

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 371**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2002 E 10184886 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2322229**

54 Título: **Remodelación y glucoconjugación del Factor IX**

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
26.06.2017

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Corporate Patents, Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 619 371 T3

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

DESCRIPCIÓN

Remodelación y glucoconjugación del Factor IX

Antecedentes de la invención

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

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

Las estructuras de glucano encontradas en los glucopéptidos que existen de forma natural se dividen normalmente en dos clases, glucanos ligados en N y ligados en O.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

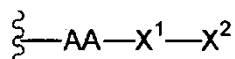
A pesar de los esfuerzos dirigidos hacia la elaboración enzimática de estructuras de sacárido, todavía sigue existiendo una necesidad de un procedimiento industrialmente práctico para la modificación de péptidos glucosilados y no glucosilados con grupos modificadores tales como polímeros solubles en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

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un conjugado covalente entre un Factor IX y un grupo modificador, a una composición farmacéutica que comprende dicho conjugado y a un procedimiento *in vitro* sin células de formación de dicho conjugado, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. También describe una multitud de procedimientos de remodelación de un péptido que tiene una estructura de glucano específica unida al mismo.

La siguiente descripción describe las realizaciones preferidas de la invención y proporciona una descripción escrita de las reivindicaciones que se adjuntan a la misma. La invención incluye cualquiera y todas las variaciones de estas realizaciones que son o resultan obvias después de la lectura de la presente memoria descriptiva.

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



en la que

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

X¹-X² es un sacárido ligado por enlace covalente al AA, en la que

X¹ es un primer residuo de glucosilo; y

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

(a) eliminar X² o una unidad de sacárido del mismo del péptido, formando así un glucano truncado; y

(b) poner en contacto el glucano truncado con al menos una glucosiltransferasa y al menos un donador de glucosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donador de glucosilo al glucano truncado, remodelándose así el péptido.

En un aspecto, el procedimiento comprende además

(c) eliminar X^1 , exponiendo así el AA; y

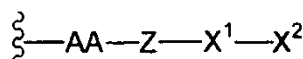
(d) poner en contacto el AA con al menos una glucosiltransferasa y al menos un donador de glucosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donador de glucosilo al AA, remodelándose así el péptido.

En otro aspecto, el procedimiento comprende además:

- 5 (e) antes de la etapa (b), eliminar un grupo añadido al sacárido durante la modificación postraducciona.

En una realización, el grupo es un miembro seleccionado de fosfato, sulfato, carboxilato y ésteres de los mismos.

En otra realización, el péptido tiene la fórmula:

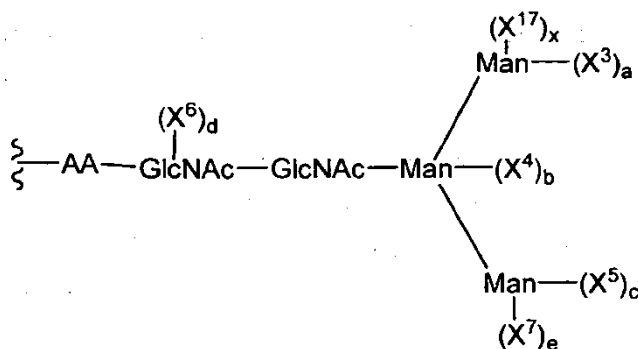


en la que

- 10 Z es un miembro seleccionado de O, S, NH, y un ligador cruzado.

Al menos uno de los donadores de glucosilo comprende un grupo modificador, y el grupo modificador es un polímero hidrosoluble, que comprende poli(etilenglicol). Incluso más preferentemente, el poli(etilenglicol) tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.

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



- 15 en la que
 X^3, X^4, X^5, X^6, X^7 y X^{17} son residuos de monosacárido u oligosacárido independientemente seleccionados; y
a, b, c, d, e y x están seleccionados independientemente de los números enteros 0, 1 y 2, con la condición de que al menos un miembro seleccionado de a, b, c, d, e y x sea 1 ó 2. El procedimiento comprende:

- 20 (a) eliminar al menos uno de X^3, X^4, X^5, X^6, X^7 o X^{17} , o una unidad de sacárido del mismo, del péptido, formando así un glucano truncado; y
(b) poner en contacto el glucano truncado con al menos una glucosiltransferasa y al menos un donador de glucosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donador de glucosilo al glucano truncado, remodelándose así el péptido.

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

En otro aspecto, X^3, X^5 y X^7 están seleccionados del grupo constituido por (manosa)_z y (manosa)_z-(X^8)_y en la que

X^8 es un resto glucosilo seleccionado de mono- y oligo-sacáridos;

y es un número entero seleccionado de 0 y 1; y

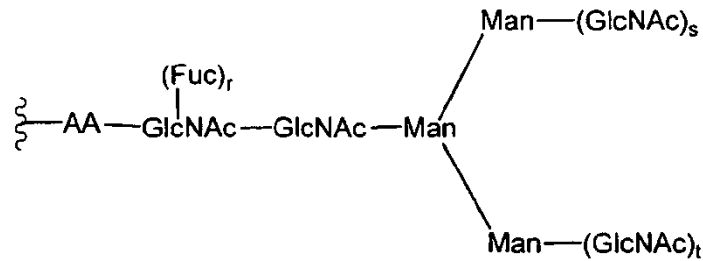
- 30 z es un número entero entre 1 y 20, en la que
si z es 3 o mayor, (manosa)_z está seleccionada de estructuras lineales y ramificadas.

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

- 35 Al menos uno de los donadores de glucosilo comprende un grupo modificador, y el grupo modificador es un polímero hidrosoluble, que comprende poli(etilenglicol). Incluso más preferentemente, el poli(etilenglicol) tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.

Además, el péptido es el factor IX.

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



en la que

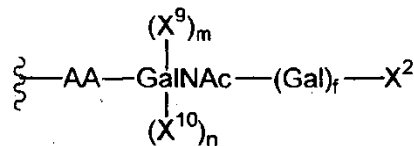
5 r, s y t son números enteros independientemente seleccionados de 0 y 1. El procedimiento comprende:

(a) poner en contacto el péptido con al menos una glucosiltransferasa y al menos un donador de glucosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donador de glucosilo al glucano, remodelándose así el péptido.

