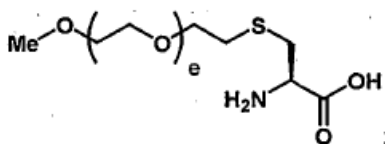


- 5 en las que e, f y r se seleccionan, de manera independiente, entre números enteros de 1 a 2.500; y q, q' y q'' se seleccionan de manera independiente entre números enteros de 1 a 20.

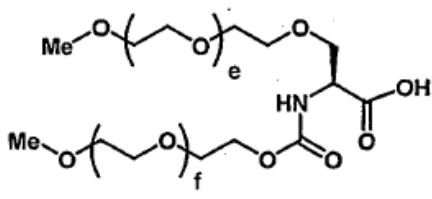
En realizaciones ilustrativas de la invención, el PEG es m-PEG (5 kD, 10 kD o 20 kD). Una especie de PEG ramificado ilustrativo es una serina- o cisteína-(m-PEG)<sub>2</sub> en la que m-PEG es un m-PEG de 20 kD.

- 10 Como será evidente para los expertos, los polímeros ramificados de uso en la invención incluyen variaciones sobre los temas indicados anteriormente. Por ejemplo, el conjugado de di-lisina-PEG mostrado anteriormente puede incluir tres subunidades poliméricas, la tercera unida a la  $\alpha$ -amina mostrada como no modificada en la estructura anterior. Del mismo modo, el uso de una tri-lisina funcionalizado con tres o cuatro subunidades poliméricas está dentro del
- 15 alcance de la invención.

Las realizaciones específicas de acuerdo con la invención incluyen:

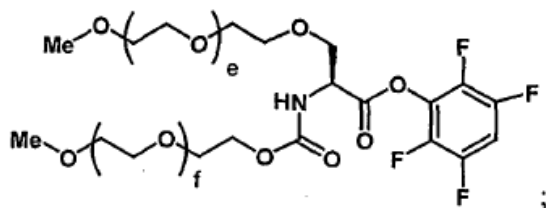


y

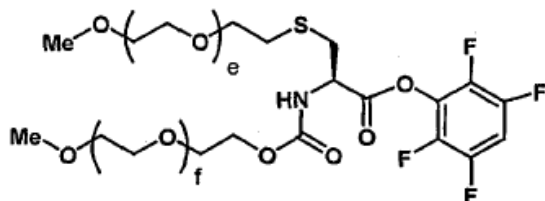


20

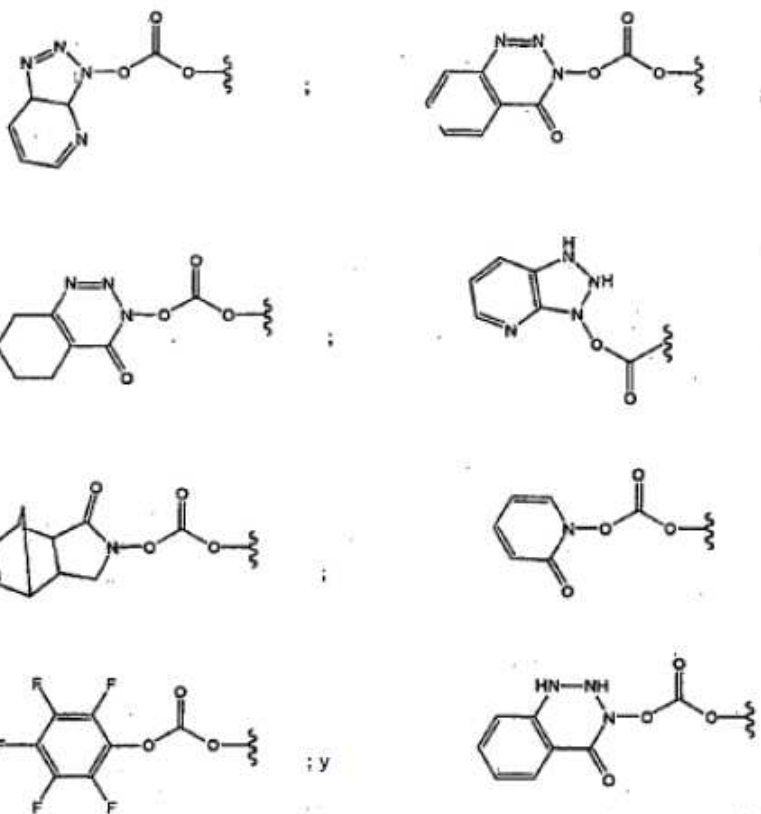
y carbonatos y ésteres activos de estas especies, tales como:



y



- 5 Otros grupos de activación o salientes, apropiados para activar PEG lineales de uso en la preparación de los compuestos expuestos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, las especies:

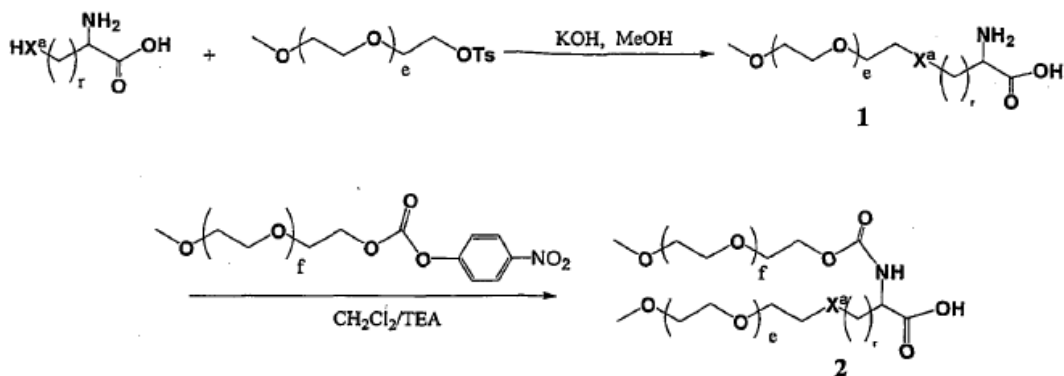


- 10 Las moléculas de PEG que se activan con estas y otras especies y los métodos de fabricación de los PEG activados se exponen en el documento WO 04/083259.

Los expertos en la materia observarán que una o más de las ramificaciones de m-PEG del polímero ramificado se pueden sustituir con una fracción de PEG con un extremo diferente, por ejemplo, OH, COOH, NH<sub>2</sub>, alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, etc. Además, las estructuras anteriores se modifican fácilmente mediante la inserción de enlaces de alquilo (o retirando átomos de carbono) entre el átomo de carbono α y el grupo funcional de la cadena lateral. Por lo tanto, los derivados "homo" y homólogos superiores, así como los homólogos inferiores están dentro del alcance de los núcleos para los PEG ramificados de uso en la presente invención.

15 Las especies de PEG ramificados que se exponen en el presente documento se preparan fácilmente mediante métodos tales como los que se exponen en el siguiente esquema:





en el que  $X^a$  es O o S y  $r$  es un número entero de 1 a 5. Los índices  $e$  y  $f$  son números enteros seleccionados de manera independiente de 1 a 2.500.

5

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

10

15

En una realización ilustrativa, el grupo modificador es un resto de PEG, sin embargo, se puede incorporar cualquier grupo modificador, por ejemplo, polímero hidrosoluble, polímero no hidrosoluble, fracción terapéutica, etc., en una fracción de glicosilo a través de un enlace apropiado. El azúcar modificado se forma por medios enzimáticos, medios químicos o una combinación de los mismos, produciendo de ese modo un azúcar modificado. En una realización ilustrativa, los azúcares están sustituidos con una amina activa en cualquier posición que permita la unión de la fracción modificadora, permitiendo aún así que el azúcar funcione como sustrato para una enzima capaz de acoplar el azúcar modificado al péptido G-CSF. En una realización ilustrativa, cuando la galactosamina es el azúcar modificado, la fracción de amina se une al átomo de carbono en la posición 6.

20

#### **Especies modificadas de polímeros hidrosolubles**

25

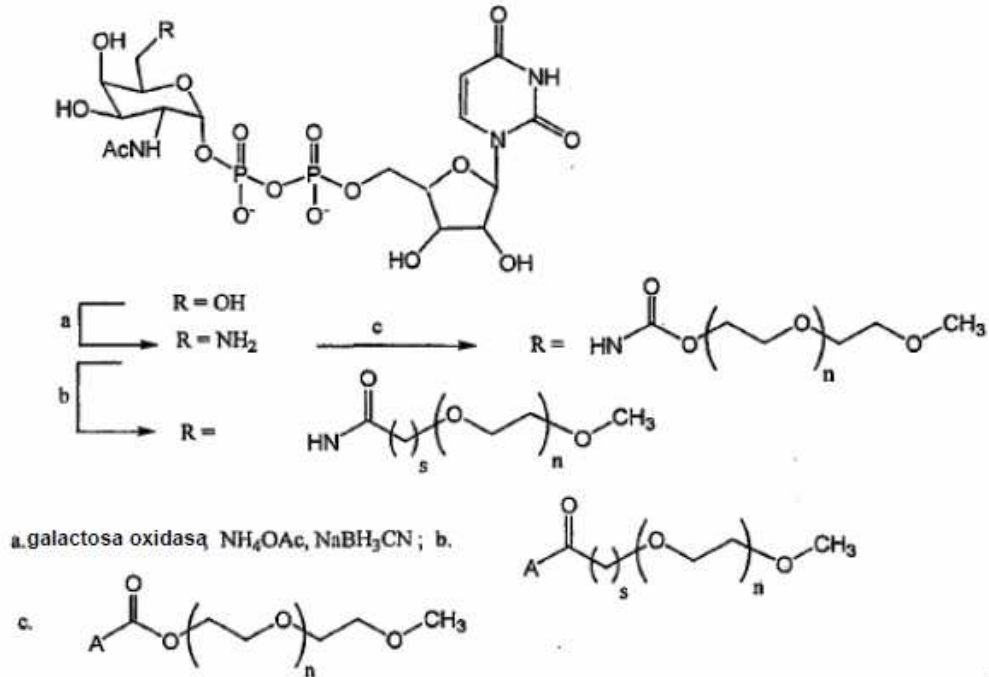
Las especies de azúcar de nucleótido modificado con polímero hidrosoluble en las que la fracción de azúcar se modifica con un polímero hidrosoluble son de uso en la presente invención. Un nucleótido de azúcar modificado ilustrativo porta un grupo de azúcar que está modificado a través de una fracción de amina en el azúcar. Los nucleótidos de azúcar modificado, por ejemplo, derivados de sacarilo-amina de un nucleótido de azúcar también son de uso en los métodos de la invención. Por ejemplo, una amina de sacarilo (sin el grupo modificador) se puede conjugar enzimáticamente a un péptido (u otra especie) y la fracción de amina de sacarilo libre se puede conjugar posteriormente con un grupo modificador deseado. Como alternativa, el nucleótido de azúcar modificado puede funcionar como sustrato para una enzima que transfiera el azúcar modificado a un aceptor de sacarilo sobre un sustrato, por ejemplo, un péptido, glucopéptido, lípido, aglicona, glicolípido, etc.

35

En una realización en la que el núcleo de sacárido es galactosa o glucosa,  $R^5$  es  $NHC(O)Y$ .

En una realización ilustrativa, el azúcar modificado se basa en una fracción de 6-amino-*N*-acetil-glicosilo. Como se muestra a continuación para *N*-acetilgalactosamina, la fracción de 6-amino-azúcar se prepara fácilmente mediante métodos convencionales.

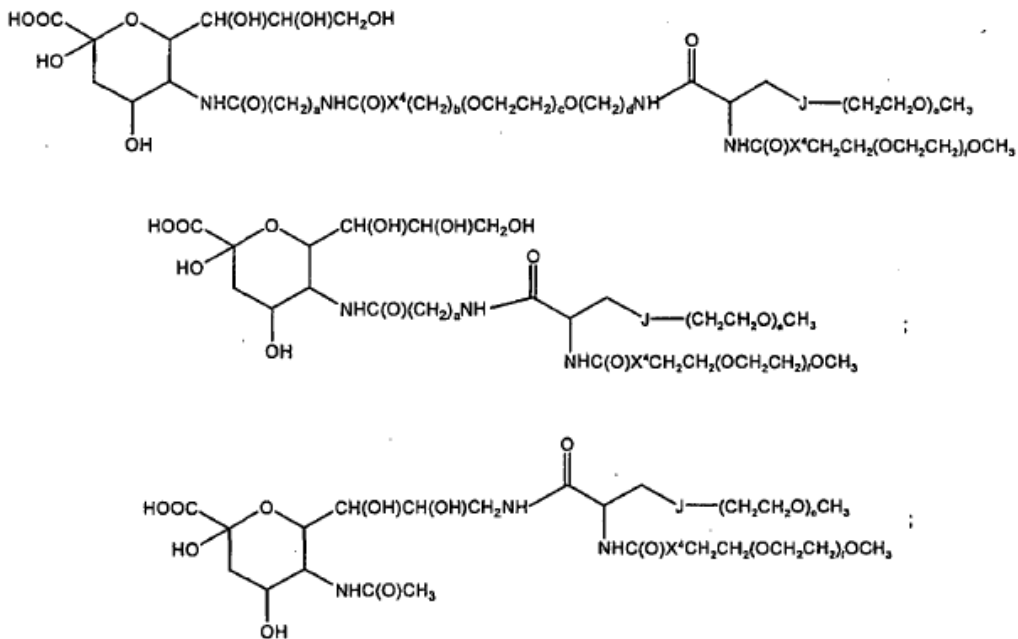
40

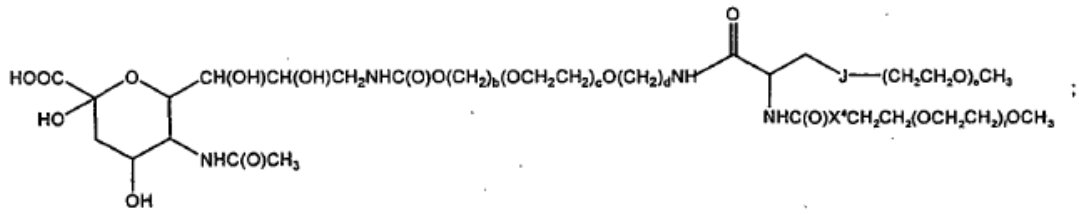


5 En el Esquema 4 anterior, el índice n representa un número entero de 0 a 2.500, preferentemente de 10 a 1.500 y más preferentemente de 10 a 1.200. El símbolo "A" representa un grupo de activación, por ejemplo, un halo, un componente de un éster activado (por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida), un componente de un carbonato (por ejemplo, carbonato de p-nitrofenilo) y similares. Los expertos en la materia observarán que se pueden preparar fácilmente otros azúcares de nucleótidos de PEG-amida mediante este y otros métodos análogos.

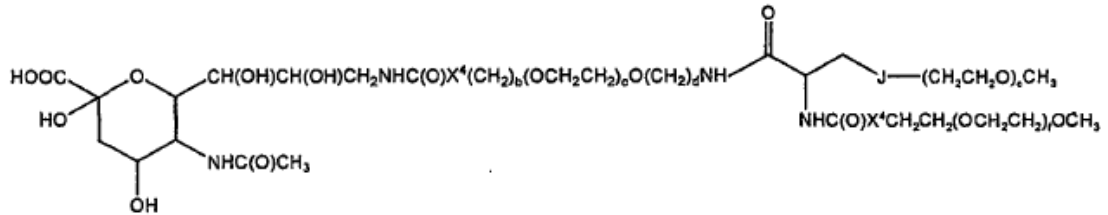
10 En otras realizaciones ilustrativas, la fracción de amida se sustituye con un grupo tal como un uretano o una urea.

En otras realizaciones adicionales, R<sup>1</sup> es un PEG ramificado, por ejemplo, una de las especies que se han expuesto anteriormente. Los compuestos ilustrativos de acuerdo con dicha realización incluyen:





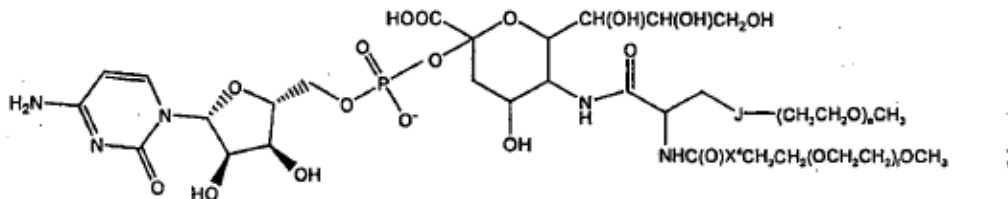
y



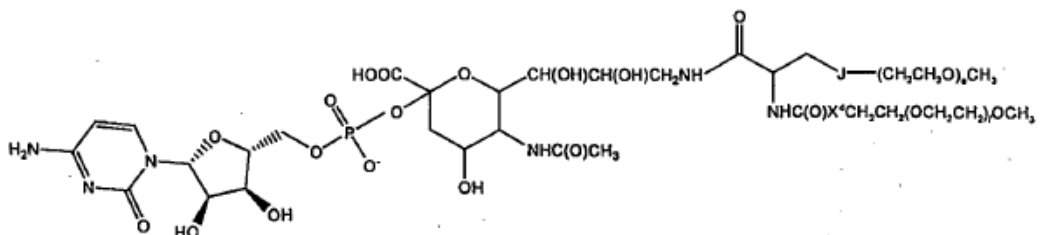
5 en las que X<sup>4</sup> es un enlace u O y J es S u O.

Además, como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona conjugados de péptidos que se forman usando azúcares de nucleótidos que se modifican con un polímero hidrosoluble, que es de cadena lineal o ramificada. Por ejemplo, los compuestos que tienen las fórmulas que se muestran a continuación están dentro del alcance de la presente invención:

10



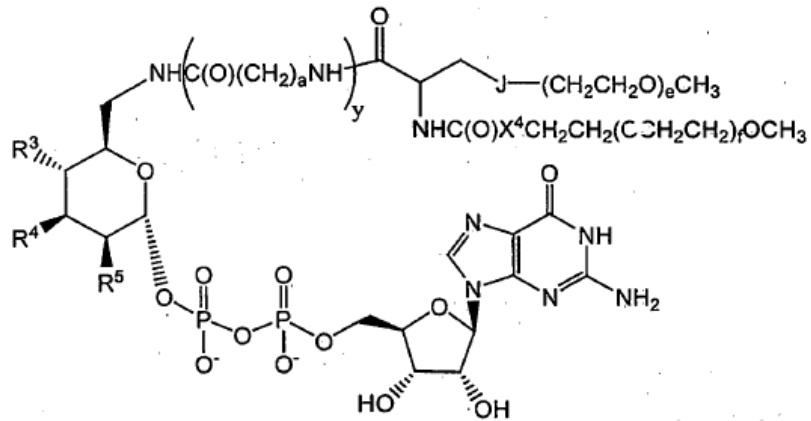
y



en las que X<sup>4</sup> es O o un enlace y J es S u O.

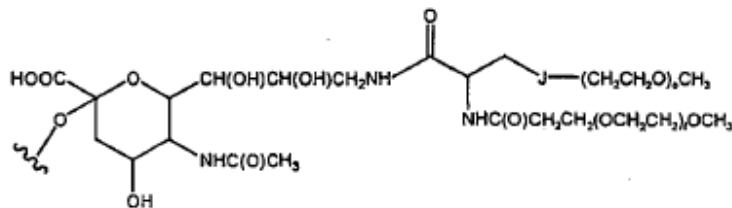
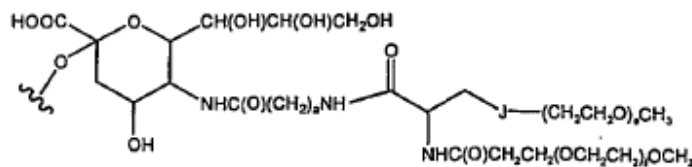
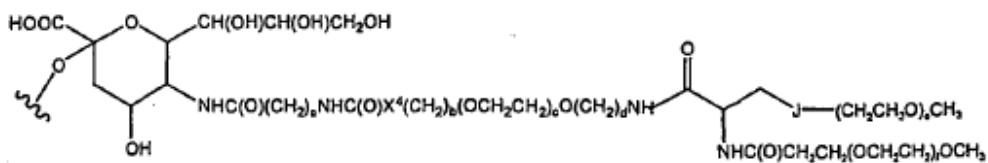
15

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

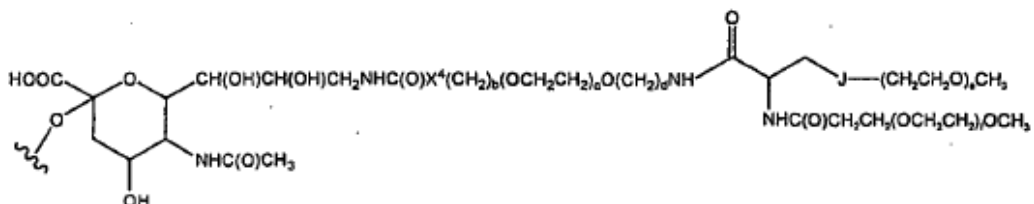


en la que  $X^4$  es un enlace u O, J es S u O, e y es 0 o 1.

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



y



- 10 en las que J es S u O.

**Polímeros no hidrosolubles**

- 15 En otra realización, análoga a las que se han descrito anteriormente, los azúcares modificados incluyen un polímero no hidrosoluble, en lugar de un polímero hidrosoluble. Además, los conjugados de la invención pueden incluir uno o más polímeros no hidrosolubles. Dicha realización de la invención se ilustra mediante el uso del conjugado como un vehículo con el que se administra un péptido terapéutico de una forma controlada. En la técnica, se conocen

sistemas de administración de fármacos poliméricos. Véase, por ejemplo, Dunn *et al.*, Eds. "POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS", ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Los expertos en la materia observarán que se puede aplicar sustancialmente cualquier sistema de administración de fármacos conocido a los conjugados de la presente invención.

5 Los polímeros no hidrosolubles representativos incluyen, pero sin limitación, polifosfazinas, poli(alcoholes vinílicos), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poli(acrilamidas), polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo),  
10 poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo) polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(acetato de vinilo), cloruro de polivinilo, poliestireno, polivinilpirrolidona, pluronics y polivinilfenol y copolímeros de los mismos.

15 Los polímeros naturales modificados sintéticamente de uso en los conjugados de la invención incluyen, pero sin limitación, alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa y nitrocelulosas. Los miembros particularmente preferidos de las amplias clases de polímeros naturales modificados sintéticamente incluyen, pero sin limitación, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de  
20 celulosa, carboximetilcelulosa, triacetato de celulosa, sal sódica de sulfato de celulosa y polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos y ácido alginico.

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

Los polímeros biodegradables representativos de uso en los conjugados de la invención incluyen, pero sin limitación, polilactidas, poliglicólidos y copolímeros de los mismos, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), poli(lactida-co-glicólido), polianhídridos, poliortoésteres, mezclas y copolímeros de los mismos. Son de uso particular las composiciones que forman geles, tales como las que incluyen colágeno, pluronics y similares.

Los polímeros de uso en la invención incluyen polímeros "híbridos" que incluyen materiales no hidrosolubles que tienen dentro al menos una porción de su estructura, una molécula que se puede biorreabsorber. Un ejemplo de dicho polímero es uno que incluye un copolímero no hidrosoluble que tiene una región que se puede biorreabsorber, una región hidrófila y una pluralidad de grupos funcionales que se pueden reticular por cadena polimérica.

Para los fines de la presente invención, la expresión "materiales no hidrosolubles" incluye materiales que son sustancialmente no hidrosolubles en agua o entornos que contienen agua. Por lo tanto, aunque determinadas regiones o segmentos del copolímero pueden ser hidrófilas o incluso hidrosolubles, la molécula de polímero, en conjunto, no se disuelve en ninguna medida sustancial en agua.

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

La región que se puede biorreabsorber puede ser bien hidrófoba o hidrófila, siempre que la composición copolimérica en conjunto no se vuelva hidrosoluble. Por lo tanto, la región que se puede biorreabsorber se selecciona basándose en la preferencia de que el polímero, en su conjunto, permanezca no hidrosoluble. Por consiguiente, las propiedades relativas, es decir, los tipos de grupos funcionales contenidos por y las proporciones relativas de la región que se puede biorreabsorber y la región hidrófila se seleccionan para asegurar que las composiciones que se pueden biorreabsorber útiles permanezcan no hidrosolubles.

Los polímeros que se pueden reabsorber ilustrativos incluyen, por ejemplo, copolímeros de bloque que se pueden reabsorber producidos de forma sintética de poli(ácido  $\alpha$ -hidroxi-carboxílico)/poli(oxialquileno), (véase, Cohn *et al.*, patente de EE.UU. n.º 4.826.945). Estos copolímeros no están reticulados y son hidrosolubles, de modo que el organismo puede excretar las composiciones de copolímero de bloque degradadas. Véase Younes *et al.*, *J Biomed. Mater. Res.* 21: 1301-1316 (1987); y Cohn *et al.*, *J Biomed. Mater. Res.* 22: 993-1009 (1988).

Los polímeros que se pueden biorreabsorber preferidos en la actualidad incluyen uno o más componentes seleccionados entre 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. Además, más preferentemente, el polímero que se puede biorreabsorber incluye un componente de poli(hidroxi)ácido. De los poli(hidroxi)ácidos, se prefieren el ácido

poliláctico, ácido poliglicólico, ácido policaproico, ácido polibutírico, ácido polivalérico y copolímeros y mezclas de los mismos.

5 Además de formar fragmentos que se absorben *en vivo* ("biorreabsorbidos"), los recubrimientos poliméricos preferidos para su uso en los métodos de la invención también pueden formar un fragmento que se puede excretar y/o metabolizar.

10 También se pueden usar en la presente invención copolímeros de orden superior. Por ejemplo, Casey *et al.*, patente de EE.UU. n.º 4.438.253, que se emitió el 20 de marzo de 1984, desvela copolímeros de tres bloques producidos a partir de la transesterificación de poli(ácido glicólico) y un poli(alquilenglicol) con terminación hidroxilo. Dichas composiciones se desvelan para su uso como suturas de monofilamento que se pueden reabsorber. La flexibilidad de dichas composiciones se controla mediante la incorporación de un ortocarbonato aromático, tal como ortocarbonato de tetra-p-tolilo a la estructura del copolímero.

15 También se pueden utilizar otros polímeros basados en ácido láctico y/o glicólico. Por ejemplo, Spinu, patente de EE.UU. n.º 5.202.413, que se emitió el 13 de abril de 1993, desvela copolímeros de múltiples bloques biodegradables que tienen bloques ordenados secuencialmente de polilactida y/o poliglicólico producidos mediante polimerización con apertura del anillo de lactida y/o glicólico en un diol oligomérico o un resto de diamina seguido de la extensión de la cadena con un compuesto difuncional tal como un diisocianato, cloruro de diacilo o diclorosilano.

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

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

35 Los polímeros que son componentes de hidrogeles también son útiles en la presente invención. Los hidrogeles son materiales poliméricos que son capaces que absorber cantidades relativamente altas de agua. Los ejemplos de compuestos que forman hidrogeles incluyen, pero sin limitación, ácidos poliacrílicos, carboximetilcelulosa sódica, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidina, gelatina, carragenano y otros polisacáridos, ácido hidroxietilmetacrílico (HEMA), así como derivados de los mismos y similares. Se pueden producir hidrogeles que son estables, biodegradables y que se pueden biorreabsorber. Además, las composiciones de hidrogel pueden incluir subunidades que presentan una o más de estas propiedades.

45 Se conocen composiciones de hidrogel biocompatibles cuya integridad se puede controlar mediante reticulación y, en la actualidad, se prefieren para su uso en los métodos de la invención. Por ejemplo, Hubbell *et al.*, patentes de EE.UU. n.º 5.410.016, que se emitió el 25 de abril de 1995 y n.º 5.529.914, que se emitió el 25 de junio de 1996, desvelan sistemas hidrosolubles, que son copolímeros de bloque reticulados que tienen un segmento de bloque central hidrosoluble intercalado entre dos extensiones hidrolíticamente lábiles. Además, dichos copolímeros están protegidos terminalmente con funcionalidades de acrilato fotopolimerizable. Cuando se reticulan, estos sistemas se convierten en hidrogeles. El bloque central hidrosoluble de dichos copolímeros puede incluir poli(etilenglicol); mientras que las extensiones hidrolíticamente lábiles pueden ser un poli( $\alpha$ -hidroxiácido) tal como ácido poliglicólico o ácido poliláctico. Véase, Sawhney *et al.*, *Macromolecules* 26: 581-587 (1993).

55 En otra realización, el gel es un gel termorreversible. En la actualidad, se prefieren los 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.

60 En otra realización ilustrativa más, el conjugado de la invención incluye un componente de un liposoma. Los liposomas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en Eppstein *et al.*, patente de EE.UU. n.º 4.522.811, que se emitió el 11 de junio de 1985. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas se pueden preparar mediante la disolución de uno o más lípidos apropiados (tales como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, araquidoil fosfatidil colina y colesterol) en un disolvente inorgánico que luego se evapora, dejando atrás una película delgada de lípido seco en la superficie del recipiente. A continuación, se introduce en el recipiente una solución acuosa del compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable. Después, el recipiente se gira manualmente para liberar el material lipídico de los lados del recipiente y para dispersar los agregados lipídicos, formando de este modo la suspensión liposomal.

65

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

Los formatos estructurales descritos anteriormente en el contexto de los polímeros hidrosolubles, tanto de cadena lineal como ramificada son de aplicación general también con respecto a los polímeros no hidrosolubles. Por lo tanto, por ejemplo, los núcleos de ramificación de cisteína, serina, dilisina y trilisina se pueden funcionalizar con dos fracciones de polímeros no hidrosolubles. Los métodos usados para producir estas especies son generalmente muy análogos a los usados para producir los polímeros hidrosolubles.

