

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 748**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010 E 10784210 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2438083**

54 Título: **Derivados de amiloide P sérico y su preparación y uso**

30 Prioridad:

**04.06.2009 US 217931 P**

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

**16.03.2016**

73 Titular/es:

**PROMEDIOR INC. (100.0%)  
101 Hartwell Avenue  
Lexington, MA 02421-3125, US**

72 Inventor/es:

**WILLETT, W. SCOTT y  
CAIMI, RICHARD J.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 563 748 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

Derivados de amiloide P sérico y su preparación y uso

**Antecedentes de la invención**

5 El amiloide P sérico (SAP) es un miembro de la familia de proteínas de pentraxina. SAP se secreta por el hígado y circula en la sangre como un pentámero estable. La investigación previa demuestra que SAP tiene un papel importante tanto en la fase de inicio como en la de resolución de la respuesta inmunitaria. SAP puede unirse a residuos de azúcar en la superficie de bacterias y de ese modo promover su opsonización y fagocitación por células presentadoras de antígeno. SAP también se une a ADN y cromatina generados por células apoptóticas en la resolución de una respuesta inmunitaria, impidiendo así una respuesta inflamatoria secundaria contra estos antígenos. Las moléculas a las que se une SAP se eliminan de zonas extracelulares debido a la capacidad de SAP para unirse a los tres receptores de Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) clásicos, que tienen una afinidad particular por Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16). Tras la unión al receptor, SAP y cualquier complejo unido generalmente se internalizan y se procesan por la célula.

15 Recientemente, se ha sugerido que SAP puede usarse como agente terapéutico para tratar diversos trastornos, incluyendo trastornos relacionados con fibrosis, trastornos de hipersensibilidad, trastornos autoinmunitarios, mucositis y trastornos inflamatorios tales como los provocados por infección microbiana. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente estadounidense con n.<sup>os</sup> de serie 11/707.333, 12/217.617, 12/720.845 y 12/720.847. Los productos terapéuticos a base de proteínas para tratar enfermedades humanas han revolucionado la industria de la atención sanitaria. Sin embargo, existen muchas dificultades en la producción de un producto terapéutico a base de proteínas que tenga la potencia necesaria y/o en la cantidad suficiente para que sea útil como agente terapéutico. Muchos posibles agentes terapéuticos se modifican para aumentar su actividad biológica, tal como semivida en plasma, en relación con la proteína derivada de manera natural. Habitualmente se implementa tecnología de expresión recombinante para producir polipéptidos en cantidad suficiente. Desafortunadamente, muchos sistemas recombinantes producen polipéptidos que tienen propiedades biológicas diferentes de las formas derivadas de manera natural, lo que puede afectar a la farmacocinética, seguridad y eficacia de un producto terapéutico.

Heegaard 1999 (J. Chromatography 853:189-195) describe un glicopéptido de unión a heparina (T3) a partir de un componente de amiloide P sérico humano que es un glicopéptido que contiene cisteína de 25 residuos de aminoácido que contiene una cadena de oligosacárido de tipo complejo biantenaria con unión en N.

30 Siebert *et al.* 1995 (FEBS Letters 371:13-16) y Siebert *et al.* 1997 (Glycoconjugate Journal 14:945-949) dan a conocer que la desialilación de SAP da como resultado cambios conformaciones en la estructura de proteínas.

Boysen *et al.* 2004 (Protein Expression and Purification 35:284-292) describen la producción recombinante de componente de amiloide P sérico humano a partir de *Pichia pastoris* y su caracterización.

Kiernan *et al.* 2004 (Proteomics 4:1825-1829) describen la caracterización proteómica de variantes novedosas de componente de amiloide P sérico a partir de orina y plasma humanos.

35 Por tanto, sigue habiendo la necesidad de desarrollar polipéptidos de SAP, y métodos de fabricación de los mismos, adecuados para el tratamiento terapéutico de seres humanos.

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

40 1. Un polipéptido de amiloide P sérico (SAP) humano glicosilado que comprende una cadena de oligosacárido con unión en N, en el que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.

2. El polipéptido de SAP humano glicosilado del punto 1, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 85% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

45 3. El polipéptido de SAP humano glicosilado del punto 1 ó 2, en el que la cadena de oligosacárido con unión en N comprende un núcleo de pentasacárido de Man[( $\alpha$ 1,6-)-(Man( $\alpha$ 1,3)]-Man( $\beta$ 1,4)-GlcNAc( $\beta$ 1,4)-GlcNAc( $\beta$ 1,N)-Asn.

4. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-3, en el que la cadena de oligosacárido comprende al menos una ramificación que tiene la estructura NeuNAc2 $\alpha$ 3Ga1 $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6.

5. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-4, en el que el polipéptido de SAP es un polipéptido recombinante.

50 6. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-5, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

7. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-5, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 95% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 5 8. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-5, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 96% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
9. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-5, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 98% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 10 10. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-5, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
11. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-5, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 15 12. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-11, en el que el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un dominio de SAP y uno o más dominios heterólogos.
13. El polipéptido de SAP humano glicosilado del punto 12, en el que el uno o más dominios heterólogos potencian uno o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos proteicos y/o purificación.
- 20 14. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-13, en el que el polipéptido comprende uno o más residuos de aminoácido modificados.
15. El polipéptido de SAP humano glicosilado del punto 14, en el que el uno o más residuos de aminoácido modificados comprenden un aminoácido pegilado, un aminoácido prenilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado y/o un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico.
- 25 16. El polipéptido de SAP humano glicosilado del punto 15, en el que el uno o más residuos de aminoácido modificados potencian uno o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos proteicos y/o purificación.
17. Una preparación farmacéutica adecuada para su uso en un mamífero que comprende el polipéptido de SAP humano de uno cualquiera de los puntos 1-16 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 18. Un método de preparación de un polipéptido de SAP humano que comprende una cadena de oligosacárido con unión en N, en el que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3, comprendiendo el método:
- i) expresar un polipéptido de SAP humano en una célula; y
- ii) aislar el polipéptido de SAP humano de la célula.
- 35 19. El método del punto 18, en el que la célula es una célula CHO.
20. El método del punto 18 ó 19, en el que el polipéptido de SAP es un polipéptido de uno cualquiera de los puntos 1-16.
- 40 21. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1 a 5 ó 12 a 16 o el método de uno cualquiera de los puntos 18-20, en el que todas las ramificaciones de la cadena de oligosacárido terminan en restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.
22. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1 a 5 ó 12 a 16 o el método de uno cualquiera de los puntos 18-20, en el que la cadena de oligosacárido está sustancialmente libre de restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6.
- 45 23. El método del punto 18, que comprende además alterar química o enzimáticamente el polipéptido de SAP aislado para producir un polipéptido de SAP que tiene una cadena de oligosacárido modificada.
24. El método del punto 23, en el que el proceso de alterar química o enzimáticamente el polipéptido de SAP aislado elimina uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 terminales de la cadena de oligosacárido.
25. El método del punto 24, en el que el proceso de alterar química o enzimáticamente el polipéptido de SAP aislado sustituye uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 terminales en la cadena de oligosacárido por uno o más

restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.

26. El polipéptido de SAP humano glicosilado de uno cualquiera de los puntos 1-16 o el método de uno cualquiera de los puntos 18-25, en el que el polipéptido de SAP aislado tiene una  $CI_{50}$  para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor de la mitad de la de una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano.

27. Método de preparación de un polipéptido de SAP humano, que comprende:

i) proporcionar un polipéptido de SAP humano glicosilado, en el que el polipéptido de SAP humano glicosilado comprende una cadena de oligosacárido con unión en N; y

ii) alterar química o enzimáticamente la cadena de oligosacárido con unión en N del polipéptido de SAP para producir un polipéptido de SAP humano glicosilado modificado, en el que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.

28. El método del punto 27, en el que el proceso de alterar química o enzimáticamente la cadena de oligosacárido con unión en N del polipéptido de SAP elimina uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 terminales de la cadena de oligosacárido.

29. El método del punto 27, en el que el proceso de alterar química o enzimáticamente la cadena de oligosacárido con unión en N del polipéptido de SAP humano sustituye uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 terminales en la cadena de oligosacárido por uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.

30. El método de uno cualquiera de los puntos 27-29, en el que la cadena de oligosacárido con unión en N tiene al menos el 50% menos de restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 que una proteína SAP humana silvestre aislada de suero humano.

31. El método de uno cualquiera de los puntos 27-29, en el que la cadena de oligosacárido con unión en N está sustancialmente libre de restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6.

32. El método de uno cualquiera de los puntos 27-31, en el que todas las ramificaciones de la cadena de oligosacárido terminan en restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.

33. El método de uno cualquiera de los puntos 27-32, en el que el polipéptido de SAP glicosilado modificado tiene una  $CI_{50}$  para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor de la mitad de la de una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano.

34. Un método de preparación de un polipéptido de SAP humano, que comprende:

i) proporcionar un polipéptido de SAP humano, y

ii) alterar química o enzimáticamente el polipéptido de SAP humano para producir un polipéptido de SAP humano glicosilado que comprende un oligosacárido con unión en N, en el que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.

35. Un polipéptido de SAP humano que comprende una cadena de oligosacárido con unión en N, en el que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3, preparado mediante un procedimiento que comprende:

i) expresar un polipéptido de SAP en una célula CHO; y

ii) aislar el polipéptido de SAP de la célula.

36. El polipéptido de SAP humano del punto 35, en el que el polipéptido de SAP tiene una  $CI_{50}$  para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor de la mitad de la de una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano.

37. Una célula CHO que comprende un polipéptido de SAP humano que comprende una cadena de oligosacárido con unión en N, en la que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.

38. El polipéptido de SAP de uno cualquiera de los puntos 1-16, para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado o trastorno seleccionado de un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico o fibroproliferativo, un trastorno de hipersensibilidad, un trastorno autoinmunitario o mucositis.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Ensayo de diferenciación en fibrocitos. Se usó un ensayo basado en ELISA para medir la producción de

MDC tras la incubación de monocitos con polipéptidos de SAP. El eje Y indica la potencia promedio (es decir, el promedio de 7 experimentos independientes) de SAP derivado de suero humano (hSAP) en comparación con SAP humano recombinante (rhSAP) aislado de células CHO-S. La actividad relativa de hSAP se fija a 1,0.

5 Figura 2. Análisis estructural de glicanos de polipéptidos de SAP variantes. Se usaron análisis de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (CL/EM) (A) y análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio aniónico (AEX-HPLC) (B) para determinar las uniones de ácido siálico en SAP humano recombinante sometido a glicorremodelación aislado de células CHO-S. Se usaron análisis de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (CL/EM) (C) y análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio aniónico (AEX-HPLC) (D) para determinar las uniones de ácido siálico en hSAP (SAP derivado de suero humano) sometido a glicorremodelación. Se usó análisis de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (CL/EM) (E) y análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio aniónico (AEX-HPLC) (F) para determinar las uniones de ácido siálico en rhSAP que se trató con una  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa para aumentar el número de ácidos siálicos con unión 2,3 terminales en los glicanos de SAP. Para las figuras de CL/EM, el eje X representa la masa en Dalton, y el eje Y representa la intensidad relativa. Para los perfiles de HPLC, el eje X es el tiempo en minutos, y el eje Y son las unidades de absorbancia (mUA).

Figura 3. Ensayo de diferenciación en fibroцитos. Se usó un ensayo basado en ELISA para medir la producción de MDC tras la incubación de monocitos con polipéptidos variantes de SAP. El eje Y indica la actividad relativa promedio de cada variante de SAP en comparación con un patrón de referencia de hSAP, para el que la actividad se fija a 1,0 (véase la barra más a la izquierda).

20 Figura 4. Ensayo de diferenciación en fibroцитos. Se trataron monocitos con hMCSF y entonces se cuantificaron posteriormente para determinar la diferenciación en fibroцитos. El eje X representa la concentración de hMCSF incubado con monocitos donadores. El eje Y indica la cantidad de proliferación de fibroцитos en el día cinco tal como se mide mediante el recuento de fibroцитos por  $5,0 \times 10^4$  células.

25 Figuras 5. Ensayo de diferenciación en fibroцитos. Se trataron monocitos con hSAP y entonces se cuantificaron posteriormente para determinar la diferenciación en fibroцитos. El eje X indica la concentración de hSAP incubado con monocitos donadores. El eje Y indica la cantidad de proliferación de fibroцитos en el día cinco tal como se mide mediante el recuento de fibroцитos por  $5,0 \times 10^4$  células.

## Descripción detallada de la invención

### Visión general

30 La mayoría de los péptidos que se producen de manera natural tienen restos de hidratos de carbono (es decir, glicanos) unidos al péptido por medio de uniones específicas a determinados aminoácidos a lo largo de la longitud de la cadena peptídica primaria, formando así "glicopéptidos". El patrón de glicosilación en cualquier péptido dado puede tener enormes implicaciones para la función de ese péptido. Por ejemplo, la estructura de los glicanos con unión en N en un péptido puede tener un impacto sobre diversas características del péptido, incluyendo susceptibilidad a proteasas, tráfico intracelular, secreción, direccionamiento tisular, semivida biológica y antigenicidad. La alteración de una o más de estas características afecta enormemente a la eficacia de un péptido en su entorno natural.

Las estructuras de glicanos encontradas en glicopéptidos que se producen de manera natural se dividen normalmente en dos clases, glicanos con unión en N y con unión en O. Los péptidos expresados en células eucariotas normalmente están N-glicosilados en residuos de asparagina en sitios en la estructura primaria del péptido que contienen la secuencia asparagina-X-serina/treonina, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico. La parte de hidrato de carbono de tales péptidos se conoce como glicano con unión en N u oligosacárido con unión en N. Los acontecimientos tempranos de N-glicosilación se producen en el retículo endoplasmático (RE) y están conservados en mamíferos, plantas, insectos y otros eucariotas superiores. En primer lugar, se construye una cadena de oligosacárido que comprende catorce residuos de azúcar sobre una molécula transportadora lipídica. A medida que el péptido naciente se traduce y se transloca al RE, se transfiere toda la cadena de oligosacárido al grupo amida del residuo de asparagina en una reacción catalizada por una enzima glicosiltransferasa unida a la membrana. El glicano con unión en N se procesa adicionalmente tanto en el RE como en el aparato de Golgi. El procesamiento adicional conlleva generalmente la eliminación de algunos de los residuos de azúcar y la adición de otros residuos de azúcar en reacciones catalizadas por glicosilasas y glicosiltransferasas específicas para los residuos de azúcar eliminados y añadidos.

Normalmente, las estructuras finales de los glicanos con unión en N dependen del organismo en el que se produce el péptido. Por ejemplo, los péptidos producidos en bacterias generalmente no están glicosilados. Los péptidos expresados en células de insecto contienen normalmente cadenas de oligosacárido con unión en N con alto contenido en manosa o paucimansa. Los péptidos producidos en cultivos de células de mamífero habitualmente se glicosilan de manera diferente dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo celular. Incluso en la misma especie y en las mismas condiciones, algunas veces se encuentra una cierta cantidad de heterogeneidad en la cadena de glicosilo. En general, los péptidos producidos en células vegetales comprenden estructuras de glicanos

que difieren significativamente de las producidas en células animales.

Se ha propuesto una variedad de métodos en la técnica para adaptar el patrón de glicosilación de un péptido, incluyendo métodos descritos en las solicitudes internacionales publicadas n.ºs WO 99/22764, WO 98/58964 y WO 99/54342 así como en la patente estadounidense n.º 5.047.335. Esencialmente, muchas de las enzimas requeridas para la glicosilación *in vitro* de péptidos se han clonado y secuenciado. En algunos casos, estas enzimas se han usado *in vitro* para añadir azúcares específicos a un glicano sobre un péptido. En otros casos, se han modificado por ingeniería genética células para que expresen una combinación de enzimas y péptidos deseados de manera que se produzca la adición de un resto de azúcar deseado a un péptido expresado dentro de la célula.

Se usan dos clases principales de enzimas en la síntesis de hidratos de carbono: glicosiltransferasas y glicosidasas. Las glicosiltransferasas añaden o modifican las estructuras de oligosacáridos existentes sobre un péptido. Las glicosiltransferasas son eficaces para producir productos específicos con buen control estereoquímico y regioquímico. Las glicosiltransferasas se han usado para preparar oligosacáridos y para modificar estructuras de hidrato de carbono con unión en N y O terminales, particularmente en péptidos producidos en células de mamífero. Por ejemplo, los oligosacáridos terminales de glicopéptidos pueden estar completamente sialilados y/o fucosilados para proporcionar estructuras de azúcar más constantes usando glicosiltransferasas, lo que puede mejorar la farmacodinámica del glicopéptido y una variedad de otras propiedades biológicas.

Las glicosidasas se clasifican adicionalmente como exoglicosidasas (por ejemplo,  $\beta$ -manosidasa,  $\beta$ -glucosidasa) y endoglicosidasas (por ejemplo Endo-A, Endo-M). Las glicosidasas catalizan normalmente la hidrólisis de un enlace glicosídico. Sin embargo, en condiciones apropiadas, pueden usarse para formar esta unión. La mayoría de las glicosidasas usadas para la síntesis de hidratos de carbono son exoglicosidasas; la transferencia de glicosilos se produce en el extremo terminal no reductor del sustrato. La glicosidasa se une a un donador de glicosilo en un producto intermedio de glicosil-enzima que o bien se intercepta por agua para producir el producto de hidrólisis, o bien por un aceptor, para generar un nuevo glicósido u oligosacárido. Una ruta a modo de ejemplo que usa una exoglicosidasa es la síntesis del trisacárido central de todos los glicopéptidos con unión en N, incluyendo la unión  $\beta$ -manósido, que se forma mediante la acción de  $\beta$ -manosidasa (Singh *et al.*, Chem. Commun. 993-994 (1996)). Aunque su uso es menos común que el de las exoglicosidasas, las endoglicosidasas también se utilizan para preparar hidratos de carbono. Las endoglicosidasas pueden usarse para transferir una cadena de oligosacárido completa, en vez de un monosacárido, sobre un polipéptido. Se han añadido fragmentos de oligosacárido a sustratos usando endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminas, tales como endo-F y endo-M (Wang *et al.*, Tetrahedron Lett. 37: 1975-1978; y Haneda *et al.*, Carbohydr. Res. 292: 61-70 (1996)). Cada una de estas clases de enzimas se ha usado satisfactoriamente para producir péptidos glicosilados. Para una revisión general, véase, Crout *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 98-111. (1998).

El amiloide P sérico (SAP) es una proteína sérica que se produce de manera natural en mamíferos compuesta por cinco subunidades idénticas, o "promotores", que están asociadas de manera no covalente en un complejo similar a un disco. SAP pertenece a la superfamilia de proteínas de pentraxina, que se caracterizan por esta estructura pentamérica cíclica. Las pentatraxinas cortas clásicas incluyen SAP así como proteína C reactiva (Osmand, A.P., *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 74: 739-743, 1997). SAP se sintetiza normalmente en el hígado y tiene una semivida fisiológica de veinticuatro horas. La secuencia de la subunidad de SAP humana se da a conocer a continuación, correspondiendo a los aminoácidos 20-223 de n.º de registro de Gene bank NP\_001630 (secuencia señal no representada).

HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLTIPLEKPLQNFTLCFRAYS DLSRA  
 YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPV  
 HICVSWESSSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QD  
 SYGGKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPENILSAYQGTPLPANILD  
 WQALNYEIRGYVIKPLVWV (SEQ ID NO: 1)

A continuación se da a conocer la secuencia de la subunidad de SAP de *Gallus gallus*.

QEDLYRKVFVFREDPSDAYVLLQVQLERPLLNFTVCLRSYTDLTRP  
 HSLFSYATKAQDNEILLFKPKPGEYRFYVGGKYVTFRVPENRGEW  
 EHCASWESGSGIAEFWLNRPWPRKGLQKGYEVGNEAVVMLG  
 QEQDAYGGGFDVYNSFTGEMADVHLWDAGLSPDKMRSAYLALR  
 LPPAPLAWGRLRYEAKGDVVVKPRLREALGA (SEQ ID NO: 2)

A continuación se da a conocer la secuencia de la subunidad de SAP de *Bos taurus*.

QTDLRGKVFVFPRESSTDHVTLITKLEKPLKNLTLCLRAYSDLRSG  
 YSLFSYNIHSKDNELLVFKNGIGEYSLYIGKTKVTVRATEGFPSPVH  
 ICTSWESSTGIAEFWINGKPLVKRGLKQGYAVGAHPKIVLGQEQDS  
 YGGGFDKNQSFMGEIGDLYMWDSVLSPEEILLVYQSSSISPTILD  
 WQALKYEIKGYVIVKPMVWG (SEQ ID NO: 3)

A continuación se da a conocer la secuencia de la subunidad de SAP de *Cricetulus migratorius*.