10 Al menos uno de los donadores de glucosilo comprende un grupo modificador, y el grupo modificador es un polímero hidrosoluble, que comprende poli(etilenglicol). Incluso más preferentemente, el poli(etilenglicol) tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.

Además, el péptido es el factor IX.

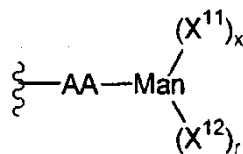
En otro aspecto más, el péptido tiene la fórmula:



15 en la que

X⁹ y X¹⁰ son residuos de monosacárido u oligosacárido independientemente seleccionados; y m, n y f son números enteros seleccionados de 0 y 1.

En otro aspecto, el péptido tiene la fórmula:

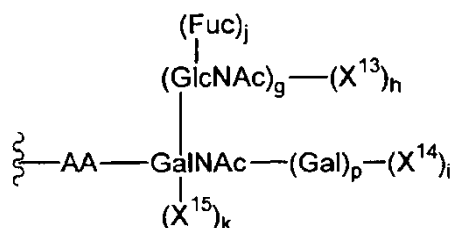


20 en la que

X¹¹ y X¹² son restos glucosilo independientemente seleccionados; y r y x son números enteros independientemente seleccionados de 0 y 1.

En una realización preferida, X¹¹ y X¹² son (manosa)_q en la que q está seleccionado de los números enteros entre 1 y 20, y si q es tres o mayor, (manosa)_q está seleccionada de estructuras lineales y ramificadas.

25 En otro aspecto, el péptido tiene la fórmula:

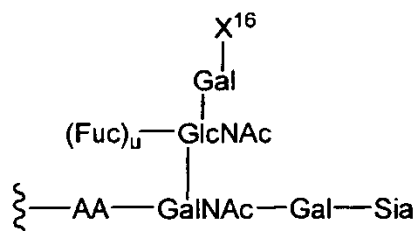


en la que

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

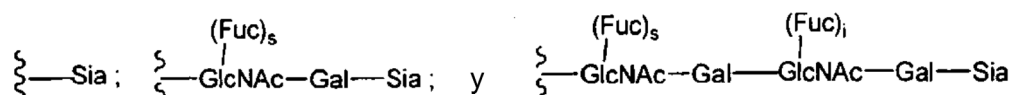
- 5 En un aspecto X^{14} y X^{15} son miembros independientemente seleccionados de GlcNAc y Sia; y i y k están seleccionados independientemente de los números enteros 0 y 1, con la condición de que al menos uno de i y k sea 1, y si k es 1, g, h y j son 0.

En otro aspecto, el péptido tiene la fórmula:



10 en la que

X^{16} es un miembro seleccionado de:

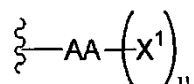


en la que

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

- 15 En un aspecto la eliminación utiliza una glucosidasa.

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



en la que

- 20 AA es un residuo de aminoácido terminal o interno del péptido;
 X^1 es un residuo de glucosilo ligado por enlace covalente a AA, seleccionado de residuos de monosacárido y oligosacárido; y u es un número entero seleccionado de 0 y 1. El procedimiento comprende: poner en contacto el péptido con al menos una glucosiltransferasa y al menos un donador de glucosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donador de glucosilo al glucano truncado, en el que el donador de glucosilo comprende un grupo modificador, remodelándose así el péptido.

- 25 La invención incluye adicionalmente un conjugado covalente entre un Factor IX y un grupo modificador que altera una propiedad de dicho Factor IX, en el que el grupo modificador está unido por enlace covalente a dicho Factor IX en un residuo de glucosilo o de aminoácido preseleccionado del péptido mediante un grupo de enlace de glucosilo intacto, en el que dicho grupo modificador comprende poli(etilenglicol), y en el que dicho grupo de enlace de glucosilo intacto es un residuo de ácido siálico.

- 30 En otro aspecto, el grupo modificador y un precursor de grupo de enlace de glucosilo intacto, se unen al péptido como una unidad unida por enlace covalente mediante la acción de una enzima, convirtiendo la enzima el precursor en el grupo de enlace de glucosilo intacto, formando así el conjugado.

El conjugado covalente de la invención comprende:

- 35 un primer grupo modificador unido por enlace covalente a un primer residuo del péptido mediante un primer grupo de enlace de glucosilo intacto, y
 un segundo grupo de enlace de glucosilo unido a un segundo residuo del péptido mediante un segundo grupo de enlace de glucosilo intacto.

- 40 En una realización, el primer residuo y el segundo residuo son estructuralmente idénticos. En otra realización, el primer residuo y el segundo residuo tienen estructuras diferentes. En una realización adicional, el primer residuo y el

segundo residuo son residuos de glucosilo. En otra realización, el primer residuo y el segundo residuo son residuos de aminoácidos.

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

- 5 El grupo modificador es un polímero hidrosoluble que comprende poli(etilenglicol), que puede tener una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.

En la invención también se proporciona un procedimiento de formación de un conjugado covalente entre un polímero y un péptido glucosilado o no glucosilado, en el que el polímero está conjugado con el péptido mediante un grupo de enlace de glucosilo intacto interpuesto entre y ligado por enlace covalente tanto al péptido como al polímero. El procedimiento comprende poner en contacto el péptido con una mezcla que comprende un azúcar de nucleótido ligado por enlace covalente al polímero y una glucosiltransferasa para la que el azúcar de nucleótido es un sustrato en condiciones suficientes para formar el conjugado.

El polímero es un polímero hidrosoluble. En otra realización preferida, el grupo de enlace de glucosilo está unido por enlace covalente a un residuo de glucosilo unido por enlace covalente al péptido, y en otra realización, el grupo de enlace de glucosilo está unido por enlace covalente a un residuo de aminoácido del péptido.

El polímero comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en un óxido de polialquileo. El óxido de polialquileo es poli(etilenglicol). En otra realización, el poli(etilenglicol) tiene un grado de polimerización de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.000, también preferentemente, el polietilenglicol tiene un grado de polimerización de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000.

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

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

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

El grupo de enlace de glucosilo intacto es un residuo de ácido siálico.