Por ejemplo, la semivida *en vivo* de los glicopéptidos terapéuticos se puede aumentar con fracciones de PEG tales como polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, la modificación química de proteínas con PEG (PEGilación) aumenta su tamaño molecular y reduce su accesibilidad a la superficie y al grupo funcional, todo ello dependiente del tamaño del PEG unido a la proteína. Esto mejora la semivida en plasma y la estabilidad proteolítica y reduce la inmunogenicidad y la absorción hepática (Chaffee *et al. J. Clin. Invest.* 89: 1643-1651 (1992); Pyatak *et al. Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol.* 29: 113-127 (1980)). Se ha informado de que la PEGilación de la interleucina-2 aumenta su potencial antitumoral *en vivo* (Katre *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 84: 1487-1491 (1987)) y la PEGilación de un F(ab')<sub>2</sub> derivado del anticuerpo monoclonal A7 ha mejorado su localización tumoral (Kitamura *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28: 1387-1394 (1990)). Por lo tanto, en otra realización, la semivida *en vivo* de un péptido derivatizado con una fracción de PEG mediante un método de la invención aumenta con respecto a la semivida *en vivo* del péptido no derivatizado.

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

### 30 **Biomoléculas**

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

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

Las biomoléculas útiles en la práctica de la presente invención se pueden derivar de cualquier fuente. Las biomoléculas se pueden aislar de fuentes naturales o se pueden producir mediante métodos sintéticos. Los péptidos pueden ser péptidos naturales o péptidos mutados. Las mutaciones se pueden efectuar por mutagénesis química, mutagénesis dirigida u otros medios de inducción de mutaciones conocidos por los expertos en la materia. 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 tanto de origen natural como sintéticos y los ácidos nucleicos son de uso en combinación con la presente invención. Dichas moléculas se pueden unir a un componente de resto de azúcar o un agente de reticulación mediante cualquier grupo reactivo disponible. Por ejemplo, los péptidos se pueden unir a través de un grupo reactivo de amina, carboxilo, sulfhidrilo o hidroxilo. El grupo reactivo puede residir en un extremo del péptido o en un sitio interno en la cadena peptídica. Los ácidos nucleicos se pueden unir a través de un grupo reactivo en una base (por ejemplo, amina exocíclica) o un grupo hidroxilo disponible en una fracción de azúcar (por ejemplo, 3'- o 5'-hidroxilo). Las cadenas de péptido y de ácidos nucleicos se pueden derivatizar además en uno o más sitios para permitir la unión de grupos reactivos apropiados en la cadena. Véase, Chrisey *et al. Nucleic Acids Res.* 24: 3031-3039 (1996).

En una realización adicional, la biomolécula se selecciona para dirigir el péptido modificado mediante los métodos de la invención a un tejido específico, mejorando de ese modo la entrega del péptido a ese tejido con respecto a la cantidad de péptido no derivatizado que se administra en el tejido. En una realización adicional más, la cantidad de péptido derivatizado administrada en un tejido específico en un período de tiempo seleccionado se ve aumentada

por derivatización en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente, al menos aproximadamente un 40 % y todavía más preferentemente, al menos aproximadamente un 100 %. En la actualidad, las biomoléculas preferidas para aplicaciones de dirección incluyen anticuerpos, hormonas y ligandos para receptores de la superficie celular.

5 Además, en otra realización ilustrativa adicional, se proporciona como conjugado con biotina. Por lo tanto, por ejemplo, se elabora un péptido biotinilado de forma selectiva mediante la unión de una fracción de avidina o estreptavidina portadora de uno o más grupos modificadores.

### 10 **Fracciones terapéuticas**

En otra realización, el azúcar modificado incluye una fracción terapéutica. Los expertos en la materia observarán que existe una superposición entre la categoría de fracciones terapéuticas y biomoléculas; muchas biomoléculas tienen propiedades o potencial terapéutico.

15 Las fracciones terapéuticas pueden ser agentes ya aceptados para un uso clínico o pueden ser fármacos cuyo uso es experimental, o cuya actividad o mecanismo de acción está en investigación. Las fracciones terapéuticas pueden tener una acción demostrada en una patología determinada o puede tan solo existir la hipótesis de que muestran la acción deseable en una patología dada. En otra realización, las fracciones terapéuticas son compuestos que se están explorando para determinar su capacidad para interactuar con un tejido de elección. Las fracciones terapéuticas, que son útiles en la práctica de la presente invención incluyen fármacos de una amplia selección de clases de fármacos que tienen una variedad de actividades farmacológicas. Las fracciones terapéuticas precedentes son sustancialmente no fluorescentes o emiten una cantidad de fluorescencia tan mínima que no son apropiadas para su uso como un marcador fluorescente en un ensayo. Además, en general, se prefiere el uso de fracciones terapéuticas que no sean azúcares. Una excepción a esta preferencia es el uso de un azúcar que se modifica mediante la unión covalente de otra entidad, tal como un PEG, biomolécula, fracción terapéutica, fracción de diagnóstico y similares. En otra realización ilustrativa, una fracción terapéutica de azúcar se conjuga a una ramificación enlazadora y el casete de azúcar-ramificación enlazadora se conjuga posteriormente a un péptido a través de un método de la invención.

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

25 En una realización ilustrativa, la fracción terapéutica se une al azúcar modificado a través de un enlace que se escinde en condiciones seleccionadas. Las condiciones ilustrativas incluyen, pero sin limitación, un pH seleccionado (por ejemplo, estómago, intestino, vacuola endocítica), la presencia de una enzima activa (por ejemplo, esterasa, reductasa, oxidasa), luz, calor y similares. En la técnica, se conocen muchos grupos escindibles. Véase, por ejemplo, Jung *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 761: 152-162 (1983); Joshi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265: 14518-14525 (1990); Zarlring *et al.*, *J. Immunol.*, 124: 913-920 (1980); Bouzizar *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 155: 141-147 (1986); Park *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 261: 205-210 (1986); Browning *et al.*, *J. Immunol.*, 143: 1859-1867 (1989).

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

65



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

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

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

También son de uso en la presente invención los estrógenos (por ejemplo, dietilestilbestrol), glucocorticoides (por ejemplo, triamcinolona, betametasona, etc.) y progestágenos tales como noretindrona, etinodiol, noretindrona, levonorgestrel; agentes tiroideos (por ejemplo, liotironina o levotiroxina) o agentes antitiroideos (por ejemplo, metimazol); fármacos antihiperprolactinémicos (por ejemplo, cabergolina); supresores de hormonales (por ejemplo, danazol o goserelina), oxióticos (por ejemplo, metilergonovina u oxitocina) y también se pueden emplear prostaglandinas tales como mioprostol, alprostadil o dinoprostona.

Otros grupos modificadores útiles incluyen fármacos inmunomoduladores (por ejemplo, antihistamínicos, estabilizadores de mastocitos, tales como lodoxamida y/o cromolina, esteroides (por ejemplo, triamcinolona, beclometazona, cortisona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, beclometazona o clobetasol), antagonistas de histamina H<sub>2</sub> (por ejemplo, famotidina, cimetidina, ranitidina), inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, ciclosporina), etc. Además, se usan grupos con actividad antiinflamatoria, tales como sulindac, etodolac, ketoprofeno y ketorolac. Otros fármacos de uso en combinación con la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia.

#### Preparación de azúcares modificados

En general, la fracción de azúcar y el grupo modificador se enlazan 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. El/los grupo/s funcional/es reactivo/s de azúcar se encuentra/n en cualquier posición de la fracción de azúcar. Los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente los que son bien conocidos en la técnica de la química de bioconjugados. En la actualidad, las clases de reacciones preferidas disponibles con fracciones de azúcar reactivas son las que evolucionan en condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, pero sin limitación, sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrófilas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples de carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se describen, por ejemplo, en March, "ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY", 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, "BIOCONJUGATE TECHNIQUES", Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney *et al.*, "MODIFICATION OF PROTEINS"; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Los grupos funcionales reactivos útiles que cuelgan de un núcleo de azúcar o grupo modificador incluyen, pero sin limitación:

(a) grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos que incluyen, pero sin limitación, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, acilimidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, alquilo, alquenilo, alquinilo y ésteres aromáticos;

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

(c) grupos haloalquilo, en los que el haluro se puede desplazar posteriormente con un grupo nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión o un ion alcóxido, generando así la unión

covalente de un nuevo grupo en el grupo funcional del átomo de halógeno;

(d) grupos dienófilos, que son capaces de participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos maleimido;

(e) grupos aldehído o cetona, de modo que la derivatización posterior es posible a través de la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de mecanismos tales como la adición de Grignard o la adición de alquililitio;

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

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

(h) grupos amina o sulfhidrilo que, por ejemplo, se pueden acilar, alquilar u oxidar;

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

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

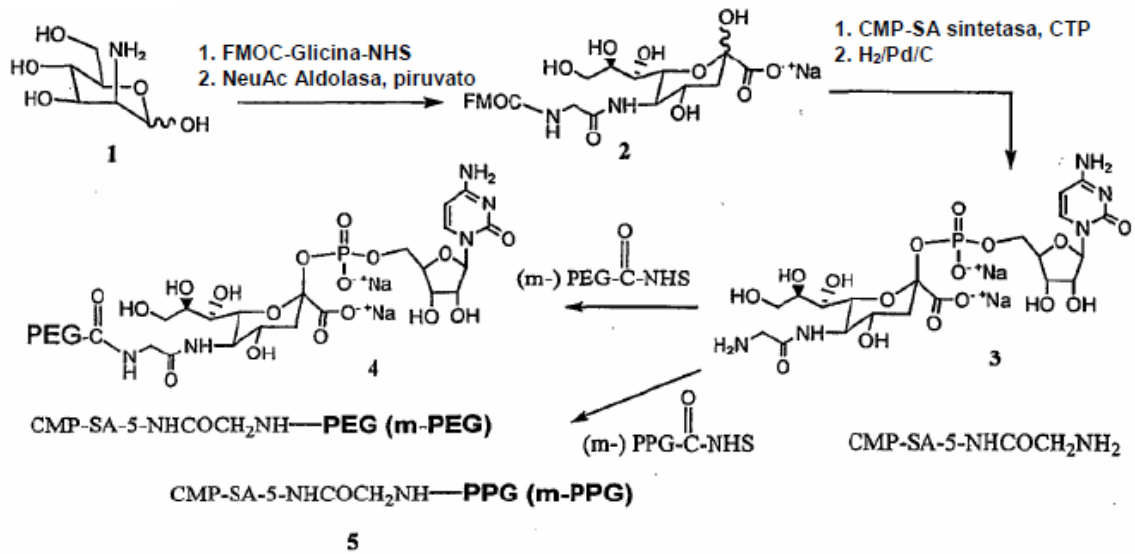
Los grupos funcionales reactivos se pueden seleccionar de modo que no participen en, ni interfieran con las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o grupo modificador. Como alternativa, un grupo funcional reactivo se puede proteger de la participación en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los expertos en la materia saben cómo proteger un determinado grupo funcional para que no interfiera con un conjunto seleccionado de condiciones de reacción. Para consultar ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo, Greene *et al.*, "PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS", John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

En la descripción que figura a continuación, se expone una serie de ejemplos específicos de azúcares modificados que son útiles en la práctica de la presente invención. En las realizaciones ilustrativas, se utiliza un derivado de ácido siálico como el núcleo de azúcar al que se une el grupo modificador. El enfoque del análisis sobre los derivados de ácido siálico tiene únicamente un fin ilustrativo y no se debería interpretar como limitante del alcance de la invención. Los expertos en la materia observarán que se puede activar una variedad de otras fracciones de azúcar y derivatizar de una manera análoga a la expuesta usando ácido siálico como ejemplo. Por ejemplo, hay disponibles numerosos métodos para la modificación de la galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y fucosa por nombrar unos cuantos sustratos de azúcar, que se modifican fácilmente mediante métodos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Elhalabi *et al.*, *Curr. Med. Chem.* 6: 93 (1999) y Schafer *et al.*, *J. Org. Chem.* 65: 24 (2000).

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

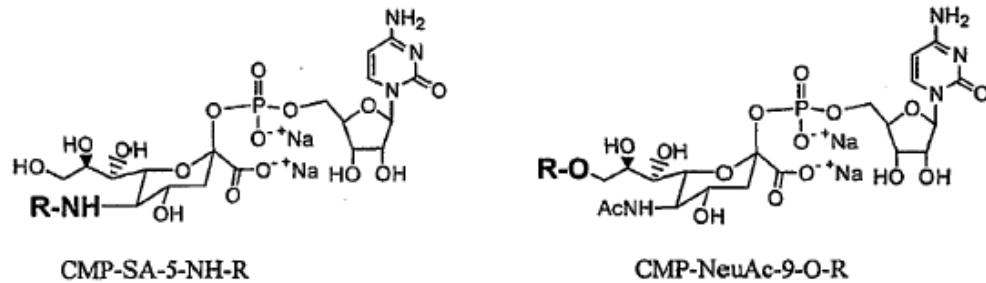
En el Esquema 4, el aminoglicósido **1** se trata con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (por ejemplo, glicina), convirtiendo el resto de amina del azúcar en el aducto de amida del aminoácido protegido correspondiente. El aducto se trata con una aldolasa para formar el  $\alpha$ -hidroxicarboxilato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

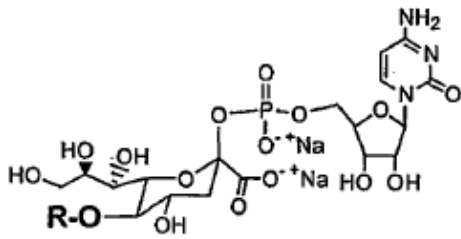
**Esquema 4**



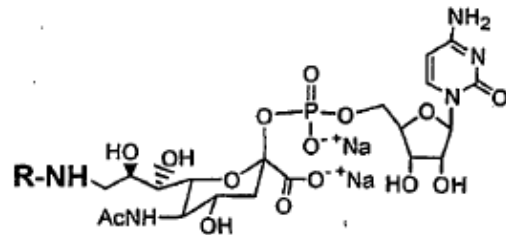
5 La Tabla 2 expone ejemplos representativos de monofosfatos de azúcar que se derivatizan con una fracción de PEG o de PPG. Determinados compuestos de la Tabla 2 se preparan mediante el método del Esquema 4. Otros derivados se preparan mediante métodos reconocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Keppler *et al.*, "Glycobiology" 11: 11R (2001); y Charter *et al.*, "Glycobiology" 10: 1049 (2000)). Otros análogos de PEG y PPG reactivos de amina se encuentran disponibles en el mercado, o se pueden preparar mediante métodos fácilmente accesibles para los expertos en la materia.

**Tabla 2**

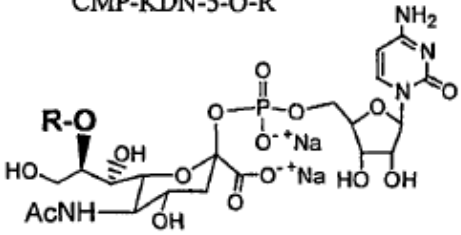




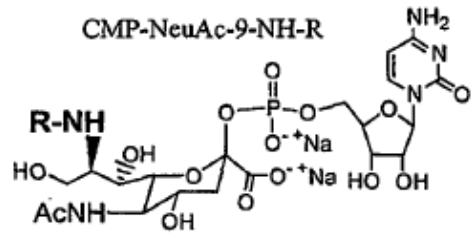
CMP-KDN-5-O-R



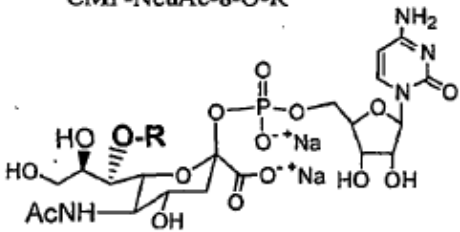
CMP-NeuAc-9-NH-R



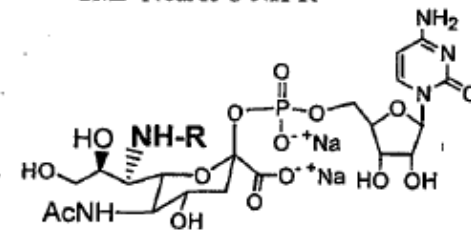
CMP-NeuAc-8-O-R



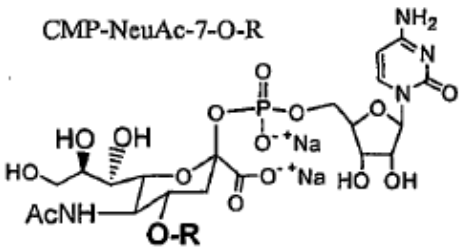
CMP-NeuAc-8-NH-R



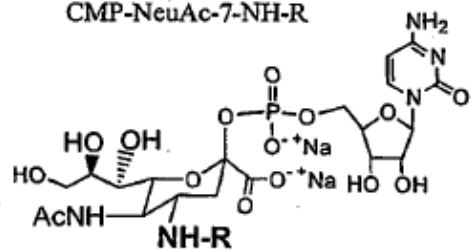
CMP-NeuAc-7-O-R



CMP-NeuAc-7-NH-R

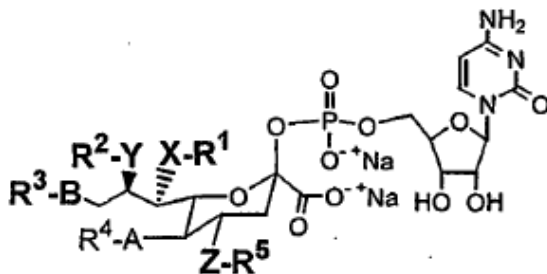


CMP-NeuAc-4-O-R



CMP-NeuAc-4-NH-R

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



(I)

10 en la que X es un grupo enlazador, que se selecciona preferentemente entre -O-, -N(H)-, -S, CH<sub>2</sub>- y -N(R)<sub>2</sub>, en los que cada R es un miembro seleccionado, de manera independiente, entre R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup>. Los símbolos Y, Z, A y B representan cada uno un grupo que se selecciona del grupo expuesto anteriormente para la identidad de X. Cada X, Y, Z, A y B se selecciona de manera independiente y, por lo tanto, pueden ser iguales o diferentes. Los símbolos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> representan H, un polímero hidrosoluble, fracción terapéutica, biomolécula u otra fracción. Como alternativa, estos símbolos representan un enlazador que se une a un polímero hidrosoluble, fracción terapéutica,

biomolécula u otra fracción.

Las fracciones ilustrativas unidas a los conjugados desvelados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, derivados de PEG (por ejemplo, alquil-PEG, acil-PEG, acil-alquil-PEG, alquil-acil-PEG carbamoil-PEG, aril-PEG), derivados de PPG (por ejemplo, alquil-PPG, acil-PPG, acil-alquil-PPG, alquil-acil-PPG carbamoil-PPG, aril-PPG), fracciones terapéuticas, fracciones de diagnóstico, manosa-6-fosfato, heparina, heparano, SLe<sub>x</sub>, manosa, manosa-6-fosfato, Sialil Lewis X, FGF, VFGF, proteínas, condroitina, queratano, dermatano, albúmina, integrinas, oligosacáridos antenarios, péptidos y similares. Los métodos de conjugación de diversos grupos modificadores para un resto de sacárido son fácilmente accesibles para los expertos en la materia ("POLY(ETHYLENE GLYCOL CHEMISTRY : BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS", J. Milton Harris, Ed., Plenum Pub. Corp., 1992; "POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMICAL AND BIOLOGICAL APPLICATIONS", J. Milton Harris, Ed., ACS Symposium Series n.º 680, American Chemical Society, 1997; Hermanson, "BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; y Dunn *et al.*, Eds. "POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS", ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

### Grupos de reticulación

La preparación del azúcar modificado para su uso en los métodos de la presente invención incluye la unión de un grupo modificador a un resto de azúcar y la formación de un aducto estable, que es un sustrato para una glicosiltransferasa. El azúcar y el grupo modificador se pueden acoplar mediante un agente de reticulación de orden cero o superior. Los compuestos bifuncionales ilustrativos que se pueden usar para la unión de grupos modificadores a los restos de hidratos de carbono incluyen, pero sin limitación, poli(etilenglicoles) bifuncionales, poliamidas, poliéteres, poliésteres y similares. En la bibliografía, se conocen metodologías generales para la unión de hidratos de carbono a otras moléculas. Véase, por ejemplo, Lee *et al.*, *Biochemistry* 28: 1856 (1989); Bhatia *et al.*, *Anal. Biochem.* 178: 408 (1989); Janda *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 8886 (1990) y Bednarski *et al.*, documento WO 92/18135. En la siguiente descripción, los grupos reactivos se tratan como favorables en la fracción de azúcar del azúcar modificado emergente. El enfoque de la descripción es para aclarar la ilustración. Los expertos en la materia observarán que la descripción también es relevante para grupos reactivos del grupo modificador.

Una estrategia ilustrativa implica la incorporación de un sulfhidrilo protegido al azúcar usando el SPDP de reticulación heterobifuncional (n-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato y, a continuación, desproteger el sulfhidrilo para la formación de un enlace disulfuro con otro sulfhidrilo en el grupo modificador.

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

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

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

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

#### *i. Sitios específicos preferidos de reactivos de reticulación*

##### *1. Grupos que reaccionan con amino*

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

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

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

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

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

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

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

Los aldehídos tales como glutaraldehído reaccionan con las aminas primarias del azúcar modificado. Aunque se forman bases de Schiff inestables 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 habituales, los polímeros cíclicos sufren deshidratación para formar polímeros de aldehído  $\alpha$ - $\beta$  insaturados. Sin embargo, las bases de Schiff son estables cuando se conjugan con otro doble enlace. La interacción resonante de ambos enlaces dobles evita la hidrólisis del enlace de Schiff. Además, las aminas a concentraciones locales elevadas pueden atacar el enlace doble etilénico para formar un producto de adición de Michael estable.

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

## 5 2. Grupos reactivos con sulfhidrilo

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

10 Preferentemente, las maleimidas reaccionan con el grupo sulfhidrilo de los componentes del azúcar modificado para formar enlaces tioéter estables. También reaccionan a una velocidad mucho menor con grupos amino primarios y los grupos imidazol de las histidinas. Sin embargo, a pH 7, el grupo maleimida se puede considerar un grupo específico de sulfhidrilo ya que, a este pH, la velocidad de reacción de los tioles simples es 1.000 veces superior a la de la amina correspondiente.

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

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

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

## 25 3. Resto reactivo con carboxilo

En otra realización, las carbodiimidas solubles tanto en agua como en un disolvente orgánico se usan como reactivos que reaccionan con carboxilo. Estos compuestos reaccionan con los grupos carboxilo libres formando una pseudourea que luego se puede acoplar a aminas disponibles proporcionando un enlace de amina que muestra cómo modificar un grupo carboxilo con una carbodiimida (Yamada *et al.*, *Biochemistry* 20: 4836-4842, 1981).

### ii. Sitios inespecíficos preferidos de los reactivos de reticulación

35 Además del uso de fracciones se reaccionan con sitios específicos, la presente invención contempla el uso de grupos reactivos inespecíficos para unir el azúcar con el grupo modificador.

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

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

En otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan entre restos de benzofenona. En general, los reactivos de benzofenona dan rendimientos de reticulación superiores a los de los reactivos de arilazida.

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

65

En otra realización más, los grupos fotoactivables se seleccionan entre diazopiruvatos. Por ejemplo, el éster de p-nitrofenilo de diazopiruvato de p-nitrofenilo reacciona con aminas alifáticas para dar amidas del ácido diazopirúvico que sufren fotólisis ultravioleta para formar aldehídos. El componente de afinidad modificado con diazopiruvato fotolisado reaccionará como el formaldehído o el glutaraldehído formando reticulaciones.

5 *iii. Reactivos homobifuncionales*  
 1. *Agentes de reticulación homobifuncionales reactivos con aminas primarias*

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

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

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

30 Los 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'-azofenilodiisocianato y hexametilendiisocianato.

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

Los ejemplos no limitantes preferidos de reactivos de aldehído alifático homobifuncionales incluyen glicoxal, malondialdehído y glutaraldehído.

40 Los ejemplos no limitantes preferidos de reactivos de acilación homobifuncionales incluyen ésteres de nitrofenilo de ácidos dicarboxílicos.

Los ejemplos no limitantes preferidos de cloruros de sulfonilo aromáticos homobifuncionales incluyen cloruro de fenol-2,4-disulfonilo y cloruro de  $\alpha$ -naftol-2,4-disulfonilo.

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

50 *2. Agentes de reticulación homobifuncionales que reaccionan con grupos sulfhidrilo libres*

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

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

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

Los ejemplos no limitantes preferidos de haluros de alquilo homobifuncionales incluyen 2,2'-dicarboxi-4,4'-diyodoacetamidoazobenceno, ácido  $\alpha,\alpha'$ -diyodo-p-xilenosulfónico, ácido  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-p-xilenosulfónico, N,N'-bis(b-bromoetil)encilamina, N,N'-di(bromoacetil)feniltidrazina y 1,2-di(bromoacetil)amino-3-fenilpropano.

65



### 3. Agentes de reticulación fotoactivables homobifuncionales

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

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

#### iv. Reactivos heterobifuncionales

##### 1. Reactivos heterobifuncionales que reaccionan con amino con una fracción disulfuro de piridilo

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

Los ejemplos no limitantes preferidos de reactivos heterobifuncionales con una fracción disulfuro de piridilo y un éster NHS que reacciona con amino incluyen 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 6-3-(2-piridiltio)propionamidohexanoato de succinimidilo (LC-SPDP), 6-3-(2-piridiltio)propionamidohexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LCSPDP), 4-succinimidiloxicarbonil-α-metil-α-(2-piridiltio)tolueno (SMPT) y 6-α-metil-α-(2-piridiltio)toluamidohexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT).

##### 2. Reactivos heterobifuncionales que reaccionan con amino con una fracción de maleimida

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

##### 3. Reactivos heterobifuncionales que reaccionan con amino con una fracción de haluro de alquilo

La síntesis, las propiedades y las aplicaciones de dichos reactivos se describen en la bibliografía. Los ejemplos no limitantes preferidos de reactivos heterobifuncionales con una fracción de haluro de alquilo y un éster de NHS que reacciona con amino incluyen (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), (4-yodoacetil)aminobenzoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SIAB), 6-(yodoacetil)aminohexanoato de succinimidilo (SIAX), 6-(6-((yodoacetil)-amino)hexanoilamino)hexanoato de succinimidilo (SIAXX), 6-(((4-(yodoacetil)-amino)-metil)-ciclohexano-1-carbonil)aminohexanoato de succinimidilo (SIACX) y 4((yodoacetil)-amino)metilciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SIAC).

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

Los ejemplos no limitantes preferidos de reactivos heterobifuncionales con una fracción de haluro de alquilo y una fracción de éster de p-nitrofenilo que reacciona con amino incluyen yodoacetato de p-nitrofenilo (NPIA).

Los expertos en la materia conocen otros agentes de reticulación. Véase, por ejemplo, Pomato *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.965.106. Es competencia del experto en la materia seleccionar un agente de reticulación apropiado para una determinada aplicación.

#### v. Grupos enlazadores escindibles

En una realización adicional más, se proporciona el grupo enlazador con un grupo que se puede escindir para liberar el grupo modificador de la fracción de azúcar. En la técnica, se conocen muchos grupos escindibles. Véase, por ejemplo, Jung *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 761: 152-162 (1983); Joshi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 14518-14525

(1990); Zarling *et al.*, *J. Immunol.* 124: 913-920 (1980); Bouzizar *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 155: 141-147 (1986); Park *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261: 205-210 (1986); Browning *et al.*, *J. Immunol.* 143: 1859-1867 (1989). Además, una amplia selección de grupos enlazadores bifuncionales escindibles (tanto homo- como hetero-bifuncionales) se encuentra disponible en el mercado en proveedores tales como Pierce.

Las fracciones escindibles ilustrativas se pueden escindir usando luz, calor o reactivos tales como tioles, hidroxilamina, bases, peryodato y similares. Además, determinados grupos preferidos se escinden *en vivo* como respuesta a la endocitosis (por ejemplo, cis-acetonitilo, véase, Shen *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 1048 (1991)). Los grupos escindibles preferidos comprenden una fracción escindible que es un miembro seleccionado del grupo que consiste en grupos disulfuro, éster, imida, carbonato, nitrobenzilo, fenacilo y benzoína.

### Conjugación de azúcares modificados a péptidos

Los azúcares modificados se conjugan con un péptido glicosilado o no glicosilado usando una enzima apropiada para mediar la conjugación. Preferentemente, las concentraciones del azúcar/es, enzima/s y péptido/s donante/s modificado/s se seleccionan de modo que la glicosilación se produzca hasta que se consuma el aceptor. Las consideraciones que se describen a continuación, aunque se exponen en el contexto de una sialiltransferasa, en general, se pueden aplicar a otras reacciones de glicosiltransferasas.

Se conoce una serie de métodos de uso de glicosiltransferasas para sintetizar las estructuras deseadas de oligosacáridos y, en general, se pueden aplicar en la presente invención. Los métodos ilustrativos se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/3249, Ito *et al.*, *Pure Appl. Chem.* 65: 753 (1993) y en las patentes de EE.UU. n.º 5.352.670; n.º 5.374.541 y n.º 5.545.553.

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

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

En general, las fracciones de glicosilo con unión en O de los conjugados de la invención se originan con una fracción de GalNAc, que se une al péptido. Se puede usar cualquier miembro de la familia de las GalNAc transferasas para unir una fracción de GalNAc al péptido (Hassan H, Bennett EP, Mandel U, Hollingsworth MA y Clausen H (2000); y "Control of Mucin-Type O-Glycosylation: O-Glycan Occupancy is Directed by Substrate Specificities of Polypeptide GalNAc-Transferases"; (Eds. Ernst, Hart y Sinay); Wiley-VCH capítulo "Carbohidratos in Chemistry and Biology - a Comprehension Handbook", 273-292). La propia fracción de GalNAc puede ser el enlazador de glicosilo intacto. Como alternativa, el resto de sacarilo se prepara usando una o más enzimas y uno o más sustratos de glicosilo apropiados para la enzima, añadiéndose el azúcar modificado a la fracción de glicosilo ampliada.

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

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

En otra realización, cada una de las enzimas utilizadas para producir un conjugado de la invención está presentes en una cantidad catalítica. La cantidad catalítica de una determinada enzima varía de acuerdo con la concentración de ese sustrato enzimático, así como con condiciones de la reacción tales como temperatura, tiempo y valor de pH. Los expertos en la materia conocen bien los medios de determinación de la cantidad catalítica para una enzima

dada a concentraciones de sustrato y condiciones de reacción seleccionadas previamente.