QTDLTGKVFVFPRESESDYVKLIPRLEKPLENFTLCFRITYTDLRPHSLFSYNTKN  
 KDNELLYKERMGEYGLYIENVGAIVRGVEEFASPVHFCTSWESSGIADFWVNG  
 IPWVKKGLKKGTYVKTQPSIILGQEQDNYGGGFDKSQSFVGMGDLNMWDSVL  
 TPEEIKSVYEGSWLEPNILDWRALNYEMSGYAVIRPRVWH (SEQ ID NO: 4)

- 5 Un aspecto de la presente invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que la modificación de una estructura de glicanos sobre un polipéptido de SAP humano puede aumentar la actividad biológica del polipéptido de SAP en relación con una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano. Tal como se demuestra mediante los ejemplos de la divulgación, SAP aislado de suero humano sólo contiene residuos de ácido siálico con unión  $\alpha 2,6$ . En cambio, SAP humano recombinante producido en células CHO sólo contiene residuos de ácido siálico con unión  $\alpha 2,3$ . Usando bioensayos basados en células *in vitro*, se demostró que polipéptidos de SAP con ácido siálico con unión  $\alpha 2,3$  tenían una actividad sistemáticamente más alta que SAP silvestre (es decir, SAP que comprende restos de ácido siálico con unión  $\alpha 2,6$ ) aislado de suero humano. Los polipéptidos de SAP variantes de la invención serán más eficaces como agentes terapéuticos debido a su potencia biológica aumentada. Por ejemplo, variantes de SAP más potentes pueden requerir menor dosificación y/o dosificación menos frecuente en relación con SAP silvestre aislado de suero humano. La presente divulgación proporciona tanto polipéptidos de SAP humano variantes como métodos para producir los mismos tal como se caracterizan en las reivindicaciones adjuntas y también tal como se describe en el presente documento. En particular, la divulgación incluye métodos y composiciones para la adición, delección o modificación *in vitro* e *in vivo* de residuos de azúcar tal como se caracterizan en las reivindicaciones adjuntas y también tal como se describe en el presente documento para producir un polipéptido de SAP humano que tiene un patrón de glicosilación deseado.

#### Definiciones

- 25 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen generalmente el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos son los que se conocen bien y se emplean comúnmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. Las técnicas y los procedimientos se realizan generalmente según métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se proporcionan a lo largo de todo este documento.

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

- 35 Tal como se usan en el presente documento, los términos “tratamiento” y “tratar” se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a prevenir completa o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en cuanto a una cura parcial o completa para un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno. “Tratamiento”, tal como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) aumentar el tiempo de supervivencia; (b) disminuir el riesgo de muerte debido a la enfermedad; (c) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo o reducir la velocidad de progresión de la enfermedad; y (d) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.

- 40 Tal como se usa en el presente documento, un producto terapéutico que “inhibe” o “previene” un trastorno o estado es un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o estado en la muestra tratada en relación con una muestra control no tratada, o retrasa el comienzo o reduce la gravedad de uno o más síntomas

del trastorno o estado en relación con la muestra control no tratada.

Tal como se usa en el presente documento los términos “sujeto” y “paciente” se refieren a animales incluyendo mamíferos, tales como seres humanos. El término “mamífero” incluye primates, animales domesticados incluyendo perros, gatos, ovejas, ganado, caballos, cabras, cerdos, ratones, ratas, conejos, cobayas, animales cautivos tales como animales de zoológicos, y animales salvajes.

Tal como se usa en el presente documento el término “tejido” se refiere a un órgano o conjunto de células especializadas tales como tejido cutáneo, tejido pulmonar, tejido renal y otros tipos de células.

El término “efecto terapéutico” se reconoce en la técnica y se refiere a un efecto local o sistémico en animales, particularmente mamíferos, y más particularmente seres humanos, provocado por una sustancia farmacológicamente activa. La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad de una sustancia tal que produce algún efecto local o sistémico deseado a una razón de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz de tal sustancia variará dependiendo del sujeto y el estado patológico que está tratándose, el peso y la edad del sujeto, la gravedad del estado patológico, la manera de administración, pudiendo determinarla fácilmente un experto habitual en la técnica. Por ejemplo, determinadas composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse en una cantidad suficiente para producir un efecto deseado a una razón de beneficio/riesgo razonable aplicable a tal tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a un polinucleótido tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). Debe entenderse también que el término incluye, como equivalentes, análogos de o bien ARN o bien ADN preparados a partir de análogos de nucleótido y, según sea aplicable a la realización que esté describiéndose, polinucleótido monocatenario (tal como sentido o antisentido) y bicatenario.

Los términos “péptidos”, “proteínas” y “polipéptidos” se usan de manera intercambiable en el presente documento. El término “proteína purificada” se refiere a una preparación de una proteína o proteínas que están preferiblemente aisladas de, o de otra forma sustancialmente libres de, otras proteínas normalmente asociadas con la(s) proteína(s) en una célula o lisado celular. Se define que el término “sustancialmente libre de otras proteínas celulares” o “sustancialmente libre de otras proteínas contaminantes” engloba preparaciones individuales de cada una de las proteínas que comprenden menos del 20% (en peso seco) de proteína contaminante, y preferiblemente comprende menos del 5% de proteína contaminante. Pueden prepararse formas funcionales de cada una de las proteínas como preparaciones purificadas usando un gen clonado tal como se conoce bien en la técnica. Por “purificado”, quiere decirse que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, tales como otras proteínas (particularmente otras proteínas que pueden enmascarar, disminuir, confundir o alterar sustancialmente las características de las proteínas componentes o bien como preparaciones purificadas o bien en su función en la mezcla reconstituida objeto). El término “purificado” tal como se usa en el presente documento significa preferiblemente al menos el 80% en peso seco, más preferiblemente en el intervalo del 85% en peso, más preferiblemente el 95-99% en peso, y lo más preferiblemente al menos el 99,8% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo presentes (pero pueden estar presentes agua, tampones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular de menos de 5000). El término “puro” tal como se usa en el presente documento tiene preferiblemente los mismos límites numéricos que “purificado” inmediatamente anterior.

Los oligosacáridos “con unión en N” son los oligosacáridos que están unidos a una estructura principal de péptido a través de una asparagina, por medio de una unión asparagina-N-acetilglucosamina. Los oligosacáridos con unión en N también se denominan “N-glicanos”. Los oligosacáridos con unión en N que se producen de manera natural tienen un núcleo de pentasacárido común de  $\text{Man}[(\alpha 1,6)-(\text{Man}(\alpha 1,3))-\text{Man}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,N)]$ . Difieren en la presencia y en el número de ramificaciones (también denominadas antenas) de azúcares periféricos tales como N-acetilglucosamina, galactosa, N-acetilgalactosamina, fucosa y ácido siálico. Opcionalmente, esta estructura también puede contener una molécula de xilosa y/o molécula de fucosa central.

El término “ácido siálico” se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia de ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-glicilil-neuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia de ácido siálico 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)). También se incluyen ácidos siálicos 9-sustituidos tales como un 9-O-acil  $\text{C}_1\text{C}_6$ -Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para una revisión de la familia de ácido siálico véase, por ejemplo, Varki, *Glycobiology* 2: 25-40 (1992); *Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function*, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, Nueva York (1992)).

Una célula “modificada por ingeniería genética” o “recombinante” es una célula que tiene una o más modificaciones en el material genético de la célula. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, inserciones de material genético, deleciones de material genético e inserción de material genético que es extracromosómico tanto si tal material se mantiene de manera estable como si no.

Tal como se usa en el presente documento, el término “azúcar modificado” se refiere a un hidrato de carbono que se produce de manera natural o que no se produce de manera natural que se añade enzimáticamente sobre un aminoácido o un residuo de glicosilo de un péptido en un procedimiento de la invención. El azúcar modificado se selecciona de varios sustratos enzimáticos incluyendo, pero sin limitarse a, nucleótidos de azúcar (mono-, di-, y trifosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo) y azúcares que ni están activado ni son nucleótidos. Un “azúcar modificado” puede funcionalizarse covalentemente con un “grupo modificador”. Los grupos modificadores útiles incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua e insolubles en agua, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, biomoléculas. El lugar de funcionalización con el grupo modificador se selecciona de manera que no impide que el “azúcar modificado” se añada enzimáticamente a un péptido o residuo de glicosilo del péptido.

#### Polipéptidos de SAP variantes

En parte, la divulgación proporciona polipéptidos de amiloide P sérico (SAP) variantes tal como se caracterizan en las reivindicaciones adjuntas y también tal como se describen en el presente documento. En particular, las variantes de SAP de la invención incluyen polipéptidos de SAP humano glicosilados que comprenden una o más cadenas de oligosacárido con unión en N o con unión en O teniendo cada una independientemente una, dos, tres, cuatro, cinco o más ramificaciones que terminan en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha 2,3$ . En algunas realizaciones, todas las ramificaciones de las cadenas de oligosacárido con unión en N o con unión en O terminan en restos con unión  $\alpha 2,3$ . También se describen en el presente documento variantes de SAP que incluyen polipéptidos de SAP humano glicosilados que contienen cadenas de oligosacárido con unión en N o con unión en O que tienen al menos el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 75%, el 80%, el 85% o incluso al menos el 95% menos de restos de ácido siálico con unión  $\alpha 2,6$  que un polipéptido de SAP silvestre derivado de suero humano. Se describe además en el presente documento que las cadenas de oligosacárido con unión en N o con unión en O están sustancialmente libres de restos de ácido siálico con unión  $\alpha 2,6$ , por ejemplo, teniendo menos del 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o incluso menos del 99% de restos de ácido siálico con unión  $\alpha 2,6$  en relación con un polipéptido de SAP silvestre derivado de suero humano. Los polipéptidos de SAP glicovariantes de la invención pueden comprender un oligosacárido con unión en N o cadena con unión en O que tiene una o más ramificaciones (por ejemplo, que tiene una estructura biantenaria, triantenaria, tetraantenaria, pentaantenaria, etc.). En determinadas realizaciones, los polipéptidos de SAP de la invención comprenden una cadena de oligosacárido con unión en N o con unión en O en la que una, dos, tres, cuatro o cinco ramificaciones de la cadena de oligosacárido están sustancialmente libres de galactosa y N-acetilglucosamina (por ejemplo, que tienen menos del 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o incluso menos del 99% de N-acetilglucosamina en relación con un polipéptido de SAP silvestre derivado de suero humano). Determinados polipéptidos de SAP de la invención tienen cadenas de oligosacárido con unión en N o con unión en O que están sustancialmente libres de galactosa y N-acetilglucosamina (por ejemplo, que tienen menos del 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o incluso menos del 99% de galactosa y/o N-acetilglucosamina en relación con un polipéptido de SAP silvestre derivado de suero humano). En algunas realizaciones, los polipéptidos de SAP de la invención comprenden una cadena de oligosacárido con unión en N o con unión en O en la que una, dos, tres, cuatro o cinco ramificaciones de la cadena de oligosacárido contienen uno o más residuos de manosa. En determinadas realizaciones, el polipéptido de SAP de la invención comprende un oligosacárido con unión en N que tiene un núcleo de pentasacárido de  $\text{Man}[(\alpha 1,6)-(\text{Man}(\alpha 1,3)]-\text{Man}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,N)-\text{Asn}$ . Este núcleo de pentasacárido también puede comprender uno o más residuos de fucosa o xilosa. En determinadas realizaciones, los polipéptidos de SAP de la invención comprenden una cadena de oligosacárido con unión en N en la que una, dos, tres, cuatro o cinco ramificaciones de la cadena de oligosacárido tienen la estructura  $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$ . Los polipéptidos de SAP de la invención también pueden comprender una cadena de oligosacárido con unión en N en la que todas las ramificaciones tienen la estructura  $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$ .

Los polipéptidos de SAP variantes de la invención pueden comprender uno o más residuos de azúcar “modificados”. Los azúcares modificados están sustituidos en cualquier posición que permita la unión del grupo o resto modificador. En aspectos preferidos, el azúcar modificado está sustituido en una posición que todavía permite que el azúcar funcione como sustrato para una enzima usada para acoplar el azúcar modificado al péptido de SAP. Un grupo modificador puede unirse a un resto de azúcar por medios enzimáticos, medios químicos o una combinación de los mismos, produciendo de ese modo un azúcar modificado, por ejemplo, galactosa, fucosa o ácido siálico modificado. En la siguiente sección se describen grupos modificadores adecuados para su uso en la presente invención así como métodos para conjugar estos grupos modificadores con residuos de azúcar.

En aspectos preferidos, los polipéptidos de SAP variantes de la invención tienen una  $\text{CI}_{50}$  para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor de la mitad de la de una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano. En algunas realizaciones, los polipéptidos de SAP variantes de la invención tienen una  $\text{CI}_{50}$  para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor de 1/3, menor de 1/4, menor de 1/10 o menor de 1/100 de la de una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano.

Los polipéptidos de SAP variantes de la invención pueden ser idénticos al menos en el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, tal como se determina usando el

programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)). En una realización específica, los parámetros empleados para calcular la identidad en porcentaje y la similitud de una alineación de aminoácidos comprenden: Matriz=PAM 150, k-tupla=2, penalización por falta de coincidencia=1, penalización por unión=20, longitud del grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, penalización por hueco=5 y penalización por tamaño de hueco=0,05.

El término “polipéptido de SAP” engloba fragmentos funcionales y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de los anteriores. Generalmente, un polipéptido de SAP se diseñará para que sea soluble en disoluciones acuosas a temperaturas, niveles de pH y osmolaridad biológicamente relevantes. Los promotores de SAP que se asocian de manera no covalente entre sí para formar un complejo de SAP pentamérico pueden tener secuencias de aminoácidos y/o modificaciones postraduccionales idénticas o, alternativamente, los promotores de SAP individuales dentro de un único complejo pueden tener secuencias y/o modificaciones diferentes. El término polipéptido de SAP incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de SAP que se produce de manera natural así como cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos y fusiones). Un polipéptido de SAP de la invención puede ser un polipéptido recombinante. En realizaciones preferidas, el polipéptido de SAP de la invención es un polipéptido de SAP humano.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de SAP variante de la invención, o un fragmento funcional del mismo. En algunos aspectos, la secuencia de aminoácidos de una variante de SAP puede diferir de SEQ ID NO: 1 en una o más sustituciones conservativas o no conservativas. Tal como se usa en el presente documento, “sustituciones conservativas” son residuos que son física o funcionalmente similares a los residuos de referencia correspondientes, es decir, una sustitución conservativa y su residuo de referencia tienen tamaño, conformación, carga eléctrica y/o propiedades químicas similares (por ejemplo, la capacidad para formar enlaces covalentes o de hidrógeno). Sustituciones conservativas preferidas son las que satisfacen los criterios definidos para una mutación puntual aceptada en Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 (1978 y sup.). Ejemplos de sustituciones conservativas son sustituciones dentro de los siguientes grupos: (a) valina, glicina; (b) glicina, alanina; (c) valina, isoleucina, leucina; (d) ácido aspártico, ácido glutámico; (e) asparagina, glutamina; (f) serina, treonina; (g) lisina, arginina, metionina; y (h) fenilalanina, tirosina. Puede encontrarse orientación adicional referente a qué cambios de aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silenciosos en Bowie *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990).

Polipéptidos de SAP variantes y fragmentos de los mismos que conservan la función biológica son útiles en las composiciones farmacéuticas y los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, un polipéptido de SAP variante o fragmento del mismo se une a Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y/o Fc $\gamma$ RIIIB. En algunas realizaciones, un polipéptido de SAP variante o fragmento del mismo inhibe una o más de diferenciación en fibrocitos, precursores de fibrocitos, precursores de miofibroblastos y/o precursores de monocitos hematopoyéticos. Pueden generarse variantes de SAP modificando la estructura de un polipéptido de SAP para fines tales como potenciar la eficacia terapéutica o estabilidad (por ejemplo, vida útil de almacenamiento *ex vivo* y resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*).

En determinados aspectos, los polipéptidos de SAP variantes de la divulgación pueden comprender además modificaciones postraduccionales además de cualquiera que esté presente de manera natural en el polipéptido de SAP. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación (por ejemplo, oligosacáridos con unión en O, oligosacáridos con unión en N, etc.), fosforilación y lipidación. Como resultado, el polipéptido de SAP modificado puede contener elementos distintos de aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o monosacáridos y fosfatos.

En determinados aspectos, una o más modificaciones en el polipéptido de SAP descrito en el presente documento pueden potenciar la estabilidad del polipéptido de SAP. Por ejemplo, tales modificaciones pueden potenciar la semivida *in vivo* del polipéptido de SAP o reducir la degradación proteolítica del polipéptido de SAP.

En determinados aspectos, los polipéptidos de SAP variantes de la invención incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una parte del polipéptido de SAP humano y uno o más dominios de fusión o partes heterólogas. Los ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, y región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP), o albúmina sérica humana. Puede seleccionarse un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para el fin de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Como otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos de SAP. Los ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como “etiquetas de epítipo”, que son habitualmente secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epítipo bien conocidas para las que están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen etiquetas FLAG, de hemaglutinina (HA) de virus influenza y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasas que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y de ese modo libere la proteína recombinante de las mismas. Las proteínas liberadas pueden aislarse entonces del dominio de fusión mediante separación

5 cromatográfica posterior. En algunos casos, el polipéptido de SAP puede fusionarse a un dominio heterólogo que estabiliza el polipéptido de SAP *in vivo*. Por “estabilizar” quiere decirse cualquier cosa que aumente la semivida en suero, independientemente de si esto se debe a una disminución de la destrucción, disminución del aclaramiento por el riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la parte Fc de una inmunoglobulina y albúmina sérica confieren un aumento de estabilidad.

10 Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión pueden disponerse de cualquier manera que sea compatible con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido de SAP puede colocarse en posición C-terminal con respecto a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo puede colocarse en posición C-terminal con respecto a un polipéptido de SAP. No es necesario que el polipéptido de SAP y el dominio heterólogo estén adyacentes en una proteína de fusión, y pueden incluirse dominios o secuencias de aminoácidos adicionales (por ejemplo, secuencias de ligador) en posición C- o N-terminal con respecto a cualquier dominio o entre los dominios.

#### Métodos de producción de moléculas con N-glicosilación alterada

15 En el presente documento se describen métodos de producción de polipéptidos de SAP humanos variantes. Los métodos implican generalmente una etapa de poner en contacto un polipéptido de SAP con uno o más agentes químicos o enzimáticos tal como se caracterizan en las reivindicaciones adjuntas y también tal como se describen en el presente documento para producir o modificar una estructura de glicosilación en el polipéptido de SAP. Los métodos pueden basarse en células o no basarse en células.

20 En la técnica enzimas se conocen bien útiles para producir o modificar estructuras de glicanos. La mayoría de las enzimas/proteínas útiles en los métodos de la divulgación pueden clasificarse en una de dos clases funcionales: glicosiltransferasas y glicosidasas. Glicosiltransferasas (por ejemplo, N-acetilglucosaminil-transferasas, galactosil-transferasas, fucosil-transferasas, sialil-transferasas, glucosil-transferasas, manosil-transferasas, etc.), tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enzima/proteína que tiene la capacidad para transferir un azúcar donador a un resto aceptor. Glicosidasas (por ejemplo, glucosidasas, manosidasas, N-acetilglucosaminidasas, sialidasas, fucosidasas, etc.), tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enzima/proteína que tiene la capacidad para catalizar la hidrólisis de la unión glicosídica entre restos de azúcar.

30 Los métodos basados en células para producir glicoformas alteradas de un polipéptido de SAP usan células o bien silvestres (por ejemplo, células CHO) o bien modificadas por ingeniería genética que tienen al menos una actividad de glicosilación modificada en relación con una célula humana. Las células adecuadas para los métodos de la divulgación incluyen, por ejemplo, células fúngicas, células procariotas (es decir, bacterias, *Archaea*), células vegetales o células animales (por ejemplo, nematodos, insectos, plantas, aves, reptiles o mamíferos (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, hámster, jerbo, perro, gato, cabra, cerdo, vaca, caballo, ballena, mono o ser humano)). Las células pueden ser células primarias, células inmortalizadas o células transformadas. Tales células pueden obtenerse de una variedad de fuentes comerciales e instalaciones de recursos de investigación, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, Md.). En determinados aspectos, la célula usada para producir un polipéptido de SAP variante es una célula CHO.