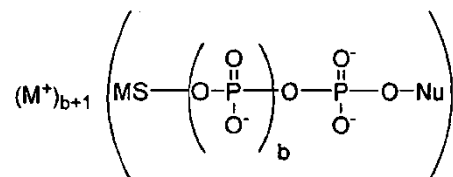
30 Además, el procedimiento se realiza en un entorno sin células.

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

35 También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un polímero y un péptido glucosilado o no glucosilado, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, en la que el polímero está conjugado con el péptido mediante un grupo de enlace de glucosilo intacto interpuesto entre y ligado por enlace covalente tanto al péptido como al polímero.

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

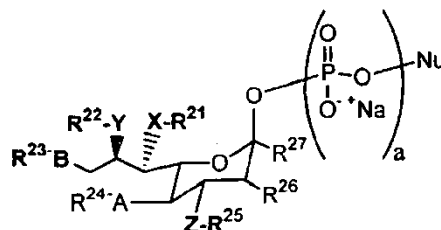
También se desvela un compuesto que tiene la fórmula:



en la que

- 45 MS es un azúcar modificado que comprende un azúcar unido por enlace covalente a un grupo modificador;
Nu es un nucleósido; y
b es un número entero de 0 a 2.

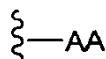
En un aspecto se incluye un compuesto que tiene la fórmula:



en la que

- 5 X, Y, Z, A y B son miembros independientemente seleccionados de S, O y NH;
 $R^{21}, R^{22}, R^{23}, R^{24}$ y R^{25} miembros independientemente seleccionados de H y un polímero;
 R^{26} es un miembro seleccionado de H, OH y un polímero;
 R^{27} es un miembro seleccionado de COO^- y Na^+ ;
 Nu es un nucleósido; y
 a es un número entero de 1 a 3.

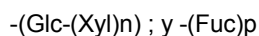
- 10 También se desvela un procedimiento de remodelación *in vitro* sin células de un péptido que tiene la fórmula:



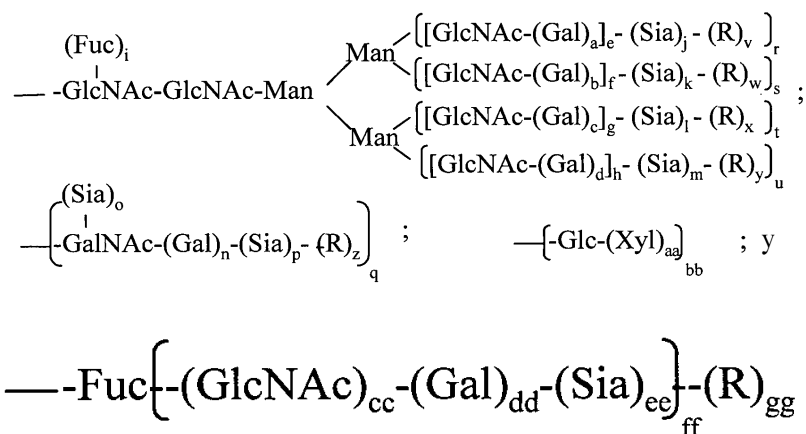
en la que

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

- 15 poner en contacto el péptido con al menos una glucosiltransferasa y al menos un donador de glucosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donador de glucosilo al residuo de aminoácido, en la que el donador de glucosilo comprende un grupo modificador, remodelándose así el péptido.



- 20 La invención proporciona un procedimiento *in vitro* sin células de formación de un conjugado entre un péptido de Factor IX y un grupo modificador, en el que el grupo modificador está unido por enlace covalente al péptido de Factor IX mediante un grupo de enlace de glucosilo intacto, comprendiendo el péptido de G-CSF un residuo de glucosilo que tiene una fórmula que es un miembro seleccionado de:



- 25 en la que

a, b, c, d, i, n, o, p, q, r, s, t, u, bb, cc, dd, ee, ff y gg son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1;
 e, f, g, h y aa son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 0 a 6;
 j, k, l y m son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 0 a 20;
 v, w, x, y y z son 0;

- 30 R es un grupo modificador, una manosa o una oligomanosa. El procedimiento comprende:

(a) poner en contacto el péptido de Factor IX con una glucosiltransferasa y un donador de glucosilo modificado, que comprende un resto glucosilo que es un sustrato para la glucosiltransferasa unido por enlace

covalente al grupo modificador, en condiciones apropiadas para la formación del grupo de enlace de glucosilo intacto.

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

- 5 c) poner en contacto el producto formado en la etapa (a) con una sialiltransferasa, preferentemente ST3 Gal3, y un donador de ácido siálico en condiciones apropiadas para transferir ácido siálico al producto, en el que dicho grupo modificador es un polímero hidrosoluble y dicho polímero hidrosoluble comprende poli(etilenglicol).

En realizaciones adicionales y con referencia a la fórmula del péptido de Factor IX presentada anteriormente, a, b, c y d son 1; e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4; aa, bb, cc, dd, ee, ff, j, k, l, m, i, n, o, p, q, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y v, w, x, y, z y gg son 0. Como alternativa, a, b, c, d, n, q se seleccionan independientemente de 0 y 1; aa, e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4; bb, cc, dd, ee, ff, j, k, l, m, i, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y v, w, x, y, z y gg son 0. Como alternativa, a, b, c, d, n, bb, cc, dd y ff son 1; e, f, g, h y aa son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4; q, ee, i, j, k, l, m, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y v, w, x, y, z y gg son 0. Como alternativa, a, b, c, d y q son 1; e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4; aa, bb, cc, dd, ee, ff, j, k, l, m, i, n, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y v, w, x, y, z y gg son 0. Como alternativa, a, b, c, d, q, bb, cc, dd y ff son 1; aa, e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4; ee, i, j, k, l, m, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y v, w, x, y, z y gg son 0

También se incluyen, un conjugado de péptido de Factor IX, formado por el procedimiento anteriormente descrito, y una composición farmacéutica que comprende el conjugado covalente de acuerdo con la presente invención y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 40G son las fórmulas para los glucanos que se unen a los sitios de glucosilación ligados en N (A y A') y a los sitios ligados en O (B) de péptidos del factor VIII. La Figura 40H a 40M son diagramas de etapas de remodelación contempladas de los péptidos en la Figura 40G basándose en el tipo de célula en la que se expresa el péptido y las estructuras de glucano remodeladas deseadas.