La temperatura a la que se lleva a cabo un proceso anterior puede variar desde justo por encima de la temperatura de congelación a la temperatura a la que se desnaturaliza la enzima más sensible. Los intervalos de temperaturas preferidos son de aproximadamente de 0 °C a aproximadamente 55 °C y más preferentemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 32 °C. En otra realización ilustrativa, uno o más componentes del presente método se realizan a una temperatura elevada usando una enzima termófila.

La mezcla de reacción se mantiene durante un período de tiempo suficiente para que el aceptor se glicosile, formando de ese modo el conjugado deseado. A menudo se puede detectar parte del conjugado tras unas cuantas horas, obteniéndose normalmente cantidades recuperables en 24 horas o menos tiempo. Los expertos en la materia entienden que la velocidad de reacción depende de una serie de factores variables (por ejemplo, concentración de enzima, concentración de donante, concentración del aceptor, temperatura, volumen de 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 aproximadamente 250 mg, preferentemente al menos aproximadamente 500 mg y más preferentemente al menos aproximadamente 1 gramo de conjugado purificado, acabado, preferentemente tras un solo ciclo de reacción, es decir, el conjugado no es una combinación de los productos de reacción de ciclos de síntesis consecutivamente iterados e idénticos.

En la siguiente descripción, la invención se ilustra mediante la conjugación de fracciones de ácido siálico modificadas con un péptido glicosilado. El ácido siálico modificado ilustrativo se marca con (m-)PEG. El enfoque de la siguiente descripción del uso de ácido siálico modificado con PEG y péptidos glicosilados es para aclarar la ilustración y no pretende implicar que la invención se limite a la conjugación de estos dos componentes. Un experto entiende que la descripción se puede aplicar en general a las adiciones de fracciones de glicosilo modificadas distintas del ácido siálico. Además, la descripción se puede aplicar igualmente a la modificación de una unidad de glicosilo con agentes distintos de PEG incluyendo otros polímeros hidrosolubles, fracciones terapéuticas y biomoléculas.

Se puede usar una metodología enzimática para la introducción selectiva de hidratos de carbono (m-)PEGilados o (m-)PPGilados en un péptido o glicopéptido. El método utiliza azúcares modificados que contienen PEG, PPG o un grupo funcional reactivo enmascarado y se combina con una glicosiltransferasa o glicosintasa apropiada. Al seleccionar la glicosiltransferasa que conseguirá la unión de hidratos de carbono deseada y al utilizar el azúcar modificado como sustrato donante, el PEG o PPG se puede introducir directamente en la cadena principal del péptido, en restos de azúcar existentes de un glicopéptido o en restos de azúcar que se han añadido a un péptido.

Hay un aceptor para la sialiltransferasa presente en el péptido que se va a modificar mediante los métodos de la presente invención bien como una estructura natural o una situada de manera recombinante, enzimática o química. Los aceptores adecuados incluyen, por ejemplo, aceptores de galactosilo tales como GalNAc, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, Gal $\beta$ 1,4GalNAc, Gal $\beta$ 1,3GalNAc, lacto-N-tetraosa, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc, Gal $\beta$ 1,3Ara, Gal $\beta$ 1,6GlcNAc, Gal $\beta$ 1,4Glc (lactosa) y otros aceptores conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Paulson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253: 5617-5624 (1978)).

En una realización, hay un aceptor para la sialiltransferasa presente en el glicopéptido que se va a modificar tras la síntesis *en vivo* del glicopéptido. Dichos glicopéptidos se pueden aislar usando los métodos reivindicados sin la modificación previa del patrón de glicosilación del glicopéptido. Como alternativa, los métodos de la invención se pueden usar para sialilar un péptido que no incluya un aceptor adecuado; primero se modifica el péptido para que incluya un aceptor mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. En una realización ilustrativa, se añade un resto de GalNAc a un sitio de glicosilación con unión en O mediante la acción de una GalNAc transferasa. Hassan H, Bennett EP, Mandel U, Hollingsworth M. A. y Clausen H (2000). "Control of Mucin-Type O-Glycosylation: O-Glycan Occupancy is Directed by Substrate Specificities of Polypeptide GalNAc-Transferases". (Eds. Ernst, Hart y Sinay). Wiley-VCH capítulo: "Carbohydrates in Chemistry y Biology - a Comprehension Handbook", 273-292.

En una realización ilustrativa, el aceptor de galactosilo se ensambla mediante la unión de un resto de galactosa a un aceptor adecuado ligado al péptido, por ejemplo, una GalNAc. El método incluye incubar el péptido que se va a modificar con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de una galactosiltransferasa (por ejemplo, Gal $\beta$ 1,3 o Gal $\beta$ 1,4) y un donante de galactosilo adecuado (por ejemplo, UDP-galactosa). La reacción se dejó proceder sustancialmente hasta su finalización o, como alternativa, la reacción se termina cuando se añade una cantidad preseleccionada del resto de galactosa. Hay otros métodos de ensamblaje de un aceptor de sacárido seleccionado que serán evidentes para los expertos en la materia.

En otra realización más, los oligosacáridos enlazados a glicopéptidos primero se "recortan" bien total o parcialmente, para dejar al descubierto bien un aceptor para la sialiltransferasa o una fracción a la que se puedan añadir uno o más restos apropiados para obtener un aceptor adecuado. Las enzimas tales como las glicosiltransferasas y las endoglicosidasas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.716.812) son útiles para las reacciones de unión y

recorte.

En la siguiente descripción, el método de la invención se ilustra mediante el uso de azúcares modificados que tienen un polímero hidrosoluble unido a los mismos. El foco de la descripción es para aclarar la ilustración. Los expertos apreciarán que la descripción es igualmente relevante para aquellas realizaciones en las que el azúcar modificado porta una fracción terapéutica, una biomolécula o similares.

En una realización ilustrativa, se "recorta" un resto de hidrato de carbono con unión en O antes de la adición del azúcar modificado. Por ejemplo, un resto de GalNAc-Gal se vuelve a recortar a GalNAc. Se conjuga un azúcar modificado que porta un polímero hidrosoluble con uno o más de los restos de azúcar que quedan al descubierto mediante el "recorte". En un ejemplo, se "recorta" un glicopéptido y se añade un polímero hidrosoluble al aminoácido de cadena lateral con unión en O resultante o glicopeptidoglicano a través de una fracción de sacarilo, por ejemplo, fracción de Sia, Gal o GalNAc conjugada con el polímero hidrosoluble. La fracción de sacarilo modificada se une a un sitio aceptor del glicopéptido "recortado". Como alternativa, se puede añadir una fracción de sacarilo no modificada, por ejemplo, Gal, al extremo del glicano con unión en O.

En otra realización ilustrativa, se añade un polímero hidrosoluble a un resto de GalNAc a través de un azúcar modificado que tiene un resto de galactosa. Como alternativa, se puede añadir una Gal no modificada al resto de GalNAc terminal.

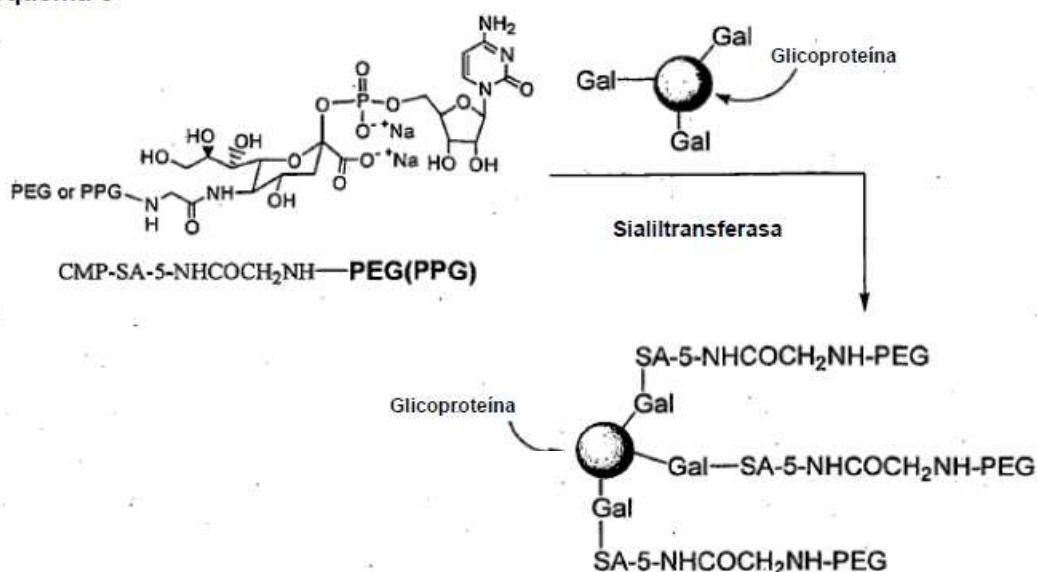
En un ejemplo adicional más, se añade un polímero hidrosoluble a un resto de Gal usando un ácido siálico modificado.

En otra realización ilustrativa, se "recorta de nuevo" un resto de glicosilo con unión en O a la GalNAc unida al aminoácido. En un ejemplo, se añade un polímero hidrosoluble a través de una Gal modificada con el polímero. Como alternativa, se añade una Gal no modificada a la GalNAc, seguida de una Gal con un polímero hidrosoluble unido. En otra realización más, se añaden uno o más restos de Gal no modificados a la GalNAc, seguidos de una fracción de ácido siálico modificada con un polímero hidrosoluble.

Las realizaciones ilustrativas descritas anteriormente proporcionan una ilustración del poder de los métodos establecidos en el presente documento. Usando los métodos de la invención, es posible "volver a recortar" y construir un resto de hidrato de carbono de sustancialmente cualquier estructura deseada. El azúcar modificado se puede añadir a los extremos de la fracción de hidrato de carbono como se ha expuesto anteriormente, o puede interponerse entre el núcleo de péptido y el extremo del hidrato de carbono.

En una realización ilustrativa, el polímero hidrosoluble se añade a un resto de Gal terminal usando un ácido siálico modificado con polímero. Se usa una sialiltransferasa adecuada para añadir un ácido siálico modificado. La metodología se resume en el Esquema 5.

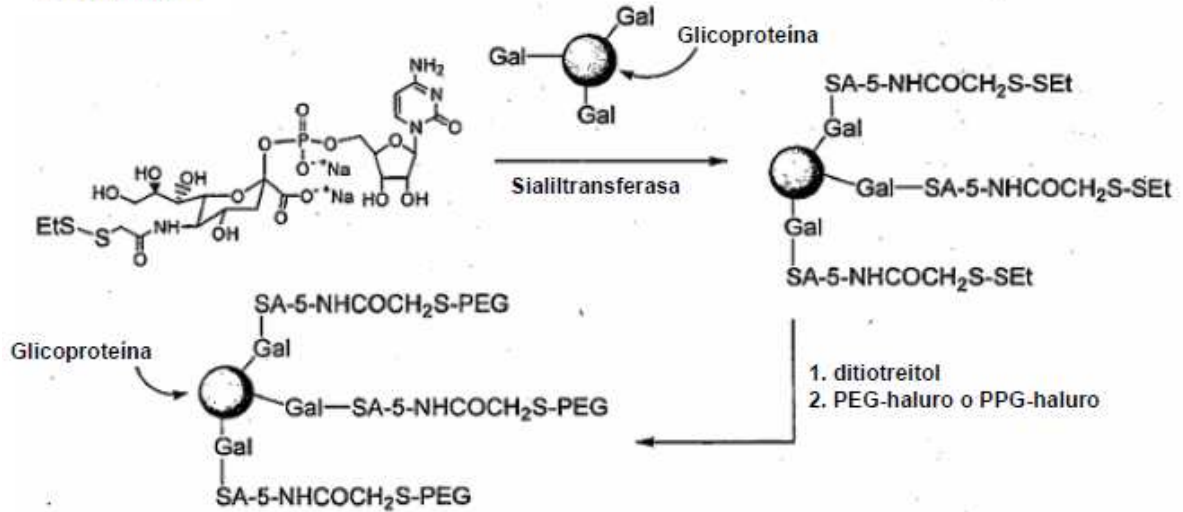
Esquema 5



En una metodología adicional más, resumida en el Esquema 6, hay una funcionalidad reactiva enmascarada presente en el ácido siálico. El grupo reactivo enmascarado preferentemente no se ve afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al péptido. Tras la unión covalente del ácido siálico modificado al péptido, se retira la máscara y se conjuga el péptido con un agente tal como PEG, PPG, una fracción terapéutica,

biomolécula u otro agente. El agente se conjuga con el péptido de una manera específica por su reacción con el grupo reactivo desmascarado de la fracción de azúcar modificado.

Esquema 6



- 5 Se puede usar cualquier azúcar modificado con su glicosiltransferasa apropiada, dependiendo de los azúcares terminales de las cadenas laterales de oligosacáridos del glicopéptido (Tabla 3). Como se ha descrito anteriormente, el azúcar terminal del glicopéptido necesario 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/s glicosidasa/s, glicosiltransferasa/s o mezcla de glicosidasa/s y glicosiltransferasa/s adecuada/s.

10

Tabla 3

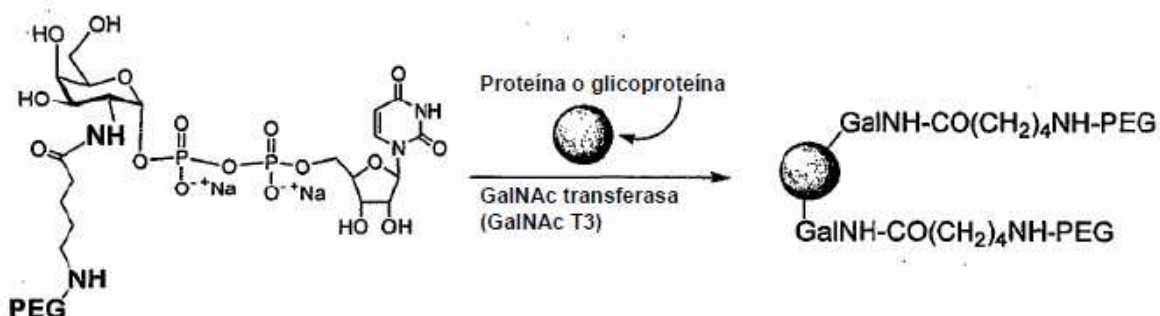
<p>Derivados de UDP-galactosa</p>	<p>Derivados de UDP-galactosamina (cuando A = NH, R<sub>4</sub> puede ser acetilo)</p>
<p>Derivados de UDP-glucosa</p>	<p>Derivados de UDP-glucosamina (cuando A = NH, R<sub>4</sub> puede ser acetilo)</p>
<p>Derivados de GDP-manosa</p>	<p>Derivados de GDP-fucosa</p>

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- $\alpha$ -fosfato, heparina, heparano, Slex, Manosa, FGF, VFGF, proteína, condroitina, queratano, dermatano, albúmina, integrinas, péptidos, etc.

X = O, NH, S, CH<sub>2</sub>, N(R<sub>1-5</sub>)<sub>2</sub>.  
 Y = X; Z = X, A = X; B = X.  
 Q = H<sub>2</sub>, O, S, NH, N-R.  
 R, R<sub>1-4</sub> = H, enlazador-M, M.  
 M = ligando de interés

En una realización alternativa, el azúcar modificado se añade directamente a la cadena principal peptídica usando una glicosiltransferasa conocida para transferir restos de azúcar al sitio de glicosilación con unión en O de la cadena principal peptídica. Dicha realización ilustrativa se expone en el Esquema 7. Las glicosiltransferasas ilustrativas útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, GalNAc transferasas (GalNAc T1-20), GlcNAc transferasas, fucosiltransferasas, glucosiltransferasas, xilosiltransferasas, manosiltransferasas y similares. El uso de dicha metodología permite la adición directa de azúcares modificados a los péptidos que carecen de hidratos de carbono o, como alternativa, a glicopéptidos existentes. En ambos casos, la adición del azúcar modificado se produce en posiciones específicas de la cadena principal del péptido según lo definido por la especificidad de sustrato de la glicosiltransferasa y no de una manera aleatoria como ocurre durante la modificación de la cadena principal peptídica de una proteína usando métodos químicos. Se puede introducir una selección de agentes en las proteínas o glicopéptidos que carecen de la secuencia peptídica de sustrato de glicosiltransferasa mediante el diseño por ingeniería genética de una secuencia de aminoácidos apropiada en la cadena polipeptídica.

Esquema 7



En cada una de las realizaciones ilustrativas que se han expuesto anteriormente, se pueden utilizar una o más etapas de modificación química o enzimática tras la conjugación del azúcar modificado con el péptido. En una realización ilustrativa, se usa una enzima (por ejemplo, fucosiltransferasa) para añadir una unidad de glicosilo (por ejemplo, fucosa) al azúcar modificado terminal unido al péptido. En otro ejemplo, se utiliza una reacción enzimática para "proteger terminalmente" (por ejemplo, sialilar) sitios en los que el azúcar modificado no se pudo conjugar. Como alternativa, se utiliza una reacción química para modificar la estructura del azúcar modificado conjugado. Por ejemplo, el azúcar modificado conjugado se hace reaccionar con agentes que estabilizan o desestabilizan su unión con el componente de péptido al que se une el azúcar modificado. En otro ejemplo, se desprotege un componente del azúcar modificado después de su conjugación con el péptido. Un experto observará que hay una selección de procedimientos enzimáticos y químicos que son útiles en los métodos de la invención en cualquier etapa después de que el azúcar modificado se haya conjugado con el péptido. La elaboración adicional del conjugado de azúcar-péptido pertenece al ámbito de la invención.

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

La fracción de dirección y el péptido terapéutico se conjugan mediante cualquier método descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Los expertos observarán que los péptidos, además de los que se han expuesto anteriormente, también se pueden derivatizar como se expone en el presente documento. En el anexo de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 60/328.523, del mismo solicitante, relacionada, presentada el 10 de octubre de 2001, se exponen péptidos ilustrativos.

En una realización ilustrativa, el agente de dirección y el péptido terapéutico se acoplan a través de una fracción enlazadora. En la presente realización, al menos uno del péptido terapéutico o del agente de dirección se acopla a la fracción enlazadora a través de un grupo enlazador de glicosilo intacto de acuerdo con un método de la invención. En una realización ilustrativa, la fracción enlazadora incluye un poli(éter) tal como poli(etilenglicol). En otra realización ilustrativa, la fracción enlazadora incluye al menos un enlace que se degrada *en vivo*, liberando el péptido terapéutico del agente de dirección, después de la administración del conjugado al tejido o región del organismo diana.

En otra realización ilustrativa más, la distribución *en vivo* de la fracción terapéutica se modifica mediante la modificación de una glicofoma en la fracción terapéutica sin conjugar el péptido terapéutico a una fracción de dirección. Por ejemplo, el péptido terapéutico se puede desviar de la captación por el sistema reticuloendotelial

mediante la protección terminal de una fracción de galactosa terminal de un grupo glicosilo con ácido siálico (o un derivado del mismo).

#### i. Enzimas

5

##### 1. Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas catalizan la adición de los azúcares activados (NDP-azúcares donantes), de una forma gradual, a una proteína, glicopéptido, lípido o glicolípido o al extremo no reductor de un oligosacárido en crecimiento. Los glicopéptidos con unión en N se sintetizan a través de una transferasa y un donante de oligosacárido unido a lípidos Dol-PP-NAG<sub>2</sub>Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub> en una transferencia de bloque seguido por el recorte del núcleo. En este caso, la naturaleza del sacárido "núcleo" es algo diferente de las uniones posteriores. En la técnica, se conoce un gran número de glicosiltransferasas

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

Para las síntesis enzimáticas de sacáridos que implican reacciones de glicosiltransferasa, la glicosiltransferasa se puede clonar o aislar de cualquier fuente. Se conocen muchas glicosiltransferasas clonadas, al igual que sus secuencias de polinucleótidos. Véase, por ejemplo, "The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferases", ([http://www.vei.co.uk/TGN/gt\\_guide.htm](http://www.vei.co.uk/TGN/gt_guide.htm)) Las secuencias de aminoácidos de la glicosiltransferasa y secuencias de nucleótidos que codifican las glicosiltransferasas de las que se pueden deducir las secuencias de aminoácidos también se encuentran en diversas bases de datos que se encuentran a disposición del público, que incluyen GenBank, Swiss-Prot, EMBL y otras.

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

Las glicosiltransferasas que codifican ADN se pueden obtener por síntesis química, mediante la exploración de transcripciones inversas de ARNm a partir de células o de cultivos de líneas celulares apropiados, mediante la exploración de bibliotecas genómicas de células apropiadas, o mediante combinaciones de estos procedimientos. La exploración de ARNm o ADN genómico se puede llevar a cabo con sondas de oligonucleótidos generadas a partir de las secuencias genéticas de las glicosiltransferasas. Las sondas se pueden marcar con un grupo detectable tal como un grupo fluorescente, un átomo radiactivo o un grupo quimioluminiscente de acuerdo con procedimientos conocidos y usados en ensayos de hibridación convencionales. Como alternativa, las secuencias de genes de las glicosiltransferasas se pueden obtener mediante el uso del procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los cebadores de oligonucleótidos de PCR que se producen a partir de la secuencia genética de las glicosiltransferasas. (Véase, patente de EE.UU. n.º 4.683.195 concedida a Mullis *et al.* y patente de EE.UU. n.º 4.683.202 concedida a Mullis).

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

En una realización ilustrativa, la invención utiliza una enzima procariótica. Dichas glicosiltransferasas incluyen enzimas implicadas en la síntesis de lipooligosacáridos (LOS), que son producidos por muchas bacterias gram negativas (Preston *et al.*, *Critical Reviews in Microbiology* 23 (3): 139-180 (1996)). Dichas enzimas incluyen, pero 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 (véase, por ejemplo, Acceso de EMBL n.º M80599 y n.º M86935 (*E. coli*); Acceso de EMBL n.º S56361 (*S. typhimurium*)), una glucosiltransferasa (Acceso de Swiss-Prot n.º P25740 (*E. coli*)), una  $\beta$ 1,2-glucosiltransferasa (*rfaJ*) (Acceso de Swiss-Prot n.º P27129 (*E. coli*) y Acceso de Swiss-Prot n.º P19817 (*S. typhimurium*)) y una  $\beta$ 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (*rfaK*) (Acceso de



EMBL n.º U00039 (*E. coli*). Otras glicosiltransferasas para las que se conocen las secuencias de aminoácidos incluyen las que están codificadas por operones tales como *ifaB*, 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*.

5 También son adecuadas para su 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 del trisacárido del grupo sanguíneo P<sup>k</sup>, D-galactosil- $\alpha$ -1,4-D-galactosil- $\beta$ -1,4-D-glucosa, que se han identificado en los LOS de los patógenos de la mucosa *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Scholten *et al.*, *J. Med. Microbiol.* 41: 236-243 (1994)). Los genes de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* que codifican las glicosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de estas estructuras se han identificado a partir de los inmunotipos L3 y L1 de *N. meningitidis* (Jennings *et al.*, *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 consiste en tres genes, *IgtA*, *IgtB* e *IgE*, codifica las enzimas glicosiltransferasa necesarias para la adición de los tres últimos de los azúcares de la cadena de lacto-N-neotetraosa (Wakarchuk *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 19166-73 (1996)). Recientemente, se demostró la actividad enzimática del producto génico de *IgtB* e *IgtA*, proporcionando la primera evidencia directa de su función de glicosiltransferasa propuesta (Wakarchuk *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271(45): 28271-276 (1996)). En *N. gonorrhoeae*, hay dos genes adicionales, *IgtD* que añade  $\beta$ -D-GalNAc en la posición 3 de la galactosa terminal de la estructura de lacto-N-neotetraosa e *IgtC* que añade una  $\alpha$ -D-Gal terminal al elemento de lactosa de un LOS truncado, creando de este modo la estructura de antígeno del grupo sanguíneo P<sup>k</sup> (Gotshlich (1994), *supra*). En *N. meningitidis*, un inmunotipo L1 separado también expresa el antígeno de grupo sanguíneo P<sup>k</sup> y se ha demostrado que porta un gen *IgtC* (Jennings *et al.*, (1995), *supra*). Las glicosiltransferasas de *Neisseria* y los genes asociados también se describen en el documento USPN 5.545.553 (Gotshlich). También se han caracterizado los genes para  $\alpha$ 1,2-fucosiltransferasa y  $\alpha$ 1,3-fucosiltransferasa de *Helicobacter pylori* (Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272: 21349-21356 20 (1997)). En la presente invención, también se usan las glicosiltransferasas de *Campylobacter jejuni* (véase, por ejemplo, [http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf\\_42.html](http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf_42.html)).

#### a) Fucosiltransferasas

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

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

#### b) Galactosiltransferasas

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

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

Chapell *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 5: 519-528 (1994)).

También son adecuadas en la práctica de la invención las formas solubles de  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa tales como las publicadas por Cho, S. K. y Cummings, R. D. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 13622-13628.

### c) Sialiltransferasas

Las sialiltransferasas son otro tipo de glicosiltransferasas que son útiles en las células recombinantes y las mezclas de reacción de la invención. Las células que producen sialiltransferasas recombinantes también producirán CMP-ácido siálico, que es un donante de ácido siálico para las sialiltransferasas. Los ejemplos de sialiltransferasas que son adecuadas para su uso en la presente invención incluyen ST3Gal III (por ejemplo, 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 la sialiltransferasa usada en el presente documento es como se describe en Tsuji *et al.*, *Glycobiology* 6: v-xiv (1996)). Una  $\alpha$ (2,3)sialiltransferasa ilustrativa denominada  $\alpha$ (2,3)sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico a la Gal terminal no reductora de un disacárido o glicósido Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Glc. Véase, Van den Eijnden *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256: 3159 (1981), Weinstein *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 13845 (1982) y Wen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 21011 (1992). Otra  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa ilustrativa (EC 2.4.99.4) transfiere ácido siálico a Gal terminal no reductora del disacárido o glicósido. Véase, Rearick *et al.*, *J. Biol. Chem.* 254: 4444 (1979) y Gillespie *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 21004 (1992). Otras enzimas ilustrativas incluyen Gal $\beta$ -1,4-GlcNAc  $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (Véase, Kurosawa *et al.* *Eur. J. Biochem.* 219: 375-381 (1994)).

Preferentemente, para la glicosilación de los hidratos de carbono de glicopéptidos, la sialiltransferasa podrá transferir ácido siálico a la secuencia de Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, la penúltima secuencia más común que subyace al ácido siálico terminal en las estructuras de hidratos de carbono totalmente sialiladas (véase, la Tabla 5).

**Tabla 5: Sialiltransferasas que usan la secuencia de Gal $\beta$ 1,4GlcNAc como un sustrato aceptor**

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

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

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

Las sialiltransferasas diferentes de las que se enumeran en la Tabla 5, también son útiles en un proceso a gran escala económico y eficaz para la sialilación de glicopéptidos importantes a nivel comercial. Como un ensayo sencillo para encontrar la utilidad de estas otras enzimas, se hacen reaccionar diversas cantidades de cada enzima (1-100 mU/mg de proteína) con asialo- $\alpha$ 1 AGP (a 1-10 mg/ml) para comparar la capacidad de la sialiltransferasa de interés para sialilar glicopéptidos con respecto a cualquiera de las ST6Gal I, ST3Gal III bovinas o ambas

sialiltransferasas. Como alternativa, se pueden usar otros glicopéptidos o glucopéptidos, u oligosacáridos con unión en N liberados enzimáticamente de la cadena principal polipeptídica en lugar de asialo- $\alpha_1$  AGP para esta evaluación. Las sialiltransferasas con la capacidad de sialilar los oligosacáridos con unión en N de glicopéptidos de forma más eficaz que ST6Gal I son útiles en un proceso práctico a gran escala para la sialilación del péptido (como se ilustra para ST3Gal III en la presente divulgación). Otras sialiltransferasas ilustrativas se muestran en la Figura 10.

#### d) GalNAc transferasas

Las N-acetilgalactosaminiltransferasas son de uso en la práctica de la presente invención, en particular para la unión de una fracción de GalNAc a un aminoácido del sitio de glicosilación con unión en O del péptido. Las N-acetilgalactosaminiltransferasas adecuadas incluyen, pero sin limitación,  $\alpha(1,3)$ -N-acetilgalactosaminiltransferasa,  $\beta(1,4)$ -N-acetilgalactosaminiltransferasas (Nagata *et al.*, *J Biol. Chem.* 267: 12082-12089 (1992) y Smith *et al.*, *J. Biol Chem.* 269: 15162 (1994)) y el polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa (Homa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 12609 (1993)).

La producción de proteínas tales como la enzima GalNAc T<sub>I,XX</sub> a partir de genes clonados mediante ingeniería genética es bien conocida. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.761.371. Un método implica la recogida de suficientes muestras y la posterior determinación de la secuencia de aminoácidos de la enzima mediante secuenciación N-terminal. Esta información se usa entonces para aislar un clon de ADNc que codifique una transferasa de longitud completa (unida a membrana) que, tras la expresión en la línea celular de insecto Sf9, produzca la síntesis de una enzima totalmente activa. La especificidad por el aceptor de la enzima se determinó entonces usando un análisis semicuantitativo de los aminoácidos que rodean los sitios de glicosilación conocidos en 16 proteínas diferentes, seguido de estudios de glicosilación *en vitro* de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que ciertos restos de aminoácidos están sobrerrepresentados en los segmentos de péptidos glicosilados y que los restos en posiciones específicas que rodean restos de serina y treonina glicosilados pueden tener una influencia más marcada en la eficacia aceptora que otras fracciones de aminoácidos.

#### 2. Sulfotransferasas

La invención también proporciona métodos de producción de péptidos que incluyen moléculas sulfatadas, incluyendo, por ejemplo, polisacáridos sulfatados tales como heparina, sulfato de heparano, carragenina y compuestos relacionados. Las sulfotransferasas adecuadas incluyen, por ejemplo, condroitina-6-sulfotransferasa (ADNc de pollo descrito por Fukuta *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 18575-18580(1995); n.º de acceso GenBank D49915), glicosaminoglicano N-acetilglucosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 1 (Dixon *et al.*, *Genomics* 26: 239-241 (1995); UL18918) y glicosaminoglicano N-acetilglucosamina N-desacetilasa/N-sulfotransferasa 2 (ADNc murino descrito en Orellana *et al.*, *J. Biol Chem.* 269: 2270-2276 (1994) y Eriksson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 10438-10443 (1994); ADNc humano descrito en (n.º de acceso GenBank U2304).