40 El término “actividad de glicosilación” se refiere a cualquier actividad que puede (i) añadir glicanos con unión en N o con unión en O a una molécula diana (es decir, una actividad oligosacaril-transferasa); (ii) eliminar glicanos con unión en N o con unión en O a partir de una molécula diana; (iii) modificar uno o más glicanos con unión en N o con unión en O en una molécula diana; (iv) modificar oligosacáridos unidos a dolicol; (v) ayudar en la actividad de una o más de las actividades en i-iv. Por consiguiente, la actividad de glicosilación incluye, por ejemplo, actividad glicosidasa, actividad glicosiltransferasa, actividad de síntesis, modificación o transportador de nucleótidos de azúcar. La modificación de uno o más glicanos con unión en N o con unión en O en una molécula diana incluye la acción de una actividad manosilfosforil-transferasa, una actividad cinasa o una actividad fosfatasa, por ejemplo, una actividad manosilfosforil-transferasa, una actividad cinasa o una actividad fosfatasa que altera el estado de fosforilación de glicanos en moléculas diana.

50 Las células modificadas por ingeniería genética útiles en los métodos de la divulgación pueden tener una o más modificaciones genéticas incluyendo, pero sin limitarse a: (i) delección de un gen endógeno que codifica para una proteína que tiene actividad de glicosilación; (ii) introducción de un ácido nucleico recombinante que codifica para una forma mutante de una proteína (por ejemplo, proteína endógena o exógena) que tiene una actividad de glicosilación; (iii) introducción o expresión de una molécula de ARN que interfiere con la expresión funcional de una proteína que tiene la actividad de glicosilación; (iv) introducción de un ácido nucleico recombinante que codifica para una proteína silvestre (por ejemplo, endógena o exógena) que tiene actividad de glicosilación; o (v) alterar los elementos promotores o potenciadores de uno o más genes endógenos que codifican para proteínas que tienen actividad de glicosilación para así alterar la expresión de las proteínas codificadas. Las moléculas de ARN descritas anteriormente incluyen, por ejemplo, ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN en horquilla corto (ARNhc), ARN antisentido o microARN (miARN). Se entiende que el punto (ii) incluye, por ejemplo, la sustitución de un gen endógeno (por ejemplo, mediante recombinación homóloga) por un gen que codifica para una proteína que tiene mayor actividad de glicosilación en relación con el gen endógeno sustituido de ese modo.

Las células modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento tienen una o más actividades de glicosilación alteradas tales como: (i) un aumento en una o más actividades de glicosilación en la célula modificada genéticamente, (ii) una disminución en una o más actividades de glicosilación en la célula modificada genéticamente, (iii) un cambio en la localización o distribución intracelular de una o más actividades de glicosilación en la célula modificada genéticamente, o (iv) un cambio en la razón de una o más actividades de glicosilación en la célula modificada genéticamente en relación con una célula no modificada del mismo origen. Se entiende que un aumento en la cantidad de actividad de glicosilación puede deberse a la sobreexpresión de una o más proteínas que tienen actividad de glicosilación, un aumento en el número de copias de un gen endógeno (por ejemplo, duplicación génica), o una alteración en el promotor, potenciador o supresor de un gen endógeno que estimula un aumento en la expresión de la proteína codificada por el gen. Una disminución en una o más actividades de glicosilación puede deberse a la sobreexpresión de una forma mutante (por ejemplo, una forma dominante negativa) de una o más proteínas que tienen actividades que alteran la glicosilación, la introducción o expresión de una o más moléculas de ARN de interferencia que reducen la expresión de una o más proteínas que tienen una actividad de glicosilación, o la delección de uno o más genes endógenos que codifican para una proteína que tiene actividad de glicosilación.

Las células modificadas por ingeniería genética usadas mediante los métodos de la divulgación pueden expresar (por ejemplo, sobreexpresar) genes silvestres o mutantes que codifican para proteínas que tienen actividad de glicosilación. Tales genes incluyen, pero no se limitan a, ALG7, ALG13, ALG14, ALG1, ALG2, ALG11, RFT1, ALG3, ALG9, ALG12, ALG6, ALG8, ANL1, ALG10, ALG5, OST3, OST4, OST6, STT3, OST1, OST5, WBP1, SWP1, OST2, DPM1, SEC59, OCH1, MNN9, VAN1, MNN8, MNN10, MNN11, HOC1, MNN2, MNN5, MNN6, KTR1, YUR1, MNN4, KRE2, KTR2, KTR3, MNN1, MNS1, MNN4, PNO1, MNN9, glucosidasa I, glucosidasa II o endomanosidasa. Los genes que codifican para proteínas que tienen actividad de glicosilación pueden ser de cualquier especie (por ejemplo, eucariotas inferiores (por ejemplo, hongos (incluyendo levaduras) o tripanosomas), procariotas (es decir, bacterias o *Archaea*), plantas o animales (por ejemplo, insectos, aves, reptiles o mamíferos, tales como ratón o rata, perro, gato, caballo, cabra, vaca, cerdo, primate no humano o ser humano)). Se entiende que las células modificadas por ingeniería genética usadas para los métodos de la divulgación pueden expresar cualquier número de genes (por ejemplo, genes que codifican para proteínas que tienen actividad de glicosilación) y/o cualquier combinación de uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 ó 20 o más) de cualquiera de los genes mencionados en el presente documento. Además, cualquier célula modificada por ingeniería genética usada por los métodos de la divulgación puede comprender cualquier número de mutaciones que alteran o suprimen una o más actividades de glicosilación.

En algunas realizaciones, el término “expresión génica” o “expresión” se refiere a los procesos celulares mediante los cuales se produce un polipéptido biológicamente activo a partir de una secuencia de ADN y presenta una actividad biológica en una célula. Como tal, la expresión génica implica los procesos de transcripción y traducción, pero también implica procesos postranscripcionales y postraduccionales que pueden influir en una actividad biológica de un gen o producto génico. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, síntesis, procesamiento y transporte de ARN, así como síntesis, transporte de polipéptidos, y modificación postraducciona de polipéptidos.

Por ejemplo, la divulgación proporciona métodos para producir un polipéptido de SAP de la invención expresando un gen de SAP en una célula. En algunas realizaciones, la célula puede contener un gen de SAP endógeno o fragmento del mismo. En otras realizaciones, puede introducirse (por ejemplo, transformarse, transfectarse, etc.) un polinucleótido que codifica para un polipéptido de SAP exógeno o fragmento del mismo en una célula. Los polinucleótidos de SAP adecuados que pueden introducirse en una célula incluyen fragmentos de ácido nucleico así como constructos de ácido nucleico o vectores de expresión. En realizaciones preferidas, el gen endógeno o exógeno codifica para un polipéptido de SAP humano.

En algunas realizaciones, el fragmento de ácido nucleico, por ejemplo, que codifica para un polipéptido de SAP humano, usado para transformar la célula huésped puede incluir un sitio de Shine-Dalgarno (por ejemplo, un sitio de unión a ribosoma) y un sitio de iniciación (por ejemplo, el codón ATG) para iniciar la traducción del mensaje transcrito para producir la enzima. Además, puede incluir una secuencia de terminación para terminar la traducción. Una secuencia de terminación es normalmente un codón para el que no existe un aminoacetil-ARNt correspondiente, terminando así la síntesis del polipéptido. En algunas realizaciones, puede suministrarse un constructo de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de SAP, por ejemplo, como plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce un polipéptido de SAP.

En algunas realizaciones, un vector de expresión adecuado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de SAP de la invención operativamente unida a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras se reconocen en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión de cualquiera de los polipéptidos de la divulgación. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen secuencias reguladoras a modo de ejemplo en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquier secuencia de control de la expresión que regule la expresión de una secuencia de ADN cuando está operativamente unida a la misma puede usarse en estos vectores para expresar cualquiera de los polipéptidos de la divulgación. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor *tet*, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema TAC o TRC, promotor de T7 cuya expresión está dirigida por ARN polimerasa de T7, las

regiones de promotor y operador principales del fago lambda, las regiones de control para la proteína de recubrimiento fd, el promotor para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de  $\alpha$ -acoplamiento, el promotor de polihedrina del sistema de baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse y/o el tipo de proteína que se desea que se exprese. Además, también deben considerarse el número de copias del vector, la capacidad para controlar el número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores de antibiótico.

En algunas realizaciones, el fragmento de ácido nucleico o sistema de expresión usado para transformar la célula huésped puede incluir opcionalmente una o más secuencias marcadoras. En términos generales, las secuencias marcadoras adecuadas codifican normalmente para un producto génico, habitualmente una enzima que inactiva o detecta de otra forma o se detecta por un compuesto en el medio de crecimiento. Por ejemplo, la inclusión de una secuencia marcadora puede hacer que la célula transformada sea resistente a un antibiótico, o puede conferir un metabolismo específico de compuesto a la célula transformada. Los ejemplos de secuencias marcadoras adecuadas que confieren resistencia incluyen kanamicina, ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina. Alternativamente, en vez de presión selectiva, puede usarse un gen marcador que permita la detección de colonias particulares que contienen el gen, tal como  $\beta$ -galactosidasa, en el que se emplea un sustrato que proporciona un producto coloreado.

Una variedad de métodos son adecuados para transformar una célula de la presente invención con un fragmento de ácido nucleico o vector de expresión. Los métodos de transformación comunes incluyen electroporación, transformación mediada por liposomas, transformación mediada por calcio y transfección mediada por virus.

En determinados aspectos, cuando se transforma una célula huésped con un fragmento de ácido nucleico o sistema de expresión de la presente invención, el gen (por ejemplo, SAP humano) en dicho sistema puede integrarse en el ADN cromosómico de las células huésped mediante una denominada recombinación homóloga y el huésped portará el sistema de expresión de manera estable.

Con el fin de integrar el sistema de expresión en el vector en el ADN cromosómico de las células huésped, puede usarse un gen marcador de selección apropiado en el que dicho gen marcador tiene una secuencia homóloga al gen en el ADN cromosómico de la célula huésped específica. El experto en la técnica puede seleccionar fácilmente marcadores de selección para tal fin. Como ejemplo, un marcador preferido es un gen que existe en un cromosoma y que está relacionado con el metabolismo de las células huésped. Concretamente, se prefiere usar un huésped que se ha modificado de tal manera que el gen mencionado anteriormente en el cromosoma se inactivará mediante un medio apropiado tal como una mutación. El huésped puede someterse entonces a una recombinación homóloga con un vector de expresión que contiene el gen intacto correspondiente, con lo cual sólo los transformantes que contienen el gen de metabolismo normal pueden crecer para seleccionarse. Por tanto, si se ha introducido un gen marcador de este tipo en el vector de expresión, tendrá lugar una recombinación homóloga entre el gen marcador en dicho vector de expresión y la parte correspondiente del ADN cromosómico, con lo cual el casete de expresión del gen heterólogo se integrará simultáneamente en el ADN cromosómico.

En algunas realizaciones, el término "expresar" una proteína en una célula también incluye métodos de introducción de una proteína por sí misma en células. Por tanto, en determinados aspectos, la divulgación proporciona métodos para preparar un polipéptido de SAP de la invención introduciendo un polipéptido de SAP en una célula. En la técnica se conocen técnicas para introducir polipéptidos directamente en una célula e implican generalmente un procedimiento de permeación de la membrana celular. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, microinyección de polipéptidos de SAP; encapsulación de un polipéptido de SAP dentro de vesículas de membrana (por ejemplo, liposomas, cuerpos capsulares, fantasmas de eritrocitos, protoplastos, etc.) y puesta en contacto de los mismos con una membrana celular para de ese modo provocar la introducción intracelular del polipéptido de SAP mediante fusión; uso de métodos físicos (por ejemplo, mecánicos, químicos, eléctricos, etc.) que se basan en macromoléculas que entran en células mediante difusión a través de orificios introducidos de manera transitoria en sus membranas plasmáticas (por ejemplo, carga por raspado, carga por perlas, etc.); y mediante captación a través de endocitosis natural debido a fagocitosis celular. Un método de introducción intracelular puede utilizar una ruta mediada por receptor, en el que uno de diversos receptores expresados sobre la superficie celular se fija como diana y se une un polipéptido de SAP (de manera covalente o no covalente) al ligando relacionado que actúa como resto transportador. Se han descrito varios métodos para introducir proteínas en células vivas usando adsorción electrostática, en la que en primer lugar se cationiza la proteína y luego se pone en contacto con la superficie cargada negativamente de una célula (véase la publicación de patente japonesa n.º 2004/049214).

En determinados aspectos, la divulgación proporciona células CHO que expresan un polipéptido de SAP. En algunas realizaciones, la célula CHO expresa un polipéptido de SAP exógeno. En realizaciones preferidas, la célula CHO expresa un polipéptido de SAP humano. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona células CHO que comprenden una secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido de SAP. En realizaciones preferidas, la secuencia de polinucleótido codifica para un polipéptido de SAP humano. Cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente puede usarse para "expresar" un polipéptido de SAP de la invención en una célula CHO o cualquier otra célula adecuada dada a conocer en el presente documento.

5 Cuando cualquiera de las actividades de glicosilación de la célula silvestre o modificada por ingeniería genética puede inducirse o depende de la presencia de una clave de inducción (por ejemplo, una clave química o física), la célula silvestre o modificada por ingeniería genética, opcionalmente, puede cultivarse en presencia de un agente de inducción antes, durante o posteriormente a la introducción del ácido nucleico que codifica para un polipéptido de SAP o un polipéptido de SAP. Por ejemplo, tras la introducción del polipéptido de SAP en la célula, puede exponerse a un agente inducción químico que puede promover la expresión de una o más proteínas que tienen una actividad de N-glicosilación silvestre o alterada. Cuando múltiples claves de inducción inducen la expresión condicional de una o más proteínas que tienen una actividad de N-glicosilación silvestre y/o alterada, puede ponerse en contacto una célula con múltiples agentes de inducción. En algunas realizaciones, el medio de cultivo puede modificarse para producir la estructura de glicanos deseada en el polipéptido de SAP. Por ejemplo, puede modificarse la concentración de suero, glucosa y/o lípido (por ejemplo, dolicol) del medio para la producción óptima de la glicovariante de SAP deseada. En algunas realizaciones, pueden alterarse la temperatura, el pH y/o la osmolaridad del medio de cultivo para la producción óptima de la glicovariante de SAP deseada.

15 Un polipéptido de SAP variante de la invención puede procesarse adicionalmente *in vivo* o puede procesarse *in vitro* antes de o tras el aislamiento de la célula o el medio celular. El procesamiento adicional puede incluir la modificación de uno o más residuos de glicano del polipéptido de SAP o una modificación en el polipéptido de SAP distinta de su(s) estructura(s) de glicano. En algunas realizaciones, el procesamiento adicional del polipéptido de SAP puede incluir la adición (unión covalente o no covalente) de uno o más restos heterólogos. En algunas realizaciones, el procesamiento adicional implica tratamiento enzimático o químico del polipéptido de SAP. El tratamiento enzimático puede implicar poner en contacto el polipéptido de SAP con una o más glicosidasas, fosfodiesterasa, fosfolipasa, glicosiltransferasa o proteasa durante un tiempo suficiente para inducir la modificación, adición o delección de residuos de glicano (por ejemplo, galactosa, manosa, fucosa, ácido siálico, xilosa, N-acetilglucosamina, etc.) sobre el polipéptido de SAP. La adaptación de una cadena de oligosacárido con unión en N puede lograrse mediante la modificación, adición o delección secuenciales de los restos de azúcar deseados, usando técnicas bien conocidas en la técnica. La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono sobre variantes de péptido puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo- y exoglicosidasas tal como se describe por Thotakura *et al.*, 1987, *Met. Enzymol.* 138: 350. Se dan a conocer métodos a modo de ejemplo de adición de restos de azúcar en las patentes estadounidenses n.ºs 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554 y 5.922.577.

30 En determinadas realizaciones, la modificación de la estructura de glicanos de SAP requiere la presencia de uno o más nucleótidos de azúcar. Los nucleótidos de azúcar a modo de ejemplo que se usan en la presente invención incluyen mono-, di- o trifosfatos de nucleótidos o análogos de los mismos. En una realización preferida, el nucleótido de azúcar modificado se selecciona de un UDP-glicósido, CMP-glicósido o un GDP-glicósido. Incluso más preferiblemente, el nucleótido de azúcar se selecciona de una UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, GDP-manosa, GDP-fucosa, CMP-ácido siálico, CMP-ácido N-glicolilneuramínico o CMP-NeuAc. En determinadas realizaciones, se utiliza un nucleótido de azúcar modificado para añadir un residuo de azúcar modificado al polipéptido de SAP. También se usan derivados de N-acetilamina de los nucleótidos de azúcar en el método de la invención.

40 La adición o eliminación química de restos glicosilo puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, la desglicosilación química puede implicar la exposición del polipéptido de SAP a ácido trifluorometanosulfónico, u otro ácido fuerte. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o la totalidad de los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), al tiempo que el péptido permanece intacto. Se describen métodos de desglicosilación química por Haldmuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 y por Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118: 131. El tratamiento químico puede implicar, por ejemplo, poner en contacto el polipéptido de SAP alterado con un ácido, tal como ácido fluorhídrico, durante un tiempo suficiente para inducir la modificación del polipéptido de SAP. El tratamiento con ácido fluorhídrico, en determinadas condiciones, elimina específicamente los residuos de manosa que están unidos por fosfodiéster a los glicanos, al tiempo que deja el fosfato sobre el glicano. Un polipéptido de SAP alterado puede procesarse adicionalmente mediante la adición o eliminación de un grupo fosfato de uno o más N-glicanos. Por ejemplo, puede ponerse en contacto un polipéptido de SAP alterado con una manosilo cinasa o una manosilo fosfatasa.

50 En determinados aspectos, es deseable modificar sólo residuos de azúcar terminales en la estructura de glicanos del polipéptido de SAP (oligosacárido con unión en N o con unión en O). En algunas realizaciones, se modifican una o más ramificaciones de la estructura de glicanos de SAP mediante la adición, eliminación, sustitución o modificación de al menos un residuo de ácido siálico terminal. Pueden usarse métodos adecuados para modificar glicanos descritos en el presente documento para alterar sólo el resto de azúcar terminal en la estructura de glicanos de SAP. En algunas realizaciones, se sustituye un residuo de ácido siálico terminal que tiene una unión  $\alpha$ 2,6, unión  $\alpha$ 2,8 o unión  $\alpha$ 2,9 por uno o más residuos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3 terminales. En un aspecto particular, se modifica SAP humano que comprende residuos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 terminales según uno de los métodos de la divulgación con el fin de sustituir uno o más de los residuos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 terminales por uno o más residuos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.

60 En determinados aspectos, el procedimiento de preparación de un polipéptido de SAP de la invención implica una primera etapa de desglicosilar el polipéptido de SAP. El polipéptido de SAP puede estar parcial o completamente

desglicosilado. En algunas realizaciones, la primera etapa de desglicosilación implica eliminar sólo restos de azúcar terminales de al menos una ramificación de la estructura de glicanos sobre el polipéptido de SAP. En algunas realizaciones, la primera etapa de desglicosilación elimina al menos un residuo de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6. En algunas realizaciones, la primera etapa de desglicosilación elimina al menos un glicano con unión en O. En algunas realizaciones, la primera etapa de desglicosilación elimina al menos un glicano con unión en N. En algunas realizaciones, la primera etapa de desglicosilación elimina todos los glicanos con unión en O y con unión en N. En algunas realizaciones, se procesa adicionalmente un polipéptido de SAP desglicosilado (parcial o completamente) según los métodos de la divulgación, lo que incluye, pero no se limita a, modificar química o enzimáticamente el polipéptido de SAP parcial o completamente desglicosilado, introducir el polipéptido de SAP parcial o completamente desglicosilado en una célula, o combinación de los mismos, en las que el/los método(s) produce(n) un polipéptido de SAP variante de la invención. En algunas realizaciones, tras haber introducido un polipéptido de SAP parcial o completamente desglicosilado en una célula, puede modificarse adicionalmente, *in vivo* o *in vitro*, según los métodos de la divulgación para producir un polipéptido de SAP variante de la invención. De manera similar, un polipéptido de SAP parcial o completamente desglicosilado que se modifica *in vitro*, usando métodos enzimáticos o químicos descritos en el presente documento, puede introducirse en una célula para producir un polipéptido de SAP variante de la invención.

Se entiende que un polipéptido de SAP de la invención puede procesarse en una célula, aunque no es necesario. Por ejemplo, la divulgación también proporciona métodos libres de células de producción de un polipéptido de SAP variante de la invención. En algunos aspectos los métodos libres de células incluyen la etapa de poner en contacto un polipéptido de SAP, en condiciones de glicosilación, con un lisado celular preparado a partir de una célula silvestre (por ejemplo, una célula fúngica, una célula vegetal o una célula animal) o célula modificada por ingeniería genética que tiene al menos una actividad de glicosilación modificada, en los que la puesta en contacto del polipéptido de SAP con el lisado celular une un oligosacárido con unión en N o con unión en O al polipéptido de SAP o modifica un oligosacárido con unión en N o con unión en O existente en el polipéptido de SAP. Por "condiciones de N-glicosilación" quiere decirse que una mezcla (por ejemplo, de polipéptido de SAP y lisado celular) se incuba en condiciones que permiten la N-glicosilación alterada deseada.