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

La Figura 56, que comprende las Figuras 56A y 56B, es una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos

correspondiente a modo de ejemplo del factor IX (SEC ID N°: 9 y 10, respectivamente).

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

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

La Figura 87 es una gráfica que representa la concentración en plasma en µg/ml con el tiempo de TP10 pre- y post-sialilación inyectado en ratas.

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

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

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

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

La Figura 93 es un esquema que representa la conversión de N-glucanos de alta manosa en N-glucanos híbridos. La enzima 1 es α1,2-manosidasa, de *Trichoderma reesei* o *Aspergillus saitoi*. La enzima 2 es GnT-I (β-1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa I). La enzima 3 es GalT-I (β1,4-galactosiltransferasa 1). La enzima 4 es α2,3-sialiltransferasa o α2,6-sialiltransferasa.

La Figura 94, que comprende las Figuras 94A y 94B, es dos gráficas que representa el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB tratada con una α1,2-manosidasa de *T. reesei* recombinante (Figura 94A) y el perfil de HPLC de los oligosacáridos escindidos por N-glicanasa de la ARNasaB modificada (Figura 94B).

La Figura 95 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB tratada con una α1,2-manosidasa comercialmente disponible purificada de *A. saitoi* (Glyko & CalBioChem).

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

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

La Figura 98 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB modificada tratando el producto mostrado en la Figura 97 con una ST3 gal III recombinante (α2,3-sialiltransferasa III) usando MFC-AS como donador para la transferasa.

La Figura 99 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de ARNasaB modificada tratando el producto mostrado en la Figura 97 con una ST3 gal III recombinante (α2,3-sialiltransferasa III) usando MFC-AS-PEG (10 kDa) como donador para la transferasa.

La Figura 100 es una serie de esquemas que representa la conversión de N-glucanos de alta manosa en N-glucanos complejos. La enzima 1 es α1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* o *Aspergillus saitoi*. La enzima 2 es GnT-I. La enzima 3 es GALT 1. La enzima 4 es α2,3-sialiltransferasa o α2,5-sialiltransferasa. La enzima 5 es α-manosidasa II. La enzima 6 es α-manosidasa. La enzima 7 es GnT-II. La enzima 8 es α1,6-manosidasa. La enzima 9 es α1,3-manosidasa.

La Figura 101 es un diagrama del enlace catalizado por N-acetilglucosaminiltransferasa I a VI (GnT I-VI). R = GlcNAcβ1,4GlcNAc-Asn-X.

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 123 es una imagen de un gel de SDS-PAGE que representa los productos de reacción de sialilación

directa de factor IX y encapsulado de ácido siálico de factor IX-AS-PEG. El carril 1 es patrones de proteína, el carril 2 es blanco; el carril 3 es factor IXr; el carril 4 es factor IXr-AS-PEG encapsulado con AS (10 kDa); el carril 5 es factor IXr-AS-PEG (10 kDa); el carril 6 es ST3 gal1; el carril 7 es ST3 gal3; los carriles 8, 9, 10 son factor IXr-AS-PEG(10 kDa) sin tratamiento con sialidasa previo.

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

Descripción detallada de la invención

La presente invención incluye procedimientos y composiciones para la adición y/o delección *in vitro* sin células de azúcares a o desde una molécula de péptido en un modo tal que se proporcione una molécula de glucopéptido que tiene un patrón de glucosilación personalizado o deseado específico, en el que el glucopéptido se produce a una escala industrial. En una realización preferida de la invención, el glucopéptido así producido ha unido al mismo un azúcar modificado que se ha añadido al péptido mediante una reacción enzimática. Una característica clave de la invención es tomar un péptido producido por cualquier tipo de célula y generar una estructura de glucano de núcleo sobre el péptido, tras lo cual la estructura de glucano se remodela luego *in vitro* para generar un glucopéptido que tiene un patrón de glucosilación adecuado para uso terapéutico en un mamífero. Más específicamente, según la presente invención es posible preparar una molécula de glucopéptido que tiene una molécula de azúcar modificado u otro compuesto conjugado a la misma, de forma que la molécula conjugada confiera una propiedad beneficiosa sobre el péptido. Según la presente invención, la molécula conjugada se añade al péptido enzimáticamente debido a que la adición basada en enzimas de moléculas conjugadas a péptidos tiene la ventaja de regioselectividad y estereoselectividad. Por tanto, es posible usar los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento para remodelar un péptido para conferir al péptido una estructura de glucano deseada que tiene preferentemente un azúcar modificado unido al mismo. También es posible usar los procedimientos y composiciones de la invención para generar moléculas de péptido que tienen estructuras de glucano deseadas y o modificadas a una escala industrial, proveyendo así por primera vez a la materia de una solución práctica para la eficiente producción de péptidos terapéuticos mejorados.

Definiciones

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

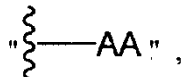
Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del sujeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

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

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

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

Como se usa en el presente documento, la estructura



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

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

Una “estructura de núcleo de trimanosilo elemental” se refiere a un resto de glucano que comprende únicamente una estructura de núcleo de trimanosilo, sin azúcares adicionales unidos a la misma. Si el término “elemental” no se incluye en la descripción de la “estructura de núcleo de trimanosilo”, entonces el glucano comprende la estructura de núcleo de trimanosilo con azúcares adicionales unidos a la misma. Opcionalmente, esta estructura también puede contener una molécula de fucosa y/o una molécula de xilosa de núcleo.

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

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

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

El término “ácido siálico” se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico (frecuentemente abreviado Neu5Ac, NeuAc o NANA). Un segundo miembro de la familia es ácido N-glucolil-neuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en que el grupo N-acetilo de NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano y col. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori y col., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). También están incluidos ácidos siálicos 9-sustituídos tales como 9-O-acil C₁-C₆-Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para una revisión de la familia del ácido siálico véase, por ejemplo, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, Nueva York (1992)). La síntesis y uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación se desvela en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.