#### 3. Glicosiltransferasas unidas a células

En otra realización, las enzimas utilizadas en el método de la invención son glicosiltransferasas unidas a células. Aunque se conocen muchas glicosiltransferasas solubles (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.032.519), las glicosiltransferasas generalmente están en forma unida a la membrana cuando se asocian con células. Muchas de las enzimas unidas a la membrana estudiadas hasta la fecha se consideran proteínas intrínsecas; es decir, que no se liberan de las membranas por tratamiento con ultrasonidos y requieren detergentes para la solubilización. Las glicosiltransferasas de superficie se han identificado en las superficies de las células de vertebrados e invertebrados y también se ha reconocido que estas transferasas de superficie mantienen la actividad catalítica en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la función más reconocida de las glicosiltransferasas de la superficie celular es el reconocimiento intercelular (Roth, "MOLECULAR APPROACHES to SUPRACELLULAR PHENOMENA", 1990).

Se han desarrollado métodos de modificación de las glicosiltransferasas expresadas por las células. Por ejemplo, Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 8227-8231 (1989) han publicado una metodología genética para aislar secuencias de ADNc clonado que determinan la expresión de estructuras de oligosacáridos de la superficie celular y sus glicosiltransferasas afines. Se transfectó una biblioteca de ADNc generada a partir de ARNm aislado de una línea celular murina que se sabe que expresa UDP-galactosa: $\beta$ -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa en células COS-1. A continuación, se cultivaron las células transfectadas y se ensayaron para determinar la actividad de la  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa.

Francisco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89: 2713-2717 (1992), desvelan un método de anclaje de  $\beta$ -lactamasa a la superficie externa de *Escherichia coli*. Se produce una fusión tripartita que consiste en (i) una secuencia señal de una proteína de membrana externa; (ii) una sección que abarca la membrana de una proteína de la membrana externa; y (iii) una secuencia de  $\beta$ -lactamasa madura completa que da lugar a una molécula de  $\beta$ -lactamasa unida a la superficie activa. Sin embargo, el método de Francisco solo se limita a sistemas de células procariontas y, como es reconocido por los autores, requiere la fusión tripartita completa para que funcione adecuadamente.

#### 4. *Proteínas de fusión*

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

#### 5. *Enzimas inmovilizadas*

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

#### **Purificación de conjugados de péptidos**

Los productos producidos mediante los procesos anteriores se pueden usar sin purificación. Sin embargo, normalmente se prefiere extraer dichos productos. Se pueden usar técnicas convencionales, bien conocidas, para la extracción de sacáridos glicosilados tales como cromatografía de capa fina o de capa gruesa, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico o filtración con membrana. Se prefiere el uso de la filtración con membrana, más preferentemente utilizando una membrana osmótica inversa, o una o más técnicas de cromatografía en columna para la extracción, como se describe en lo sucesivo en el presente documento y en la bibliografía citada en el presente documento. Por ejemplo, se puede usar la filtración en membrana en la que las membranas tienen un punto de corte de peso molecular de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 10.000 para retirar proteínas tales como glicosiltransferasas. A continuación, se puede usar la nanofiltración u ósmosis inversa para retirar las sales y/o purificar los sacáridos resultantes (véase, por ejemplo, el documento WO 98/15581). Las membranas de nanofiltro son una clase de membranas de ósmosis inversa que dejan pasar sales monovalentes, pero que retienen sales polivalentes y solutos sin cargar de más de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Daltons, dependiendo de la membrana usada. Por lo tanto, en una aplicación habitual, los sacáridos preparados con los métodos de la presente invención se retendrán en la membrana y las sales contaminantes pasarán a través de la misma.

Si la glicoproteína modificada se produce intracelularmente, como una primera etapa, los desechos de partículas ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Opcionalmente, la proteína se puede concentrar con un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, seguido de la separación de la variante polipeptídica de otras impurezas mediante una o más etapas seleccionadas entre cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (por ejemplo, sobre dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía sobre Azul-Sefarosa, CM Azul-Sefarosa, MONO-Q, MONO-S, lentil lectina-Sefarosa, WGA-Sefarosa, Con A-Sefarosa, Éter Toyopearl, Butil Toyopearl, Fenil Toyopearl, SP-Sefarosa, o proteína A Sefarosa, cromatografía SDS-PAGE, cromatografía sobre sílice, cromatografía de enfoque, HPLC de fase inversa (por ejemplo, gel de sílice con grupos alifáticos anexos), filtración sobre gel usando, por ejemplo, tamiz molecular Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía sobre columnas que unen selectivamente el polipéptido y precipitación con etanol o con sulfato de amonio.

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

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

5 En otra realización, primero se concentran los sobrenadantes de los sistemas que producen el glicopéptido modificado de la invención usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender un ligando para el péptido, una lectina o molécula de anticuerpo unido a un soporte adecuado. Como alternativa, se  
10 puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tenga grupos DEAE colgantes. Las matrices adecuadas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Como 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 en particular los grupos sulfopropilo.

15 Por último, se pueden emplear una o más etapas de RP-HPLC empleando medios hidrófobos de RP-HPLC, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo colgantes u otros grupos alifáticos, para purificar además una composición de variante polipeptídica. También se pueden emplear algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una glicoproteína modificada homogénea.

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

### Composiciones farmacéuticas

30 Los polipéptidos modificados en diversos sitios de glicosilación con unión en O de acuerdo con el método de la presente invención tienen una amplia selección de aplicaciones farmacéuticas.

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

45 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un polímero hidrosoluble no natural, una fracción terapéutica o una biomolécula y un péptido glicosilado o no glicosilado. El polímero, la fracción terapéutica o la biomolécula se conjuga con el péptido a través de un grupo enlazador de glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente tanto con el péptido como con el polímero, la fracción terapéutica o la biomolécula.

50 Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para su uso en una variedad 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 métodos de administración de fármacos, véase Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990).

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

65 Normalmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía subcutánea o parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. Por lo tanto, la invención proporciona composiciones para la administración parenteral que comprenden el compuesto disuelto o suspendido en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso, por ejemplo,

agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similares. Las composiciones también pueden contener detergentes tales como Tween 20 y Tween 80; estabilizantes tales como manitol, sorbitol, sacarosa y trehalosa; y conservantes tales como EDTA y m-cresol. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables cuando se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como agentes para el ajuste del pH y de tamponamiento, agentes para el ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden filtrar en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso como tales, o se pueden liofilizar, siendo el preparado liofilizado combinado con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. Por lo general, el pH de los preparados estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9 y lo más preferentemente entre 7 y 8.

En algunas realizaciones, los glicopéptidos de la invención se pueden incorporar a liposomas formados a partir de líquidos de formación de vesículas convencionales. Hay una variedad de métodos disponibles para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467 (1980), patentes de EE.UU. n.º 4.235.871, n.º 4.501.728 y n.º 4.837.028. La dirección de liposomas usando una variedad de agentes de dirección (por ejemplo, los sialil galactósidos de la invención) se conoce bien en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.957.773 y n.º 4.603.044).

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

Los mecanismos de dirección, en general, requieren la colocación de los agentes de dirección en la superficie del liposoma de manera que las fracciones diana queden 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 la formación del liposoma usando métodos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, alquilación o acilación de un grupo hidroxilo presente en el hidrato de carbono con un haluro de alquilo de cadena larga o con un ácido graso, respectivamente). Como alternativa, el liposoma se puede formar de una manera que primero se incorpore una parte conectora a la membrana en el momento de la formación de la membrana. La parte conectora debe tener una parte lipófila, que se incrusta firmemente y se ancla en la membrana. Además, debe tener una parte reactiva, que esté químicamente disponible en la superficie acuosa del liposoma. La parte reactiva se selecciona para que sea químicamente adecuada para formar un enlace químico estable con el agente de dirección o hidrato de carbono, que se añade posteriormente. En algunos casos, es posible unir el agente diana a la molécula conectora 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 diana o hidrato de carbono que se extiende, tridimensionalmente, fuera de la superficie vesical.

Los compuestos preparados con los métodos de la invención también pueden encontrar uso como reactivos de diagnóstico. Por ejemplo, se pueden usar compuestos marcados para localizar zonas de inflamación o metástasis tumoral en un paciente sospechoso de tener una inflamación. Para este uso, los compuestos se pueden marcar con  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$  o tritio.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar los conjugados y los métodos de la presente invención, pero no para limitar la invención reivindicada.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1 (Ejemplo de referencia)

#### 1.1a Preparación de interferón $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc (pH 6,2)

Se reconstituyó interferón  $\alpha$ -2 $\beta$  mediante la adición de 200  $\mu\text{l}$  de agua a 4 mg de IFN  $\alpha$ -2 $\beta$ . Cuando se disolvió el sólido, se añadieron 1,92 ml de tampón de reacción (MES 20 mM, pH 6,2, NaCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\text{MnCl}_2$  5 mM, polisorbato al 0,05 % y  $\text{NaN}_3$  al 0,05 %). A continuación, se añadieron UDP-GalNAc (4,16 mg; 3 mM) y GalNAc T2 (80 mU; 80  $\mu\text{l}$ ) y se incubó la mezcla de reacción a 32 °C con movimiento de rotación lento. La reacción se controló usando el análisis de MALDI y se completó esencialmente tras 72 h.

Una vez completa, se sometió la mezcla de reacción a mapeo de péptidos y análisis de la ocupación de sitios.

#### 1.1b Preparación de interferón $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc (pH 7,4)

Se reconstituyó interferón  $\alpha$ -2 $\beta$  según lo descrito por el fabricante. Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de agua a 50  $\mu\text{g}$  de IFN  $\alpha$ -2 $\beta$ . Cuando se disolvió el sólido, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción (MES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$

5 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, polisorbato al 0,05 % y NaN<sub>3</sub> al 0,05 %). A continuación, se añadieron UDP-GalNAc (100 µg; 3 mM) y GalNAc T2 (80 mU; 80 µl) y se incubó la mezcla de reacción a 32 °C con movimiento de rotación lento. La reacción se controló usando el análisis de MALDI y resultó completarse en aproximadamente de 48 a 72 h.

### 5 **1.2 Preparación de interferón- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc-SA-PEG de 20 kilodalton usando CMP-SA-PEG y ST6GalNAc1**

Se intercambió el tampón del IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc (1,0 ml, ~2 mg, 0,1 µmol) de 1.1 (anterior) (2 veces) usando un cartucho Centricon con filtro MWCO de 5 kilodalton y un segundo tampón (MES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, polisorbato al 0,05 % y NaN<sub>3</sub> al 0,05 %). Se reconstituyó el IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc del cartucho de centrifugación usando el segundo tampón, 1,0 ml y se añadieron tanto CMP-SA-PEG-20 kilodalton (10 mg, 0,5 µmol) como ST6GalNAc1 (200 µl) a la mezcla de reacción. Se incubó la reacción a 32 °C durante 96 h con movimiento de giro lento. El producto, IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton se purificó usando cromatografía de SP Sefarosa y SEC (Superdex 75). La adición de ácido siálico-PEG se verificó mediante el análisis MALDI.

### 15 **1.3 Preparación de interferón- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc-Gal-SA-PEG-20 kilodalton usando CMP-SA-PEG, núcleo-1- $\beta$ 1,3-galactosil-transferasa y ST3Gal2**

Se intercambió el tampón del IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc (1,0 ml, ~2 mg, 0,1 µmol) de la adición de GalNAc descrita anteriormente (pH 6,2) (2 veces) usando un cartucho Centricon con filtro MWCO de 5 kilodalton y un segundo tampón (MES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, polisorbato al 0,05 % y NaN<sub>3</sub> al 0,05 %). Se reconstituyó el IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc del cartucho de centrifugación usando 1,0 ml del segundo tampón, que contenía CMP-SA-PEG-20 kilodalton (10 mg, 0,5 µmol), UDP-Galactosa (1,8 mg, 3 mM), núcleo-1- $\beta$ 1,3-galactosil-transferasa (200 mU sobre resina) y ST3Gal2 (200 mU,  $\alpha$ 2,3-(O)-sialitransferasa). Se incubó la mezcla de reacción a 32 °C durante 96 h con movimiento de rotación lento. El producto, IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton se purificó usando cromatografía de SP Sefarosa y SEC (Superdex 75). La adición de ácido siálico-PEG se verificó mediante el análisis MALDI.

### 1.9 Ensayo de concentración de proteína

30 La concentración de proteína se determinó usando un espectrofotómetro a una absorbancia fija de 280 nm con 1 cm de longitud de la trayectoria de la célula. Se midieron lecturas por triplicado para una muestra ensayada con agua y tampón como controles. La concentración de proteína se determinó usando el coeficiente de extinción a 0,799 ml/mg de proteína.

### 35 **1.10 Formulación de producto final**

El tampón de formulación contenía PBS exento de pirógenos, pH 6,5, manitol al 2,5 % y polisorbato 80 al 0,05 % que se desgasificó al vacío y se filtró en condiciones estériles (0,2 µm).

40 Se eliminó la endotoxina usando un Detoxi-Gel™ equilibrado con 5 lechos de columna del tampón de formulación (PBS, pH 6,5, manitol al 2,5 % y polisorbato 80 al 0,05 %). Se controló el caudal por gravedad a ~0,3 ml/min. Las muestras de productos se aplicaron sobre el gel y se eluyó el producto usando el tampón de formulación. Se ajustó el volumen del producto recogido con tampón de formulación adicional para proporcionar una concentración de proteína de aproximadamente 100 µg/ml.

45 Se filtraron las formulaciones de péptido en condiciones estériles (0,2 µ) y se dispensó el efluente como alícuotas de 1 ml en viales de 2,0 ml exentos de pirógenos. Además, se tomaron alícuotas para el análisis de proteínas y endotoxinas. Todos los productos se almacenaron a 4 °C.

### 50 **1.13 Estudio farmacocinético**

El análisis farmacocinético se realizó usando proteína radioyodada. Tras la administración de los interferones marcados mediante inyecciones IV en la vena de la cola de las ratas, se midió la tasa de eliminación como la reducción de la radiactividad en la sangre extraída a intervalos específicos durante 72 h. Cada punto temporal es una medida de al menos cinco ratas.

### 1.14 Resultados

60 Se midió la velocidad de reacción de GalNAc-T2 a dos valores de pH, un pH neutro (7,4) y un pH ligeramente ácido (6,2). La glicosilación con GalNAc procedió con éxito tanto a pH 6,2 como a pH 7,4. Como puede verse en el análisis MALDI del progreso de la reacción, la velocidad de reacción fue más rápida a pH 7,4 que a pH 6,2.

Se añadieron GalNAc-T2 y GalNAc al interferón  $\alpha$ -2 $\beta$  cuantitativamente, bien a pH 6,2 o pH 7,4. La reacción se siguió por MALDI. Durante la reacción enzimática, se formó un nuevo ion de masa de interferón (IFN- $\alpha$ -2b 19,281 Da

e IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc, 19,485 Da).

El producto de la reacción a pH 6,2, IFN- $\alpha$ -2b-GalNAc, se sometió a análisis para determinar la posición de la sustitución de GalNAc en la proteína. Con este fin, se usaron el mapeo del péptido y el mapeo de ocupación del sitio. El mapeo del péptido usando TIC de LC-MS/MS y un digesto GluC de IFN- $\alpha$ -2b produjo un fragmento peptídico de la masa 1018,69, La secuenciación de aminoácidos del péptido MS/MS del ion de masa de péptido 1018,69 que contenía GalNAc indicó la unión del azúcar a T<sup>106</sup>.

Se examinó la sialil-PEGilación de IFN- $\alpha$ -2b-GalNAc usando ST6GalNAc-1 y CMP-SA-PEG-20 kilodaltons. La reacción de IFN- $\alpha$ -2b-GalNAc produjo la proteína PEGilada, que fue visible por SDS PAGE. En general, la reacción se desarrolló a 32 °C durante 96 h. La reacción se controló por SDS PAGE. La SDS PAGE indicó que aproximadamente el 70 % de IFN- $\alpha$ -2b-GalNAc se convirtió en IFN- $\alpha$ -2b-GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton. El análisis MALDI de la nueva banda indica un ion de masa de 41.500 Daltons, la masa de IFN- $\alpha$ -2b-GalNAc-SA-PEG-20 kilodaltons.

También se produjo la glicofoma de interferón  $\alpha$ -2b PEGilado que contenía la estructura de GalNAc-Gal-SA-PEG. La reacción se realizó usando las condiciones descritas anteriormente. El producto deseado se detectó por SDS PAGE. Se usó una reacción de dos etapas en un solo recipiente para generar el producto deseado, comenzando con IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc con núcleo-1- $\beta$ 3-galactosiltransferasa-1, ST3Gal2, UDP-galactosa y CMP-SA-PEG-20 kilodalton. La reacción se incubó a 32 °C durante 96 h. La reacción se controló por SDS PAGE. Después de 24 h, la reacción se había completado en aproximadamente un 70 %. El MALDI del producto indicó un ion de masa de 41.900 Da, que procede del producto de IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc-Gal-SA-PEG-20 kilodalton.

Se purificaron ambas glicofomas de los productos de interferón- $\alpha$ -2 $\beta$  PEGilado usando un proceso de dos etapas. En la primera etapa, se realizó la cromatografía de intercambio iónico usando SP Sefarosa. Este procedimiento eliminó los materiales de PEG sin reaccionar y proporcionó una cierta separación de otras proteínas. La etapa de intercambio iónico fue seguida de la separación en SEC. Se usó una Columna Superdex 75 para eliminar el resto de proteínas más pequeñas, incluyendo las glicosiltransferasas y el interferón  $\alpha$  no PEGilado. Ambas glicofomas PEGiladas de interferón  $\alpha$  se purificaron hasta más del 90 %, como se muestra mediante SDS PAGE.

Los datos antivirales indican que las glicofomas PEGiladas A y B conservan sus efectos antivirales.

Se inyectaron las proteínas PEGiladas radioyodadas en ratas a través de la vena de la cola, la AUC para ambas proteínas fue de 5 a 7 veces superior al interferón  $\alpha$ -2 $\beta$  no PEGilado.

Tanto la glicofoma A (IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton) como la glicofoma B (IFN- $\alpha$ -2 $\beta$ -GalNAc-Gal-SA-PEG-20 kilodalton) resultaron ser bioactivas.

## EJEMPLO 2

### 2.1 Preparación de G-CSF-GalNAc (pH 6,2)

Se concentraron 960  $\mu$ g de G-CSF en 3,2 ml de tampón por ultrafiltración usando un filtro UF (5 kilodalton) y se reconstituyó con 1 ml de tampón de MES 25 mM (pH 6,2, NaN<sub>3</sub> al 0,005 %). A continuación, se añadieron UDP-GalNAc (6 mg, 9,24 mM), GalNAc-T2 (40 ml, 0,04 U) y MnCl<sub>2</sub> 100 mM (40  $\mu$ l, 4 mM), y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente durante 48 horas. Tras 48 horas, la MALDI indicó que la reacción se había completado (cambio del ion de masa de 18.800 a 19.023 unidades de masa). Se purificó la mezcla de reacción mediante HPLC usando SEC (Superdex 75 y Superdex 200). Se eluyó la columna usando solución salina tamponada con fosfato, pH 4,9 y Tween 80 al 0,005 %. Se recogió el pico correspondiente a G-CSF-GalNAc y se concentró hasta aproximadamente 150  $\mu$ l usando un filtro Centricon de 5 kilodalton, y se ajustó el volumen hasta 1 ml usando PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 4,9 y Tween 80 al 0,005 %); la concentración de proteína fue de 1 mg/ml a A<sub>280</sub>).

### 2.2 Preparación de G-CSF-GalNAc-Gal (pH 6,0)

Se añadió G-CSF-GalNAc (100  $\mu$ g) a 100  $\mu$ l de una solución que contenía tampón de MES 25 mM, pH 6,0, UDP-GalNAc 1,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y 80 mU de GalNAc-T2. A continuación, se añadieron CMP-SA-PEG-20 kilodalton (0,5 mg, 0,025  $\mu$ mol), 75  $\mu$ g de UDP-galactosa (0,125  $\mu$ mol), 20  $\mu$ l de núcleo-1-Gal-T (10 mU) y se agitó lentamente la solución a 32 °C durante 24 horas. La MALDI indicó la total conversión de G-CSF-GalNAc en G-CSSF-GalNAc-Gal.

### 2.3 Preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton (C).

#### 2.3a Proceso secuencial (pH 6,2)



Se cambió el tampón de una solución de G-CSF-GalNAc que contenía 1 mg de proteína a tampón de MES 25 mM (pH 6,2, NaN<sub>3</sub> al 0,005 %), a continuación, se añadieron 5 mg (0,25 μmol) de CMP-SA-PEG (20 kilodalton). Por último, se añadieron 100 μl de una solución de MnCl<sub>2</sub> 100 mM y ST6GalNAc-I (100 μl), y se agitó lentamente la mezcla de reacción a 32 °C. Se tomaron alícuotas en los puntos temporales (24, 48 y 72 h) y se analizaron mediante SDS-PAGE. Tras 24 h, no se observó más reacción. Se concentró la mezcla de reacción mediante filtración de centrifugación (5 kilodalton), se cambió el tampón frente a NaOAc 25 mM (pH 4,9) y se concentró hasta 1 ml. Se purificó el producto usando intercambio iónico (SP-Sefarosa, NaOAc 25 mM, pH 4,9) y SEC (Superdex 75; PBS-pH 7,2, tween 80 al 0,005 %, 1 ml/min). Se recogió la fracción deseada, se concentró hasta 0,5 ml y se conservó a 4 °C.

### 2.3b Proceso en un recipiente usando ST6GalNAc-I (pH 6,0)

Se concentraron 960 μg de proteína G-CSF disuelta en 3,2 ml de tampón de formulación producto mediante filtración de centrifugación (5 kilodalton) hasta 0,5 ml, y se reconstituyó en tampón de MES 25 mM (pH 6,0, NaN<sub>3</sub> al 0,005 %) hasta un volumen total de aproximadamente 1 ml o una concentración de proteína de 1 mg/ml. Tras la reconstitución, se añadieron UDP-GalNAc (6 mg, 9,21 μmol), GalNAc-T2 (80 μl, 80 mU), CMP-SA-PEG-20 kilodalton (6 mg, 0,3 μmol) y enzima de ratón ST6GalNAc-I (120 μl). Se agitó la reacción a 32 °C durante 48 horas. Tras la reacción, se purificó el producto usando condiciones de cromatografía convencionales en SP-Sefarosa y SEC como se ha descrito anteriormente. Se obtuvo un total de 0,5 mg de proteína (A<sub>280</sub>), para aproximadamente un 50 % del rendimiento total. La estructura del producto se confirmó mediante análisis tanto con MALDI como con SDS-PAGE.

### 2.4 Preparación de G-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEG-20 kilodalton (D)

#### 2.4a A partir de G-CSF-GalNAc

Se añadieron directamente UDP-galactosa (4 mg, 6,5 μmol), núcleo-1-Gal-T<sub>1</sub> (320 μl, 160 mU), CMP-SA-PEG-20 kilodalton (8 mg, 0,4 μmol), ST3Gal2 (80 μl, 0,07 mU) y 80 μl de MnCl<sub>2</sub> 100 mM a 1,5 ml en bruto de mezcla de reacción de G-CSF-GalNAc (1,5 mg) en tampón de MES 25 mM (pH 6,0) del Ejemplo 2.1 (anterior). Se incubó la mezcla resultante a 32 °C durante 60 horas, aunque la reacción se había completado tras 24 h. Se centrifugó la mezcla de reacción y se concentró la solución hasta 0,2 ml usando ultrafiltración (5 kilodalton) y luego se volvió a disolver en NaOAc 25 mM (pH 4,5) hasta un volumen final de 1 ml. Se purificó el producto usando SP-Sefarosa, se concentraron las fracciones pico usando un filtro de centrifugación (5 kilodalton) y se siguió purificando el residuo usando SEC (Superdex 75). Tras la concentración usando un filtro de centrifugación (5 kilodalton), se diluyó la proteína hasta 1 ml usando tampón de formulación que consistía en PBS, manitol al 2,5 %, polisorbato al 0,005 %, pH 6,5 y se formuló a una concentración de proteína de 850 μg de proteína por ml (A<sub>280</sub>). El rendimiento total fue del 55 %. El análisis de MALDI se muestra en la FIG 28.

#### 2.4b A partir de G-CSF

Se concentraron 960 μg de G-CSF (3,2 ml) con un filtro de centrifugación (5 kilodalton) y se reconstituyó con tampón de MES 25 mM (pH 6,0, NaN<sub>3</sub> al 0,005 %). Se ajustó el volumen total de la solución de G-CSF hasta aproximadamente 1 mg/ml, y se añadieron UDP-GalNAc (6 mg), GalNAc-T2 (80 μl), UDP-galactosa (6 mg), núcleo-1-Gal-T<sub>1</sub> (160 μl, 80 μU), CMP-SA-PEG (20 kilodalton) (6 mg), ST3Ga1-2 (160 μl, 120 μU) y MnCl<sub>2</sub> (40 μl de una solución 100 mM). Se incubó la mezcla resultante a 32 °C durante 48 h.

### 2.5 Cromatografía HPLC en SP Sefarosa

La SP Sefarosa se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 1.4.

### 2.6 Cromatografía de exclusión por tamaño

La SEC se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 1.5. Las muestras purificadas se conservaron a 4 °C.

#### 2.6a Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

Tras la primera etapa de cromatografía HIC se puede usar una segunda etapa de purificación para eliminar los contaminantes distintos del G-CSF no PEGilado. Por lo tanto, hay un método disponible para la purificación de G-CSF glicopegulado que se realiza a través de una purificación inicial en columna de permeación de gel.

### 2.7 Análisis SDS PAGE

El análisis SDS PAGE se realizó como se expone en el Ejemplo 1.6.

### 2.8 Análisis MALDI

El análisis MALDI se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 1.7.

**2.9 Análisis de mapeo de péptidos**

El análisis de mapeo de proteínas se realizó como se ilustra en el Ejemplo 1.8.

**5 2.10 Ensayo de concentración de proteína**

La concentración de proteína se determinó como se ha descrito en el Ejemplo 1.9.

**10 2.11 Formulación del producto**

El producto se formuló como se ha expuesto en el Ejemplo 1.10.

**15 2.12 Determinación de endotoxina**

La endotoxina se determinó como se ha expuesto en el Ejemplo 1.11.

**2.13 Ensayo de proliferación celular**

20 Se realizó un ensayo de proliferación de G-CSF con una línea celular NFS-60 y una línea celular Tf-1 de acuerdo con procedimientos convencionales. Se sembraron las células en una placa de 96 pocillos a 25.000 células/ml en presencia de diferentes concentraciones de G-CSF (51 nM, 25,5 nM, 12,75 nM, 3,2 nM, 1,6 nM, 0,8 nM, 0 nM), un análogo de G-CSF químicamente PEGilado y G-CSF C PEGilado del Ejemplo 2.3 (anterior) y G-CSF D PEGilado del Ejemplo 2.4 (anterior). Las células se incubaron 37 °C durante 48 horas. Se usó un ensayo MTT colorimétrico para determinar la viabilidad celular.

**25 2.14 Actividad in vivo: Producción de glóbulos blancos (WBC) en la rata**

30 Se examinaron dos dosis de fármaco (50 µg/kg, 250 mg/kg) para cada uno de C, G-CSF y un G-CSF químicamente PEGilado usando ratones. Se extrajo sangre en los puntos temporales de 2 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 84 horas y 96 horas, y se midió el recuento de WBC y neutrófilos (FIG. 4).

**2.15 Estudio de estabilidad acelerada**

35 Se realizó un estudio de estabilidad acelerada de G-CSF PEG-ilado, C, del Ejemplo 2.3 y G-CSF PEG-ilado, D, del Ejemplo 2.4 usando a tampón a pH 8,0 calentado a 40 °C. Se diluyeron 72 µg de G-CSF PEG-ilado C hasta 8 ml con tampón de formulación (PBS, manitol al 2,5 %, polisorbato 80 al 0,005 %). Se diluyó 1 mg de G-CSF PEG-ilado D, con 16 ml de tampón de formulación. Se ajustaron ambas soluciones a pH 8,0 con NaOH, y la solución resultante se filtró en condiciones estériles en tubos exentos de pirógenos. Se giraron lentamente las muestras a 40 °C y se tomaron alícuotas (0,8 ml) en los puntos temporales de 0 horas, 72 horas y 168 horas. El análisis se realizó usando SEC (Superdex 200) como se ha descrito anteriormente (FIG. 6 y FIG. 7).

**40 2.16 Radiomarcaje de proteína**

45 Se radiomarcó G-CSF usando el reactivo Bolton Hunter. Dicha reacción se realizó a pH 7,4 durante 15 minutos y fue seguida de una purificación por SEC (Superdex 200). Tras la purificación, se ajustó el pH del tampón de formulación a 5,0 y se determinó la concentración de proteína mediante A<sub>280</sub>.

**2.17 Ensayo de ELISA**

50 Se utilizó un ensayo de Elisa para cuantificar los derivados de G-CSF en plasma de rata. Los resultados farmacocinéticos se muestran en la FIG. 9.

**2.18 Estudio farmacocinético**

55 Se realizaron dos estudios farmacocinéticos. Para el primer estudio farmacocinético, se radiomarcaron las proteínas y se administraron mediante inyecciones IV en la vena de la cola en ratas. Se midió la tasa de aclaramiento como la reducción de la radiactividad en la sangre extraída a intervalos específicos durante 48 horas. Cada punto temporal era una medida de al menos cinco ratas.

60 En concreto, se inyectaron 10 µg de derivado de G-CSF por animal (~1 µg de la proteína marcada y 9 µg de proteína sin marcar). Además de la extracción de sangre y su recuento como se ha descrito anteriormente, también se recogió plasma y se hizo precipitar el ácido de la proteína. Entonces, también se realizó el recuento de los sedimentos de proteína para determinar la radiactividad. Los datos de estos estudios se muestran en la FIG. 2, la FIG. 3 y FIG. 8.