Los métodos adecuados para obtener lisados celulares que conservan la actividad o integridad de una o más actividades de glicosilación en el lisado pueden incluir el uso de tampones y/o inhibidores apropiados, incluyendo inhibidores de nucleasas, proteasas y fosfatasas que conservan o minimizan cambios en actividades de N-glicosilación en el lisado celular. Tales inhibidores incluyen, por ejemplo, quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(P-aminoetil éter)N,N,N1,N1-tetraacético (EGTA), inhibidores de proteasas tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina, antipainina, e inhibidores de fosfatasas tales como fosfato, fluoruro de sodio y vanadato. Los inhibidores pueden elegirse de manera que no interfieren con, o afectan sólo de manera mínimamente adversa a, la actividad o actividades de N-glicosilación de interés. Se describen tampones y condiciones apropiados para obtener lisados que contienen actividades enzimáticas, por ejemplo, en Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999); Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3<sup>a</sup> ed. Burtis and Ashwood, eds. W.B. Saunders, Filadelfia, (1999).

Un lisado celular puede procesarse adicionalmente para eliminar o minimizar la presencia de sustancias interferentes, según sea apropiado. Si se desea, puede fraccionarse un lisado celular mediante cualquiera de una variedad de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo fraccionamiento subcelular, y técnicas cromatográficas tales como cromatografía de intercambio iónico, fase hidrófoba e inversa, exclusión molecular, afinidad e inducción de carga hidrófoba (véanse, por ejemplo, Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, tercera edición, Springer-Verlag, Nueva York (1993); Burton y Harding, J. Chromatogr. A 814:71-81 (1998)), o cualquier otra técnica de purificación adecuada.

Puede prepararse un lisado celular en el que los orgánulos celulares completos permanecen intactos y/o funcionales. Por ejemplo, un lisado puede contener uno o más de retículo endoplasmático rugoso intacto, retículo endoplasmático liso intacto o aparato de Golgi intacto. Se describen métodos adecuados para preparar lisados que contienen orgánulos celulares y someter a prueba la funcionalidad de los orgánulos, por ejemplo, en Moreau *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 266(7):4329-4333; Moreau *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 266(7):4322-4328; Rexach *et al.* (1991) J. Cell Biol. 114(2):219-229; y Paulik *et al.* (1999) Arch. Biochem. Biophys. 367(2):265-273.

El polipéptido de SAP puede ponerse en contacto con tan sólo una proteína purificada que tiene actividad de glicosilación. En algunas realizaciones, el polipéptido de SAP puede ponerse en contacto con más de una proteína purificada que tiene actividad de glicosilación. Una o más proteínas que tienen actividad de glicosilación pueden purificarse usando técnicas de aislamiento de proteínas convencionales. Un polipéptido de SAP puede ponerse en contacto con una o más proteínas en un tampón adecuado durante un tiempo suficiente para inducir la modificación de los polipéptidos de SAP tal como se describió anteriormente. El polipéptido de SAP puede ponerse en contacto con más de una proteína al mismo tiempo o secuencialmente. Cuando el polipéptido de SAP se pone en contacto secuencialmente con más de una proteína que tiene actividad de glicosilación, el polipéptido de SAP puede purificarse tras una o más etapas, pero no es necesario. Es decir, un polipéptido de SAP puede ponerse en contacto con una actividad de proteína "A" y luego purificarse antes de poner en contacto la molécula con una actividad de

proteína "B". En la técnica se conocen métodos de modificación de péptidos como tales, por ejemplo, Lee y Park (2002) 30(6):716-720 y Fujita y Takegawa (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 282(3):678-682.

En determinados aspectos, los métodos de la divulgación comprenden una etapa de aislamiento de un polipéptido de SAP, por ejemplo, a partir de una célula o a partir de componentes de un lisado celular. En la técnica se conocen muchas técnicas convencionales para el aislamiento de proteínas. Por ejemplo, los métodos de aislamiento de polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de fase inversa, cromatografía de líquidos (por ejemplo, HPLC), cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de quelación de metales o de inmutofinidad), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, precipitación, solubilización diferencial, inmunoprecipitación, centrifugación (por ejemplo, ultracentrifugación, centrifugación en gradiente de sacarosa, etc.) o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el polipéptido de SAP puede conjugarse con una etiqueta de afinidad para facilitar la purificación del polipéptido. Las etiquetas de afinidad adecuadas para la purificación de SAP incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), estreptavidina, biotina y poli(His). Las etiquetas de afinidad pueden producirse como parte de la proteína recombinante (es decir, como una proteína de fusión que comprende un dominio de etiqueta de afinidad heterólogo y un dominio de polipéptido de SAP) o unirse (de manera covalente o no covalente) *in vivo* o *in vitro* al polipéptido de SAP. En algunas realizaciones, pueden usarse múltiples etapas de purificación para aislar un polipéptido de SAP. Por ejemplo, un polipéptido de SAP que comprende una etiqueta de purificación puede purificarse por afinidad a partir de un lisado celular o mezcla de múltiples componentes usando purificación por afinidad. Entonces el polipéptido de SAP purificado por afinidad puede purificarse adicionalmente para eliminar cualquier contaminante no deseado minoritario mediante una etapa de purificación adicional, por ejemplo, cromatografía de exclusión molecular o RP-HPLC. Cuando se produce un polipéptido de la invención en una célula, el polipéptido de SAP puede aislarse de la propia célula o de los medios en los que se cultivó la célula. En algunas realizaciones, se producen polipéptidos de SAP de la invención y se secretan de una célula a los medios de cultivo. En estas realizaciones, el aislamiento puede comprender la separación de la fracción celular de la fracción soluble que contiene SAP (por ejemplo, mediante centrifugación).

En algunos aspectos, puede ser ventajoso unir el polipéptido de SAP a un soporte de fase sólida antes de poner en contacto la molécula diana con una o más actividades de N-glicosilación. Tal unión puede permitir una purificación más fácil tras las modificaciones de la N-glicosilación. Los soportes de fase sólida adecuados incluyen, pero no se limitan a, placas de ensayo de múltiples pocillos, partículas (por ejemplo, partículas magnéticas o codificadas), una columna de cromatografía o una membrana.

En algunas realizaciones, cualquiera de los polipéptidos de SAP alterados descritos en el presente documento puede unirse a un resto heterólogo usando medios enzimáticos o químicos. Un "resto heterólogo" se refiere a cualquier constituyente que se une (por ejemplo, de manera covalente o no covalente) a la molécula diana alterada, constituyente que es diferente de un constituyente originalmente presente en el polipéptido de SAP. Los restos heterólogos incluyen, por ejemplo, polímeros solubles e insolubles en agua, restos de direccionamiento, restos terapéuticos, restos de diagnóstico y biomoléculas.

Los polipéptidos de SAP de la invención pueden comprender uno o más residuos de azúcar "modificados". Un grupo modificador puede unirse a un resto de azúcar por medios enzimáticos, medios químicos o una combinación de los mismos, produciendo de ese modo un azúcar modificado, por ejemplo, galactosa, fucosa o ácido siálico modificados. Cuando se usa un ácido siálico modificado, puede usarse o bien una sialil-transferasa o bien una trans-sialidasa en estos métodos. Los azúcares pueden sustituirse en cualquier posición que permita la unión del resto modificador, pero que todavía permita que el azúcar funcione como sustrato para la enzima usada para acoplar el azúcar modificado al péptido.

En general, el resto de azúcar y el grupo modificador se unen entre sí a través del uso de grupos reactivos, que se transforman normalmente mediante el proceso de unión en un nuevo grupo funcional o especie no reactiva. El/los grupo(s) funcional(es) reactivo(s) de azúcar puede(n) ubicarse en cualquier posición en el resto de azúcar. Grupos reactivos y clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente los que se conocen bien en la técnica de química de bioconjugados. Clases de reacciones favorecidas actualmente disponibles con restos de azúcar reactivos son las que avanzan en condiciones relativamente suaves. Éstas incluyen, pero no se limitan a, sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrófilas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples de carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se comentan, por ejemplo, en Smith y March, *Advanced Organic Chemistry*, 5ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 2001; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney *et al.*, *Modification of Proteins*; *Advances in Chemistry Series*, vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Los grupos funcionales reactivos útiles colgantes de un núcleo de azúcar o grupo modificador incluyen, pero no se limitan a: (a) grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos (por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, acilimidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alqueno, alquino y aromáticos); (b) grupos hidroxilo, que pueden convertirse, por ejemplo, en ésteres, éteres, aldehídos, etc.; (c) grupos haloalquilo, en los que el haluro puede desplazarse posteriormente con un grupo

nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión o un ión de alcóxido, dando como resultado de ese modo la unión covalente de un nuevo grupo al grupo funcional del átomo de halógeno; (d) grupos dienófilos, que pueden participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos maleimido; (e) grupos aldehído o cetona, de manera que la derivatización posterior es posible por medio de la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o por medio de mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquil-litio; (f) grupos haluro de sulfonilo para la reacción posterior con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas; (g) grupos tiol, que pueden convertirse, por ejemplo, en disulfuros o hacerse reaccionar con haluros de alquilo y acilo; (h) grupos amina o sulfhidrilo, que pueden, por ejemplo, acilarse, alquilarse u oxidarse; (i) alquenos, que pueden someterse, por ejemplo, a cicloadiciones, acilación, adición de Michael, metátesis, reacción de Heck, etc.; (j) epóxidos, que pueden reaccionar, por ejemplo, con aminas y compuestos de hidroxilo.

Los grupos funcionales reactivos pueden elegirse de manera que no participen en, o interfieran con, las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o grupo modificador. Alternativamente, puede protegerse un grupo funcional reactivo frente a su participación en la reacción por la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica entienden cómo proteger un grupo funcional particular de manera que no interfiera con un conjunto elegido de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo, Greene *et al.*, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

En algunas realizaciones, el azúcar modificado es un azúcar activado. Azúcares modificados activados útiles en la presente invención son normalmente glicósidos que se han alterado de manera sintética para incluir un grupo saliente activado. Tal como se usa en el presente documento, el término "grupo saliente activado" se refiere a los restos que se desplazan fácilmente en reacciones de sustitución nucleófila reguladas por enzimas. En la técnica se conocen muchos azúcares activados. Véanse, 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 tales grupos salientes incluyen fluoro, cloro, bromo, tosilato, mesilato, triflato y similares. Los grupos salientes activados preferidos para su uso en la presente invención son los que no estorban estéricamente de manera significativa la transferencia enzimática del glicósido al aceptor. Por consiguiente, las realizaciones preferidas de derivados de glicósidos activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, prefiriéndose particularmente fluoruros de glicosilo. Entre los fluoruros de glicosilo, los más preferidos son 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-acetilglucosaminilo, 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 son los más preferidos.

En determinados aspectos, se conjuga un residuo de azúcar modificado con uno o más polímeros solubles en agua. Los expertos en la técnica conocen muchos polímeros solubles en agua y son útiles en la práctica de la presente invención. El término polímero soluble en agua engloba especies tales como sacáridos (por ejemplo, dextrano, amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poliaminoácidos; ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido acrílico), poliéteres, por ejemplo, polietilenglicol); péptidos, proteínas, y similares. La presente invención puede ponerse en práctica con cualquier polímero soluble en agua con la única limitación de que el polímero debe incluir un punto en el que pueda unirse el resto del conjugado.

En la bibliografía se describen métodos y la química para la activación de polímeros solubles en agua y sacáridos así como métodos para conjugar sacáridos y polímeros con diversas especies. Los métodos usados comúnmente para la activación de polímeros incluyen la activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorohidrina, divinilsulfona, carbodiimida, haluros de sulfonilo, triclorotriazina, etc. (véanse, R. F. Taylor, (1991), Protein Immobilization, Fundamentals and Applications, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson *et al.*, (1993), Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, N.Y.; Dunn, R. L., *et al.*, Eds. Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, ACS Symposium Series vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

En determinados aspectos, se conjuga un residuo de azúcar modificado con uno o más polímeros insolubles en agua. En algunas realizaciones, puede usarse la conjugación con un polímero insoluble en agua para administrar un péptido terapéutico de una manera controlada. En la técnica se conoce 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 técnica apreciarán que sustancialmente cualquier sistema de administración de fármacos conocido puede aplicarse a los conjugados de la presente invención.

Los polímeros insolubles en agua representativos incluyen, pero no se limitan a, polifosfazenos, poli(alcoholes vinílicos), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poli(acrilamidas), polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquilenos), poli(tereftalatos de alquilenos), poli(vinil éteres), poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo),

poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), poliestireno, polivinilpirrolidona, plurónicos y polivinilfenol, y copolímeros de los mismos.

5 Estos y otros polímeros comentados en el presente documento pueden obtenerse fácilmente de fuentes comerciales tales como Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), Polysciences (Warrenton, Pa.), Aldrich (Milwaukee, Wis.), Fluka (Ronkonkoma, N.Y.) y BioRad (Richmond, Calif.), o bien sintetizarse a partir de monómeros obtenidos de estos proveedores usando técnicas convencionales. Los polímeros biodegradables representativos útiles en los conjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, polilactidas, poliglicolidas y copolímeros de las mismas, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), poli(lactida-co-glicolida), polianhídridos, poliortoésteres, combinaciones y copolímeros de los mismos. Son de uso particular las composiciones que forman geles, tales como los que incluyen colágeno, y plurónicos.

En una realización preferida, uno o más residuos de azúcar modificados se conjugan con una o más moléculas de PEG.

15 En determinados aspectos, el azúcar modificado se conjuga con una biomolécula. La biomolécula de la invención puede incluir, pero no se limita a, proteínas funcionales, enzimas, antígenos, anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos o nucleósidos únicos, oligonucleótidos, polinucleótidos y ácidos nucleicos monocatenarios y con más cadenas), lectinas, receptores o una combinación de los mismos. Algunas biomoléculas preferidas son esencialmente no fluorescentes, o emiten una cantidad mínima de fluorescencia tal que son inapropiadas para su uso como marcador fluorescente en un ensayo. Otras biomoléculas pueden ser fluorescentes.

20 En algunas realizaciones, la biomolécula es un resto de direccionamiento. Un "resto de direccionamiento" y "agente de direccionamiento", tal como se usa en el presente documento, se refieren a especies que se localizarán selectivamente en un tejido o región particular del cuerpo. En algunas realizaciones, se selecciona una biomolécula para dirigir el polipéptido de SAP de la invención a un compartimento intracelular específico, potenciando de ese modo la administración del péptido a ese compartimento intracelular en relación con la cantidad de péptido no derivatizado que se administra al tejido. La localización está mediada por el reconocimiento específico de determinantes moleculares, el tamaño molecular del conjugado o agente de direccionamiento, las interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y similares. Los expertos en la técnica conocen otros mecanismos para dirigir un agente a una región o tejido particular.

30 En algunas realizaciones, el azúcar modificado incluye un resto terapéutico. Los expertos en la técnica apreciarán que hay solapamiento entre la categoría de las biomoléculas y los restos terapéuticos, es decir, muchas biomoléculas tienen propiedades o potencial terapéutico.

35 Las clases de restos terapéuticos útiles incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos; fármacos antiinflamatorios esteroideos; adyuvantes; fármacos antihistamínicos; fármacos antitusivos; fármacos antiprurícticos; fármacos anticolinérgicos; fármacos antieméticos y fármacos antinauseosos; fármacos anorexígenos; fármacos estimulantes centrales; fármacos antiarrítmicos; fármacos bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos; fármacos cardiotónicos; fármacos antihipertensores; fármacos diuréticos; fármacos vasodilatadores; fármacos vasoconstrictores; fármacos antiulcerosos; fármacos anestésicos; fármacos antidepresivos; fármacos tranquilizantes y sedantes; fármacos antipsicóticos; y fármacos antimicrobianos.

40 Otros restos farmacológicos útiles en la práctica de la presente invención incluyen fármacos antineoplásicos, agentes citocidas, antiestrógenos y antimetabolitos. También se incluyen dentro de esta clase agentes basados en radioisótopos tanto para diagnóstico (por ejemplo, obtención de imágenes) como para terapia, y toxinas conjugadas.

El resto terapéutico también puede ser una hormona, un relajante muscular, un antiespasmódico, agente activante óseo, agente modulador endocrino, modulador de la diabetes, andrógeno, antidiuréticos o fármaco de calcitonina.

45 Otros grupos de modificación útiles incluyen fármacos inmunomoduladores, inmunosupresores, etc. También son útiles grupos con actividad antiinflamatoria, tales como sulindaco, etodolaco, ketoprofeno y ketorolaco. Otros fármacos de uso conjuntamente con la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

50 Los polipéptidos de SAP con N-glicosilación alterada producidos mediante los métodos de la divulgación pueden ser homogéneos (es decir, la muestra de polipéptido de SAP es uniforme en estructura de N-glicanos específica) o sustancialmente homogéneos. Por "sustancialmente homogéneos" quiere decirse que al menos aproximadamente el 25% (por ejemplo, al menos aproximadamente el 27%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 99%) de los polipéptidos de SAP contienen la misma estructura de N-glicanos específica.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de SAP variantes de la invención tienen una  $CI_{50}$  para inhibir la

diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor de 1/2, menor de 1/3, menor de 1/4, menor de 1/10 o menor de 1/100 de la de una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano. Hay muchos métodos bien caracterizados para determinar la receptividad de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o monocitos a SAP para la diferenciación en fibrocitos. Estos métodos pueden usarse para determinar la potencia

5 relativa de cualquiera de los polipéptidos variantes de SAP de la invención en comparación con una muestra de SAP derivado de suero humano, cualquier otro polipéptido variante de SAP u otro agente activante o supresor de fibrocitos. Pueden obtenerse PBMC o monocitos adecuados para su uso en estos métodos de diversas líneas de cultivo tisular. Alternativamente, pueden obtenerse células adecuadas para ensayos de diferenciación en fibrocitos de cualquier muestra biológica que contenga PBMC o monocitos. La muestra biológica puede obtenerse de suero,

10 plasma, tejido sano o tejido fibrótico. En general, los ensayos de diferenciación en fibrocitos se realizan incubando PBMC o monocitos en medios con diversas concentraciones de un polipéptido de SAP para determinar el grado de diferenciación en fibrocitos. La concentración de SAP puede oscilar entre 0,0001 µg/ml y 1 mg/ml, y en algunas realizaciones es de 0,001 µg/ml, 1,0 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml, 40 µg/ml, 45 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml o 500 µg/ml. En algunos ensayos, los medios pueden complementarse con hMCSF entre 1-100 ng/ml; siendo la concentración preferida de hMCSF 25 ng/ml. La indicación de que PBMC y monocitos se han diferenciado en fibrocitos puede determinarla un experto en la técnica. En general, los fibrocitos se definen morfológicamente como células adherentes con una conformación de huso alargada y la presencia de un núcleo ovalado. En algunos ensayos, las células se fijan y se tiñen con Hema 3 antes de contar los fibrocitos mediante recuento directo, por ejemplo, usando un microscopio invertido. Un experto en la

20 técnica interpreta la cantidad de diferenciación en fibrocitos como una indicación de la receptividad de una célula a SAP. Tal como se indica mediante los ejemplos de la divulgación, una mayor supresión de la diferenciación en fibrocitos indica un mayor grado de receptividad a SAP. Un método alternativo de medición de la diferenciación en fibrocitos implica determinar la expresión de factores secretados o marcadores de superficie celular específicos de fibrocitos, por ejemplo, citocinas (por ejemplo, IL-1ra, ENA-78/CXCL-5, PAI-1), fibronectina, colágeno-1. En la técnica se conocen bien métodos de detección y/o cuantificación de marcadores de superficie celular o factores secretados, incluyendo, pero sin limitarse a, diversas técnicas basadas en ELISA y FACS que usan anticuerpos inmunorreactivos contra uno o más marcadores específicos de fibrocitos. Tal como se describe en los ejemplos de la divulgación, la medición de la expresión de quimiocina derivada de macrófagos (MDC) es un método eficaz de determinación de la diferenciación en fibrocitos.