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

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

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

El término “semivida” o “t_{1/2}”, como se usa en el presente documento en el contexto de administrar un fármaco de péptido a un paciente, se define como el tiempo requerido para que la concentración en plasma de un fármaco en un paciente se reduzca a la mitad. Puede haber más de una semivida asociada al fármaco de péptido que depende de múltiples mecanismos de eliminación, redistribución, y otros mecanismos muy conocidos en la técnica. Normalmente, las semividas alfa y beta se definen de forma que la fase alfa está asociada con la redistribución y la

fase beta está asociada con la eliminación. Sin embargo, con fármacos de proteína que, en general, están confinados a la circulación sanguínea, puede haber al menos dos semividas de eliminación. Para algunos péptidos glucosilados, la rápida eliminación de la fase beta puede mediarse por receptores sobre macrófagos, o células endoteliales que reconocen galactosa terminal, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa o fucosa. La eliminación de fase beta más lenta puede producirse mediante filtración glomerular renal para moléculas con un radio eficaz < 2 nm (aproximadamente 68 kD) y/o captación y metabolismo específico o no específico en tejidos. La glucoPEGilación puede encapuchar azúcares terminales (por ejemplo, galactosa o N-acetilgalactosamina) y así bloquear la rápida eliminación de la fase alfa mediante receptores que reconocen estos azúcares. También puede conferir un radio eficaz más grande y así disminuir el volumen de distribución y captación de tejido, prolongando así la fase beta tardía. Por tanto, el impacto preciso de la glucoPEGilación sobre las semividas de fase alfa y fase beta variará dependiendo del tamaño, estado de glucosilación, y otros parámetros como es muy conocido en la técnica. Más explicación de “semivida” se encuentra en Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin y RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Ámsterdam, pág 101 - 120).

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

Un “ácido nucleico aislado” se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de las secuencias que lo flanquean en un estado que se produce de manera natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en que se produce de manera natural. El término también se aplica a ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente de otros componentes que acompañan de manera natural al ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN o proteínas que lo acompañan de manera natural en la célula. Por tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus autónomamente replicante, o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, como un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o digestión con enzima de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un ácido nucleico híbrido que codifica secuencia de péptidos adicional.

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

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

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

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

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

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

compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas el 50%, si el 90% de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten el 90% de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 3'ATTGCC5' y 3'TATGGC comparten el 50% de homología.

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

- 5 La determinación de la identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos puede llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, un algoritmo matemático útil para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268), modificado como en Karlin y Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877). Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) y puede accederse, por ejemplo, en el sitio de la malla mundial del Centro nacional para información biotecnológica (NCBI) que tiene el localizador universal de recursos "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/". Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST (designado "blastn" en el sitio web de NCBI), usando los siguientes parámetros: penalización por hueco = 5; penalización por extensión de hueco = 2; penalización por desapareamiento = 3; recompensa por coincidencia = 1; valor esperado 10,0; y tamaño de palabra = 11 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico descrito en el presente documento. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST (designado "blastp" en el sitio web de NCBI) o el programa NCBI "blastp", usando los siguientes parámetros: valor esperado 10,0, matriz de puntuación BLOSUM62 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en el presente documento. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, Gapped BLAST puede utilizarse como se describe en Altschul y col. (1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Alternativamente, PSI-Blast o PHI-Blast pueden usarse para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (idem) y relaciones entre moléculas que comparten un patrón común. Si se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast y PHI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- 15
- 20
- 25 La identidad en porcentaje entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a aquellas descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo de la identidad en porcentaje, normalmente se cuentan coincidencias exactas.

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

30

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

35

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

40

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

45

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

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

50

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

55

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

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

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

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

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

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

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos que existen de forma natural y a aminoácidos sintéticos, además de análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácido que funcionan de un modo similar a los aminoácidos que existen de forma natural. Los aminoácidos que existen de forma natural son aquellos codificados por el código genético, además de aquellos aminoácidos que se modifican después, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que la de un aminoácido que se produce de manera natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos de péptido modificados, pero retienen la misma estructura química básica que la de un aminoácido que se produce de manera natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de un modo similar a un aminoácido que se produce de manera natural.

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

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

Nombre completo	Código de tres letras	Código de una letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	Y
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q

(continuación)

Nombre completo	Código de tres letras	Código de una letra
Serina	Ser	S
Treonina	Th	T
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W

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

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

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

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

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

También pueden incorporarse otras modificaciones sin que afecten de manera adversa a la actividad y éstas incluyen, pero sin limitación, la sustitución de uno o más de los aminoácidos en la forma isomérica L natural con

aminoácidos en la forma isomérica D. Por tanto, el péptido puede incluir uno o más residuos de D-aminoácido, o puede comprender aminoácidos que están todos en la forma D. También se contemplan formas retro-inversas de péptidos según la presente invención, por ejemplo, péptidos invertidos en los que todos los aminoácidos están sustituidos con formas de D-aminoácido.

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

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

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

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

- Como se usa en el presente documento, el término "azúcar modificado" se refiere a un hidrato de carbono que se produce tanto de manera natural como de manera no natural, que se añade enzimáticamente a un aminoácido o a un residuo de glucosilo de un péptido en un procedimiento de la invención. El azúcar modificado está seleccionado de diversos sustratos enzimáticos incluyendo, sin limitación, nucleótidos de azúcar (mono-, di- y trifosfatos),
25 azúcares activados (por eje. haluros de glucosilo, mesilatos de glucosilo) y azúcares que ni están activados ni son nucleotidos.