65

En el segundo estudio farmacocinético, se administraron los derivados de G-CSF no marcados (30 µg por animal) mediante inyecciones IV en la vena de la cola en ratas. Se extrajeron muestras sanguíneas en los puntos temporales indicados y se analizaron las muestras mediante el ensayo ELISA de G-CSF. Los datos se muestran en la FIG. 9.

5

## 2.19 Resultados

GalNAc T2 humana transfirió GalNAc a G-CSF expresado en *E. coli* usando UDP-GalNAc como donante. Dependiendo del pH del tampón de reacción, se añadieron una o dos fracciones de GalNAc a G-CSF según lo determinado por MALDI. La adición de la segunda GalNAc se produjo lentamente ascendiendo hasta aproximadamente el 10-15 % del producto total. Se pudo añadir una GalNAc selectivamente a G-CSF, en rendimientos de conversión de más del 90 %, ajustando el pH de la solución de reacción a 6,0-6,2. La adición de la segunda GalNAc se produjo cuando la reacción se realizó a un pH de entre aproximadamente 7,2 y 7,4. Tanto  $\text{Co}^{+2}$  como  $\text{Mn}^{+2}$  son iones metálicos divalentes útiles en la reacción. El mapeo de péptidos de los productos de reacción indicó que el producto predominante de la reacción fue la adición de GalNAc a treonina-133, el sitio natural de glicosilación con unión en O en sistemas de mamíferos. La segunda GalNAc se observó en el fragmento de péptido amino terminal de G-CSF y se postuló que se produce en la treonina-2.

La reacción de G-CSF-GalNAc con ST6GalNAc-1 (pollo o ratón) y CMP-SA-PEG-20 kilodalton proporcionó el producto G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton, que fue verificado mediante MALDI, con rendimientos de conversión del aproximadamente 50 % según lo determinado por SDS-PAGE. El G-CSF-GalNAc también se pudo alargar más usando núcleo-1-Gal-T y UDP-galactosa para proporcionar la conversión completa a G-CSF-GalNAc-Gal. La glico-PEGilación de este producto intermedio con ST3Gal2 y CMP-SA-PEG-20 kilodalton proporcionó entonces el producto G-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEG-20 kilodalton en rendimientos globales del aproximadamente 50 %. Estas reacciones se llevaron a cabo de forma secuencial en un solo recipiente o simultáneamente en un solo recipiente a partir de G-CSF o sus productos intermedios glicosilados. En estos estudios, se observó poca o ninguna diferencia en el rendimiento global mediante el uso de cualquiera de las metodologías.

Los productos de las reacciones de glicosilación o glico-PEGilación se purificaron usando una combinación de intercambio iónico y SEC. La etapa de intercambio iónico elimina el G-CSF sin reaccionar o sus productos intermedios glicosilados (GalNAc o GalNAc-Gal), así como cualquier CMP-SA-PEG-20 kilodalton sin reaccionar. La etapa de SEC eliminó el resto de G-CSF sin reaccionar y otros contaminantes proteicos de las glicosiltransferasas usadas en el proceso. Los G-CSF que contenían GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton o GalNAc-Gal-SA-PEG-20 kilodalton resultaron tener propiedades y tiempos de retención idénticos al usar estos métodos de purificación. Los productos finales resultaron tener perfiles típicos como se muestra.

Una vez purificadas, se formularon las proteínas PEGiladas en un tampón de PBS que contenía manitol al 2,5 % y Tween 80 al 0,005 %. Inicialmente, se usó el pH 6,5 en la formulación, pero la agregación de la proteína glico-PEGilada fue un problema (véase más adelante), pues el pH del tampón de formulación se redujo hasta 5,0. Los informes publicados han indicado que la agregación de G-CSF se evita mediante el mantenimiento de un pH de la solución entre 4 y 5. La endotoxina se eliminó usando un cartucho de eliminación de endotoxina mediante una técnica estéril. Las concentraciones de proteína se ajustaron normalmente a concentraciones de 100 µg/ml a 1 mg/ml según lo requerido para los estudios biológicos. Por lo general, los cálculos de endotoxina fueron inferiores a 3EU/ml con este proceso. Los productos formulados se almacenan a 4.

Se ensayaron los productos en un ensayo de proliferación celular *in vitro* usando células NSF-60 sensibles a G-CSF. Se observó que los productos tanto GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton como GalNAc-Gal-SA-20 kilodalton fueron eficaces al inicio de la proliferación celular (FIG. 1).

Se realizó un estudio de estabilidad acelerada en un G-CSF PEGilado químicamente y C (G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton). El pH del tampón de formulación se ajustó a 8,0 y la temperatura se elevó hasta 40 °C. Se tomaron muestras de cada proteína en los puntos temporales 0, 72 y 168 h (FIG. 6 y FIG. 7). Se observó la agregación completa de G-CSF PEGilado químicamente en estas condiciones en 168 h. Se usó la SEC usando una cromatografía Superdex 200 para separar los agregados. Aunque el glicoconjugado G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton también formó agregados que se podían separar usando SEC, la agregación se produjo a un ritmo mucho más lento.

El G-CSF glicoPEGilado se radiyodó usando el reactivo de Bolton Hunter. También se realizó un estudio de marcaje en frío antes del radiomarcaje real para determinar la extensión de la agregación y establecer una metodología para la eliminación de cualquier agregado formado. El uso del reactivo de Bolton Hunter (frío) proporcionó algunos agregados como se muestra en la FIG. 5. La SEC usando una columna Superdex 200 eliminó los agregados y proporcionó el material marcado, monomérico. Se obtuvieron resultados similares usando reactivo marcado con  $^{125}\text{I}$ . El uso de la formulación minimizó la agregación durante el almacenamiento. El contenido de proteína se midió mediante la medición de la absorbancia a  $A_{280}$ .

65

Los resultados del estudio farmacocinético en ratas incorporando G-CSF, G-CSF PEGilado químicamente y el conjugado de PEG-G-CSF marcado con el reactivo de Bolton Hunter se muestran en la FIG. 3. En este estudio, se analizaron la sangre y la proteína precipitada en plasma para determinar la radiactividad tras la administración IV de 10 µg de conjugado de G-CSF por rata. Los datos tanto de la sangre como de la proteína en plasma indican claramente que el conjugado de PEG y G-CSF PEGilado químicamente tienen tasas de aclaramiento idénticas (FIG. 3 y FIG. 8).

A continuación, se examinó la capacidad de los derivados de G-CSF para iniciar la producción de WBC en un modelo de ratón. Se inyectó IV cada compuesto de ensayo como un solo bolo, y se controló la inducción de WBC y neutrófilos a lo largo del tiempo. El G-CSF PEGilado químicamente fue la proteína más potente analizada al administrar 250 µg/kg. El conjugado de PEG (G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20 kilodalton) indujo la producción de WBC hasta casi el mismo grado que G-CSF PEGilado químicamente a 250 µg/kg, y mucho más que G-CSF a una concentración similar.

### EJEMPLO 3

El presente ejemplo desvela mutaciones de la secuencia de aminoácidos que introducen cambios en sitios de glicosilación con unión en O, es decir, los restos de serina o treonina, en un sitio que contiene preferentemente prolina de la secuencia de 175 aminoácidos de tipo silvestre de G-CSF o cualquier versión modificada de la misma. Como referencia, a continuación, se muestra la secuencia de G-CSF de 175 aminoácidos de tipo silvestre.

MTPLGPASSLP QSFLKCLEQ VRKIQGDGAA LQEKLC  
 TYKLCHPEEL VLLGHSLGIP WAPLSSCPSQ ALQLAGCLSQ  
 LHSGLFLYQG LLQALEGISP ELGPTLDTLQ LDVADFATTI  
 WQQMEELGMA PALQPTQGAM PAFASAFQRR AGGVLVASHL  
 QSFLEVSYRV LRHLAQP (SEC ID n.º 2)

Los polipéptidos mutados de la invención se definen en las reivindicaciones.

#### 3.1 Mutaciones N-terminales

En los mutantes N-terminales, se reemplaza el extremo N de un G-CSF de tipo silvestre, M<sup>1</sup>TPLGPA (SEC ID N<sup>o</sup>) bien por M<sup>1</sup>X<sub>n</sub>TPLGPA o M<sup>1</sup>B<sub>o</sub>PZ<sub>m</sub>X<sub>n</sub>TPLGPA, en los que n, o y m son número enteros seleccionados de 0 a 3 y al menos uno de X, B y O es Thr o Ser. Cuando más de uno de X, B y O es Thr o Ser, la identidad de estas fracciones se selecciona de manera independiente. Cuando aparecen, los superíndices indican la posición del aminoácido en la secuencia de partida de tipo silvestre.

Los ejemplos preferidos incluyen:

M<sup>1</sup>VTPL<sup>4</sup>GPA (SEC ID N<sup>o</sup>)  
 M<sup>1</sup>QTPL<sup>4</sup>GPA (SEC ID N<sup>o</sup>)  
 M<sup>1</sup>ATPL<sup>4</sup>GPA (SEC ID N<sup>o</sup>)  
 M<sup>1</sup>PTQGAMPL<sup>4</sup>GPA (SEC ID N<sup>o</sup>)  
 M<sup>1</sup>VQTPL<sup>4</sup>GPA (SEC ID N<sup>o</sup>)  
 M<sup>1</sup>QSTPL<sup>4</sup>GPA (SEC ID N<sup>o</sup>)  
 M<sup>1</sup>GQTPL<sup>4</sup>GPA (SEC ID N<sup>o</sup>)  
 M<sup>1</sup>APTSSSPL<sup>4</sup>GPA (SEC ID N<sup>o</sup>)  
 M<sup>1</sup>APTPL<sup>4</sup>GPA (SEC ID N<sup>o</sup>).

#### 3.2 Sitio de mutación interna 1

En estos mutantes, se reemplaza el extremo N de un GCSF de tipo silvestre, M<sup>1</sup>TPLGP (SEC ID N<sup>o</sup>: 8) por M<sup>1</sup>TPX<sub>n</sub>BoOrP, en los que n, o y r son número enteros seleccionados de 0 a 3 y al menos uno de X, B y O es Thr o Ser. Cuando más de uno de X, B y O es Thr o Ser, la identidad de estas fracciones se selecciona de manera independiente. Cuando aparecen, los superíndices indican la posición del aminoácido en la secuencia de partida de tipo silvestre.

Los ejemplos preferidos incluyen:

M<sup>1</sup>TPTLGP (SEC ID N°: 8)  
 M<sup>1</sup>TPTQLGP (SEC ID N°: 8)  
 M<sup>1</sup>TPTSLGP (SEC ID N°: 8)  
 M<sup>1</sup>TPTQGP (SEC ID N°: 8)  
 5 M<sup>1</sup>TPTSSP (SEC ID N°: 8)  
 M<sup>1</sup>TPQTP (SEC ID N°: 8)  
 M<sup>1</sup>TPTGP (SEC ID N°: 8)  
 M<sup>1</sup>TPLTP (SEC ID N°: 8)  
 M<sup>1</sup>TPNTGP (SEC ID N°: 8)  
 10 M<sup>1</sup>TPVTP (SEC ID N°: 8)  
 M<sup>1</sup>TPMVTP (SEC ID N°: 8)  
 MT<sup>1</sup>P<sup>2</sup>TQGL<sup>3</sup>G<sup>4</sup>P<sup>5</sup>A<sup>6</sup>S<sup>7</sup> (SEC ID N°: 8).

**3.3 Sitio de mutación interna 2**

Esta mutación se realiza con el fin de mantener la actividad de G-CSF. En estos mutantes, la secuencia de aminoácidos que contenía H<sup>53</sup>, LGH<sup>53</sup>SLGI (SEC ID N°:) se muta a LGH<sup>53</sup>B<sub>o</sub>LGI, donde  $\Theta$  es H, S, R, E o Y, y B es bien Thr o Ser.

Los ejemplos preferidos incluyen:

LGHTLGI  
 LGSSLGI  
 25 LGYSLGI  
 LGESLGI  
 30 LGSTLGI

**3.4 Sitio de mutación interna 3**

En este tipo de mutante, se secuencia de aminoácidos que abarca p<sup>129</sup>, P<sup>129</sup>ALQPT (SEC ID N°:), se muta a P<sup>129</sup>Z<sub>m</sub>J<sub>q</sub>O<sub>r</sub>X<sub>n</sub>PT, en la que Z, J, O y X se seleccionan, de manera independiente, entre Thr o Ser, y m, q, r y n son número enteros seleccionados de 0 a 3.

Los ejemplos preferidos incluyen:

40 P<sup>129</sup>TLGPT  
 P<sup>129</sup>TQGPT  
 P<sup>129</sup>TSSPT  
 P<sup>129</sup>TQGAPT  
 P<sup>129</sup>NTGPT  
 45 P<sup>129</sup>ALTPT  
 P<sup>129</sup>MVTPT  
 P<sup>129</sup>ASSTPT  
 P<sup>129</sup>TTQP  
 P<sup>129</sup>NTLP  
 50 P<sup>129</sup>TLQP  
 MAP<sup>129</sup>ATQPTQGAM  
 MP<sup>129</sup>ATTQ PTQGAM.

**3.5 Sitio de mutación interna 4**

En este tipo de mutante, la secuencia de aminoácidos que rodea a P<sup>61</sup>, LGIPWAP<sup>61</sup>LSSC (SEC ID N°:), se reemplaza por PZ<sub>m</sub>U<sub>s</sub>J<sub>q</sub>P<sup>61</sup>O<sub>r</sub>X<sub>n</sub>B<sub>o</sub>C, en la que m, s, q, r, n y o son número enteros seleccionados entre 0 a 3 y al menos uno de Z, J, O, X, B y U se selecciona bien como Thr o Ser. Cuando más de uno de Z, J, O X, B y U es Thr o Ser, cada uno se selecciona de manera independiente.

Los ejemplos preferidos incluyen:

P<sup>61</sup>TSSC  
 P<sup>61</sup>TSSAC  
 65 LGIPTA P<sup>61</sup>LSSC  
 LGIPTQ P<sup>61</sup>LSSC

5 LGIPTQG P<sup>61</sup>LSSC  
 LGIPQT P<sup>61</sup>LSSC  
 LGIPTS P<sup>61</sup>LSSC  
 LGIPTS P<sup>61</sup>LSSC  
 LGIPTQP<sup>61</sup>LSSC  
 LGTPWAP<sup>61</sup> LSSC  
 LGTPFA P<sup>61</sup>LSSC  
 P<sup>61</sup>FTP  
 10 SLGAP<sup>58</sup>TAP<sup>61</sup> LSS.

3.6 Mutaciones C-terminales

15 En este tipo de mutante, la secuencia de aminoácidos en el extremo C de un G-CSF de tipo silvestre, RHLAQP<sup>175</sup> (SEC ID N°.), se reemplaza por  $\emptyset_a G_p J_q O_r P^{175} X_n B_o Z_m U_s \psi_t$ , en el que a, p, q, r, n, o, m, s y t son números enteros seleccionados de 0 a 3, y al menos uno de Z, U, O, J, G, O, B y X es Thr o Ser, y cuando más de uno de Z, U, O, J, G,  $\emptyset$ , B y X son Thr o Ser, se seleccionan de manera independiente.  $\emptyset$  es opcionalmente R, y G es opcionalmente H. El símbolo  $\psi$  representa cualquier resto de aminoácido sin cargar o E (glutamato).

20 Los ejemplos preferidos incluyen:

25 RHLAQTP<sup>175</sup>  
 RHLAQTP<sup>175</sup>  
 QP<sup>175</sup>TQGAMP  
 RHLAQTP<sup>175</sup>AM  
 QP<sup>175</sup>TSSAP  
 QP<sup>175</sup>TSSAP  
 QP<sup>175</sup>TQGAMP  
 QP<sup>175</sup>TQGAM  
 30 QP<sup>175</sup>TQGA  
 QP<sup>175</sup>TVM  
 QP<sup>175</sup>NTGP  
 QP<sup>175</sup>QTLP

3.7 Mutaciones internas que rodean a P<sup>133</sup>

35 Otros mutantes de G-CSF adicionales incluyen los que tienen mutaciones internas que rodean al aminoácido P<sup>133</sup>. Los ejemplos incluyen:

40 P<sup>133</sup>TQTAMP<sup>139</sup>  
 P<sup>133</sup>TQGTMP  
 P<sup>133</sup>TQGTNP  
 P<sup>133</sup>TQGTLP  
 PALQP<sup>133</sup>TQTAMPA.

45 **EJEMPLO 4**

50 Las mutaciones en la secuencia de aminoácidos del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) pueden introducir sitios adicionales para la glicosilación con unión en O, de modo que la proteína se puede modificar en estos sitios usando el método de la presente invención. El presente ejemplo expone mutantes representativos seleccionados de la invención.

4.1 G-CSF (variante de 178 aa de tipo silvestre)

mtpigpasslp qsfllkleq vrkiqgdgaa lqeklvseca tyklchpeel vñghslgip  
 waplsscpsq alqlagclsq lhsglflyqg llqalegisp elgptldtlq ldvadfatti wqqmeelgma  
 palqptqgam pafasafqrr aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqp (SEC ID n.º 1)

55

4.2 G-CSF (variante de 175 aa de tipo silvestre)

mtp<sup>3</sup>lpgpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklca tyklchpeel vllghslgip wap<sup>1</sup>lsscpsq  
alqlagclsq lhgflyqg llqalegisp elgptldtlq ldvadfatti wq<sup>1</sup>qmeelgma palqptqgam  
pafasafqrr aggvlvashl qsflevsyrv lrhlaqp (SEC ID n.º 3)

5 4.9 G-CSF mutante 1 (mutación amino-terminal)

mia<sup>1</sup>tp<sup>3</sup>lpgpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklcatyk lchpeelvll  
ghslgipwap lsscpsqalq lagclsq<sup>1</sup>lhs gflyqgllq alegispelg ptldtlqldv  
adfattiwq<sup>1</sup>q meelgmapal qptqgampaf asafqrragg vlvashlqsf  
levsyrvlrh laqp

4.10 G-CSF mutante 2 (mutación amino-terminal)

mgvtetp<sup>3</sup>lpgpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklcatyk lchpeelvll  
ghslgipwap lsscpsqalq lagclsq<sup>1</sup>lhs gflyqgllq alegispelg ptldtlqldv  
adfattiwq<sup>1</sup>q meelgmapal qptqgampaf asafqrragg vlvashlqsf levsyrvlrh  
laqp

10

4.11 G-CSF mutante 3 (mutación amino-terminal)

mapt<sup>3</sup>lpgpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklcatyk lchpeelvll ghslgipwap  
lsscpsqalq lagclsq<sup>1</sup>lhs gflyqgllq alegispelg ptldtlqldv adfattiwq<sup>1</sup>q  
meelgmapal qptqgampaf asafqrragg vlvashlqsf levsyrvlrh laqp

15 4.12 G-CSF mutante 4 (sitio 1)

**mtp<sup>3</sup>tqgl**pgpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklcatyk lchpeelvll  
ghslgipwap lsscpsqalq lagclsq<sup>1</sup>lhs gflyqgllq alegispelg ptldtlqldv  
adfattiwq<sup>1</sup>q meelgmapal qptqgampaf asafqrragg vlvashlqsf levsyrvlrh  
laqp

4.13 G-CSF mutante 5 (sitio 3)

Mtp<sup>3</sup>lpgpasslp qsfllkcleq vrkiqgdgaa lqeklcatyk lchpeelvll ghslgipwap  
lsscpsqalq lagclsq<sup>1</sup>lhs gflyqgllq alegispelg ptldtlqldv adfattiwq<sup>1</sup>q  
meelgmap<sup>129</sup>at qptqgampaf asafqrragg vlvashlqsf levsyrvlrh la<sup>1</sup>qp

20

## 4.14 G-CSF mutante 6 (sitio 4)

MtpIgpaspIq qsfllkcleq vrkiqgdgaa IqekIcatyk Ichpeelvll ghslgip<sup>58</sup>ftp  
 Isscpsqalq lagclsqIhs glflyqgllq alegispelg ptldtlqldv adfattiwqq  
 meelgmapaL qptqgampaf asafqrragg vivashlqsf levsyrvlrh laqp

## EJEMPLO 5

5

## GlicoPEGilación de G-CSF producido en células CHO

**5a. Preparación de factor de estimulación de colonias de granulocitos asialo (G-CSF)**

10 Se disolvió G-CSF producido en células CHO a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M y  
 CaCl<sub>2</sub> 5 mM, y se concentró hasta 500 µl en un filtro de centrifugación Centricon Plus 20. Se incubó la solución con  
 300 mU/ml de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, se diluyó una  
 pequeña alícuota de la reacción con el tampón apropiado y se realizó un gel IEF. A continuación, se añadió la  
 15 mezcla de reacción a un conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa previamente lavado (volumen de  
 reacción de 800 µl/ml) y se centrifugaron suavemente las perlas lavadas durante 24 horas a 4 °C. Se centrifugó la  
 mezcla a 10.000 rpm, y se recogió el sobrenadante. Se lavaron las perlas 3 veces con tampón de Tris-EDTA, una  
 vez con 0,4 ml de tampón de Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón de Tris-EDTA, y se combinaron todos los  
 sobrenadantes. Se sometió el sobrenadante a diálisis a 4 °C frente a Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 1 M, NaN<sub>3</sub> al  
 0,05 %, y luego dos veces más frente a Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 1 M, NaN<sub>3</sub> al 0,05 %. A continuación, se  
 20 concentró la solución sometida a diálisis usando un filtro de centrifugación Centricon Plus 20, y se conservó a -20 °C.  
 Las condiciones para el gel de IEF se ejecutaron de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados  
 por Invitrogen. Se sometieron a diálisis muestras de G-CSF natural y desialilado frente a agua, y se analizaron  
 mediante MALDI-TOF MS.

**25 5b. Preparación de G-CSF-(α2,3)-Sialil-PEG**

Se disolvió G-CSF desialilado a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN<sub>3</sub> al 0,05 %, pH 7,2. Se incubó la  
 solución con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gall a 32 °C durante 2 días. Para controlar la  
 30 incorporación de ácido siálico-PEG, se añadió a una pequeña alícuota de la reacción CMP-SA-PEG-ligando  
 fluorescente. Se separó el marcador incorporado al péptido del marcador libre mediante filtración en gel sobre una  
 columna analítica G3000SW de Toso Haas usando tampón de PBS (pH 7,1). Se cuantificó el marcador fluorescente  
 incorporado al péptido usando un detector fluorescente en línea. Tras 2 días, se purificó la mezcla de reacción  
 usando una columna preparativa G3000SW de Toso Haas, usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las  
 35 fracciones basándose en la absorción UV. Se analizó el producto de la reacción usando análisis SDS-PAGE y IEF  
 de acuerdo con los procedimientos y los reactivos suministrados por Invitrogen. Se sometieron a diálisis muestras de  
 G-CSF natural y PEGilado frente a agua, y se analizaron mediante MALDI-TOF MS.

**5c. Preparación de G-CSF-(α2,8)-Sialil-PEG**

40 Se disolvió G-CSF producido en células CHO, que contenía un glicano con unión en O sialilado en 2,3, a 2,5 mg/ml  
 en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN<sub>3</sub> al 0,05 %, pH 7,2. Se incubó la solución 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, se añadió a una  
 pequeña alícuota de la reacción CMP-SA-PEG-ligando fluorescente. Se separó el marcador incorporado al péptido  
 del marcador libre mediante filtración en gel sobre una columna analítica G3000SW de Toso Haas usando tampón  
 45 de PBS (pH 7,1). Se cuantificó el marcador fluorescente incorporado al péptido usando un detector fluorescente en  
 línea. Tras 2 días, se purificó la mezcla de reacción usando una columna preparativa G3000SW de Toso Haas,  
 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basándose en la absorción UV. Se analizó el producto  
 de la reacción usando análisis SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos suministrados  
 por Invitrogen. Se sometieron a diálisis muestras de G-CSF natural y PEGilado frente a agua, y se analizaron  
 50 mediante MALDI-TOF MS.

**5d. Preparación de G-CSF-(α2,6)-Sialil-PEG**

55 Se disolvió G-CSF, que contenía un GalNAc con unión en O, a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN<sub>3</sub> al  
 0,05 %, pH 7,2. Se incubó la solución con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST6GalNAcI o II a 32 °C  
 durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, se añadió a una pequeña alícuota de la  
 reacción CMP-SA-PEG-ligando fluorescente. Se separó el marcador incorporado al péptido del marcador libre  
 mediante filtración en gel sobre una columna analítica G3000SW de Toso Haas usando tampón de PBS (pH 7,1). Se



cuantificó el marcador fluorescente incorporado al péptido usando un detector fluorescente en línea. Tras 2 días, se purificó la mezcla de reacción usando una columna preparativa G3000SW de Toso Haas, usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basándose en la absorción UV. Se analizó el producto de la reacción usando análisis SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos suministrados por Invitrogen. Se sometieron a diálisis muestras de G-CSF natural y PEGilado frente a agua, y se analizaron mediante MALDI-TOF MS.

Se trató G-CSF producido en células CHO con sialidasa de *Arthrobacter* y luego se purificó mediante exclusión por tamaño en Superdex 75 y se trató con ST3Gal1 o ST3 Gal2, y después con CMP-SA-PEG 20 KDa. La molécula resultante se purificó mediante intercambio iónico y filtración en gel, y el análisis por SDS PAGE demostró que la PEGilación se había completado. Esta fue la primera demostración de glicoPEGilación de glicanos con unión en O.

## EJEMPLO 6

### **GCSF recombinante- Expresión, replegamiento y purificación**

- Se extraen las células por centrifugación, se desecha el sobrenadante. Los resultados de crecimiento en diversos medios se muestran en la Figura 9.
- Se vuelve a suspender el sedimento celular en Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 75 mM, EDTA 5 mM - se usan 10 ml/g (tampón de lisis).
- Se microfluidizan las células (la prensa francesa también funciona).
- Se centrifuga durante 30 min, 4 °C a 5.000 rpm - se desecha el sobrenadante.
- Se vuelve a suspender el sedimento en el tampón de lisis y se centrifuga como antes.
- Se lavan los IB en Tris 25 mM, pH 8, NaCl 100 mM, TX-100 al 1 %, NaDOC al 1 %, EDTA 5 mM. Se vuelven a suspender los sedimentos con la pipeta y el vórtice. Se centrifuga durante 15 min a 4 °C y 5.000 rpm. Se repite esta etapa una vez más (un total de dos lavados).
- Se lavan los sedimentos dos veces en Tris 25 mM, pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM para eliminar los detergentes, y se centrifugan como antes.
- Se vuelven a suspender los sedimentos en H<sub>2</sub>O desionizada para extraer alícuotas y se centrifuga como antes. Se congelan los sedimentos a - 20 °C.
- Se vuelven a suspender los IB a 20 mg/ml en HCl de guanidina 6 M, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM, Tris 100 mM, pH 8, DTT 10 mM usando una pipeta, seguido de la rotación durante 2-4 h a temperatura ambiente.
- Se centrifugan los IB solubilizados durante 1 min a temperatura ambiente a 14.000 rpm. Se guarda el sobrenadante.
- Se diluye el sobrenadante 1:20 con tampón de replegamiento de MES 50 mM, pH 6, NaCl 240 mM, KCl 10 mM, lauril-maltósido 0,3 mM, PEG3350 al 0,055 %, GSH 1 mM, GSSG 0,1 M, arginina 0,5 M, y se vuelve a realizar el plegamiento en un rotador durante la noche a 4 °C.
- Se transfiere el replegamiento a MWCO de 7 kDa snakeskin de Pierce para la diálisis. Tampón de diálisis: NaOAc 20 mM, pH 4, NaCl 50 mM, Tween-80 al 0,005 %, EDTA 0,1 mM. Se realizó la diálisis un total de 3 veces en comparación con al menos un exceso de 200 veces a 4 °C.
- Tras la diálisis se pasa el material a través de un filtro de 0,45 µM.
- Se equilibra la columna de SP-sefarosa con el tampón de diálisis y se aplica la muestra. Se lava la columna con tampón de diálisis y se eluye con tampón de diálisis que contiene un gradiente de sal hasta NaCl 1 M. La proteína normalmente se eluye a NaCl 300-400 mM.
- Se comprueba el material en SDS-PAGE (véase, por ejemplo, la Figura 10).

## EJEMPLO 7

### **El método de dos enzimas en dos recipientes**

El siguiente ejemplo ilustra la preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG en dos etapas secuenciales, en las que cada producto intermedio se purifica antes de usarlo en la siguiente etapa.

#### **7a. Preparación de G-CSF-GalNAc (pH 6,2) a partir de G-CSF y UDP-GalNAc usando GalNAc-T2**

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

Tras 24 h, la MALDI indicó que la reacción se había completado. Se sometió la mezcla de reacción directamente a purificación por HPLC usando SEC (Superdex 75 y Superdex 200) y un tampón de elución que comprendía PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 4,9 y Tween 80 al 0,005 %). Se concentró el pico extraído de G-CSF-GalNAc usando un filtro MWCO de Centricon 5 KDa hasta aproximadamente 150 µl, y se ajustó el volumen hasta 1ml usando PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 4,9 y Tween 80 al 0,005 %). Concentración de proteína

final de 1 mg/ml ( $A_{280}$ ) con un rendimiento del 100 %. La muestra se guardó a 4 °C.

**7b. Preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG usando G-CSF-GalNAc purificado, CMP-SA-PEG (20 KDa) y ST6GalNAc-TI de ratón (pH 6,2).**

Se cambió el tampón de la solución de G-CSF-GalNAc que contenía 1 mg de proteína a tampón de MES 25 mM (pH 6,2,  $\text{NaN}_3$  al 0,005 %), y se añadió CMP-SA-PEG (20 KDa) (5 mg, 0,25  $\mu\text{mol}$ ). Tras disolver, se añadió  $\text{MnCl}_2$  (100  $\mu\text{l}$ , solución 100 mM) y ST6GalNAc-I (100  $\mu\text{l}$ , enzima de ratón) y se agitó lentamente la mezcla de reacción a 32 °C durante tres días. Se concentró la mezcla de reacción por ultrafiltración (MWCO 5 K) y se cambió el tampón con NaOAc 25 mM (pH 4,9) una vez, y luego se concentró hasta 1 ml de volumen total. A continuación, se purificó el producto usando SP-sefarosa (A: NaOAc 25 mM + tween-80 al 0,005 %, pH 4,5; B: NaOAc 25 mM + tween-80 al 0,005 %, pH 4,5 + NaCl 2 M), en el tiempo de retención de 13-18 min y SEC (Superdex 75; PBS-pH 7,2, Tween 80 al 0,005 %) en el tiempo de retención de 8,6 min (superdex 75, caudal de 1 ml/min). Las fracciones deseadas se recogieron, se concentraron hasta 0,5 ml y se conservaron a 4 °C.