25

30 Los métodos para detectar y/o caracterizar la N-glicosilación (por ejemplo, N-glicosilación alterada) de un polipéptido de SAP incluyen un método asistido por secuenciador de ADN (DSA), electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluoróforo (FACE) o espectrometría de masas de desorción/ionización láser potenciada por superficie con tiempo de vuelo (SELDI-TOF EM). Por ejemplo, un análisis puede utilizar DSA-FACE en el que, por ejemplo, se desnaturalizan las glicoproteínas seguido por inmovilización, por ejemplo, sobre una membrana. Las glicoproteínas pueden reducirse entonces con un agente reductor adecuado tal como ditioneitol (DATA) o β-mercaptoetanol. Los grupos sulfhidrido de las proteínas pueden carboxilarse usando un ácido tal como ácido yodoacético. A continuación, los N-glicanos pueden liberarse de la proteína usando una enzima tal como N-glicosidasa F. Los N-glicanos, opcionalmente, pueden reconstituirse y derivatizarse mediante aminación reductora. Entonces pueden concentrarse los N-glicanos derivatizados. La instrumentación adecuada para el análisis de N-glicanos incluye, por ejemplo, el secuenciador de ADN ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems). El análisis de datos puede realizarse usando, por ejemplo, el software GENESCAN® 3.1 (Applied Biosystems). Opcionalmente, pueden tratarse adicionalmente manoproteínas aisladas con una o más enzimas para confirmar su estado de N-glicanos. Las enzimas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, α-manosidasa o α-1,2-manosidasa. Los métodos adicionales de análisis de N-glicanos incluyen, por ejemplo, espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF-EM), cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) en fase normal, fase inversa y cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, con detección amperométrica pulsada cuando los glicanos no están marcados y con absorbancia de UV o fluorescencia si los glicanos están marcados apropiadamente). Véanse también Callewaert *et al.* (2001) *Glycobiology* 11(4):275-281 y Freire *et al.* (2006) *Bioconjug. Chem.* 17(2):559-564.

40

45

#### El polipéptido de SAP de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades

50 La presente invención se refiere además al polipéptido de SAP de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado o trastorno tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas y también tal como se describe en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación proporciona dicho uso en el tratamiento de un trastorno sensible a SAP en un paciente en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de SAP variante de la invención va a administrarse

55 a un paciente que lo necesita. La dosificación y frecuencia de tratamiento puede determinarlas un experto en la técnica y variarán dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, y la naturaleza y gravedad del trastorno que va a tratarse o prevenirse. En algunas realizaciones, un polipéptido de SAP variante va a administrarse a un paciente una o dos veces al día, una o dos veces por semana, una o dos veces al mes o justo antes de o al aparecer los síntomas.

60 Las dosificaciones pueden determinarse fácilmente mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica o tal como se enseña en el presente documento. La toxicidad y el efecto terapéutico de SAP pueden determinarse

mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en animales experimentales, por ejemplo, determinando la DL<sub>50</sub> y la DE<sub>50</sub>. La DE<sub>50</sub> (dosis eficaz 50) es la cantidad de fármaco requerida para producir un efecto especificado en el 50% de una población animal. La DL<sub>50</sub> (dosis letal 50) es la dosis de fármaco que mata al 50% de una población de muestra.

5 En algunas realizaciones, el trastorno sensible a SAP es fibrosis. El uso de SAP como tratamiento terapéutico para la fibrosis se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0243163. Los trastornos relacionados con fibrosis que pueden tratarse con el método objeto incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de colágeno, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar fibrótica humana (por ejemplo, bronquiolitis obliterante, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar de etiología conocida, estroma tumoral en enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica que afecta a los pulmones, síndrome de Hermansky-Pudlak, neumoconiosis de los mineros del carbón, asbestosis, silicosis, hipertensión pulmonar crónica, hipertensión pulmonar asociada con SIDA, sarcoidosis, asma de moderada a grave y similares), enfermedad vascular fibrótica, esclerosis arterial, aterosclerosis, venas varicosas, infartos coronarios, infartos cerebrales, fibrosis miocárdica, fibrosis musculoesquelética, adhesiones posquirúrgicas, enfermedad renal humana (por ejemplo, síndrome nefrítico, síndrome de Alport, nefropatía asociada con VIH, enfermedad renal poliquística, enfermedad de Fabry, nefropatía diabética, glomerulonefritis crónica, nefritis asociada con lupus sistémico, y similares), esclerosis sistémica progresiva (PSS), colangitis esclerosante primaria (PSC), fibrosis hepática, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, fibrosis quística, enfermedad de injerto contra huésped crónica, esclerodermia (local y sistémica), oftalmopatía de Graves, retinopatía diabética, glaucoma, enfermedad de Peyronie, fibrosis del pene, uretrostenosis tras citoscopia, acreción interna tras cirugía, cicatrización, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal idiopática, fibrosis peritoneal de etiología conocida, ergotismo inducido por fármacos, fibrosis a consecuencia de cáncer benigno o maligno, fibrosis a consecuencia de infección microbiana (por ejemplo, viral, bacteriana, parasitaria, fúngica, etc.), enfermedad de Alzheimer, fibrosis a consecuencia de enfermedad inflamatoria del intestino (incluyendo formación de estenosis en enfermedad de Crohn y colitis microscópica), tumores de células del estroma, mucositis, fibrosis inducida por ataque químico o ambiental (por ejemplo, quimioterapia contra el cáncer, pesticidas o radiación (por ejemplo, radioterapia contra el cáncer)).

En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con fibrosis se selecciona de esclerodermia sistémica o local, queloides, cicatrices hipertróficas, aterosclerosis, reestenosis, fibrosis e inflamación pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis como resultado de infección por hepatitis B o C crónica, enfermedad renal, enfermedad cardíaca resultante de tejido cicatricial, degeneración macular y retinopatía retiniana y vítrea. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con fibrosis resulta de fármacos quimioterápicos, fibrosis inducida por radiación, y lesiones y quemaduras. En algunas realizaciones, el trastorno o estado relacionado con fibrosis resulta de la cicatrización posquirúrgica, por ejemplo, tras trabeculectomía u otra cirugía de filtración del ojo.

En algunas realizaciones, el trastorno sensible a SAP es un trastorno de hipersensibilidad tal como los mediados por respuestas Th1 o Th2. El uso de SAP como tratamiento terapéutico para trastornos de hipersensibilidad también se describe en la solicitud provisional estadounidense n.º 61/209.795. Los trastornos relacionados con hipersensibilidad que pueden tratarse con SAP incluyen, pero no se limitan a, rinitis alérgica, sinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, broncoconstricción alérgica, disnea alérgica, aumento alérgico en la producción de moco en los pulmones, eccema atópico, dermatitis, urticaria, anafilaxia, neumonitis y asma alérgica.

En algunas realizaciones, puede usarse un polipéptido de SAP variante de la invención en el tratamiento de respuestas inmunitarias específicas de alérgeno, tales como anafilaxia, a diversos antígenos, incluyendo, pero sin limitarse a, fármacos antimicrobianos (por ejemplo, cefalosporinas, sulfonamidas, penicilina y otras β-lactamas), anticonvulsivos (por ejemplo, fenitoína, fenobarbital, carbamazepina, dapsona, alopurinol y minociclina), quimioterápicos (por ejemplo, taxanos, compuestos de platino, asparaginasas y epipodofilotoxinas), heparina, insulina, protamina, aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos, relajantes musculares (por ejemplo, succinilcolina, atracurio, vecuronio y pancuronio), agentes de inducción (por ejemplo, barbituratos, etomidato, propofol), narcóticos (por ejemplo, fentanilo, meperidina, morfina), coloides para la expansión del volumen intravascular, materiales de radiocontraste, hemoderivados, látex, productos animales, caspa de animales, ácaros del polvo, insectos (por ejemplo, mordeduras, picaduras o veneno), cosméticos, metales (por ejemplo, níquel, cobalto y cromato), plantas, esporas, polen, alimentos (por ejemplo, leche, huevos, trigo, soja, cacahuets y frutos secos, marisco), vacunación y antígenos fúngicos (por ejemplo, especies de *Aspergillus*, *Curvularia*, *Exserohilum* y *Alternaria*).

En algunas realizaciones, el trastorno sensible a SAP es un trastorno autoinmunitario tal como los mediados por respuestas de Th1 o Th2. El uso de SAP como tratamiento terapéutico para trastornos autoinmunitarios también se describe en la solicitud provisional estadounidense n.º 61/209.845. Los trastornos relacionados con autoinmunidad que pueden tratarse con SAP incluyen, pero no se limitan a, diabetes tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, miocarditis autoinmunitaria, pénfigo, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, artritis de Lyme crónica, cardiomiopatía dilatada familiar, dermatomiositis juvenil, policondritis, síndrome de Sjogren, psoriasis, artritis idiopática juvenil, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad de injerto contra huésped.

En algunas realizaciones, el trastorno sensible a SAP es una mucositis. El uso de SAP como tratamiento terapéutico

para la mucositis también se describe en la solicitud estadounidense n.º 12/217.614. Los métodos de la invención pueden ser útiles para tratar mucositis oral, esofágica y gastrointestinal, así como úlceras gástricas y duodenales, o erosiones del estómago y esófago.

5 En algunas realizaciones, puede usarse un polipéptido de SAP variante de la invención en el tratamiento de una enfermedad o estado inflamatorio. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria puede ser una infección viral, bacteriana, fúngica o parasitaria. El uso de SAP como tratamiento terapéutico para la infección viral también se ha descrito en la patente estadounidense 6.406.698 y en la solicitud de patente internacional n.º WO1997/026906.

#### Preparaciones y formulaciones farmacéuticas

10 En determinadas realizaciones, al menos un polipéptido de SAP variante de la invención es para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad tal como se describió anteriormente, en el que el polipéptido de SAP va a administrarse a un sujeto como agente terapéutico. Los agentes terapéuticos de la invención pueden formularse de una manera convencional usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, pueden formularse agentes terapéuticos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables para su administración mediante, por ejemplo, inyección (por ejemplo s.c., i.m., i.p.), inhalación o insuflación (a través o bien de la boca o bien de la nariz) o administración oral, bucal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral o rectal. En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos pueden ser para administración local, en el sitio en el que están presentes las células diana, es decir, un tejido, órgano o líquido específico (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, masa tumoral, etc.).

20 La presente invención proporciona además el uso de cualquier polipéptido de SAP variante de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno o un estado, tal como se describe en el presente documento, en un paciente, por ejemplo, el uso de un polipéptido de SAP variante en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o estado descrito en el presente documento. En algunos aspectos, puede usarse cualquier polipéptido de SAP variante de la invención para preparar una preparación farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o estado descrito en el presente documento.

25 Los agentes terapéuticos pueden formularse para una variedad de modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada. Pueden encontrarse técnicas y formulaciones en general en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. Para administración parenteral, se prefiere la inyección, incluyendo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para la inyección, los compuestos pueden formularse en disoluciones líquidas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y disolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen formas liofilizadas. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos pueden administrarse a células mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis o mediante incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas.

30 Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma, por ejemplo, de comprimidos, pastillas para chupar o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma, por ejemplo, de disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse adecuadamente para dar la liberación controlada del compuesto activo.

35 Para administración mediante inhalación (por ejemplo, administración pulmonar), los agentes terapéuticos pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases a presión o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos farmacéuticos también pueden administrarse por las vías intranasal o intrabronquial incluyendo insuflación, polvos y formulaciones en aerosol (para ejemplos de inhalantes de esteroides, véanse Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacology. 35:1187-1193; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75:107-111). Por ejemplo, pueden ponerse formulaciones en aerosol en propelentes a presión aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. También pueden formularse como productos farmacéuticos para preparaciones no a presión tales como en un nebulizador o un atomizador. Normalmente, tal administración es en un tampón acuoso farmacológicamente aceptable.

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas adecuadas para administración respiratoria (por ejemplo, intranasal, inhalación, etc.) de polipéptidos de SAP variantes o bien en forma sólida o bien en forma líquida.

Pueden formularse polipéptidos de SAP de la invención para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Además, también pueden formularse polipéptidos de SAP de la invención como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo por vía subcutánea o por vía intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, pueden formularse agentes terapéuticos con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados ligeramente solubles, por ejemplo, como una sal ligeramente soluble. La fórmula de liberación controlada también incluye parches.

En determinadas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse para su administración al sistema nervioso central (SNC) (revisado en Begley, Pharmacology & Therapeutics 104: 29-45 (2004)). Los enfoques convencionales para la administración de fármacos al SNC incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene afinidad por una molécula de superficie de células endoteliales en combinación con un agente que por sí mismo no puede cruzar la barrera hematoencefálica en un intento de aprovechar una de las rutas de transporte endógenas de la barrera hematoencefálica); estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes solubles en agua con portadores de colesterol o lípido); y la alteración transitoria de la integridad de la BBB mediante alteración hiperosmótica (resultante de la infusión de una disolución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

En determinadas realizaciones, se incorporan polipéptidos de SAP de la invención en una formulación tópica que contiene un portador tópico que es generalmente adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier material de este tipo conocido en la técnica. El portador tópico puede seleccionarse para proporcionar la composición en la forma deseada, por ejemplo, como una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, disolución, o similar, y puede estar compuesto por un material o bien de origen sintético o bien que se produce de manera natural. Es preferible que el portador seleccionado no afecte de manera adversa al agente activo u otros componentes de la formulación tópica. Los ejemplos de portadores tópicos adecuados para su uso en el presente documento incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras, y similares.

Las composiciones farmacéuticas (incluyendo preparaciones cosméticas) pueden comprender desde aproximadamente el 0,00001 hasta el 100% tal como desde el 0,001 hasta el 10% o desde el 0,1% hasta el 5% en peso de uno o más de los polipéptidos de SAP variantes descritos en el presente documento. En determinadas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente el 0,25% en peso al 75% en peso de la formulación, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 0,25% en peso al 30% en peso de la formulación, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 0,5% en peso al 15% en peso de la formulación, y lo más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 1,0% en peso al 10% en peso de la formulación.

Pueden tratarse o prevenirse estados del ojo, por ejemplo, mediante inyección sistémica, tópica, intraocular de agentes terapéuticos, o mediante inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libera agentes terapéuticos. Pueden administrarse polipéptidos de SAP de la invención en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de manera que el compuesto se mantiene en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir que el compuesto penetre en las regiones de la córnea e internas del ojo, como por ejemplo la cámara anterior, la conjuntiva, la cámara posterior, el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el humor vítreo, la córnea, el iris/cuerpo ciliar, el cristalino, la coroides/retina y la esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, una pomada, un aceite vegetal o un material de encapsulación. Alternativamente, los compuestos pueden ser para inyección directa en el humor vítreo y acuoso. En una alternativa adicional, los

compuestos pueden ser para la administración sistémica, tal como mediante inyección o infusión intravenosa, para su uso en el tratamiento del ojo.

Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento pueden almacenarse en un entorno libre de oxígeno según métodos en la técnica.

5 Las composiciones a modo de ejemplo comprenden un polipéptido de SAP con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros componentes terapéuticos. El/los portador(es) debe(n) ser "farmacéuticamente aceptable(s)" en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de la composición y no provocar un efecto perjudicial inaceptable en el sujeto. Tales portadores se describen en el presente documento o de lo contrario los conocen bien los expertos en la técnica de farmacología. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están libres de pirógenos y son adecuadas para su administración a un paciente humano. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están libres de irritantes y son adecuadas para su administración a un paciente humano. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están libres de alérgenos y son adecuadas para su administración a un paciente humano. Las composiciones pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

15 En algunas realizaciones, un polipéptido de SAP va a administrarse en una formulación de liberación temporal, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Puede prepararse un polipéptido de SAP con portadores que protegerán frente a una liberación rápida. Los ejemplos incluyen un vehículo de liberación controlada, tal como un polímero, sistema de administración microencapsulado o gel bioadhesivo. Alternativamente, puede lograrse la administración prolongada de un polipéptido de SAP incluyendo en la composición agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, hidrogeles de monoestearato de aluminio y gelatina.

20 En la técnica se conocen métodos para administrar compuestos de ácido nucleico (véanse, por ejemplo, Akhtar *et al.*, 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; y Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Sullivan *et al.*, solicitud internacional n.º WO 94/02595). Estos protocolos pueden utilizarse para la administración de prácticamente cualquier compuesto de ácido nucleico. Pueden administrarse compuestos de ácido nucleico a células mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis o mediante incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas. Alternativamente, la combinación de ácido nucleico/vehículo se administra localmente mediante inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. Otras vías de administración incluyen, pero no se limitan a, administración oral (forma de comprimido o píldora) y/o intratecal (Gold, 1997, Neuroscience, 76, 1153-1158). Otros enfoques incluyen el uso de diversos sistemas de portadores y transporte, por ejemplo a través del uso de conjugados y polímeros biodegradables. Para una revisión exhaustiva de las estrategias de administración de fármacos, véanse Ho *et al.*, 1999, Curr. Opin. Mol. Ther., 1, 336-343 y Jain, Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities, Decision Resources, 1998 y Groothuis *et al.*, 1997, J. NeuroVirol., 3, 387-400. Se proporcionan descripciones más detalladas del suministro y la administración de ácido nucleico en Sullivan *et al.*, citado anteriormente, Draper *et al.*, documento PCT WO93/23569, Beigelman *et al.*, solicitud internacional n.º WO99/05094, y Klimuk *et al.*, publicación internacional n.º WO99/04819.

35 Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la invención descrita anteriormente, así como para exponer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: SAP recombinante es más potente que SAP derivado de suero humano.

Se sometieron a ensayo SAP humano recombinante aislado de células CHO-S (rhSAP) y SAP derivado de suero humano (hSAP) para determinar su bioactividad usando un bioensayo *in vitro*. En este ensayo, se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) enriquecidas en monocitos con concentraciones variables de o bien rhSAP o bien hSAP durante 96 horas. Tras esta incubación, se retiraron los sobrenadantes de cultivo resultantes y se sometieron a ensayo mediante ELISA para cuantificar la cantidad de quimiocina derivada de macrófagos (MDC) que se produjo. MDC se produce por fibrocitos y por tanto es un indicador de la diferenciación de monocitos en fibrocitos. Comparando la concentración inhibitoria al 50% (CI<sub>50</sub>) de la muestra con respecto al patrón de referencia de hSAP, puede determinarse la potencia relativa de una glicovariante de SAP. El resultado se expresa como una razón de CI<sub>50</sub> de la muestra frente al patrón de referencia de hSAP.

55 Todas las muestras y los patrones de SAP se diluyeron inicialmente hasta una concentración de 1,0 mg/ml en medios FibroLife complementados. Se diluyeron en serie patrones de SAP para generar concentraciones de patrón de trabajo de 60, 30, 20, 13,4, 8,8, 6,0, 3,0, 1,5 y 0,75 µg/ml (concentración de patrón final de 30, 15, 10, 6,7, 4,4, 3,0, 1,5, 0,75 y 0,375 µg/ml). Véase la siguiente tabla 1.

Concentración de patrón de rhSAP de trabajo (µg/ml)	Volumen de patrón	Volumen de medios FibroLife complementados
---	-------------------	--

60	60 (1 mg/ml)	940
30	600 (60 µg/ml)	600
20	800 (30 µg/ml de patrón)	400
3,4	800 (20 µg/ml de patrón)	400
8,8	800 (13,4 µg/ml de patrón)	400
6,0	800 (8,8 µg/ml de patrón)	400
3,0	600 (6,0 µg/ml de patrón)	600
1,5	600 (3,0 µg/ml de patrón)	600
0,75	600 (1,5 µg/ml de patrón)	600

5 Para preparar el ensayo de ELISA, se diluyó el anticuerpo de captura (es decir, anticuerpo de ratón anti-MDC humana) hasta la concentración de trabajo en PBS sin proteína transportadora. Se usó el anticuerpo de captura diluido para recubrir placas de 96 pocillos, y entonces se selló cada placa y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Antes de usar las placas recubiertas, se aspiró cada pocillo y se lavó con tampón de lavado, repitiendo el procedimiento dos veces para un total de tres lavados. Entonces se bloquearon las placas añadiendo 300 µl de diluyente de reactivo a cada pocillo e incubando a temperatura ambiente durante una hora. Tras la incubación, se repitió el procedimiento de aspiración y lavado de pocillos.

10 Para el ensayo ELISA, se añadieron a cada pocillo muestras de 100 µl de o bien los sobrenadantes de los cultivos de monocitos/fibroblastos o bien los patrones de SAP. Entonces se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas antes de aspirar y lavar los pocillos. Entonces se añadieron a cada pocillo 100 µl de una dilución de trabajo de estreptavidina-HRP. Se incubó la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de añadir 50 µl de disolución de parada a cada pocillo. Inmediatamente, se midió la densidad óptica de cada pocillo usando un lector de microplacas fijado a 450 nm. Si se disponía de corrección de longitud de onda, se fijó el lector de microplacas a 540 nm o 570 nm. Si no se disponía de corrección de longitud de onda, entonces se restaron las lecturas a 540 nm o 570 nm de las lecturas a 450 nm. Esta resta corrige las imperfecciones ópticas en la placa.