- El "azúcar modificado" se funcionaliza por enlace covalente con un "grupo modificador". Los grupos modificadores útiles incluyen, pero sin limitación, polímeros solubles en agua, restos terapéuticos, restos diagnósticos, biomoléculas, y similares. El sitio de la funcionalización con el grupo modificador está seleccionado de forma que no prevenga que el "azúcar modificado" se añada enzimáticamente a un péptido.
30

- El término "soluble en agua" se refiere a restos que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. Procedimientos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua son muy conocidos en la técnica. Polímeros solubles en agua a modo de ejemplo incluyen péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) y similares. Los péptidos pueden tener secuencias mixtas o estar compuestos de un único aminoácido, por ejemplo poli(lisina). Similarmente, los sacáridos pueden ser de secuencia mixta o estar compuestos de una única unidad de sacárido, por ejemplo, dextrano, amilosa, quitosano y poli(ácido siálico). Un poli(éter) a modo de ejemplo es poli(etilenglicol). La poli(etilenimina) es una poliamina a modo de ejemplo, y el ácido poli(aspártico) es un poli(ácido carboxílico) representativo.
35

- La expresión "grupo de unión a glucosilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un residuo glucosilo al que se une por enlace covalente un agente (p. ej., polímero hidrosoluble, resto terapéutico, biomolécula). En los procedimientos de la invención, el "grupo de unión a glucosilo" pasa a estar unido por enlace covalente a un péptido glucosilado o no glucosilado, de modo que une el agente a un resto aminoácido y/o glucosilo sobre el péptido. Un "grupo de unión a glucosilo" normalmente deriva de un "azúcar modificado" mediante la unión enzimática del "azúcar modificado" a un resto aminoácido y/o glucosilo del péptido. Un "grupo de unión a glucosilo intacto" se refiere a un grupo de unión que deriva de un resto glucosilo en el que el monómero sacárido individual que se une al conjugado no se degrada, por ejemplo se oxida, por ejemplo mediante metaperyodato sódico. "Grupos de unión a glucosilo intactos" de la invención pueden proceder de un oligosacárido natural mediante la adición de unidad(es) de glucosilo o eliminación de una o más unidades de glucosilo de una estructura de sacárido parental.
40 45

- Las expresiones "resto dirigido" y "agente dirigido", como se usa en el presente documento, hacen referencia a especies que localizarán en un tejido o región concreto del cuerpo. La localización está mediada por un reconocimiento específico de determinantes moleculares, el tamaño molecular del agente o conjugado dirigido, las interacciones iónicas, las interacciones hidrofóbicas y similares. Los expertos en la técnica conocen otros mecanismos de dirigir un agente a un tejido o región concretos.
50

- Como se usa en el presente documento, "resto terapéutico" significa cualquier agente útil para tratamiento incluyendo, pero sin limitación, antibióticos, agentes antiinflamatorios, fármacos antitumorales, citotoxinas y agentes radioactivos. "Resto terapéutico" incluye profármacos de agentes bioactivos, constructos en los que más de un resto terapéutico está unido a un vehículo, por ejemplo agentes multivalentes. Resto terapéutico también incluye péptidos
55

y constructos que incluyen péptidos. Ejemplos de péptidos incluyen los divulgados en la Figura 1 y las Tablas 5 y 6, en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "fármaco antitumoral" significa cualquier agente útil para combatir el cáncer, incluidas citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, agentes antimitóticos, procarbazona, hidroxurea, asparaginasa, corticosteroides, interferones y agentes radiactivos. Asimismo, dentro del alcance de la expresión "fármaco antitumoral" abarca conjugados de péptidos con actividad antitumoral, por ejemplo TNF- α . Conjugados incluyen, entre otros, los formados entre una proteína terapéutica y una glucoproteína de la invención. Un conjugado representativo es el formado entre PSGL-1 y TNF- α .

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

Como se usa en el presente documento, "un agente radiactivo" incluye cualquier radioisótopo que es eficaz en el diagnóstico o destrucción de un tumor. Como ejemplos se incluyen, pero sin limitación, indio-111, cobalto-60 y tecnecio. Además, elementos radiactivos naturales tales como uranio, radio y torio, que normalmente representan mezclas de radioisótopos, son ejemplos adecuados de un agente radiactivo. Los iones metálicos normalmente están quelados con un resto quelante orgánico.

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

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

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

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

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

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

superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 100 %.

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

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

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

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

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

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

Descripción de la invención

I. Procedimiento para remodelar las cadenas de glucano

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

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

- 55 En la presente invención, un péptido producido por una célula se trata enzimáticamente *in vitro* mediante la adición sistemática de las enzimas y sustratos adecuados, de modo que se elimina los restos de azúcar que no deben estar presentes sobre el péptido, y se añaden los restos de azúcar, que opcionalmente incluyen azúcares modificados, que se deben añadir al péptido, de un modo que proporcionan un glucopéptido que tiene una “glucosilación

deseada”, como se define en otros lugares en el presente documento.

A. Procedimiento para remodelar glucanos unidos a N

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

La presente invención incluye la generación de un péptido que tiene una estructura central de trimanosilo como elemento fundamental de la estructura de las moléculas de glucano contenidas en el mismo. Dada la variedad de los sistemas celulares usados para producir péptidos, sean los propios sistemas naturales o impliquen metodología de ADN recombinante, la presente invención proporciona procedimientos mediante los cuales una molécula de glucano en un péptido producido en cualquier tipo de célula se puede reducir a una estructura central de trimanosilo. Una vez que se ha generado la estructura central de trimanosilo elemental, es posible usar los procedimientos descritos en el presente documento para generar *in Vitro* una estructura de glucano deseada sobre el péptido que confiere al péptido una o más propiedades que potencien la eficacia terapéutica del péptido.

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

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

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

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

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

Un ejemplo de un glucopéptido unido a N que tiene una glucosilación deseada es un péptido que tiene un glucano unido a N que tiene un núcleo de trimanosilo con al menos un residuo de GlcNAc unido al mismo. Este residuo se añade al núcleo de trimanosilo usando la N-acetil-glucosaminiltransferasa I (GnT-I). Si se añade un segundo residuo de GlcNAc se usa la N-acetil-glucosaminiltransferasa II (GnT-II). Opcionalmente se pueden añadir residuos de

GlcNAc adicionales con la GnT-IV y/o la GnT-V, y un tercer residuo GlcNAc bisectada se puede unir a la β 1,4 manosa del núcleo de trimanosilo usando la N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III). Opcionalmente, esta estructura se puede extender mediante tratamiento con la β 1,4 galactosiltransferasa para añadir un residuo de galactosa a cada GlcNAc no bisectada, e incluso más opcionalmente, usando las enzimas α 2,3 o α 2,6-sialiltransferasa, los residuos de ácido siálico se pueden añadir a cada residuo de galactosa. La adición de una GlcNAc bisectada al glucano no se requiere para la posterior adición de residuos de galactosa y ácido siálico; no obstante, con respecto a la afinidad por el sustrato de las enzimas GnT-III de rata y humana, la presencia de uno o más de los residuos de galactosa sobre el glucano impide la adición de la GlcNAc bisectada porque el glucano que contiene galactosa no es un sustrato de estas formas de GnT-III. Por tanto, en los casos en los que se desea la presencia de la GlcNAc bisectada y se usan estas formas de GnT-III, es importante que si el glucano contiene residuos de galactosa y/o ácido siálico añadidos, se eliminen antes de la adición de la GlcNAc bisectada. Otras formas de GnT-III pueden no requerir este orden específico de sustratos para su actividad.