**EJEMPLO 8**

**Método de un recipiente para fabricar G-CSF-GalNAc-SA-PEG con la adición simultánea de enzimas**

Los siguientes ejemplos ilustran la preparación de G-CSF-GalNAc-SA-PEG en un recipiente usando la adición simultánea de enzimas.

**8a. Proceso de un recipiente usando ST6GalNAc-I de ratón (pH 6,0).**

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

**8b. Proceso de un recipiente usando ST6GalNAc-I de pollo (pH 6,0).**

Se concentraron 14,4 mg de G-CSF hasta 3 ml de volumen final, se cambió el tampón con tampón de MES 25 mM (pH 6,0,  $\text{NaN}_3$  al 0,05 %, Tween 80 al 0,004 %) y se ajustó el volumen hasta 13 ml. A continuación, se añadieron UDP-GalNAc (90 mg, 150  $\mu\text{mol}$ ), GalNAc-T2 (0,59 U), CMP-SA-PEG-20 KDa (90 mg), ST6GalNAc-I de pollo (0,44 U) y  $\text{MnCl}_2$  100 mM (600  $\mu\text{l}$ ). Reposó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 60 h. A continuación, se concentró la mezcla de reacción usando un UF (MWCO 5 K) y centrifugación. El residuo (aproximadamente 2 ml) se disolvió en tampón de NaOAc 25 mM (pH 4,5) y se volvió a concentrar hasta 5 ml de volumen final. Esta mezcla se purificó usando SP-sefarosa durante aproximadamente 10-23 min, SEC (Superdex 75, 17 min, caudal de 0,5 ml/min) y una SEC adicional (Superdex 200, 23 min, caudal de 0,5 ml/min), hasta un rendimiento de 3,6 mg (rendimiento global del 25 %) de G-CSF-GalNAc-SA-PEG-20 KDa ( $A_{280}$  y método BCA).

**EJEMPLO 9**

**Método de un recipiente para preparar G-CSF-GalNAc-Gal-SA-PEG con adición secuencial de enzimas**

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

**9.1 Partiendo de GalNAc-G-CSF**

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

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

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

Se añadieron directamente UDP-Galactosa (4 mg, 6,5  $\mu\text{mol}$ ), núcleo-1-Gal-T (320  $\mu\text{l}$ , 160 mU), CMP-SA-PEG-20

KDa (8 mg, 0,4  $\mu$ mol), ST3Gal2 (80  $\mu$ l, 0,07 mU) y  $MnCl_2$  100 mM (80  $\mu$ l) a la mezcla de reacción en bruto de G-CSF-GalNAc (1,5 mg) en 1,5 ml de tampón de MES 25 mM (pH 6,0) de la etapa anterior. Se incubó la mezcla resultante a 32 °C durante 60 h. Se centrifugó la mezcla de reacción y se concentró la solución usando ultrafiltración (MWCO 5 K) a 0,2 ml, y luego se volvió a disolver con NaOAc 25 mM (pH 4,5) hasta un volumen final de 1 ml. Se purificó el producto usando SP-sefara (tiempo de retención de 10 a 15 min), se concentró la fracción pico usando un filtro de centrifugación (MWCO 5 K) y se siguió purificando el residuo usando SEC (Superdex 75, tiempo de retención de 10,2 min). Tras la concentración usando un filtro de centrifugación (MWCO 5 K), se diluyó la proteína hasta 1 ml usando tampón de formulación con PBS, manitol al 2,5 %, polisorbato al 0,005 %, pH 6,5, y se formuló a una concentración de proteína de 850  $\mu$ g de proteína por ml ( $A_{280}$ ). El rendimiento total fue del 55 %.

## EJEMPLO 10

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

#### a. A partir de G-CSF

Se concentró G-CSF (960  $\mu$ g, 3,2 ml) por ultrafiltración (MWCO 5 K) y se reconstituyó con tampón de Mes 25 mM (pH 6,0,  $NaN_3$  al 0,005 %). El volumen total de la solución de G-CSF era de aproximadamente 1 mg/ml. Se añadieron UDP-GalNAc (6 mg), GalNAc-T2 (80  $\mu$ l, ~80  $\mu$ U), UDP-Gal (6 mg), Núcleo-GalT (160  $\mu$ l, 80  $\mu$ U), CMP-SA-PEG (20 K) (6 mg) y a 2,3-(O)-sialiltransferasa (160  $\mu$ l, 120  $\mu$ U),  $MnCl_2$  100 mM (40  $\mu$ l). Se incubó la mezcla resultante a 32 °C durante 48 h. La purificación se realizó como se describe a continuación usando IEX y SEC. Se concentraron las fracciones resultantes que contenían el producto, usando ultrafiltración (MWCO 5 K) y se ajustó el volumen hasta aproximadamente 1 ml con tampón. La concentración de proteína resultó ser de 0,392 mg/ml mediante  $A_{280}$ , dando un rendimiento total del 40 % de G-CSF.

## EJEMPLO 11

El siguiente ejemplo ilustra un método enzimático alternativo para obtener grandes cantidades de G-CSF glicoPEGilado.

Se expresó la proteína factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en *E. coli* y se replegó a partir de cuerpos de inclusión según lo desvelado en el Ejemplo X (anterior).

#### 11a. Cebado de la reacción mediante la adición de GalNAc.

Se llevó a cabo la GalNAcilación de G-CSF a 33 °C en tampón de Bis-Tris 50 mM, pH 6,5 que contenía  $MnCl_2$  1 mM usando GalNAcT2 replegada en presencia de UDP-GalNAc. Esta etapa ceba la reacción, permitiendo que la GalNAc transferasa y sialiltransferasa funcionen conjuntamente en etapas posteriores para producir de manera muy eficaz la cantidad máxima de GCSF-PEG en un corto período de tiempo.

#### 11b. Proceso de PEGilación:

La PEGilación se inició 2 ( $\pm$ 1) horas después de la GalNAcilación añadiendo directamente CMP-SA-PEG (20 K) y ST6GalNAc (de pollo o humana) a la reacción de cebado. Esta etapa produce sustrato (GCSF-O-GalNAc) para que las sialiltransferasas dirijan la reacción más rápido en un período más corto de tiempo de lo que se consigue en una reacción de dos etapas en la que la GCSF-O-GalNAc se purifica primero a partir de UDP-GalNAc y otros componentes de reacción (véase, por ejemplo, Ejemplo X anterior). Además, la reacción de cebado en un solo recipiente produce un rendimiento más alto de producto que una reacción en un solo recipiente en la que todos los componentes se añaden simultáneamente.

De hecho, la comparación de varios tipos de reacciones de un solo recipiente muestra que cuando todos los componentes se añadieron simultáneamente y se incubó durante 23 horas, el GCSF-PEG producido fue del 77 %. Por el contrario, cuando la adición de todas las enzimas necesarias para la reacción de PEGilación se realizó mediante la etapa de GalNAcilación de 2 h descrita anteriormente, el rendimiento del producto fue del 85 %. Por lo tanto, la adición secuencial de los componentes de reacción produjo un rendimiento un 10 % superior al obtenido cuando todos los componentes de reacción se añadieron simultáneamente.

## EJEMPLO 12

El presente ejemplo describe los resultados de la GalNAcilación con unión en O de seis proteínas G-CSF mutantes.

#### 12. 1. GalNAcilación de proteína G-CSF mutante:

A continuación, se enumeran todas las secuencias de las proteínas G-CSF mutantes. Con estas proteínas, se examinó la glicosilación con unión en O. En las mismas condiciones para la glicosilación de G-CSF natural, se usó

GalNAc-T<sub>2</sub> (BV) *in vitro* con UDP-GalNAc en tampón de MES 25 mM (pH 6,0). Se usó la MALDI para controlar la reacción. La medición del peso molecular creciente de las proteínas proporcionó el número de adición de GalNAc. Para una adición de GalNAc, el peso molecular aumentado debe ser de 203 Da. Basándose en los resultados de MALDI, se encontró que el G-CSF-2, -3, -4 mutante aceptó una GalNAc; y también se observó alguna adición para G-CSF-5 mutante, y el G-CSF-1 mutante aceptó dos GalNAc, formando MAPT-G-CSF(GalNAc)<sub>2</sub> (aumento del peso molecular de 18.965 a 19.369 Daltons).

**Tabla X. Adición de GalNAc de G-CSF mutante (PM medido por MALDI)**

Péptido	PM (material intacto)	PM (aducto de GalNAc)	N.º de adición de GalNAc
G-CSF-1 mutante (MAPT-G-CSF)	18.965	19.369	2
G-CSF-2 mutante	18.766	19.029	1
G-CSF-3 mutante	18.822	19.026	1
G-CSF-4 mutante	19.369	19.574	1
G-CSF-5 mutante	18.957	18.853	1
G-CSF-6 mutante			NT
G-CSF natural	18.800	19.023	1

Se usaron el mapeo de péptidos y el análisis N-terminal para la determinación de los sitios de glicosilación de MAPT-G-CSF(GalNAc)<sub>2</sub>. En el mapeo del péptido digerido con Glu C, se encontró un pico en G-1+GalNAc, lo que indica la adición de una GalNAc a la secuencia G-1. El análisis de degradación de Edman N-terminal sugirió la T normal se había perdido, indicando la adición de GalNAc en el resto de T.

## 12.2 GlicoPEGilación de secuencias de G-CSF mutante

### a. GlicoPEGilación de secuencia de G-CSF mutante e impacto del tampón en la glicoPEGilación de MAPT-G-CSF

Se realizó un examen de glicoPEGilación (20 K) de 5 mutantes. La glicoPEGilación se realizó usando un sistema de tres enzimas/tres nucleótidos. (UDP-GalNAc/GalNAc-T<sub>2</sub>/UDP-Gal/Núcleo GalT/CMP-SA-PEG/O-sialiltransferasa) en tampón de MES 25 mM (pH 6,0). Todos los mutantes se pueden monoglicoPEGilar. No se detectó diPEGilación apreciable en estas condiciones mediante gel de SDS-PAGE gel por tinción con azul de Coomassie.

Dado que MAPT-G-CSF acepta dos GalNAc, en teoría, dicho mutante debería recibir dos PEG. Por consiguiente, se examinó el impacto del tampón sobre la PEGilación de MAPT-G-CSF como material de partida. Para esta reacción, se examinaron cuatro tampones diferentes (1. tampón de MES 1 M; 2. tampón de MES 25 mM (pH 6,0); 3. tampón de Bis-tris 50 mM (pH 6,0); 4. tampón de HEPS 1 M (pH 7,4). Se encontró que MAPT-G-CSF se puede PEGilar en todo el sistema de tampones ensayado. Sin embargo, el producto de la monoPEGilación seguía siendo importante. En caso de usarse tampón MES 1 M y HEPS 1 M, se formó algún producto de diPEGilación, lo que indica que la alta concentración de tampón mejora la glicoPEGilación.

### b. Comparación de la eficacia de glicoPEGilación mediante la formación de MAPT-G-CSF(GalNAc-SA-PEG)<sub>2</sub> y MAPT-G-CSF(GalNAc-Gal-SA-PEG)<sub>2</sub>

Para ver la eficacia de la glicoPEGilación de G-CSF-1 mutante catalizado por diferentes enzimas, se examinaron dos enzimas (St<sub>6</sub>GalNAcI y O-sialiltransferasa) para determinar la sialilPEGilación. Por consiguiente, MAPT-G-CSF se convirtió en MAPT-G-CSF(GalNAc)<sub>2</sub> y MAPT-G-CSF(GalNAc-Gal)<sub>2</sub> para la sialilPEGilación. Se trató la primera con CMP-SA-lis-PEG(20 K)/St<sub>6</sub>GalNAc I, y la segunda se trató con CMP-SA-PEG(20 K)/O-sialiltransferasa. Ambas reacciones se realizaron en tampón de MES 25 mM(pH 6,0) y 1 mg/ml de concentración de proteína. La eficacia de la PEGilación se puede observar en gel e SDS-PAGE. Pareció que dos enzimas eran muy similares en la glicoPEGilación de esta proteína usando CMP-SA-Lis-PEG (20 KDa) en las condiciones ensayadas.

### c. La concentración alta de proteína condujo a la formación de MAPT-G-CSF((GalNAc-SA-PEG(20KDa))<sub>2</sub> como producto principal

Tras examinar el impacto de la enzima y del tampón en la glicoPEGilación, como se ha descrito anteriormente, se examinó la influencia de la concentración de proteína en la PEGilación mediante la combinación con un factor de alta concentración de tampón usando St<sub>6</sub>GalNAcI como enzima de glicoPEGilación. Por lo tanto, se aplicaron UDP-GalNAc/GalNAc-T<sub>2</sub> y CMP-SA-PEG(20 KDa)/St<sub>6</sub>GalNAcI para la glicoPEGilación de MAPT-G-CSF usando 8-10 mg/ml de concentración de proteína para la reacción en tampón MES 1 M (pH 6,0). El resultado sugirió que, en

estas condiciones, el producto de diPEGilación deseado se convirtió en el principal. También se alcanzó una conversión superior al 90 % mediante la aplicación de más CMP-SA-PEG (20 K) y enzima. Se purificó el producto de G-CSF PEG-ilado, MAPT-G-CSF((GalNAc-SA-PEG(20KDa))<sub>2</sub>) mediante la combinación de purificación en SP-Sefarosa y SEC sobre Superdex 200.

### 12.3. Actividad de proliferación celular de MAPT-G-CSF-(GalNAc-SA-PEG)<sub>2</sub>

Se realizó el ensayo de proliferación celular de MAPT-G-CSF-(GalNAc-SA-PEG)<sub>2</sub> con la línea celular NFS-60 y la línea celular Tf-1. El ensayo se realizó usando la concentración de proteína de entre 0 ng/ml y 1.000 ng/ml. MAPT-G-CSF(GalNAc-SA-PEG(20K))<sub>2</sub> fue activo en dicho ensayo.

### 12.4 Detalles experimentales

#### 12.4a Procedimiento general de GalNAcilación de G-CSF mutante

Se cambió el tampón de un cierto volumen de solución de G-CSF mutante (para 100 ug de proteína) con tampón MES (25 mM + NaN<sub>3</sub> al 0,005 %, pH 6,0). Se ajustó el volumen final a 100 ug/100 ul. A dicha solución, se añadieron 5 ul de MnCl<sub>2</sub> 100 mM y GalNAc-T<sub>2</sub> (1 mU). Se agitó la mezcla resultante a TA durante un periodo de tiempo necesario para el análisis de MALDI o QTOF.

#### 12.4b Preparación de MAPTP-G-CSF-(GalNAc)<sub>2</sub>

Se cambiaron 5,4 mg de MAPTP-G-CSF (KJ-675-159, 0,18 mg/ml, 0,053 umol) con tampón MES (25 mM + NaN<sub>3</sub> al 0,005 %, pH 6,0). Se ajustó el volumen final a 5,4 ml. A dicha solución, se añadieron UDP-GalNAc (5 mg, 0,15 umol), MnCl<sub>2</sub> 100 mM y 0,25 ml de GalNAc-T<sub>2</sub> (1,0 U/ml, 50 ul). Se agitó la mezcla resultante a 32 °C durante 24 h. M<sup>+</sup> (MALDI): 19364 (MAPT-G-CSF-(GalNAc)<sub>2</sub>) frente a 18951 (MVPTP-G-CSF).

#### 12.4c Procedimiento general de glicoPEGilación de secuencias de G-CSF mutantes mediante reacción en un solo recipiente

Se mezclaron 100 ug de G-CSF (G-CSF-1,2,3,4,5 mutante) con UDP-GalNAc (0,6 mg, 0,923 umol), GalNAc-T<sub>2</sub> (20 ul, 8 mU), UDP-Gal (0,6 mg, 0,923 umol), Núcleo 1 Gal T (20 ul, 10 mU), CMP-SA-PEG(20 K) (1 mg, 0,05 umol), St<sub>3</sub>GallI (20 ul, 28 mU), MnCl<sub>2</sub> 100 mM 3 ul en 100 ul de tampón MES 25 mM (pH 6,0 + NaN<sub>3</sub> al 0,005 %). Se agitó la mezcla resultante a TA durante 24 h. La glicoPEGilación se siguió mediante SDS-PAGE.

#### 12.4d Comparación de glicoPEGilación de G-CSF-1 mutante (20 KDa) en sistema de diversos tampones

Se cambió el tampón de GalNAc<sub>2</sub>-MATP-G-CSF (54 ug) al siguiente sistema de cuatro tampones (1. tampón de MES 1 M; 2. tampón de MES 25 mM (pH 6,0); 3. tampón de Bis-tris 50 mM (pH 6,0); 4. tampón de HEPS 1 M (pH 7,4). A continuación, se añadieron CMP-SA-PEG (20 K) (216 ug), ST<sub>6</sub>GalNAcI (BV, 1 U/ml, 2,5 ul), 2,5 ul de MnCl<sub>2</sub> 100 mM. Se agitó la mezcla resultante a TA durante 24 h. Se usó el gel de SDS-PAGE para seguir la reacción.

#### 12.4e Comparación de GlicoPEGilación de MAPT-G-CSF mediante el uso de ST<sub>6</sub>GalNAc<sub>i</sub> y O-sialiltransferasa (Wang787-29 y 787-40)

##### 12.4e1 Usando St<sub>6</sub>GalNAc I

Primera etapa: se concentraron 30 ml de solución de KJ-675-159 (0,18 mg/ml, 5,4 mg de proteína en total) por ultrafiltración (MWCO 5 K) a 3500 g, y luego se cambió el tampón con tampón de MES 25 mM (pH 6,0). Se ajustó el volumen final a 5,4 ml en un tubo de plástico. Se añadió GalNAc-T<sub>2</sub> (1,0 U /ml, 50 ul), seguida de la adición de 0,25 ml de MnCl<sub>2</sub>. Se agitó la mezcla resultante a TA durante 24 h. La MALDI sugirió que la reacción se había completado. Se concentró la mezcla de reacción por UF (MWCO 5 K) y se diluyó con tampón de MES 25 mM hasta 5 ml, y luego se añadieron CMP-SA-PEG(20 K) (2 x 25 mg), ST<sub>6</sub>GalNAc, (BV, 1 U/ml), 0,25 ml de MnCl<sub>2</sub> 100 mM. Se agitó la mezcla resultante a 32 °C durante una noche. Para la reacción, se usó SDS-PAGE.

##### 12.4e2 Usando O-sialiltransferasa(St<sub>3</sub>GallI):

Se mezclaron 200 ug de GalNAc<sub>2</sub>-MATP-G-CSF en 200 ul de tampón de MES 25 mM (pH 6,0) con 0,6 mg de UDP-Gal y núcleo GalT (0,2 U/ml, 10 ul) y 10 ul de MnCl<sub>2</sub> 100 mM. Se agitó la mezcla resultante a 32 °C durante 24 h. Se concentró la mezcla de reacción mediante UF (MWCO 5 K) y se diluyó con tampón de MES 25 mM a 200 ul. Se añadieron CMP-SA-PEG (800 ug), St<sub>3</sub>GallI (1,0 U/ml, 10 ul), 10 ul de MnCl<sub>2</sub> 100 mM. Se agitó la mezcla resultante a TA durante 24 h. Se agitó la mezcla resultante a 32 °C durante una noche. Para seguir la reacción, se usó gel de SDS-PAGE.

12.4f MAPTP-G-CSF-(GalNAc-SA-PEG(20 K)<sub>2</sub>) de la glicoPEGilación de MAPT-G-CSF-(GalNAc)<sub>2</sub> (Wang 787-42)

Se concentró solución de MAPTP-G-CSF (540 ug) y se cambió con tampón de MES 1 M (pH 6,0) y se ajustó hasta 50 ul. A continuación, se añadieron UDP-GalNAc (100 ug, 0,15 umol, 5 eq), GalNAcT<sub>2</sub> (5,0 U/ml, 5 ul) y MnCl<sub>2</sub> 100 mM (5 ul). Se agitó la mezcla resultante a TA durante una noche. A continuación, se añadieron CMP-SA-PEG (20K) (2,16 mg, 0,108 umol) y St<sub>6</sub>GalNAcI (1,0 U/ml, 50 ul). Se agitó la mezcla resultante a TA durante 60 h. Se añadieron más CMP-SA-PEG(20 K) (2,16 mg, 0,108 umol) y St<sub>6</sub>GalNAcI (1,0 U/ml, 50 ul), seguido de la rotación lenta a TA durante 24 h. Se cambió la mezcla de reacción con tampón A (NaOAc 25 mM, polisorbato 80 al 0,005 %, pH 4,5), luego se purificó en una columna de SP-FF de Amersham (5 ml) con una elución isocrática de A al 100 % durante 10 minutos seguida por un gradiente lineal de A al 100 % a B al 20 % durante 20 minutos a un caudal de 3 ml min<sup>-1</sup>, en el que B = NaOAc 25 mM, NaCl 2 M, polisorbato 80 al 0,005 %, pH 4,5. Se combinó el pico del tiempo de retención de 17 min y se concentró hasta 0,5 ml, que se purificó adicionalmente en una Superdex 200 HiLoad de Amersham (16 x 600 mm, 34 μm) con solución salina tamponada con fosfato, pH 5,0, Tween 80 al 0,005 %, a un caudal de 0,4 ml min<sup>-1</sup>. Se combinaron las fracciones de producto en el tiempo de retención de 160 min, se concentraron hasta proporcionar 30 ug de MAPT-G-CSF(GalNAc-SA-PEG(20 K)<sub>2</sub>)(BCA). El rendimiento no se optimizó.

## 12.4 g Secuencias de G-CSF mutantes

20 **G-CSF-1 mutante:**

MAPTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHEPEELVLLGHSL  
GIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAD  
  
FATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVL  
RHLAQP (SEC ID n.º 9)

25 **G-CSF-2 mutante:**

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHEPEELVLLGHSLGIP  
WAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFAT  
TIWQQMEELGMAPATQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHL  
AQP (SEC ID n.º)

30 **G-CSF-3 mutante:**

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHEPEELVLLGHSLGIP  
WAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFAT  
TIWQQMEELGMAPALQPTQTAMPAPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHL  
AQP (SEC ID n.º)

35 **G-CSF-4 mutante (marcador C-terminal):**

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHEPEELVLLGHSLGIP  
WAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFAT  
TIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRLHL  
AQPTQGAMP (SEC ID n.º 8)

**G-CSF-5 mutante (MIATP N-terminal):**

MIATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLKATYKLCHEPEELVLLGHSLG  
IPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADF  
ATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLR  
HLAQP (SEC ID n.º 10)

**G-CSF-6 mutante (177 Mer):**

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLKATYKLCHEPEELVLLGHSLG  
LGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVA  
DFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRV  
LRHLAQP (SEC ID n.º 1)

**G-CSF recombinante humano expresado en *E. coli*:**

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLKATYKLCHEPEELVLLGHSLGIP  
WAPLSSCPSQALQLAGCLSLSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDYADFAT  
TIWQQMEELGMAPALQPT<sup>134</sup>QGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLR  
HLAQP (SEC ID n.º 2)

**EJEMPLO 13 (Ejemplo de referencia)**

El siguiente ejemplo ilustra la preparación de una proteína hGH GlicoPEGilada. La hGH de tipo silvestre no tiene sitio de glicosilación natural, por lo tanto, se diseñó un sitio de O-glicosilación *de novo* en una proteína hGH mutante que luego se iba a glicosilar con una GalNAc transferasa y sialilPEGilar en el sitio mutante. Se diseñaron cinco proteínas hGH mutantes para incorporar un sitio de O-glicosilación, ya sea en el extremo amino o en la región del bucle de la molécula de proteína. Se produjeron las cinco proteínas mutantes, y cada una se ensayó para determinar la actividad de hGH en un ensayo de proliferación de células Nb2-11.

**13. 1 Secuencia de aminoácidos de hGH mutante:**

**hGH derivada de la pituitaria de 192 aminoácido de tipo silvestre que comprende metionina N-terminal**

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDQYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNP  
QTSLSFSESIPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDS  
NVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYC  
FRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEC ID n.º)

**hGH derivada de la pituitaria de 192 aminoácido de tipo silvestre que carece de metionina N-terminal**

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDQYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQ  
TSLCFSESIPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSN  
VYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCF  
RKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEC ID n.º)

**MVTP mutante:**

(M)VTPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFL  
QNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGA  
SDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGL  
LYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEC ID n.º)

**PTOGAMP mutante:**

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNP  
QTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDS  
NVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPTOGAMPKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLY  
CFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEC ID n.º)

5

**TTT mutante:**

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNP  
QTSLCrSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDS  
NVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPTTTQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYC  
FRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEC ID n.º)

10

**MAPT mutante:**

MAPTSSPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSF  
LQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYG  
ASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYG  
LLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEC ID n.º)

**NTG mutante:**

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNP  
QTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDS  
NVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPNTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLY  
CFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

15

Se ensayaron las cuatro hGH mutantes para determinar la capacidad de actuar como sustratos para la glicosiltransferasa GalNAcT2. De las cuatro hGH mutantes, dos resultaron ser glicosiladas por GalNAcT2 mediante análisis de MALDI-MS.

20

**13.2 Preparación de hGH-(TTT)-GalNAc-SA-PEG-30 KDa.**

Para TTT mutante, la adición de GalNAc dio lugar a una mezcla compleja de especies 1-GalNAc y 2-GalNAc sin glicosilar. Los experimentos de mapeo de péptidos (digestión con tripsina) mostraron que las dos GalNAc se añadieron al péptido T12 (L129-K141) que contenía la mutación TTT. El (M)VTP mutante solo mostró un rastro de GalNAc añadida por MALDI-MS.

25

Se cambió el tampón de hGH-TTT mutante (4,0 ml, 6,0 mg, 0,27 µmol) dos veces con 15 ml de tampón de lavado (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,02%, pH 7,4) y una vez con tampón de reacción (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,02%, pH 7,4), y luego se concentró hasta 2,0 ml usando un filtro de centrifugación Centricon, de 5 KDa MWCO.

30

Se combinó el hGH-TTT mutante con UDP-GalNAc (1,38 µmol, 0,90 mg) y GalNAc-T2 (0,12 ml, 120 mU). Se incubó la reacción a 32 °C con agitación suave durante 19 horas. Se analizó la reacción por MALDI-MS, y se observó la



5 adición parcial de GalNAc al hGH-TTT mutante (aproximadamente el 40 %). Se añadieron CMP-SA-PEG-30 K (16 mg, 0,533  $\mu$ mol) y ST6GalNAc1 (0,375 ml, 375 mU) a la mezcla de reacción para llevar el volumen total hasta 2,85 ml. Se incubó la reacción a 32 °C con agitación suave durante 22 h. La reacción se controló por SDS-PAGE a las 0 h y 22 h. Se determinó la extensión de la reacción mediante gel de SDS-PAGE. Se purificó el producto, hGH(TTT)-GalNAc-SA-PEG-30 KDa, usando SP Sefarosa y se analizó mediante SDS-PAGE. Se observó muy bajo rendimiento del hGH-(TTT)-GalNAc-SA-PEG-30 kDa deseado.

### 13.3 Preparación de hGH-(PTQGAMP)-GalNAc-SA-PEG-30 kDa

10 Se glicosiló fácilmente la PTQGAMP mutante con UDP-GalNAc y GalNAc T2, luego se glicoPEGiló usando CMP-SA-PEG-30k Da y ST6GalNAc1 en la escala de 10 mg para dar 1,45 mg de hGH-(PTQGAMP)-GalNAc-SA-PEG-30 kDa purificado. Los experimentos de mapeo de péptidos (digestión con tripsina) localizaron la GalNAc sobre el péptido tripsina T12 (L129-K141) que contenía la mutación PTQGAMP.

15 Se cambió el tampón de hGH-PTQGAMP-mutante (4,55 ml, 10,0 mg, 0,45  $\mu$ mol) dos veces con 15 ml de tampón de lavado (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,02%, pH 7,4) y una vez con tampón de reacción (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, MnCl<sub>2</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,02%, pH 7,4, y después se concentró hasta 3 ml usando un filtro de centrifugación Centricon, 5 KDa MWCO.

20 Se combinó el hGH-PTQGAMP mutante con UDP-GalNAc (2,26  $\mu$ mol, 1,47 mg) y GalNAc-T2 (0,1 ml, 100 mU). Se incubó la reacción a 32 °C con agitación suave durante 22 horas. Se analizó la reacción por MALDI-MS, y se observó la adición completa de GalNAc al hGH-PTQGAMP mutante. Se añadieron CMP-SA-PEG-30 K (27 mg, 0,9  $\mu$ mol) y ST6GalNAc1 (0,350 ml, 350 mU) a la mezcla de reacción para llevar el volumen total hasta 3,4 ml. Se incubó la reacción a 32 °C con agitación suave durante 24 h. La reacción se controló por SDS-PAGE a las 0 h y 25 16,5 h. Se determinó la extensión de la reacción mediante gel de SDS-PAGE. Se purificó el producto, hGH(PTQGAMP)-GalNAc-SA-PEG-30 KDa, usando cromatografía de SP Sefarosa y SEC (Superdex 200), y luego se formuló. El producto final se analizó por MALDI, mapeo de péptidos y SDS-PAGE (tinción de plata). La proteína se determinó mediante BCA frente a patrón de BCA. El rendimiento aislado total (1,45 mg) fue del 12,5% basado en proteína.

### 30 EJEMPLO 14 (Ejemplo de referencia)

El presente ejemplo expone la preparación de un glicoconjugado de GM-CSF PEG de la invención.

#### 35 14. 1 Preparación de (PEG (20 K)-SA-Gal-GalNAc)<sub>2</sub>-GM-CSF y PEG (20 k)-SA-Gal-GalNAc-GM-CSF

Se disolvió GM-CSF (1 mg) en tampón de MES 25 mM (1 ml) (pH 6,0, NaN<sub>3</sub> al 0,005 %), y luego se añadieron UDP-GalNAc (1 mg), GalNAc-T<sub>2</sub> (200  $\mu$ l, 0,38 U/ml, 0,076 U), MnCl<sub>2</sub> 100 mM (80  $\mu$ l). Se incubó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 72 h. La MALDI indicó la formación de GalNAc<sub>2</sub>-GM-CSF.