15 Se sometieron a ensayo tanto RHSAP como hSAP para determinar la bioactividad usando este ensayo (figura 1). En promedio, RHSAP es 3,4 veces más activo que hSAP (promedio de 7 experimentos independientes).

Ejemplo 2: Modificación de estructuras de glicanos de SAP

20 Usando técnicas de glicorremodelación *in vitro*, se modificaron restos de glicano en una muestra de SAP humano recombinante (rhSAP) para sustituir restos de ácido siálico con unión α2,3 terminales por restos de ácido siálico con unión α2,6 (figura 2, A y B). De manera similar, también se modificó una muestra de SAP derivado de suero humano (hSAP) para sustituir restos de ácido siálico con unión α2,6 terminales por restos de ácido siálico con unión α2,3 (figura 2, C y D). Además, ya que rhSAP aislado de células CHO-S está sólo parcialmente sialilado, se trató una muestra de rhSAP para sialilar completamente las estructuras de glicanos unidas con restos de ácido siálico con unión α2,3 (figura 2, E y F).

25 Se trataron tanto rhSAP como hSAP (n.º de cat. de Calbiochem 970549) con una α2,3,6,8,9-sialidasa (n.º de cat. de Sigma N8271) para desialilar completamente los polipéptidos. Tras el tratamiento con sialidasa durante 17 horas, se purificaron rhSAP y hSAP desialilados (es decir asialo) usando cromatografía de afinidad de fosfoetanolamina (PE) y de exclusión molecular (Sephadex 200 calidad prep.). Entonces se trataron enzimáticamente asialo-polipéptidos de SAP purificados usando o bien α2,3- o bien α2,6-sialiltransferasas (n.º de cat. de Calbiochem 566223) en presencia de CMP-ácido siálico (n.º de cat. de Calbiochem 233264) durante 17 horas a 37°C. Las siguientes tablas proporcionan detalles sobre cada mezcla de reacción.

Reacciones de asialo-rhSAP (reac.)			
Tratamiento con α2,3 sialiltransferasa (ST3Gal3)			
	parámetro	unidades	valor
disoluciones madre de reactivos rhSAP, ST3Gal3	[asialo-rhSAP] dis. mad.	mg/ml	10,8
	PM de asialo-rhSAP	g/mol	116293
	[asialo-rhSAP] dis. mad.	µM	93
	[Galactosa] máx.	µM	929
	[ST3Gal3] dis. mad.	mg/ml	0,9
	PM de ST3Gal3	g/mol	84000
	[ST3Gal3] dis. mad.	µM	10,7
	[CMP-SA] dis. mad.	mg/ml	25
	PM de CMP-SA	g/mol	658,4
	[CMP-SA] dis. mad.	mM	38
volúmenes de reac.	µl de asialo-rhSAP en reac.	µl	260
	µl de ST3Gal3 en reac.	µl	50

ES 2 563 748 T3

	μl de CMP-SA en reac.	μl	75
	tampón (HEPES 10 mM/NaCl 150 mM, pH 8)	μl	615
	vol. de reac. tot.	μl	1000
concentraciones de reac.	[asialo-rhSAP] reac.	μM	24,1
	[Galactosa] máx.	μM	241
	[SAP] reac.	mg/ml	2,8
	[ST3Gal3] reac.	μM	0,5357
	[ST3Gal3] reac.	mg/ml	0,045
	[CMP-SA] reac.	mM	2,85
	asialo-rhSAP:ST3	razón en masa	62
	asialo-rhSAP:ST3	razón molar	45
	CMP-SA:ST3	razón molar	5316
	CMP-SA:asialo-rhSAP	razón molar	118
CMP-SA:Galactosa	razón molar	11,8	
Tratamiento con α2,6 sialiltransferasa (reac. de ST6)			
	parámetro	unidades	valor
disoluciones madre de reactivos rhSAP, ST6	[asialo-rhSAP] dis. mad.	mg/ml	10,8
	PM de asialo-rhSAP	g/mol	116293
	[asialo-rhSAP] dis. mad.	μM	93
	[Galactosa] máx.	μM	929
	[ST6] dis. mad.	mg/ml	0,205
	PM de ST6	g/mol	42000
	[ST6] dis. mad.	μM	4,9
	[CMP-SA] dis. mad.	mg/ml	25
	PM de CMP-SA	g/mol	658,4
[CMP-SA] dis. mad.	mM	38	
volúmenes de reac.	μl de asialo-rhSAP 1 en reac.	μl	260
	μl de ST6 en reac.	μl	30
	μl de CMP-SA en reac.	μl	75
	tampón (HEPES 10 mM/NaCl 150 mM, pH 8)	μl	635
	vol. de reac. tot.	μl	1000
concentraciones de reac.	[asialo-rhSAP] reac.	μM	24,1
	[Galactosa] máx.	μM	241
	[asialo-rhSAP] reac.	mg/ml	2,8
	[ST6] reac.	μM	0,146
	[ST6] reac.	mg/ml	0,006
	[CMP-SA] reac.	mM	2,85
	asialo-rhSAP:ST6	razón en masa	457
	asialo-rhSAP:ST6	razón molar	165
	CMP-SA:ST6	razón molar	19448
	CMP-SA:asialo-rhSAP	razón molar	118
CMP-SA:Galactosa	razón molar	11,8	

Reacciones de asialo-hSAP			
Tratamiento con α2,3 sialiltransferasa (ST3Gal3)			
	parámetro	unidades	valor
disoluciones madre de reactivos hSAP, ST3Gal3	[asialo-hSAP] dis. mad.	mg/ml	5,6
	PM de SAP	g/mol	116293
	[asialo-hSAP] dis. mad.	μM	48
	[Galactosa] máx.	μM	482
	[ST3Gal3] dis. mad.	mg/ml	0,9
	PM de ST3Gal3	g/mol	84000
	[ST3Gal3] dis. mad.	μM	10,7
	[CMP-SA] dis. mad.	mg/ml	25
	PM de CMP-SA	g/mol	685,4
	[CMP-SA] dis. mad.	mM	38

ES 2 563 748 T3

volúmenes de reac.	μl de asialo-hSAP en reac.	μl	500
	μl de ST3Gal3 en reac.	μl	50
	μl de CMP-SA en reac.	μl	75
	tampón (HEPES 10 mM/NaCl 150 mM, pH 8)	μl	375
	vol. de reac. tot.	μl	1000
concentraciones de reac.	[asialo-hSAP] reac.	μM	24,1
	[Galactosa] máx	μM	241
	[asialo-hSAP] reac.	mg/ml	2,8
	[ST3Gal3] reac.	μM	0,54
	[ST3Gal3] reac.	mg/ml	0,045
	[CMP-SA] reac.	mM	2,85
	asialo-hSAP:ST3	razón en masa	62
	asialo-hSAP:ST3	razón molar	45
	CMP-SA:ST3	razón molar	5316
	CMP-SA:asialo-rhSAP	razón molar	118
CMP-SA:Galactosa	razón molar	11,8	
Tratamiento con α2,6 sialiltransferasa (reac. de ST6)			
	parámetro	unidades	valor
disoluciones madre de reactivos hSAP, ST6	[asialo-hSAP] dis. mad.	mg/ml	5,6
	PM de asialo-hSAP	g/mol	116293
	[asialo-hSAP] dis. mad.	μM	48
	[Galactosa] máx.	μM	482
	[ST6] dis. mad.	mg/ml	0,205
	PM de ST6	g/mol	42000
	[ST6] dis. mad.	μM	4,9
	[CMP-SA] dis. mad.	mg/ml	25
	PM de CMP-SA	g/mol	658,4
[CMP-SA] dis. mad.	mM	38	
volúmenes de reac.	μl de asialo-hSAP en reac.	μl	500
	μl de ST6 en reac.	μl	30
	μl de CMP-SA en reac.	μl	75
	tampón (HEPES 10 mM/NaCl 150 mM, pH 8)	μl	395
	vol. de reac. tot.	μl	1000
concentraciones de reac.	[asialo-hSAP] reac.	μM	24,1
	[Galactosa] máx	μM	241
	[asialo-hSAP] reac.	mg/ml	2,8
	[ST6] reac.	μM	0,146
	[ST6] reac.	mg/ml	0,006
	[CMP-SA] reac.	mM	2,85
	asialo-hSAP:ST6	razón en masa	455
	asialo-hSAP:ST6	razón molar	164
	CMP-SA:ST6	razón molar	19448
	CMP-SA:asialo-rhSAP	razón molar	118
CMP-SA:Galactosa	razón molar	11,8	

En una reacción separada, se realizó la sialilación completa de rhSAP a 37°C durante 17 horas usando la α2,3-sialiltransferasa sin desialilar en primer lugar la molécula según la siguiente tabla.

Tratamiento con α2,3 sialiltransferasa (ST3Gal3)			
	parámetro	unidades	valor
disoluciones madre de reactivos rhSAP, ST3Gal3	[rhSAP] dis. mad.	mg/ml	19,0
	PM de rhSAP	g/mol	116293
	[rhSAP] dis. mad.	μM	163
	[Galactosa] máx.	μM	1634
	[ST3Gal3] dis. mad.	mg/ml	0,9
	PM de ST3Gal3	g/mol	84000
	[ST3Gal3] dis. mad.	μM	10,7

	[CMP-SA] dis. mad.	mg/ml	25
	PM de CMP-SA	g/mol	658,4
	[CMP-SA] dis. mad.	mM	38
volúmenes de reac.	µl de rhSAP en reac.	µl	500
	µl de ST3Gal3 en reac.	µl	50
	µl de CMP-SA en reac.	µl	100
	tampón (HEPES 10 mM/NaCl 150 mM, pH 8)	µl	350
	vol. de reac. tot.	µl	1000
concentraciones de reac.	[rhSAP] reac.	µM	81,7
	[Galactosa] máx.	µM	817
	[rhSAP] reac.	mg/ml	9,5
	[ST3Gal3] reac.	µM	0,54
	[ST3Gal3] reac.	mg/ml	0,045
	[CMP-SA] reac.	mM	3,80
	BTA-02-17:ST3	razón en masa	211
	BTA-02-17:ST3	razón molar	152
	CMP-SA:ST3	razón molar	7088
	CMP-SA:BTA-02-17	razón molar	46
CMP-SA:Galactosa	razón molar	4,6	

Tras el tratamiento de sialilación, se purificaron variantes tanto de rhSAP como de hSAP sialilados usando cromatografía de afinidad de PE seguido por diálisis en NaPi 10 mM/sorbitol al 5% pH 7,5 (tampón P5S). Se realizó la confirmación de las uniones de ácido siálico deseadas (es decir, hSAP con unión  $\alpha$ 2,3 y RHSAP con unión  $\alpha$ 2,6) usando tanto cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (figura 2; A, C, y E) como cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio aniónico (figura 2; B, D, y F) tras el tratamiento de los polipéptidos de SAP glicovariantes con  $\alpha$ 2,3 sialidasa (n.º de cat. de Calbiochem 480706) a 37°C durante 24 horas.

Ejemplo 3: Bioensayos *in vitro* para determinar la potencia de glicovariantes de SAP para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos.

Se sometieron a ensayo rhSAP y hSAP glicorremodelados para determinar su bioactividad usando el mismo bioensayo *in vitro* descrito en el ejemplo 1. En resumen, se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) enriquecidas en monocitos con concentraciones variables de un polipéptido de SAP durante 96 horas. Tras esta incubación, se retiraron los sobrenadantes de cultivo y se sometieron a ensayo mediante ELISA para cuantificar aproximadamente la quimiocina derivada de macrófagos (MDC) que se produjo. Se expresaron los resultados como una razón de  $CI_{50}$  de la muestra frente al patrón de referencia de hSAP y se representaron gráficamente como actividad relativa (actividad relativa de hSAP = 1). Todos los materiales de prueba que contenían unión de ácido siálico en  $\alpha$ 2,3 son  $\geq 2,4$  veces más activos que hSAP (figura 3). Mezclas iguales de derivados de SAP con ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 muestran niveles de actividad intermedios entre el 100% de SAP con unión  $\alpha$ 2,6 y el 100% SAP con unión  $\alpha$ 2,3 tal como se esperaba (las dos barras más a la derecha en la figura 3).

Un método alternativo de cuantificación de la diferenciación en fibrocitos implica contar directamente el número de fibrocitos que se generan tras incubarse los monocitos con un supresor de fibrocitos (por ejemplo, SAP o variante del mismo) o agente activante (por ejemplo, M-CSF). En un experimento, se purificaron monocitos a partir de PBMC derivadas de sangre completa usando selección negativa con perlas magnéticas convencional en la técnica (por ejemplo n.º de cat. 113-41D, Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivaron en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos que contenía medios FibroLife complementados con 25 ó 50 ng/ml de M-CSF por triplicado. Se incubó la placa durante 96 horas a 37°C en un incubador con el 5% de CO<sub>2</sub>. Entonces se fijaron las células con paraformaldehído y se tiñeron con tinción Hema 3 (n.º de cat. 122-911, Hema 3 Stain, Fisher Scientific, Hampton, NH). Se determinó el número de fibrocitos por pocillo sumando el recuento de cinco campos diferentes por pocillo usando un microscopio invertido. Se definieron los fibrocitos morfológicamente como células adherentes con una conformación de huso alargada y la presencia de un núcleo ovalado. Los datos indican que o bien 25 o bien 50 ng/ml de M-CSF eran suficientes para aumentar el número de fibrocitos que se diferenciaban a partir de monocitos en ~50% en este donador (figura 4). Experimentos posteriores usaron medios FibroLife complementados con 25 ng/ml de M-CSF según era necesario y tal como se define a continuación.

Medios FibroLife: (n.º de cat. LM-0001, Lifeline Cell Technology, Walkersville, MD) complementados con HEPES 10 mM (n.º de cat. H0887, Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales 1 x (n.º de cat. M7145, Sigma-Aldrich), piruvato de sodio 1 mM (n.º de cat. S8636, Sigma-Aldrich), glutamina 2 mM (n.º de cat. 25030-149, Invitrogen), penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 ug/ml (n.º de cat. P0781, Sigma-Aldrich), e ITS-3 (n.º de cat. I2771, albúmina sérica bovina 500 ug/ml, insulina 10 ug/ml, transferrina 5 ug/ml, selenito de sodio 5 ng/ml, ácido linoleico 5 ug/ml y ácido oleico 5 ug/ml; Sigma-Aldrich).

En un experimento adicional, se purificaron PBMC o monocitos a partir de sangre completa y se cultivaron en medios FibroLife complementados con diversas cantidades de SAP por triplicado (tal como se describió anteriormente). Se incubó la placa durante 96 horas a 37°C en un incubador con el 5% de CO<sub>2</sub>. Entonces se fijaron las células con paraformaldehído y se tiñeron con tinción Hema 3 (n.º de cat. 122-911, Hema 3 Stain, Fisher Scientific, Hampton, NH). Se determinó el número de fibrocitos por pocillo sumando el recuento de cinco campos diferentes por pocillo usando un microscopio invertido. Se determinó que la concentración mínima de SAP necesaria para proporcionar una inhibición máxima de la diferenciación en fibrocitos en este sistema era de 2 ug/ml (figura 5). El número de fibrocitos disminuye al aumentar la concentración de SAP en todos los donadores.

**Lista de secuencias**

- 10 <110> PROMEDIOR, INC.
- <120> DERIVADOS AMILOIDE P SÉRICO Y SU PREPARACIÓN Y USO
- <130> 104112-0020-WO1
- 15 <140>
- <141> 04-06-2010
- <150> Documento 61/217.931
- 20 <151> 04-06-2009
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
- <211> 204
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 1

ES 2 563 748 T3

His Thr Asp Leu Ser Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Val  
 1 5 10 15

Thr Asp His Val Asn Leu Ile Thr Pro Leu Glu Lys Pro Leu Gln Asn  
 20 25 30

Phe Thr Leu Cys Phe Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg Ala Tyr Ser  
 35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Asn Thr Gln Gly Arg Asp Asn Glu Leu Leu Val Tyr  
 50 55 60

Lys Glu Arg Val Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Arg His Lys Val  
 65 70 75 80

Thr Ser Lys Val Ile Glu Lys Phe Pro Ala Pro Val His Ile Cys Val  
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile Asn Gly Thr  
 100 105 110

Pro Leu Val Lys Lys Gly Leu Arg Gln Gly Tyr Phe Val Glu Ala Gln  
 115 120 125

Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Lys Phe  
 130 135 140

Asp Arg Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Ile Gly Asp Leu Tyr Met Trp  
 145 150 155 160  
 Asp Ser Val Leu Pro Pro Glu Asn Ile Leu Ser Ala Tyr Gln Gly Thr  
 165 170 175

Pro Leu Pro Ala Asn Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Asn Tyr Glu Ile  
 180 185 190

Arg Gly Tyr Val Ile Ile Lys Pro Leu Val Trp Val  
 195 200

5 <210> 2  
 <211> 208  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 <400> 2

ES 2 563 748 T3

Gln Glu Asp Leu Tyr Arg Lys Val Phe Val Phe Arg Glu Asp Pro Ser  
 1 5 10 15

Asp Ala Tyr Val Leu Leu Gln Val Gln Leu Glu Arg Pro Leu Leu Asn  
 20 25 30

Phe Thr Val Cys Leu Arg Ser Tyr Thr Asp Leu Thr Arg Pro His Ser  
 35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Ala Thr Lys Ala Gln Asp Asn Glu Ile Leu Leu Phe  
 50 55 60

Lys Pro Lys Pro Gly Glu Tyr Arg Phe Tyr Val Gly Gly Lys Tyr Val  
 65 70 75 80

Thr Phe Arg Val Pro Glu Asn Arg Gly Glu Trp Glu His Val Cys Ala  
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Gly Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Leu Asn Gly Arg  
 100 105 110

Pro Trp Pro Arg Lys Gly Leu Gln Lys Gly Tyr Glu Val Gly Asn Glu  
 115 120 125

Ala Val Val Met Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly Gly Phe  
 130 135 140

Asp Val Tyr Asn Ser Phe Thr Gly Glu Met Ala Asp Val His Leu Trp  
 145 150 155 160

Asp Ala Gly Leu Ser Pro Asp Lys Met Arg Ser Ala Tyr Leu Ala Leu  
 165 170 175

Arg Leu Pro Pro Ala Pro Leu Ala Trp Gly Arg Leu Arg Tyr Glu Ala  
 180 185 190

Lys Gly Asp Val Val Val Lys Pro Arg Leu Arg Glu Ala Leu Gly Ala  
 195 200 205

<210> 3  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*  
 <400> 3

5

ES 2 563 748 T3

Gln Thr Asp Leu Arg Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Ser  
 1 5 10 15

Thr Asp His Val Thr Leu Ile Thr Lys Leu Glu Lys Pro Leu Lys Asn  
 20 25 30

Leu Thr Leu Cys Leu Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg Gly Tyr Ser  
 35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Asn Ile His Ser Lys Asp Asn Glu Leu Leu Val Phe  
 50 55 60

Lys Asn Gly Ile Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Lys Thr Lys Val  
 65 70 75 80

Thr Val Arg Ala Thr Glu Lys Phe Pro Ser Pro Val His Ile Cys Thr  
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Thr Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile Asn Gly Lys  
 100 105 110

Pro Leu Val Lys Arg Gly Leu Lys Gln Gly Tyr Ala Val Gly Ala His  
 115 120 125

Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Gly Phe  
 130 135 140

Asp Lys Asn Gln Ser Phe Met Gly Glu Ile Gly Asp Leu Tyr Met Trp  
 145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Ser Pro Glu Glu Ile Leu Leu Val Tyr Gln Gly Ser  
 165 170 175

Ser Ser Ile Ser Pro Thr Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Lys Tyr Glu  
 180 185 190

Ile Lys Gly Tyr Val Ile Val Lys Pro Met Val Trp Gly  
 195 200 205

<210> 4

<211> 204

5 <212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 4

ES 2 563 748 T3

Gln Thr Asp Leu Thr Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Glu  
1 5 10 15

Ser Asp Tyr Val Lys Leu Ile Pro Arg Leu Glu Lys Pro Leu Glu Asn  
20 25 30

Phe Thr Leu Cys Phe Arg Thr Tyr Thr Asp Leu Ser Arg Pro His Ser  
35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Asn Thr Lys Asn Lys Asp Asn Glu Leu Leu Ile Tyr  
50 55 60

Lys Glu Arg Met Gly Glu Tyr Gly Leu Tyr Ile Glu Asn Val Gly Ala  
65 70 75 80

Ile Val Arg Gly Val Glu Glu Phe Ala Ser Pro Val His Phe Cys Thr  
85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Asp Phe Trp Val Asn Gly Ile  
100 105 110

Pro Trp Val Lys Lys Gly Leu Lys Lys Gly Tyr Thr Val Lys Thr Gln  
115 120 125

Pro Ser Ile Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Asn Tyr Gly Gly Gly Phe  
130 135 140

Asp Lys Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Met Gly Asp Leu Asn Met Trp  
145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Thr Pro Glu Glu Ile Lys Ser Val Tyr Glu Gly Ser  
165 170 175

Trp Leu Glu Pro Asn Ile Leu Asp Trp Arg Ala Leu Asn Tyr Glu Met  
180 185 190

Ser Gly Tyr Ala Val Ile Arg Pro Arg Val Trp His  
195 200

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de amiloide P sérico (SAP) humano glicosilado que comprende una cadena de oligosacárido con unión en N, en el que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.
- 5 2. Polipéptido de SAP humano glicosilado según la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 85% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
3. Polipéptido de SAP humano glicosilado según la reivindicación 1 ó 2, en el que la cadena de oligosacárido con unión en N comprende un núcleo de pentasacárido de  $\text{Man}[(\alpha$ 1,6-)( $\text{Man}(\alpha$ 1,3)]-\text{Man}(\beta1,4)-  
10  $\text{GlcNAc}(\beta$ 1,4)- $\text{GlcNAc}(\beta$ 1,N)-\text{Asn}.
4. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la cadena de oligosacárido comprende al menos una ramificación que tiene la estructura  $\text{NeuNAc}2\alpha$ 3 $\text{Gal}\beta$ 4 $\text{GlcNAc}\beta$ 2 $\text{Man}\alpha$ 6.
5. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polipéptido de SAP es un polipéptido recombinante.  
15
6. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
7. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 95% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.  
20
8. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 96% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 25 9. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 98% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
10. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en el 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.  
30
11. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
12. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un dominio de SAP y uno o más dominios heterólogos.  
35
13. Polipéptido de SAP humano glicosilado según la reivindicación 12, en el que el uno o más dominios heterólogos potencian una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos proteicos y/o purificación.
14. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el polipéptido comprende uno o más residuos de aminoácido modificados.  
40
15. Polipéptido de SAP humano glicosilado según la reivindicación 14, en el que el uno o más residuos de aminoácido modificados comprenden un aminoácido pegilado, un aminoácido prenilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotilado y/o un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico.
16. Polipéptido de SAP humano glicosilado según la reivindicación 15, en el que el uno o más residuos de aminoácido modificados potencian una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos proteicos y/o purificación.  
45
17. Preparación farmacéutica adecuada para su uso en un mamífero que comprende el polipéptido de SAP humano según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 50 18. Método de preparación de un polipéptido de SAP humano que comprende una cadena de oligosacárido con unión en N, en el que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido

siálico con unión  $\alpha$ 2,3, comprendiendo el método:

i) expresar un polipéptido de SAP humano en una célula; y

ii) aislar el polipéptido de SAP humano de la célula.