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

En algunos casos, un núcleo de trimanosilo elemental solo puede constituir la glucosilación deseada de un péptido. Por ejemplo, se ha demostrado que un péptido que solo tiene un núcleo de trimanosilo está implicado en la enfermedad de Gaucher (Mistry y col., 1966, Lancet 348: 1555-1559; Bijsterbosch y col., 1996, Eur. J. Biochem. 237:344-349).

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

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

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

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

d) es fácilmente evidente a partir de la discusión en b) y c) que no es necesario que las células produzcan únicamente péptidos que tengan un núcleo de trimanosilo elemental o estructuras Man3GlcNAc4 unidos a los

mismos. En su lugar, a menos que las células descritas en b) y c) produzcan péptidos que tengan estructuras centrales de trimanosilo elemental 100 % (es decir que no tienen azúcares adicionales unidas a los mismos) o 100 % de estructuras Man3GlcNAc4, las células, de hecho, producen una mezcla heterogénea de péptidos que tienen, en combinación, estructuras centrales de trimanosilo elemental o estructuras Man3GlcNAc4 como la única estructura de glucano además de estas estructuras que tienen azúcares adicionales unidas a los mismos.

La proporción de péptidos que tienen un núcleo de trimanosilo o una estructura de Man3GlcNAc4 que tiene azúcares adicionales unidos a los mismos, frente a los que tienen una estructura, variará en función de la célula que los produzca. La complejidad de los glucanos (es decir, cuál y cómo muchos azúcares se unen al núcleo de trimanosilo) también variará en función de la célula que los produzca.

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

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

Aislamiento de un glucopéptido central de trimanosilo elemental

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La adición química de los restos glucosilo se lleva a cabo mediante cualquier procedimiento reconocido en la técnica. La adición enzimática de restos de azúcar se consigue, preferentemente, usando una modificación de los procedimientos expuestos en el presente documento, sustituyendo las unidades de glucosilo nativas por los azúcares modificados usados en la invención. Otros procedimientos de añadir restos de azúcar se divulgan en las patentes de EE.UU. N° 5.876.980. 6.030.815. 5.728.554 y 5.922.577.

Puntos de unión ejemplares para determinados residuos glucosilo incluyen, pero sin limitación, (a) sitios para N- y O-glucosilación; (b) restos glucosilo terminales que son aceptores para una glucosiltransferasa; (c) arginina, asparagina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (r) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína; (f) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina; (g) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (h) el grupo amida de la glutamina. Ejemplos de procedimientos de uso en la presente invención se describen en el documento WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pág. 259-306 (1981).

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

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

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

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

En la Figura 6 se muestra una estructura compleja típica de glucano unido a N producida en células vegetales. Es importante destacar que cuando las células vegetales son deficientes en la actividad enzimática GnT-I no se puede añadir xilosa y fucosa al glucano. Por tanto, el uso de células defectivas en GnT-I proporciona una ventaja concreta en la presente invención en cuanto a que estas células producen péptidos que tienen un núcleo de trimanosilo elemental sobre el cual se pueden añadir azúcares adicionales sin realizar ninguna reacción de "recorte". De un modo similar, en los casos en los que la estructura producida en una célula vegetal puede ser de la variedad Man5

de glucano, si no hay GnT-I en estas células no se puede añadir xilosa y fucosa a la estructura. En este caso, la estructura de Man5 se puede recortar a un núcleo de trimanosilo elemental (Man3) usando manosidasa 3. De acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento, ahora es posible añadir restos de azúcar deseados al núcleo de trimanosilo para generar una estructura de glucano deseada.

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

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

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

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

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

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

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

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

Determinación de la estructura primaria del glucano

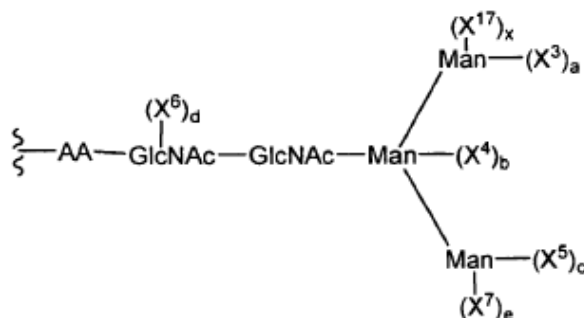
Cuando una célula produce glucopéptido unido a N, como se indica en otros lugares del presente documento, puede comprender una mezcla heterogénea de estructuras de glucano que se debe reducir a un núcleo de trimanosilo común generalmente elemental o a una estructura de Man3GlcNAc4, antes de añadir otros restos de azúcar al mismo. Con el fin de determinar exactamente qué azúcares se deben eliminar de cualquier estructura de glucano

concreta, en ocasiones es necesario identificar la estructura primaria del glucano. En la materia se conocen bien técnicas para determinar la estructura primaria del glucano y se describen con detalle en, por ejemplo, Montreuil, "Structure and Biosynthesis of Glycopeptides" en Polysaccharides in Medicinal Applications, pág. 273-327, 1996, Eds. Severian Damitriu, Marcel Dekker, NY. Por tanto, es sencillo para un experto en la materia de glucobiología aislar una población de péptidos producidos por una célula y determinar la o las estructuras de los glucanos unidos a los mismos. Por ejemplo, se dispone de procedimientos eficientes para (i) romper los enlaces glucosídicos mediante escisión química tal como hidrólisis, acetólisis, hidrazinólisis, o mediante desaminación nitrosa; (ii) metilación completa seguida de hidrólisis o metanólisis y mediante cromatografía de gases-líquidos y espectroscopia de masas de los monosacáridos parcialmente metilados; y (iii) la definición de enlaces anoméricos entre monosacáridos usando exoglucosidasas, que también proporcionan información sobre la estructura primaria del glucano mediante degradación secuencial. En concreto, las técnicas de espectroscopia de masas y de espectrometría por resonancia magnética nuclear (RMN), especialmente RMN de campo alto, se han usado con éxito para determinar la estructura primaria del glucano.