40 Se añadieron UDP-Gal (6 mg, 9,8 mmol), núcleo-1-Gal-T<sub>1</sub> (0,5 U/ml, 80  $\mu$ l), CMP-SA-PEG (20 kilodalton) (6 mg, 0,3  $\mu$ mol),  $\alpha$ -(O)-sialiltransferasa (1 U/ml, 120  $\mu$ l), MnCl<sub>2</sub> 100 mM (50  $\mu$ l). La mezcla de reacción se centrifugó lentamente a 32 °C durante 48 h. La mezcla de reacción se centrifugó a 2 rpm durante 5 min. Se extrajo la solución de proteína. Se mezcló la resina restante con 1 ml de tampón de MES 25 mM (pH 6,0) y se hizo vibrar durante 30 s. 45 Se concentró la suspensión de nuevo; se combinaron las soluciones de proteína y se concentraron hasta 200  $\mu$ l. La purificación por HPLC proporcionó GM-CSF glico-PEGilado.

### EJEMPLO 15 (Ejemplo de referencia)

50 Es posible incorporar un sitio de glicosilación con unión en O similar al del interferón  $\alpha$ -2 a cualquier proteína interferón  $\alpha$  en la misma posición relativa. Esto se puede realizar mediante la alineación de la secuencia de aminoácidos de interés con la secuencia de IFN- $\alpha$ -2b (10-20 aminoácidos de longitud) y la modificación de la secuencia de aminoácidos para incorporar el sitio de glicosilación. Para crear el sitio, se puede usar la mutación con cualquier aminoácido, de eliminación o inserción. Los mutantes ilustrativos mantienen tanta homología como es posible con la secuencia de IFN- $\alpha$ -2 en esta región, con énfasis en la T de la posición 106 (mostrada a continuación en negrita). A continuación, se muestra un ejemplo de cómo se realiza esto.

Alineaciones de interferón  $\alpha$  en la base de datos de proteínas de NCBI

n.º GI	n.º aa	Secuencia de aa	Nombre
IFN-a-2 $\beta$	1	CVIQGVGVGTETPLMKEDSIL 20	(SEC ID n.º X)
124449	98	..... 117	IFN- $\alpha$ 2(a,b,c)
20178265	99	...E...E....N.... 118	IFN- $\alpha$ 14
124453	99	...E...E....N.... 118	IFN- $\alpha$ 10
585316	99	...E..ME....N.... 118	IFN- $\alpha$ 17
124442	99	...E...E....N..F.. 118	IFN- $\alpha$ 7
124438	99	...E...E....NV.... 118	IFN- $\alpha$ 4
417188	99	..M.E...I.S...Y.... 118	IFN- $\alpha$ 8
20178289	99	...E...E....NV.... 118	IFN- $\alpha$ 21
124457	99	..MM.E...ED....NV.... 118	IFN- $\alpha$ 5
124463	99	..T.E...E.IA..N.... 118	IFN- $\alpha$ 16
124460	99	..M.E.W.GG....N.... 118	IFN- $\alpha$ 6
124455	99	..M.EER.G....NA.... 118	IFN- $\alpha$ 1/13

5 La glicosilación/glico-PEGilación se produce en T<sup>106</sup> (IFN- $\alpha$ -2). La numeración de las proteínas comienza con el primer aminoácido posterior a la eliminación de la secuencia líder de la proteína de la forma pre-pro expresada de forma natural.

10 Mutaciones del interferón  $\alpha$  para introducir sitios de glicosilación con unión en O en los IFN- $\alpha$  que carecen de este sitio.

n.º GI	n.º aa	Secuencia de aa	Nombre
IFN-a-2 $\beta$	1	CVIQGVGVGTETPLMKEDSIL 20	(SEC ID n.º X)
124449	98	..... 117	IFN- $\alpha$ 2 (a, b, c)
20178265	99	...E...T....N.... 118	IFN- $\alpha$ 14 (E <sup>107</sup> T)
20178265	99	...G...T....N.... 118	IFN- $\alpha$ 14 (E <sup>103</sup> G; E <sup>107</sup> T)
124453	99	...E...T....N.... 118	IFN- $\alpha$ 10 (E <sup>107</sup> T)
124453	99	...G...T....N.... 118	IFN- $\alpha$ 10 (E <sup>103</sup> G; E <sup>107</sup> T)
585316	99	...E..MT....N.... 118	IFN- $\alpha$ 17 (E <sup>107</sup> T)
585316	99	...E..VT...N.... 118	IFN- $\alpha$ 17 (ME <sup>107</sup> VT)
585316	99	...G..MT....N.... 118	IFN- $\alpha$ 17 (E <sup>103</sup> G; E <sup>107</sup> T)
124442	99	...E...T....N..F.. 118	IFN- $\alpha$ 7 (E <sup>107</sup> T)
124442	99	...G...T....N..F.. 118	IFN- $\alpha$ 7 (E <sup>103</sup> G; E <sup>107</sup> T)
124438	99	...E...T....NV.... 118	IFN- $\alpha$ 4 (E <sup>107</sup> T)
124438	99	...G...T....NV.... 118	IFN- $\alpha$ 4 (E <sup>103</sup> G; E <sup>107</sup> T)
417188	99	..M.E...T.S...Y.... 118	IFN- $\alpha$ 8 (I <sup>107</sup> T)
417188	99	..M.G...T.S...Y.... 118	IFN- $\alpha$ 8 (E <sup>103</sup> G; I <sup>107</sup> T)
20178289	99	...E...T....NV.... 118	IFN- $\alpha$ 21 (E <sup>107</sup> T)
20178289	99	...G...T....NV.... 118	IFN- $\alpha$ 21 (E <sup>103</sup> G; E <sup>107</sup> T)
124457	99	..MM.E...TD....NV.... 118	IFN- $\alpha$ 5 (E <sup>107</sup> T)
124457	99	..MM.E...TE....NV.... 118	IFN- $\alpha$ 5 (ED <sup>108</sup> TE)
124457	99	..MM.G...TD....NV.... 118	IFN- $\alpha$ 5 (E <sup>103</sup> G; E <sup>107</sup> T)
124463	99	..T.E...T.IP..N.... 118	IFN- $\alpha$ 16 (E <sup>107</sup> T;A <sup>110</sup> P)
124463	99	..T.E...T.TP..N.... 118	IFN- $\alpha$ 16 (E <sup>107</sup> T;IA <sup>110</sup> TP)

ES 2 560 657 T3

124463	99	..T.G...T.TP..N..... 118	IFN- $\alpha$	16 (E <sup>103</sup> G;E <sup>107</sup> T; IA <sup>110</sup> TP)
124460	99	..M.E.W.TG....N..... 118	IFN- $\alpha$	6 (G <sup>107</sup> T)
124460	99	...M.E.G.TG....N..... 118	IFN- $\alpha$	6 (W <sup>105</sup> G;G <sup>107</sup> T)
124460	99	..M.G.G.TE....N..... 118	IFN- $\alpha$	6 (E <sup>103</sup> G; W <sup>105</sup> G; GG <sup>108</sup> TE)
124455	99	..M.EER.T.....NA.... 118	IFN- $\alpha$	1/13 (G <sup>107</sup> T)
124455	99	..M.EEG.T.....NA.... 118	IFN- $\alpha$	1/13 (R <sup>105</sup> G;G <sup>107</sup> T)
124455	99	..M.GVG.T.....NA.... 118	IFN- $\alpha$	1/13 (EER <sup>105</sup> GVG;G <sup>107</sup> T)

Los números GI de la tabla anterior, a excepción del primer número 124449, se refieren a los de las proteínas de tipo silvestre no modificadas.

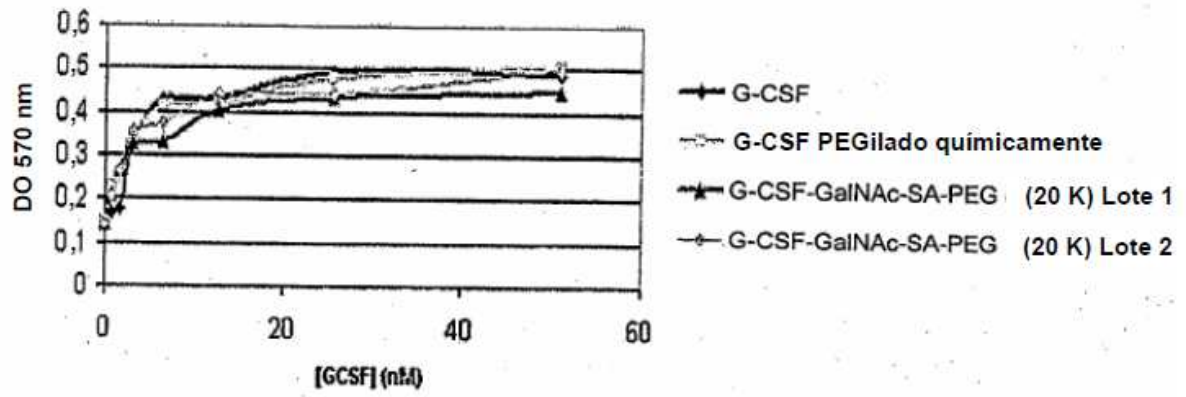
5

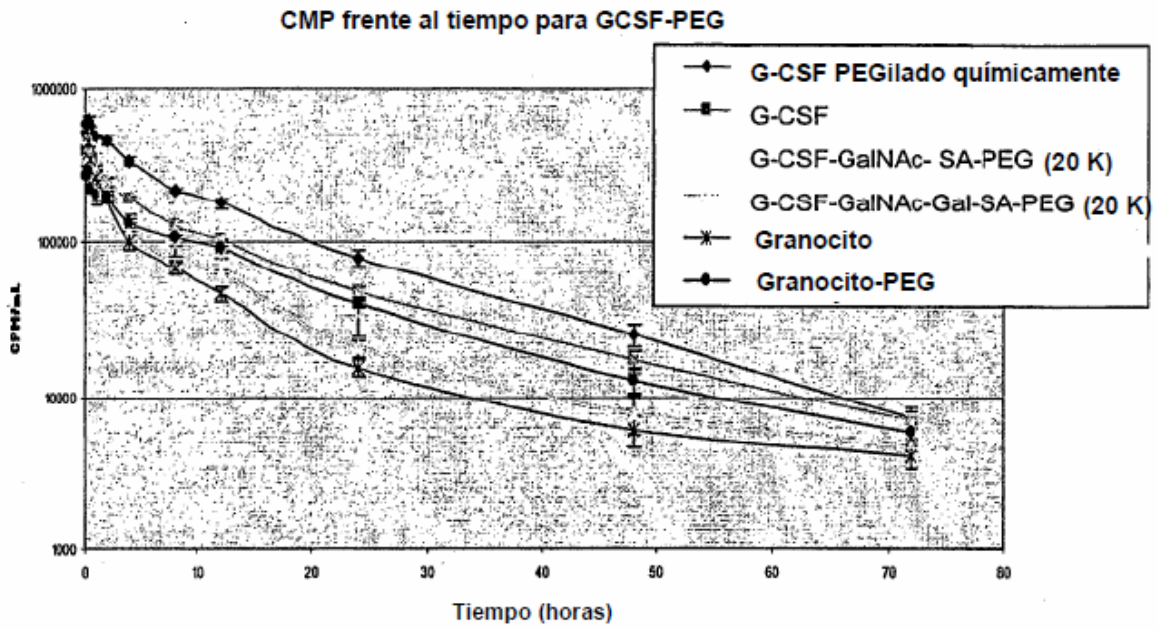
El sitio de glicosilación con unión en O se puede crear en cualquier isoforma de interferón  $\alpha$  mediante la colocación de un T o S en el sitio de aminoácido apropiado, como se ha mostrado anteriormente. La sustitución es T como se muestra en la tabla anterior. Las secuencias de aminoácidos entre las diversas formas de interferón  $\alpha$  son similares. Se puede realizar cualquier mutación, inserción, eliminación en dicha región siempre que el T o S se encuentre en la posición apropiada para la glicosilación/glico-PEGilación con respecto a P<sup>109</sup> (IFN- $\alpha$ -2) en la secuencia de alineación mostrada anteriormente.

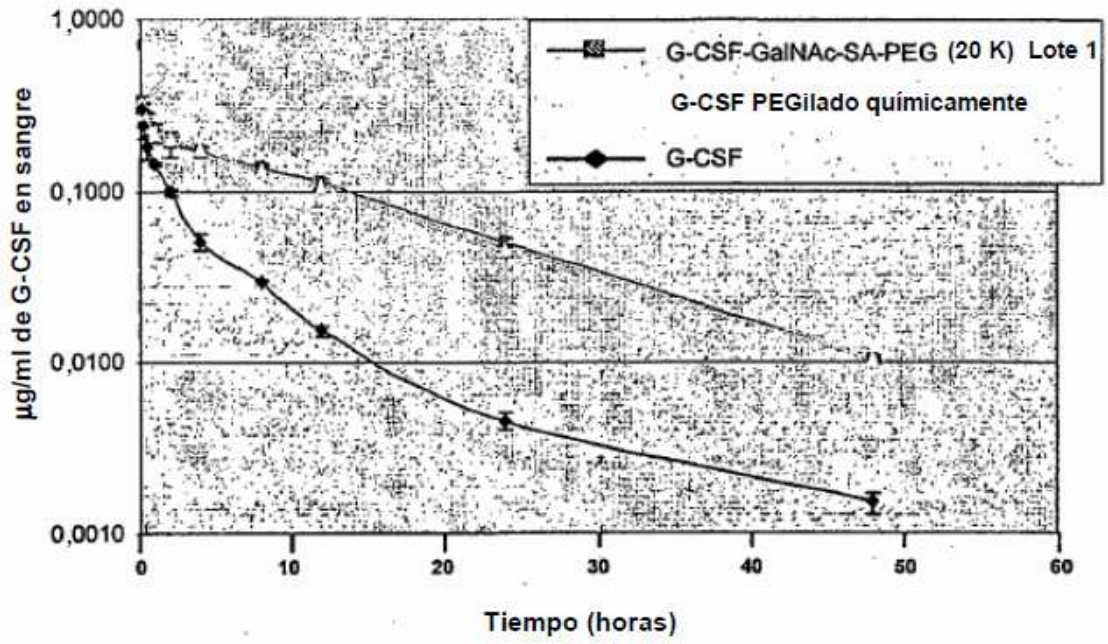
10

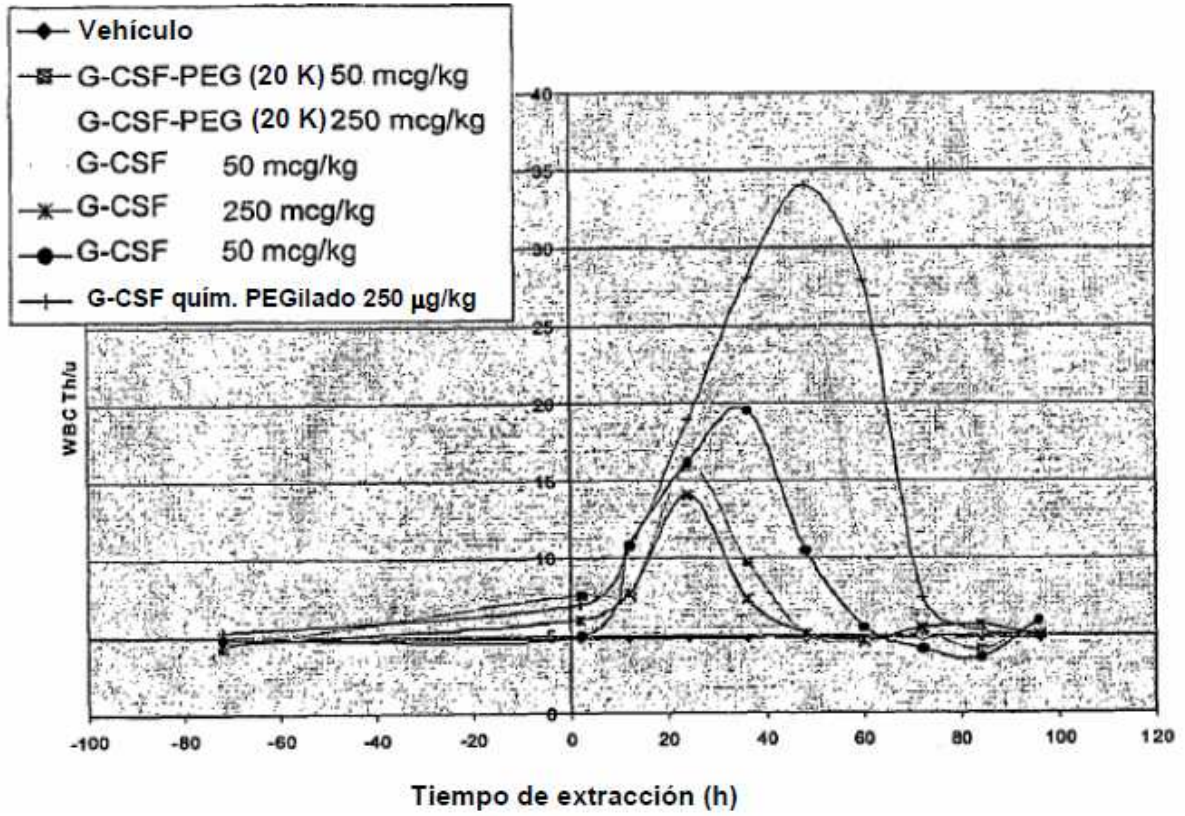
## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido G-CSF aislado que comprende una secuencia de péptido mutante, en el que la secuencia de péptido mutante codifica un sitio de glicosilación con unión en O que no existe en un polipéptido de tipo silvestre correspondiente al polipéptido aislado, en donde la secuencia de péptido mutante se selecciona del grupo que consiste en MVTPLGP, MQTPLGP, MIATPLGP, MATPLGP, MPTQGAMPLGP, MVQTPLGP, MQSTPLGP, MGQTPLGP, MAPTSSSPLGP y MAPTPLGPA, o en donde la secuencia de péptido mutante se selecciona del grupo que consiste en MTPTLGP, MTPTQLGP, MTPTSLGP, MTPTQGP, MTPTSSP, M<sup>1</sup>TPQTP, M<sup>1</sup>TPTGP, M<sup>1</sup>TPLTP, M<sup>1</sup>TPNTGP, MTPLGP, M<sup>1</sup>TPVTP, M<sup>1</sup>TPMVTP y MT<sup>1</sup>P<sup>2</sup>TQGL<sup>3</sup>G<sup>4</sup>P<sup>5</sup>A<sup>6</sup>S<sup>7</sup>, o en donde la secuencia de péptido mutante se selecciona del grupo que consiste en P<sup>129</sup>ATQPT, P<sup>129</sup>TLGPT, P<sup>129</sup>TQGPT, P<sup>129</sup>TSSPT, P<sup>129</sup>TQGAPT, P<sup>129</sup>NTGPT, PALQPTQT, P<sup>129</sup>ALTPT, P<sup>129</sup>MVTPT, P<sup>129</sup>ASSTPT, MAP<sup>129</sup>ATQPTQGAM y MP<sup>129</sup>ATTQPTQGAM, o en donde la secuencia de péptido mutante se selecciona del grupo que consiste en LGIPTA P<sup>61</sup>LSSC, LGIPTQ P<sup>61</sup>LSSC, LGIPTQG P<sup>61</sup>LSSC, LGIPQT P<sup>61</sup>LSSC, LGIPTS P<sup>61</sup>LSSC, LGIPTS P<sup>61</sup>LSSC, LGIPTQP<sup>61</sup>LSSC, LGTPWAP<sup>61</sup>LSSC, LGTPFA P<sup>61</sup>LSSC y SLGAP<sup>56</sup>TAP<sup>61</sup>LSS, o en donde la secuencia de péptido mutante se selecciona del grupo que consiste en RHLAQTP<sup>175</sup>, RHLAQTP<sup>175</sup>AM, QP<sup>175</sup>TQGAMP, RHLAQTP<sup>175</sup>AM, QP<sup>175</sup>TSSAP, QP<sup>175</sup>TSSAP, QP<sup>175</sup>TQGAMP, QP<sup>175</sup>TQGAM, QP<sup>175</sup>TQGA, QP<sup>175</sup>TVM, QP<sup>175</sup>NTGP y QP<sup>175</sup>QTLF, o en donde la secuencia de péptido mutante se selecciona del grupo que consiste en P<sup>133</sup>TQTAMP<sup>139</sup>, P<sup>133</sup>TQGTMP, P<sup>133</sup>TQGTNP, P<sup>133</sup>TQGTLP, PALQP<sup>133</sup>TQTAMPA, P<sup>129</sup>TTQP, P<sup>129</sup>NLTP, P<sup>129</sup>TLQP, P<sup>61</sup>TSSC, P<sup>61</sup>TSSAC, P<sup>61</sup>FTP y LGSTLGI.
2. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.
3. Un casete de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 2.
4. Una célula que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 2.
5. Un método de preparación de un glicoconjugado del polipéptido de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- (a) producir de manera recombinante el polipéptido y
- (b) glicosilar enzimáticamente el polipéptido con un azúcar modificado en dicho sitio de glicosilación con unión en O.
6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido de la reivindicación 1.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho polipéptido está glicoconjugado con un azúcar modificado.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho azúcar modificado está modificado con un miembro seleccionado entre poli(etilenglicol) y metoxi-poli(etilenglicol) (m-PEG).
9. Un polipéptido de la reivindicación 1, para su uso en terapia.
10. Un polipéptido de la reivindicación 1, para su uso en terapia con G-CSF.