19. Método según la reivindicación 18, en el que la célula es una célula CHO.
- 5 20. Método según la reivindicación 18 ó 19, en el que el polipéptido de SAP es un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16.
21. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 ó 12 a 16 o método según una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en el que todas las ramificaciones de la cadena de oligosacárido terminan en restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.
- 10 22. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 ó 12 a 16 o método según una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en el que la cadena de oligosacárido está sustancialmente libre de restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6.
- 15 23. Método según la reivindicación 18, que comprende además alterar química o enzimáticamente el polipéptido de SAP aislado para producir un polipéptido de SAP que tiene una cadena de oligosacárido modificada.
24. Método según la reivindicación 23, en el que el proceso de alterar química o enzimáticamente el polipéptido de SAP aislado elimina uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 terminales de la cadena de oligosacárido.
- 20 25. Método según la reivindicación 24, en el que el proceso de alterar química o enzimáticamente el polipéptido de SAP aislado sustituye uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 terminales en la cadena de oligosacárido por uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.
26. Polipéptido de SAP humano glicosilado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o método según una cualquiera de las reivindicaciones 18-25, en el que el polipéptido de SAP aislado tiene una  $CI_{50}$  para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor de la mitad de la de una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano.
- 25 27. Método de preparación de un polipéptido de SAP humano, que comprende:
- i) proporcionar un polipéptido de SAP humano glicosilado, en el que el polipéptido de SAP humano glicosilado comprende una cadena de oligosacárido con unión en N; y
- 30 ii) alterar química o enzimáticamente la cadena de oligosacárido con unión en N del polipéptido de SAP humano para producir un polipéptido de SAP humano glicosilado modificado, en el que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.
28. Método según la reivindicación 27, en el que el proceso de alterar química o enzimáticamente la cadena de oligosacárido con unión en N del polipéptido de SAP elimina uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 terminales de la cadena de oligosacárido.
- 35 29. Método según la reivindicación 27, en el que el proceso de alterar química o enzimáticamente la cadena de oligosacárido con unión en N del polipéptido de SAP humano sustituye uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 terminales en la cadena de oligosacárido por uno o más restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.
- 40 30. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 27-29, en el que la cadena de oligosacárido con unión en N tiene al menos el 50% menos de restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6 que una proteína SAP humana silvestre aislada de suero humano.
31. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 27-29, en el que la cadena de oligosacárido con unión en N está sustancialmente libre de restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,6.
- 45 32. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 27-31, en el que todas las ramificaciones de la cadena de oligosacárido terminan en restos de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.
33. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 27-32, en el que el polipéptido de SAP glicosilado modificado tiene una  $CI_{50}$  para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor de la mitad de la de una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano.
34. Método de preparación de un polipéptido de SAP humano, que comprende:

- i) proporcionar un polipéptido de SAP humano, y
  - ii) alterar química o enzimáticamente el polipéptido de SAP humano para producir un polipéptido de SAP humano glicosilado que comprende un oligosacárido con unión en N, en el que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.
- 5 35. Polipéptido de SAP humano que comprende una cadena de oligosacárido con unión en N, en el que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3 preparado mediante un procedimiento que comprende:
- i) expresar un polipéptido de SAP en una célula CHO; y
  - ii) aislar el polipéptido de SAP de la célula.
- 10 36. Polipéptido de SAP humano según la reivindicación 35, en el que el polipéptido de SAP tiene una  $CI_{50}$  para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor de la mitad de la de una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano.
37. Célula CHO que comprende un polipéptido de SAP humano que comprende una cadena de oligosacárido con unión en N, en la que al menos una ramificación de la cadena de oligosacárido termina en un resto de ácido siálico con unión  $\alpha$ 2,3.
- 15 38. Polipéptido de SAP según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado o trastorno seleccionado de un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico o fibroproliferativo, un trastorno de hipersensibilidad, un trastorno autoinmunitario o mucositis.

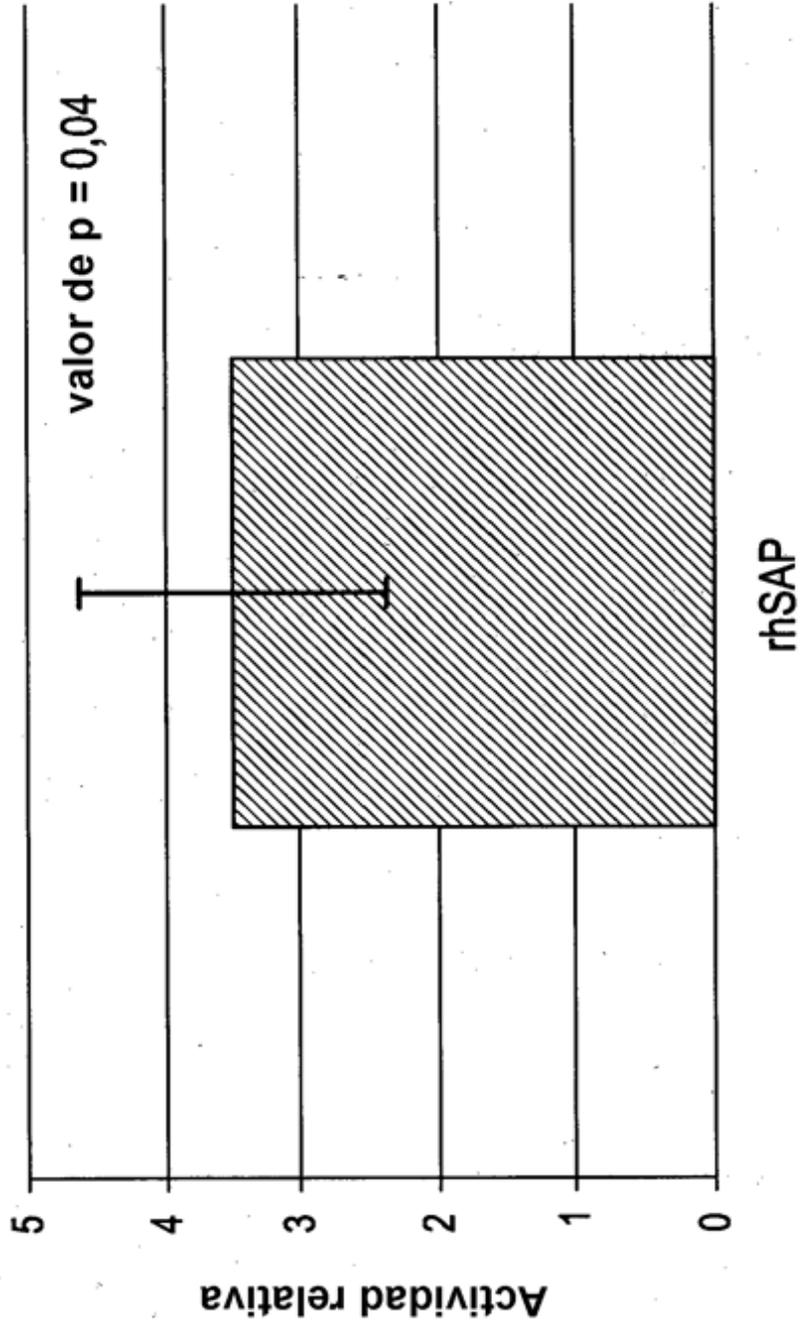


FIGURA 1

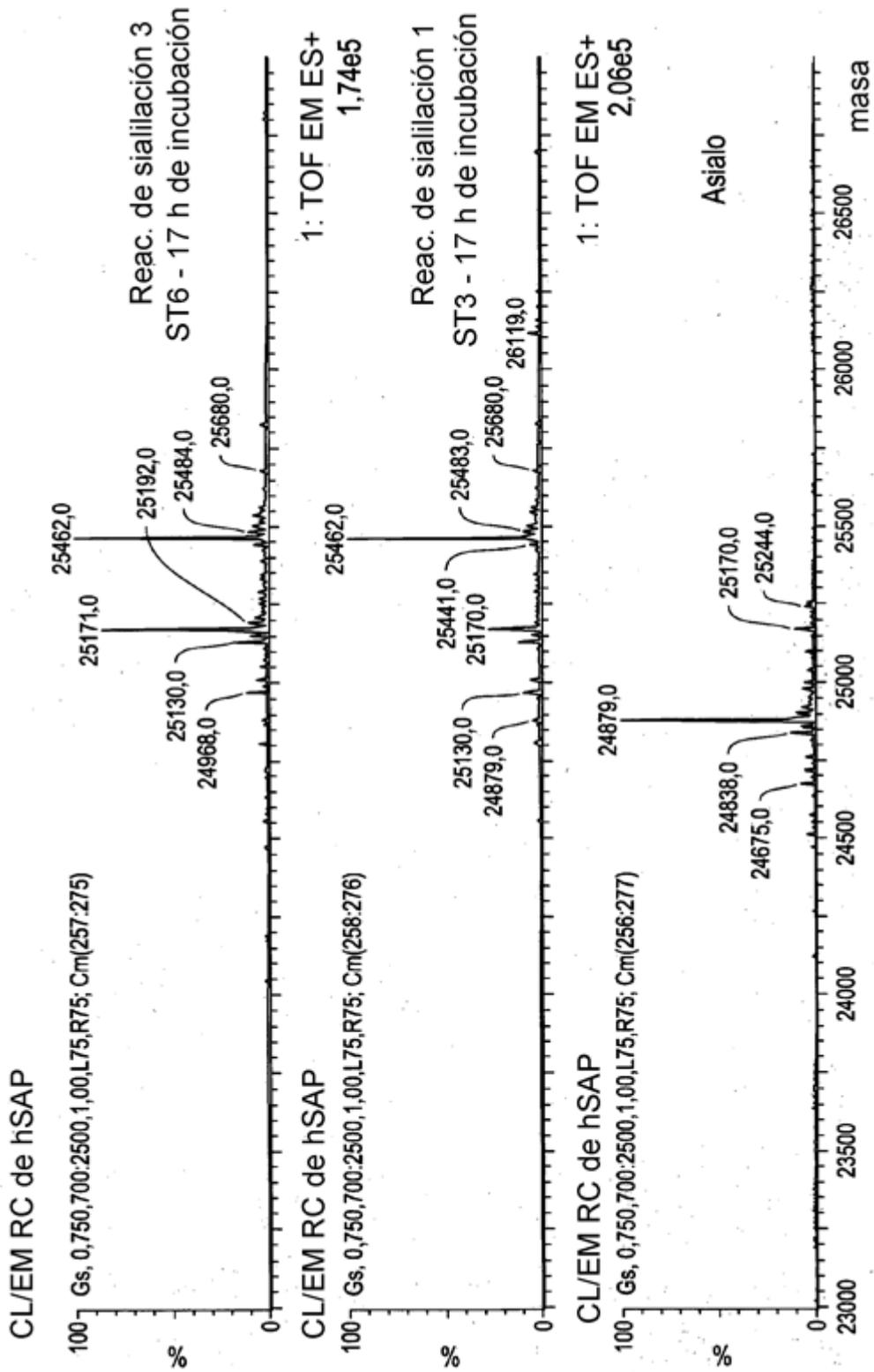


FIGURA 2A

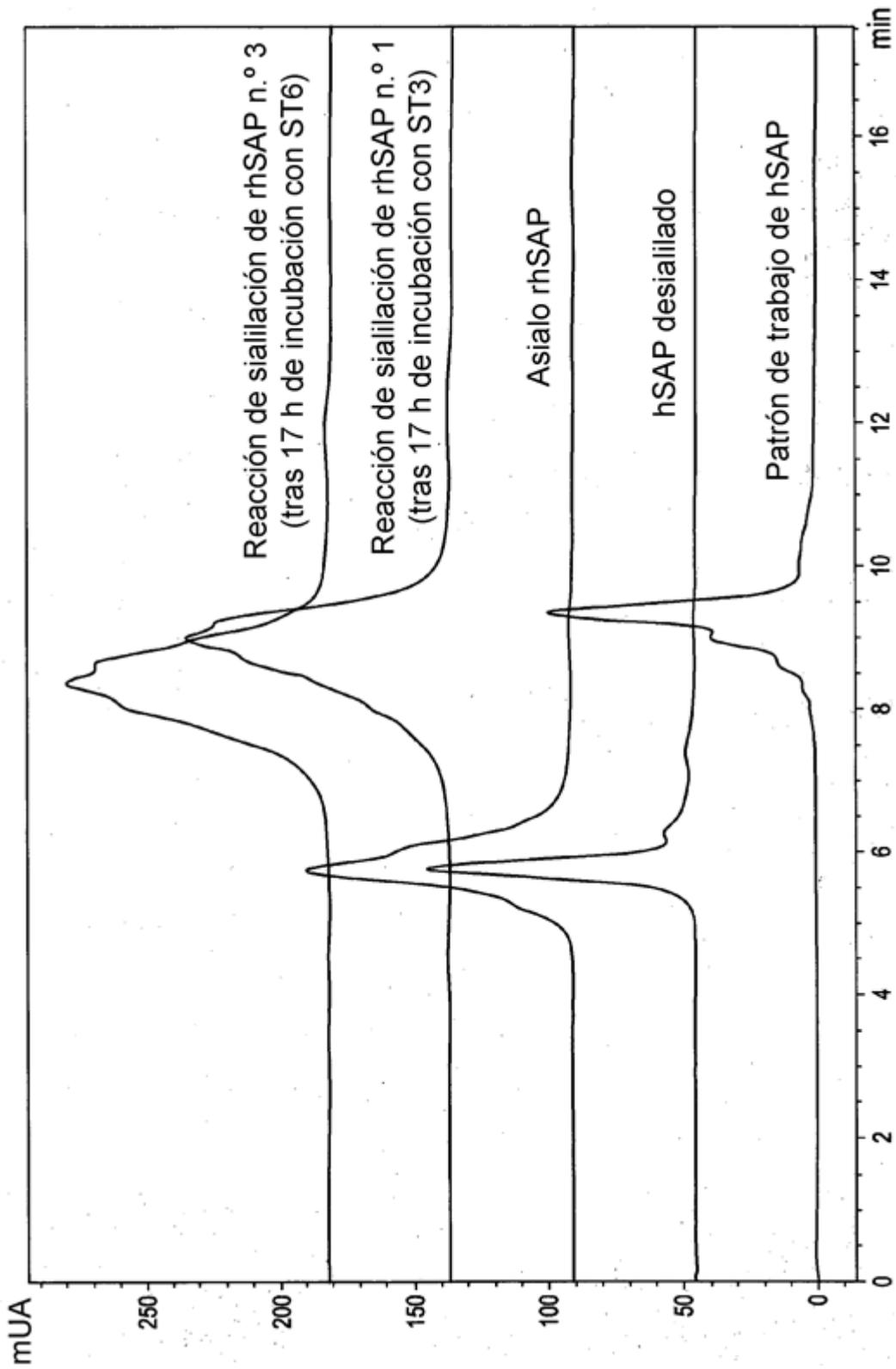


FIGURA 2B

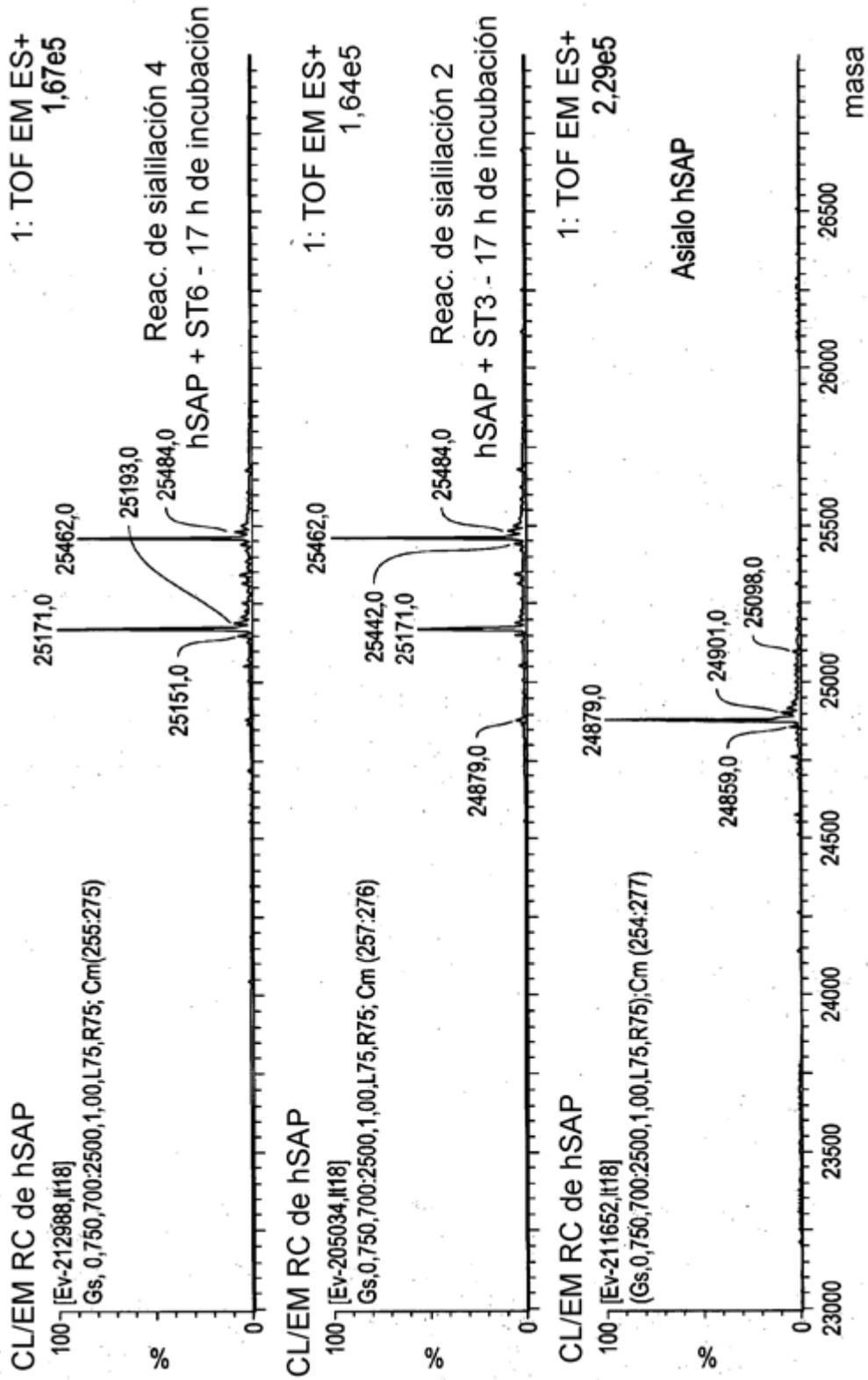


FIGURA 2C

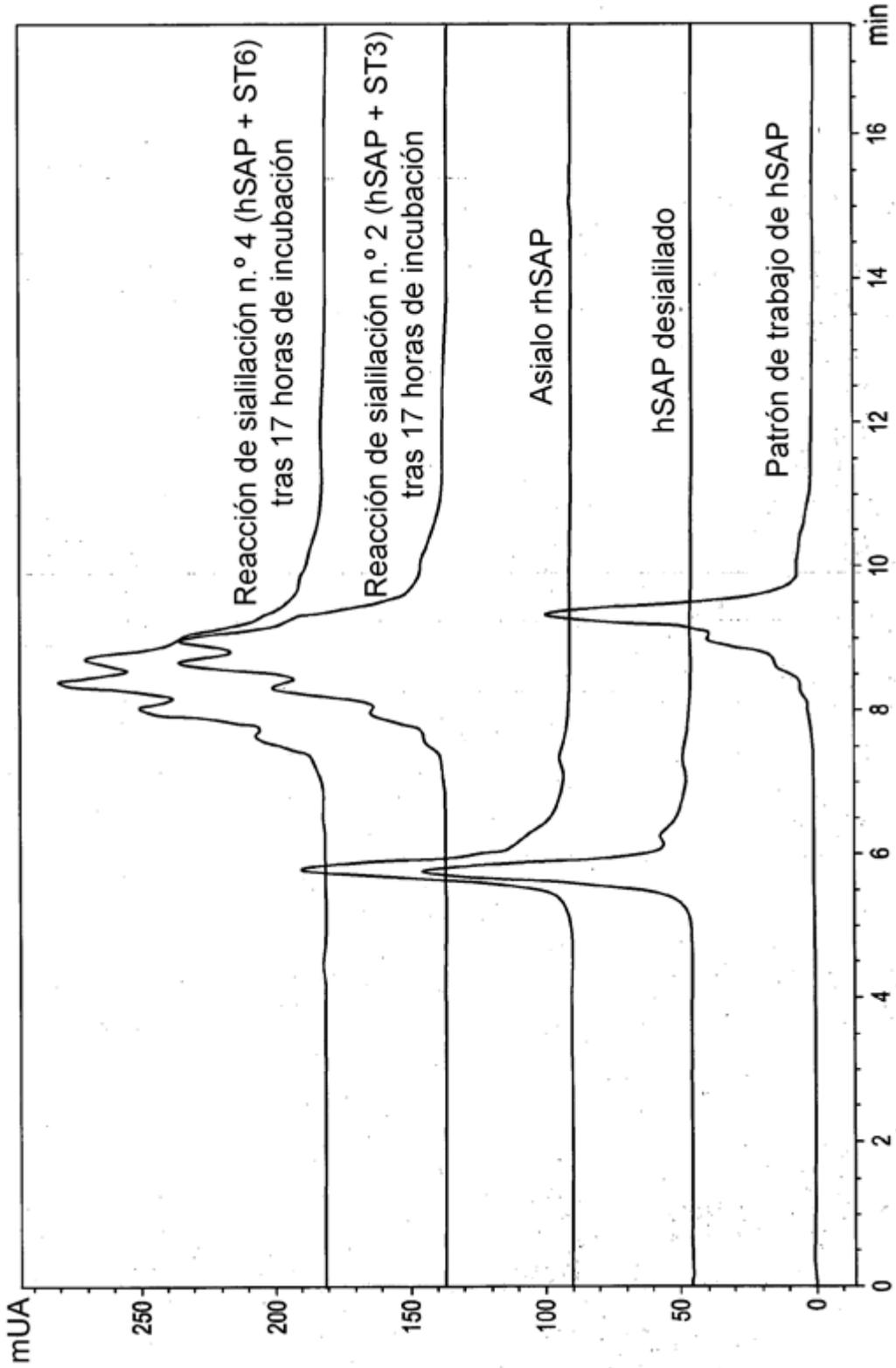


FIGURA 2D

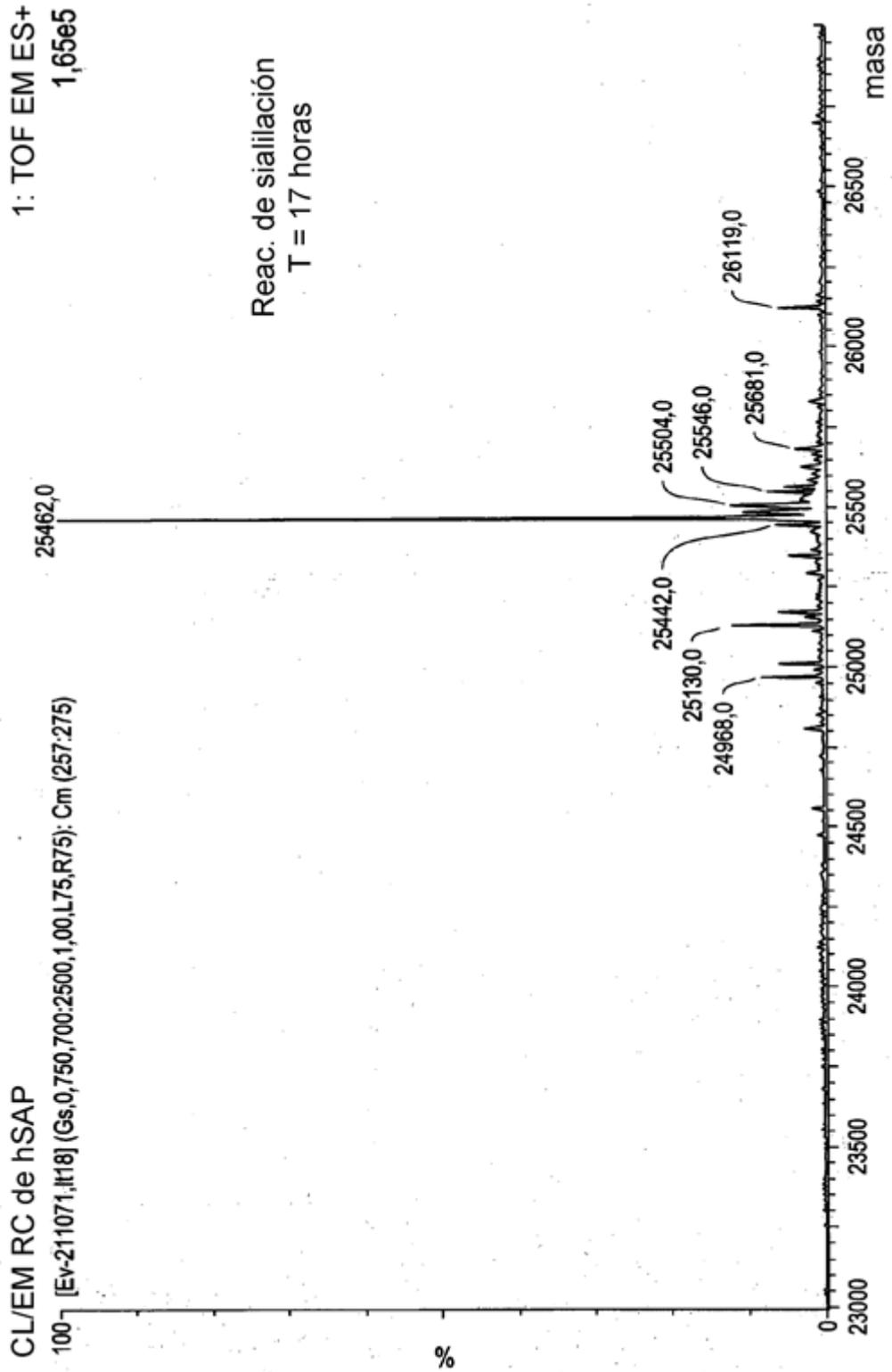


FIGURA 2E

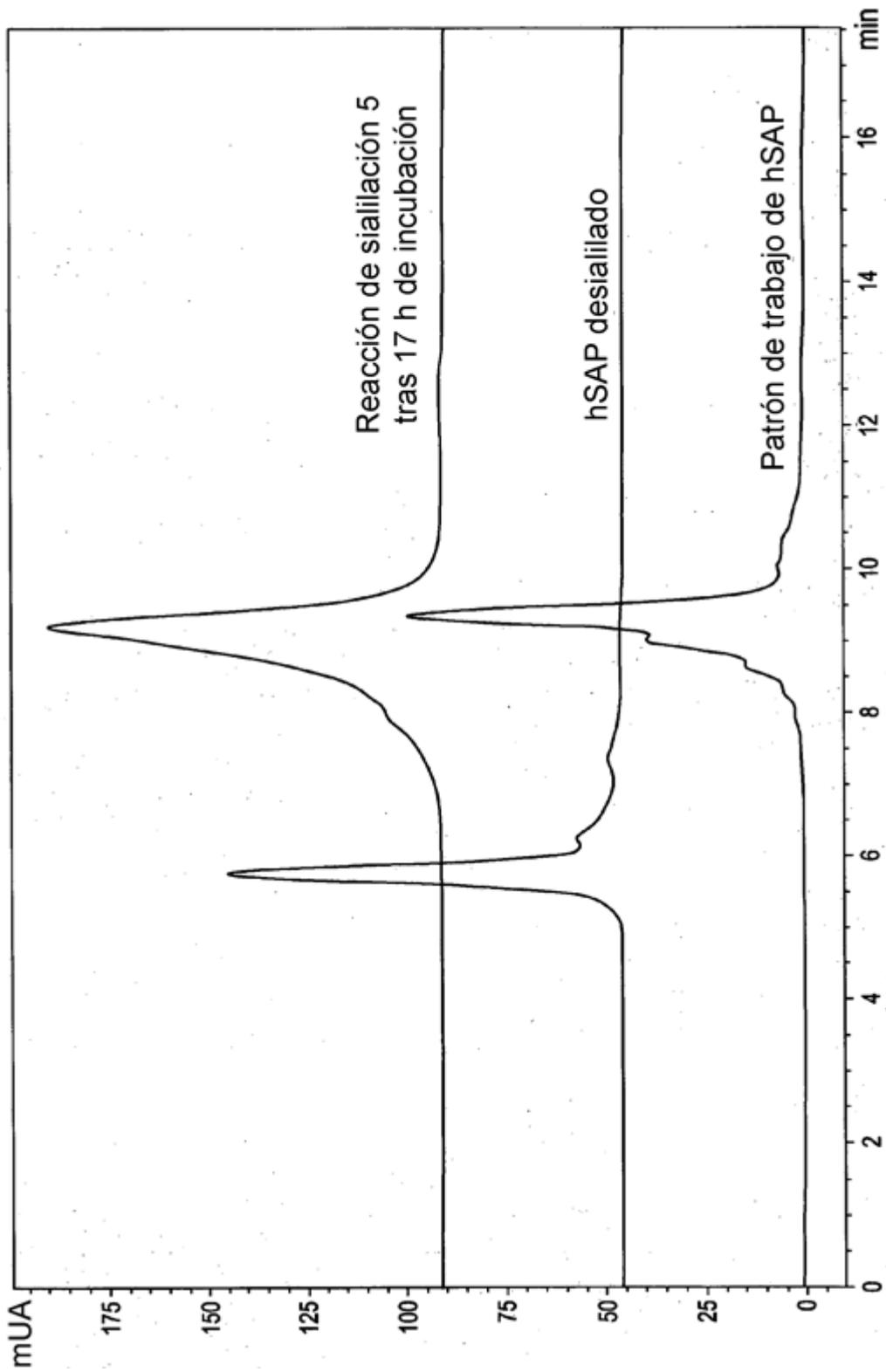


FIGURA 2F

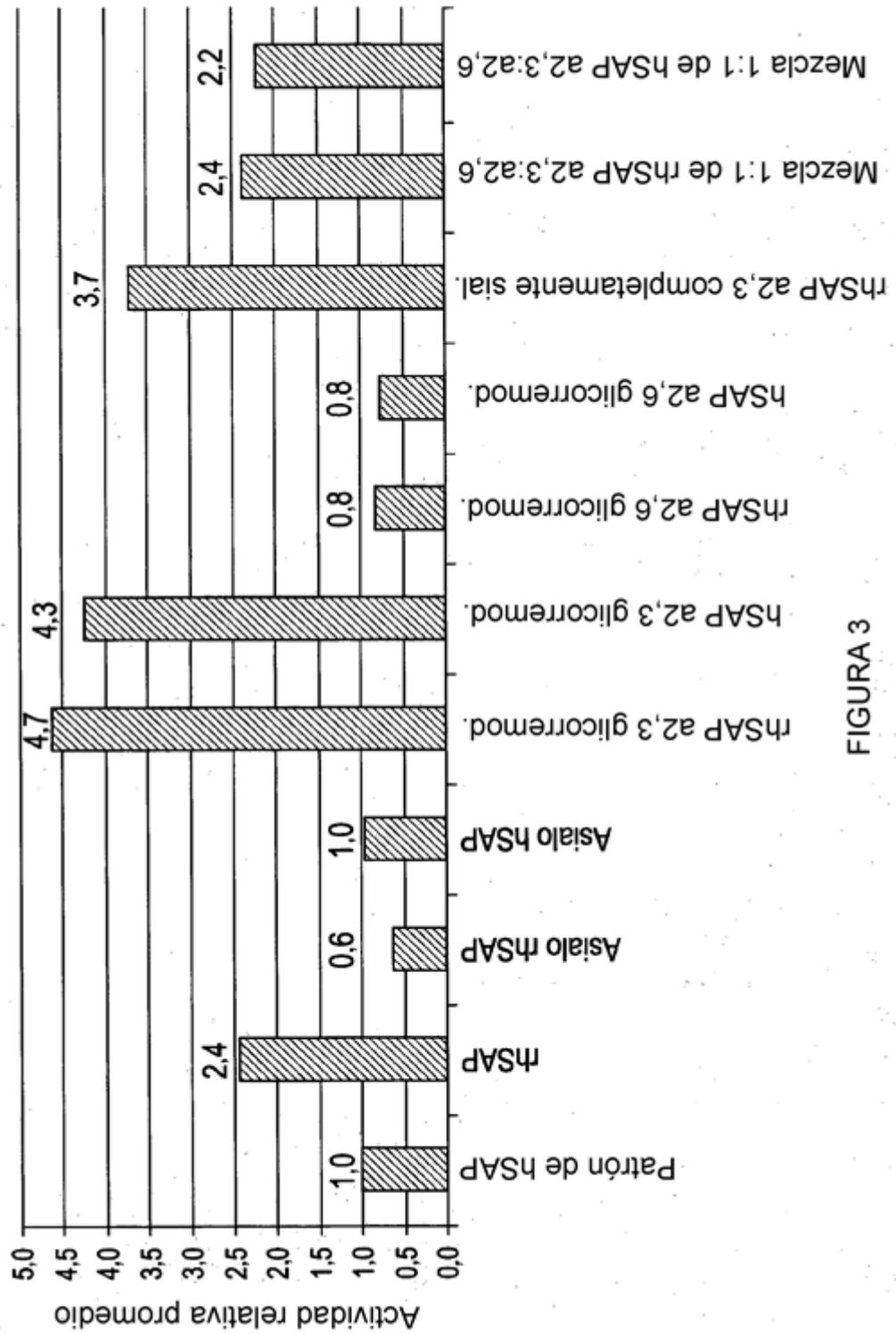


FIGURA 3

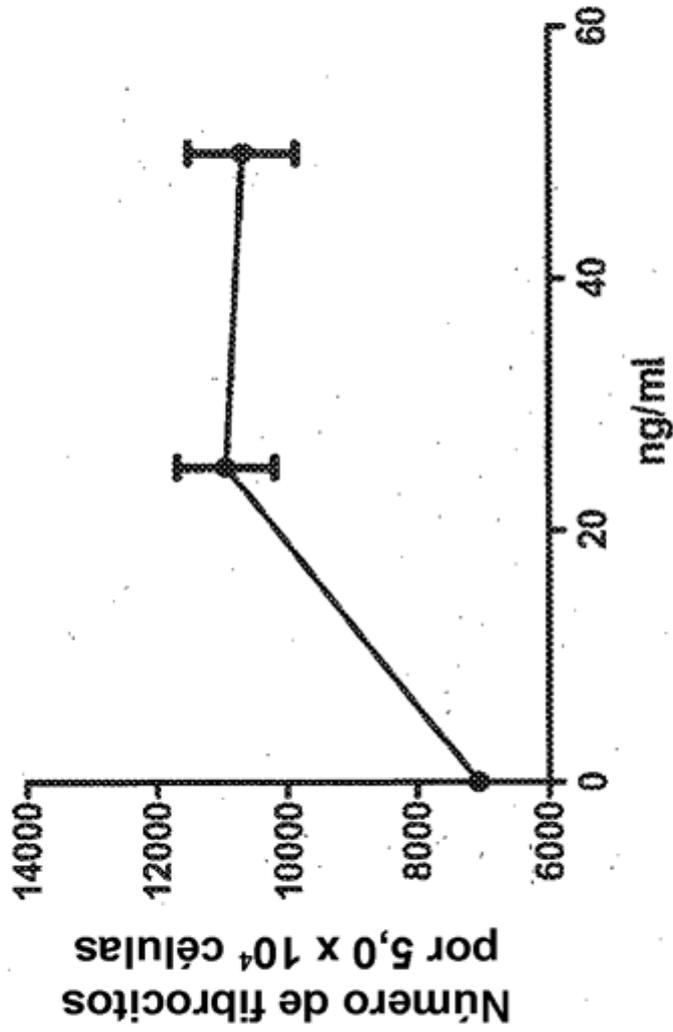


FIGURA 4

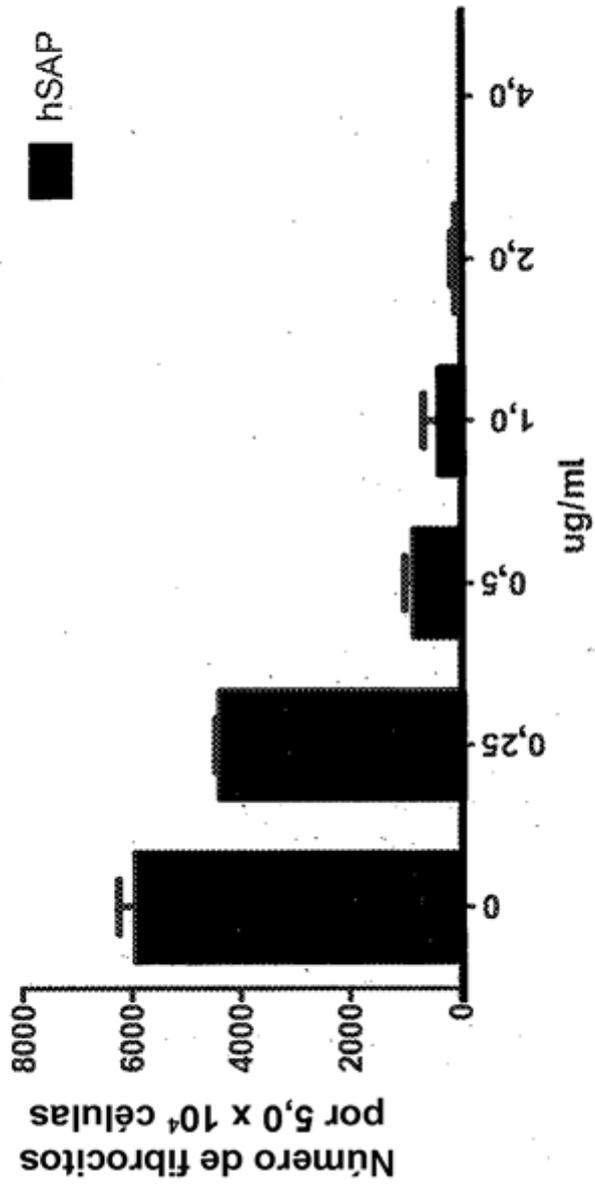


FIGURA 5