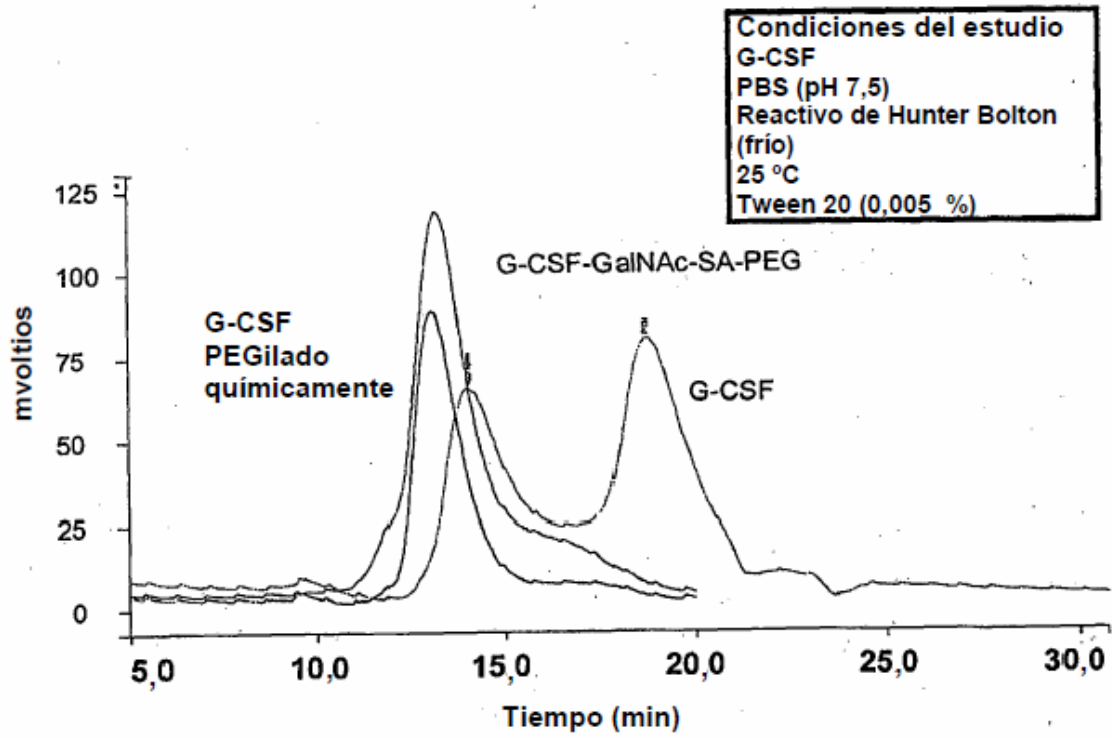


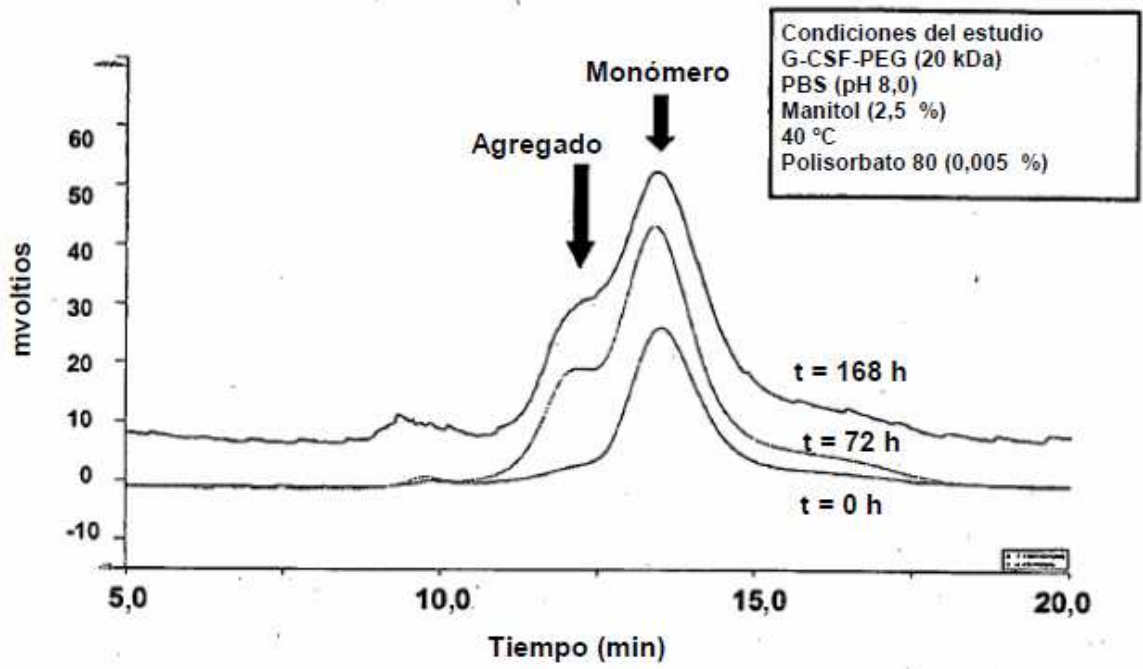


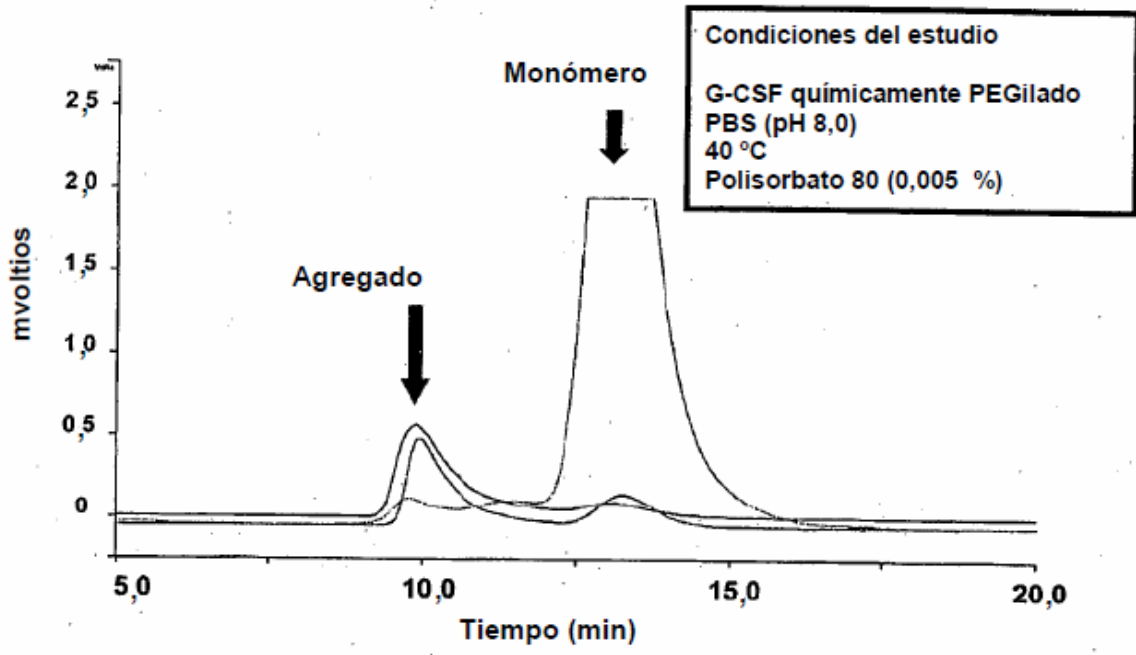


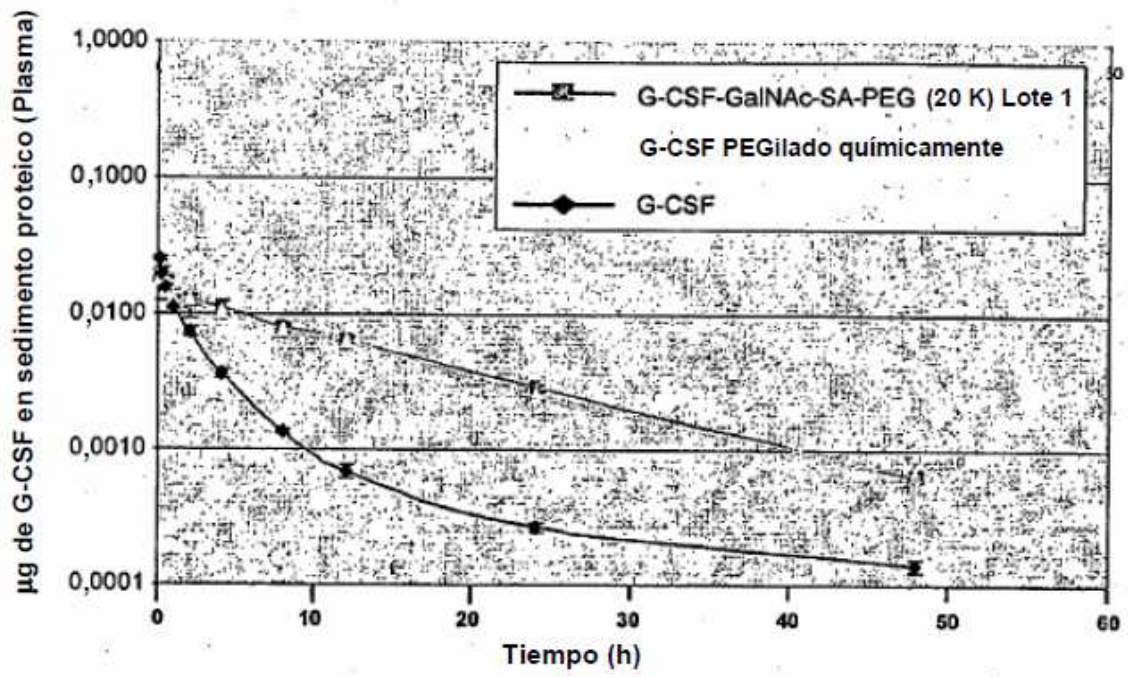












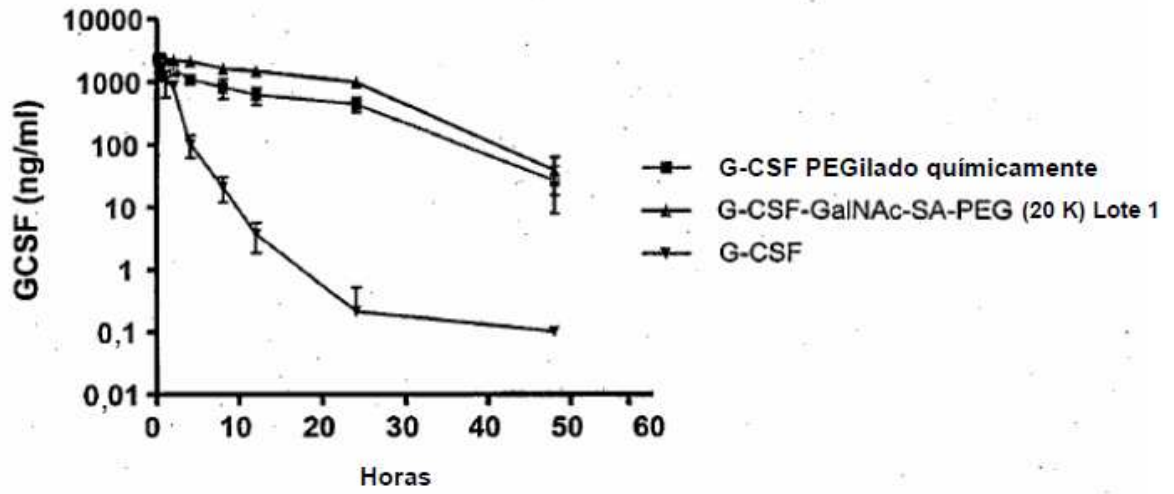


FIGURA 10A

Proteina	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
At1g08660/F22O13.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC003981 AAF99778.1 AY064135 AAL36042.1 AY124807 AAM70516.1 NC_003070 NP_172342.1 NM_180609 NP_850940.1	Q8VZJ0 Q9FRR9	
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa (ST3Gal-IV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ584673 CAE48298.1		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa (Siat7b)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620651 CAF05850.1		
$\alpha$ -2,8- sialiltransferasa (Siat8D)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ699421 CAG27883.1		
CMP $\alpha$ -2,6- sialiltransferasa (ST6Gal II)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.1	Y15111 CAA75385.1 NM_177517 NP_803483.1	O18974	
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal-II (Siat4B)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748841 CAG44450.1		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal-VI (Siat10)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748843 CAG44452.1		
ST6GalNAc-VI	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620949 CAF06586.1		
polisialiltransferasa (PST)(fragmento)ST8Sia IV	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210729 AAF17105.1	Q9TT09	
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona intestinalis</i>	n.d.	AJ626815 CAF25173.1		
$\alpha$ -2,8- polisialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Cricetulus griseus</i>	2.4.99.-	AJ652614 CAF25172.1 -AAE28634 Z46801 CAA86822.1	Q64690	
Gal $\beta$ -1,3/4-GlcNAc $\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal II (fragmento)	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY266675 AAP22943.1	Q80WK9	
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783740 CAH04017.1		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783741 CAH04018.1		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal II (Siat6)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ626821 CAF25179.1		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744809 CAG32845.1		

FIGURA 10B

Proteína	Organismo	EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6Gal V (Siat7E)	Danio rerio	n.d.	AJ735742 CAG40191.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I (Siat1)	Danio rerio	n.d.	AJ744801 CAG32837.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I (Siat7B)	Danio rerio	n.d.	AJ634459 CAG25680.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	Danio rerio	n.d.	AJ646874 CAG26703.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	Danio rerio	n.d.	AJ646883 CAG26712.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento)	Danio rerio	n.d.	AJ715535 CAG29374.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II (Siat 8C) (fragmento)	Danio rerio	n.d.	AJ715546 CAG29382.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IV (Siat 8D) (fragmento)	Danio rerio	n.d.	AJ715545 CAG29384.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E) (fragmento)	Danio rerio	n.d.	AJ715546 CAG29385.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VI (Siat 8F) (fragmento)	Danio rerio	n.d.	AJ715551 CAG29390.1		
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6- sialiltransferasa I (ST6Gal I)	Danio rerio	n.d.	AJ627627 CAF29495.1		
N-glican $\alpha$ -2,8- sialiltransferasa	Danio rerio	n.d.	BC050483 AAH50483.1 AY055462 AAL17875.1 NM_153662 NP_705948.1	Q7ZU51 Q8QH83	
ST3Gal V (related to ST6)	Danio rerio	n.d.	BC053179 AAH53179.1 AJ626820 CAF25178.1 NM_200356 NP_956649.1	Q713B9	
ST3Gal-V (ST6GalNAc V)	Danio rerio	n.d.	AJ619960 CAF04061.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (CG4871) ST6Gal I	Drosophila melanogaster	2.4.99.1	BC060932 AAH60932.1 AJ620947 CAF96984.1	Q9GU23 Q9W121	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal V)	Gallus gallus	n.d.	AJ585767 CAE51391.1 AJ621204 CAF25903.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	Gallus gallus	2.4.99.4	X80503 CAA56666.1 NM_205217 NP_990548.1	Q11200	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal V (fragmento)	Gallus gallus	2.4.99.4	W095250 AAC14168.1	Q73724	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3GAL-II)	Gallus gallus	n.d.	AJ585761 CAE51385.2		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (Siat7E)	Gallus gallus	n.d.	AJ620653 CAF05852.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I	Gallus gallus	2.4.99.1	X75558 CAA53235.1 NM_205241 NP_990572.1	Q92182	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I (Siat7B)	Gallus gallus	2.4.99.1	X75558 CAA53235.1 X74946 CAA52902.1 NM_205240 NP_990571.1	Q92183	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II	Gallus gallus	2.4.99.-	X77775 AAE68030.1 NM_205233 CAA54813.1 NP_990564.1	Q92184	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (Siat7C)	Gallus gallus	n.d.	AJ634435 CAG25677.1		

FIGURA 10C

Proteina	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (SIAT7E) (fragmento)	<i>Galus gallus</i>	n.d.	AJ646877 CAG26706.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (GPI3 sintetasa) ST8Sia	<i>Galus gallus</i>	2.4.99	U7516 AAC28888.1	P79783	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (SIAT8B)	<i>Galus gallus</i>	n.d.	AJ699419 CAG27881.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (SIAT8C)	<i>Galus gallus</i>	n.d.	AJ699420 CAG27882.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (SIAT8F)	<i>Galus gallus</i>	n.d.	AJ699424 CAG27886.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (SIAT8G)	<i>Galus gallus</i>	n.d.	AJ704564 CAG28697.1		
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6- sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Galus gallus</i>	n.d.	AJ627629 CAF29497.1		
GPI3 sintetasa (SIAT9)	<i>Galus gallus</i>	2.4.99.9	AY515255 AAS83519.1		
polisialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Galus gallus</i>	2.4.99.-	AF008194 AAB95120.1	O42399	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	U629555 AAH38612.1 AF059823 AAC17874.1 U19972 AAC37574.1 AF152381 AAD89238.1 AF186191 AAG29876.1 BC018357 AAH15057.1 NM_008038 NP_003024.1 NM_173244 NP_776479.1	Q11201 Q60677 Q9UN51	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	U63090 AAB40389.1 BC036777 AAH36777.1 X96667 CAA65447.1 NM_006927 NP_00858.1	Q16842 O00654	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (SiaT6)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.6	U62768 AAH35773.1 BC056380 AAH50880.1 AF425851 AAC13859.1 AF425852 AAC13860.1 AF425853 AAC13861.1 AF425854 AAC13862.1 AF425855 AAC13863.1 AF425856 AAC13864.1 AF425857 AAC13865.1 AF425858 AAC13866.1 AF425859 AAC13867.1 AF425860 AAC13868.1 AF425861 AAC13869.1 AF425862 AAC13870.1 AF425863 AAC13871.1 AF425864 AAC13872.1 AF425865 AAC13873.1 AF425866 AAC13874.1 AF425867 AAC13875.1 AY167992 AAC38806.1 AY167993 AAC38807.1 AY167994 AAC38808.1 AY167995 AAC38809.1 AY167996 AAC38810.1 AY167997 AAC38811.1 AY167998 AAC38812.1 NM_174963 NP_777820.1 NM_174964 NP_777821.1 NM_174965 NP_777822.1 NM_174966 NP_777823.1 NM_174967 NP_777824.1 NM_174968 NP_777825.1 NM_174969 NP_777826.1 NM_174970 NP_777827.1 NM_174971 NP_777828.1 NM_174972 NP_777829.1 NM_174973 NP_777830.1	Q11206 Q16UR6 Q86U17 Q86U18 Q86U19 Q86U20 Q86U21 Q86U22 Q81X43 Q81X44 Q81X45 Q81X46 Q81X47 Q81X48 Q81X49 Q81X50 Q81X51 Q81X52 Q81X53 Q81X54 Q81X55 Q81X56 Q81X57 Q81X58	



FIGURA 10D

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
<b>α-2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV</b>	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L23767 AAA16460.1	Q11206	
			AF035249 AAC14162.1	O60497	
			BC010645 AAH10645.1	Q96QQ9	
			AY040826 AAK93790.1	Q8N6A6	
			AF516602 AAM66431.1	Q8N6A7	
			AF516603 AAM66432.1	Q8NFD3	
			AF516604 AAM66433.1	Q8NFG7	
			AF525084 AAM81378.1		
			X74570 CAA52662.1		
			CR456858 CAG33139.1		
			NM_006278 NP_006269.1		
<b>α-2,3-sialiltransferasa (ST3Gal IV)</b>	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	AF193911 AA039131.1	Q9Y274	
			BC002302 AAH123312.1		
			AF022918 BAA17609.1		
			AX877326 CAE88895.1		
			AX886023 CAE0616.1		
			NM_006100 NP_006091.1		
<b>α-2,6-sialiltransferasa (ST6Gal II ; KIAA1877)</b>	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC008680 AAH08680.1	Q86Y44	
			AB058780 BAB47506.1	Q81UG7	
			AB059555 BAC24793.1	Q96HE4	
			AJ512141 CAD54408.1	Q96JF0	
			AX795193 CAE48260.1		
			AX795193 CAE48261.1		
			NM_032528 NP_115917.1		
<b>α-2,6-sialiltransferasa (ST6GALNAc III)</b>	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC059353 AAH59363.1	Q8N269	
			AY858540 AAG88964.1	Q8N6V1	
			AK091213 BAC09361.1		
			AJ507291 CAD45372.1		
			NM_152996 NP_69454.1		
<b>α-2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc V)</b>	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC001201 AAH01201.1	Q9BVH7	
			AK056241 BAB71127.1		
			AL035409 CAB72344.1		
			AJ507292 CAD45372.1		
			NM_030965 NP_112227.1		
<b>α-2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc II)</b>	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.1	U14550 AAAS2228.1	Q9U9J7	
			BC040455 AAH40455.1	Q12971	
			AJ251053 CAE61484.1		
			NM_006156 NP_006144.1		
<b>α-2,6-sialiltransferasa ST6Gal I</b>	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.1	BC031476 AAH31476.1	P15907	
			BC040009 AAH40009.1		
			A17362 CAA01327.1		
			A23699 CAA01686.1		
			X17247 CAA35111.1		
			X54363 CAA38246.1		
			X62822 CAA44634.1		
			NM_003032 NP_003023.1		
			NM_173216 NP_775323.1		
			<b>α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I</b>	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.3
AY096901 AAM29890.1	Q9NSC7				
AY058918 AAG89277.1	Q9NXQ7				
AK000113 BAA39095.1					
AY113399 CAA72479.2					
NM_101641 NP_060884.1					
<b>α-2,8-polisialiltransferasa ST8Sia IV</b>	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L41680 AAC41775.1	Q8N1F4	
			BC027866 AAH27866.1	Q92187	
			BC053657 AAH53657.1	Q92693	
			NM_005668 NP_005659.1		
<b>α-2,8-sialiltransferasa (GD3 synthase) ST8Sia I</b>	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.0	L32867 AAAG2366.1	Q86X71	
			L43494 AAG37686.1	Q92185	
			BC046158 AAH46158.1	Q93064	
			AA053140.1		
			AY569975 AAS75783.1		
			D26360 BAA05391.1		
			X77922 CAAS4891.1		
NM_003032 NP_003025.1					
<b>α-2,8-sialiltransferasa</b>	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L29556 AAA36613.1	Q92186	

FIGURA 10E

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
ST8Sia II			U82762 AAB51242.1 U33551 AAC24458.1 BC069584 AAH69584.1 NM_006011 NP_006002.1	Q92470 Q92746	
$\alpha$ 2,8-sialiltransferasa ST8Sia II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	AF004668 AAB87642.1 AF063092 AAC13901.2 NM_015879 NP_056963.1		
$\alpha$ -2,8- sialiltransferasa ST8Sia V	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U91641 AAC51727.1 CR457037 CAG33318.1 NM_013305 NP_037437.1	O15466	
ENSPP0000020221 (fragmento)			AC023295		
Lactosilceramida $\alpha$ -2,3- Sialiltransferasa (ST3Gal V)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.9	AF105026 AAD14634.1 AF119415 AAF66146.1 BC065936 AAH65936.1 AY152815 AAO16866.1 AAP65066 AAP65066.1 AY359105 AAQ89463.1 AB018356 BAA33850.1 AX876536 CAE89320.1 NM_003896 NP_003887.2	Q9UNP4 Q94902	
N-acetilgalactosamida $\alpha$ -2,6- sialiltransferasa (ST6GalNAc IV)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	BC006564 AAH06564.1 BC006702 AAH07402.1 BC016249 AAH16299.1 AY358672 AAC08935.1 AB035173 BAA87035.1 AK023900 BAB14715.1 AJ012937 CAD45373.1 AX380950 CAE91145.1 GR3573 BICX033599.1 NM_013443 NP_038473.2	Q969X2 Q91827 Q9JLF8	
N-acetilgalactosamida $\alpha$ -2,6- sialiltransferasa IV (ST6GalNAc IV)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF127142 AAF00102.1 BC036705 AAH36705.1 -AAP63349.1 AB035172 BAA87034.1 AK000600 BAA91281.1 Y17461 CAB44354.1 AJ271734 CAC07404.1 AX061620 CAC24981.1 AX068265 CAC27250.1 AX969252 CAF14360.1 NM_014403 NP_055218.3 NM_175039 NP_778204.1	Q9H4F1 Q9NWX6 Q9UKU1 Q9ULE9 Q9Y3G3 Q9Y3G4	
ST8Sia V (fragmento)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AJ621583 CAF21722.1 XM_291725 XP_291725.1		
Producto proteico sin nombre	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AK021929 BAB13940.1 AX381696 CAE91353.1	Q9HAA9	
GalB3/4-GlcNAc $\alpha$ - 2,3-sialiltransferasa (ST3Sia II)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.6	AJ245699 CAB53394.1	Q9QXF6	

FIGURA 10F

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB
Gal $\beta$ -1,3/4-GlcNAc $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal IV)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.6	AJ245700 CAB53395.1	Q9QXF5	
ST3Gal IV			AF141051 AAF033879.1	Q8B1JK	
polisialiltransferasa (ST8Sia IV)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.-	AJ245701 CAB53396.1	Q9QXF4	
$\alpha$ 2,3-sialiltransferasa (ST6Gal II)	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF214028 AAF680738.1 AF031344 BAE27356.1 AF178468 BAE27357.1 AF313000 AAF53001.1 NM_009177 NP_033202.2	Q54751 Q11202 Q91101 Q9DBE0	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II	<i>St3gal2 Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC015264 AAH15264.1 BC066064 AAH66064.1 AK034554 BAC28752.1 AK034863 BAC28859.1 AK053827 BAC35543.1 X76989 CAA54294.1 NM_009179 NP_033205.1 NM_178048 NP_835149.1	Q11204 Q8BPL0 Q8BSA0 Q8BSE9 Q91WH6	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC066770 AAF66770.1 AK005051 BAE23779.1 AK019416 BAB28598.1 X84234 CAA5911.1 NM_009176 NP_033202.2	Q91225 Q11205 Q9C748 Q9DBE0	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV	<i>St3gal4 Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC011121 AAH11121.1 BC050773 AAH50773.1 D28941 BAA08088.1 AK008543 BAB25732.1 AB061305 BAB47508.1 X95809 CAA65076.1 NM_009178 NP_033204.2	P97354 Q61325 Q91Y74 Q921R5 Q9CVE8	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II	<i>St6gal6 Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC011939 AAH11939.1 BC052338 AAH52338.1 BC066926 BAB79494.1 AK033562 BAC213609.1 AK041171 BAB30957.1 NM_011828 NP_061254.1	Q910R7 Q9BLY1 Q911B3 Q9VAC2 Q911B3	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II	<i>St6galnac2 Mus musculus</i>	2.4.99.-	NM_009180 6677963 BC010208 AAH10208.1 AB027198 BAB00637.1 AK004613 BAB23410.1 X93999 CAA63821.1 X94000 CAA63822.1 NM_009180 NP_033206.2	P70277 Q9DC24 Q9JJM5	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6Gal III	<i>St6gal3 Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC015434 AAH15434.1 BC027833 AAH27803H.1 BC016105 BAA03600.1 AK034758 BAC28828.1 AK081424 BAB31070H.1 NM_011493 NP_066046.1	Q64685 Q8B1J2 Q8K6L1 Q911B3 Q911B3	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6Gal II	<i>St6gal2 Mus musculus</i>	n.d.	AK082566 BAC38534.1 AB095093 BAC87752.1 AK129462 BAC98272.1 NM_172829 NP_766417.1	Q8BUU4	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III	<i>St6galnac3 Mus musculus</i>	2.4.99.-	Y11274 CAA72137.1 NM_011336 NP_035505.1	Q9QZ39 Q911P5	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III	<i>St6galnac3 Mus musculus</i>	n.d.	BC058387 AAH58387.1 AK034804 BAC28836.1 Y11342 CAA72181.2 Y11343 CAB95031.1 NM_011372 NP_035502	Q9WUV2 Q9JHP5	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV	<i>St6galnac4 Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC056451 AAH56451.1 AK085730 BAC395231.1 AK001337 CAA01446.1 Y115733 CAA43517.1	Q6D3J2 Q911P2 Q912B6 Q8B725	

FIGURA 10G

Proteína	Organismo	EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB 3D
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	L38677 AAA91869.1 BC024821 AAH24821.1 AK046188 BAC32625.1 AK052444 BAC34994.1 X84235 CAA59014.1 AJ401102 CAC20706.1 NM_011374 NP_035504.1	Q84468 Q64687 Q8BL76 Q8BW10 Q8K1C1 Q9EPK0	1J9R0 1J9R1 1J9R2 1J9R3 1J9R4 1J9R5 1J9R6
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	X83562 CAA58548.1 X99646 CAA67965.1 X99647 CAA67965.1 X99648 CAA67965.1 X99649 CAA67965.1 X99650 CAA67965.1 X99651 CAA67965.1 NM_009181 NP_033207.1	Q35696	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC034855 AAH34855.1 AK078670 BAC37354.1 X98014 CAA66642.1 X98014 CAA66643.1 X98014 CAA66644.1 NM_013666 NP_038094.1 NM_153124 NP_694764.1 NM_177416 NP_803135.1	P70126 P70127 P70128 Q8BJW0 Q8JZQ3	
GD1 sintasa (ST6GalNAc V)	<i>Mus musculus</i>	n.d.	BC075675 AAH75675.1 AY015874 BAE00172.1 X89602 CAA55556.1 NM_009182 NP_033203.1	Q64689 Q9CQJ6	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc VI)	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC036985 AAH36985.1 AB035174 BAA87036.1 AB035123 BAA95940.1 AK030648 BAC27064.1 NM_016973 NP_058669.1	Q8CDC3 Q8JZW3 Q9JM95 Q9R0G9	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa	<i>Oncorhynchus</i>	n.d.	AJ585760 CAE51384.1		

FIGURA 10H

Proteina	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt / PDB
(St3Gal-I)	<i>mykiss</i>			
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Siat1)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB094402 BAC77411.1	Q7T2X5
$\alpha$ -2,8-polisialiltransferasa (ST8Sia IV)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB094403 BAC77520.1	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV	<i>Oryzias latipes</i>	2.4.99.-	AF121967 AAF28871.1	Q9N257
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Siat7A)	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AF004404 BAD07616.1	
OSJNBa0043L24.2 o OSJNBb0002J11.9	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AL731626 CAD41185.1 AL662969 CAE04714.1	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Oryzias latipes</i>	n.d.	AP003289 BAB63715.1 AF000794 BAB05621.1	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat4)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744803 CAG32839.1	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744804 CAG32840.1	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat6)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626810 CAF25177.1	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626824 CAF25182.1	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI (Siat10) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744806 CAG32844.1	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (Siat7A)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748740 CAG38615.1	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (Siat7B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748741 CAG38616.1	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (Siat7C) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ634454 CAG25676.1	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646870 CAG26899.1	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646875 CAG26704.1	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (Siat7F) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646882 CAG26711.1	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa 8A (Siat8A)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.8	AJ697558 CAG26896.1	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa 8B (Siat8B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697559 CAG26897.1	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa 8C (Siat8C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697560 CAG26898.1	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa 8D (Siat8D)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697561 CAG26899.1	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa 8E (Siat8E)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697562 CAG26900.1	
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa 8F (Siat8F)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697563 CAG26901.1	
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa I (ST6Gal I: Siat1)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.1	AJ627624 CAF29492.1	
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ627625 CAF29493.1	
	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744807 CAG32843.1	

FIGURA 10I

Proteina	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB /3D
(Siat9)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	U012166 NP_052025		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.6	M97754 AAA42146.1 NM_031697 NP_113885.1	Q02734	
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat6)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626426 CAF25182.1		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal VI	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626743 CAF25053.1		
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa ST6Gal I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.1	X75989 CAA54302.1 NM_031695 NP_113883.1	Q11265	
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa ST6Gal I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.1	M18769 AAA41196.1 M83143 AAB07233.1	P13721	
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634168 CAG25684.1		
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634457 CAG25679.1		
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	L2935 AAC42686.1 AF072501 AA172501.1 NM_019123 NP_031199.1	Q64686	
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646871 CAG26700.1		
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646872 CAG26701.1		
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646881 CAG26710.1		
$\alpha$ -2,8- sialiltransferasa (fragmento)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699422 CAG27884.1		
$\alpha$ -2,8- sialiltransferasa (Siat8E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699423 CAG27885.1		
$\alpha$ -2,8- sialiltransferasa ST8Sia II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L13445 AAA42147.1 NM_057156 NP_476497.1	Q07977 Q54688	
$\alpha$ -2,8- sialiltransferasa ST8Sia II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U55938 AA35066.1 NM_013829 NP_037161.1	P97877	
$\alpha$ -2,8- sialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U90215 AAB49989.1	Q08563	
3- galactosamido $\alpha$ -2,6- sialiltransferasa I (Siat6)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ627625 CAF29494.1		
GM3 sintasa ST3Gal V	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AB018049 BAA33492.1 NM_031337 NP_112927.1	Q38830	
sialiltransferasa ST3Gal (Siat4A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ748340 CAG4449.1		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa (S13Gal-II)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ585763 CAE51387.1		
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa (Siat7)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ620650 CAE05849.1		
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa (ST6Galnac)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	n.d.	AJ699425 CAG27887.1		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa (ST3Gal-I)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ585765 CAE51389.1		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa (ST3GAL-IV)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ584674 CAE48299.1		
$\alpha$ -2,3- sialiltransferasa ST3Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.4	M97753 AAA41126.1	Q02745	
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa (fragmento) ST6Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.1	AF136746 AAD33059.1	Q9XSG8	
3- galactosamido $\alpha$ -2,6- sialiltransferasa (ST6GalNAc V)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620948 CAF06585.2		
$\alpha$ -2,6- sialiltransferasa (fragmento) ST6Gal I	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AF041031 AAC15633.1	O62717	

FIGURA 10J

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Siat5-r)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626047 CAF06585.1 AJ744805 CAG32841.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626116 CAF25174.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626817 CAF25175.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I (Siat1)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626116 CAF25176.1 AJ744800 CAG32836.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B) (relacionada)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634460 CAG25681.1 AJ634461 CAG25682.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7C) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634456 CAG25678.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	2.4.99.3	Y17466 CAB44338.1 AJ646869 CAG26698.1	Q9W6U6	
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646873 CAG26702.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646880 CAG26709.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II (Siat 8A) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715534 CAG29373.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II (Siat 8B) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715538 CAG29377.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715541 CAG29380.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IIIr (Siat 8Cr)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715542 CAG29381.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715547 CAG29386.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VI (Siat 8F) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715549 CAG29388.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VII (Siat 8F-r)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715550 CAG29389.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Siat5-r)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744806 CAG32842.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744802 CAG32838.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ626822 CAF25180.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ634472 CAG25683.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ646879 CAG26708.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715536 CAG29375.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II (Siat 8B) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715537 CAG29376.1		
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715539 CAG29378.1		

FIGURA 10K

Proteina	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB
$\alpha$ -2,8-sialiltransferasa (fragmento)	<i>Tetradodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715540 CAG29379.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-II)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ60730 CAE51388.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-VI)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ60730 CAE51390.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-III (Sial6))	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ626823 CAF25181.1		
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc V (Sial7E) (fragmento))	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ646878 CAG26707.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (3Gal-VI)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ626744 CAF25054.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Sial6)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ622938 CAF22058.1		
$\beta$ -galactosamida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ627628 CAF29496.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (Sial6)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AY657775 AA167042		
polysialiltransferasa (Neus)	<i>Escherichia coli K92</i>	2.4.-.-	M38479 AAA24215.1	Q47404	
$\alpha$ -2,3-polysialiltransferasa (Sial6)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	M95093 AA20478.1	Q51281	
SynE	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	U75650 AAB53842.1	O06435	
polysialiltransferasa (Sial6) (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY234102 AAO85290.1		
SialD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY231048 AAP34769.1		
polisialiltransferasa (SialD) (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY231044 AAP34767.1		
SialD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY234191 AAO85289.1		
polisialiltransferasa (SialD) (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY231047 AAP34770.1		
SialD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY231045 AAP34768.1		
polisialiltransferasa (SialD) (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY234190 AAO85288.1		
SialD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY231046 AAP34771.1		
polisialiltransferasa (SialD) (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY234193 AAO85291.1		
SialD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY231049 AAP34766.1		
SialD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	AY281045 AAP34768.1		
NWBC0067	<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	NC0100312 NP_273483.1		



FIGURA 10L

Proteina	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PD
ORF2	<i>Haemophilus influenzae</i> A2	n.d.	M94855 AAA24979.1		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> F62	2.4.99.4	U60664 AAC44539.1 AAE67205.1	P72074	
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria meningitidis</i> 406Y, NRCC 4030	2.4.99.4	U60662 AAC44544.2		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (NMB0922)	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	2.4.99.4	U60666 AAC44541.1 AE002443 AAF41330.1 NC_003112 NP_273962.1	P72074	
NMA1113	<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	n.d.	AL162755 CAB84380.1 NC_003116 NP_283887.1	Q9JUV5	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB25	n.d.	AF519787 AAM82550.1	Q8KS93	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB3	n.d.	AF519788 AAM82551.1	Q8KS92	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB39	n.d.	AF519769 AAM82552.1		
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB53	n.d.	AF519790 AAM82553.1		
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB57	n.d.	AF519791 AAM82554.1	Q8KS91	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB71	n.d.	AF519793 AAM82556.1	Q8KS89	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB8	n.d.	AF519792 AAM82555.1	Q8KS90	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC10V	n.d.	AF519779 AAM88840.1	Q8KS98	
WaaH (fragment o)	<i>Salmonella enterica</i> SARC12	n.d.	AF519781 AAM88842.1		
WaaH (fragment)	<i>Salmonella enterica</i> SARC13	n.d.	AF519782 AAM88843.1	Q8KS96	
WaaH (fragment o)	<i>Salmonella enterica</i> SARC14I	n.d.	AF519783 AAM88844.1	Q8KS97	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC15II	n.d.	AF519784 AAM88845.1	Q8KS96	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC16II	n.d.	AF519785 AAM88846.1	Q8KS95	



FIGURA 10N

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
PM1174	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d.	AE006157 AAK03258.1 NC 002663 NP_246111.1	Q9CLP3	
Secuencia 10 de patente de EE.UU. n.º 6699705	Desconocido	n.d.	-AAT17969.1		
Secuencia 2 de patente de EE.UU. n.º 6709834	Desconocido	n.d.	-AAT23232.1		
Secuencia 3 de patente de EE.UU. n.º 6699705	Desconocido	n.d.	-AAT17965.1		
Secuencia 35 de patente de EE.UU. n.º 6503744 (fragmento)	Desconocido	n.d.	-AAO96685.1 -AAS36262.1		
Secuencia 5 de patente de EE.UU. n.º 6699705	Desconocido	n.d.	-AAT17966.1		