Los kits y el equipo para el análisis de los carbohidratos también están disponibles comercialmente. En Glyko, Inc. (Novato, CA) se dispone de electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE®). En el análisis FACE se liberan glucoconjugados del péptido con Endo H o N-glucanasa (PNGasa F) para los glucanos unidos a N o hidrazina para los glucanos unidos a Ser/Thr. Después, el glucano se marca en el extremo reductor con un fluoróforo de un modo no discriminante por estructura. Los glucanos marcados con el fluoróforo se separan después en geles de poliacrilamida en base a la proporción carga/masa del sacárido, además del volumen hidrodinámico. Se toman imágenes del gel con luz UV y la composición de los glucanos se determina mediante la distancia de migración en comparación con los patrones. Los oligosacáridos se pueden secuenciar de este modo analizando los desplazamientos de migración debidos a la eliminación secuencial de los sacáridos mediante digestión con exoglucosidasa.

Realización ejemplar

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



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

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

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

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

$$\begin{aligned} X^3 y X^5 &= |-\text{GlcNAc-Gal-SA}; \\ a y c &= 1; \\ d &= 0 \text{ o } 1; \\ b, e y x &= 0. \end{aligned}$$

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

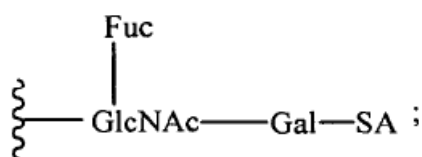
- 5 En la segunda realización preferida, los glucanos unidos a N del péptido se remodelan de modo que tengan un residuo de GlcNAc bisectada sobre el núcleo de trimanosilo. En esta realización, la estructura del glucano descrito en la Fórmula 1 se remodela para tener los restos siguientes:

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

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

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

- 20 X^3 y X^5 son



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

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

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

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

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

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

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

- 45 En las primeras realizaciones ejemplares, el péptido se expresa en una célula CHO (línea celular de ovario de hámster chino) de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con sitios consenso de glucano unido a N se expresa y secreta en células CHO, los glucanos unidos a N tendrán las estructuras representadas en la fila superior de la Figura 3. Aunque todas estas estructuras pueden estar presentes, las

estructuras con mucho más frecuentes son las dos del lado derecho. En los términos de la Fórmula 1,

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

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

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

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

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

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

$$X^3 \text{ y } X^5 = \beta\text{-Man} - \text{Man} - (\text{Man})_{0-1000};$$

a y $c = 1$ o 2 ;
 b, d, e y $x = 0$.

- 50 En una realización ejemplar, los glucanos unidos a N de un péptido expresado y secretado por células de levadura se remodelan en el núcleo de trimanosa elemental poniendo en contacto primero los glucanos con una glucosidasa específica de moléculas de $\alpha 2$ manosa, después poniendo en contacto con una glucosidasa específica de moléculas de $\alpha 6$ manosa. Este procedimiento se ilustra en la Figura 5 y el Ejemplo 6. En otra realización ejemplar, los glucanos unidos a N se remodelan además para hacer un glucano adecuado para un anticuerpo recombinante con función de
- 55 toxicidad celular mediada por Fc poniendo en contacto los glucanos centrales de trimanosa elemental con una glucosiltransferasa específica de la molécula aceptora de manosa en cada antena del núcleo de trimanosa, una molécula donadora de GlcNAc en presencia de moléculas de nucleótido-GlcNAc, después poniendo en contacto los glucanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de manosa en medio del núcleo de

trimanosa, una molécula donadora de GlcNAc en presencia de moléculas de nucleótido-GlcNAc; después, poniendo en contacto los glucanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de GlcNAc, una molécula donadora de Gal en presencia de moléculas de nucleótido-Gal y, después, poniendo en contacto los glucanos con glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de galactosa, una molécula donadora de ácido siálico en presencia de moléculas de nucleótido-SA. Este procedimiento se ilustra en las Figuras 2, 3 y 4.

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

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

B. Procedimiento para remodelar glucanos unidos a O

La O-glucosilación se caracteriza por la unión de varios monosacáridos en un enlace O-glucosídico a hidroxiaminoácidos. La O-glucosilación es una amplia modificación postraduccional en los reinos animal y vegetal.

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

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

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

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

La etapa inicial en la glucosilación-O en células de mamífero es la unión de N-acetilgalactosamina (GalNAc) usando cualquiera de una familia de al menos once α -N-acetilgalactosaminiltransferasas conocidas, cada una de las cuales

tiene una especificidad por el péptido aceptor restringida. En general, el péptido aceptor reconocido por cada enzima constituye una secuencia de al menos diez aminoácidos. Los péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos reconocida por una GalNAc-transferasa concreta se convierten en O-glucosilados en el sitio aceptor si se expresan en una célula que expresa la enzima y si se localizan adecuadamente en el aparato de Golgi en el que también hay UDP-GalNAc.

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

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

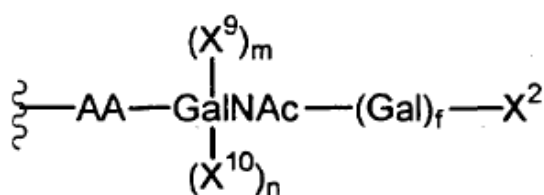
En una realización puede estar presente una secuencia adicional de aminoácidos que constituyen un aceptor eficaz para transferir un azúcar unida a O. Dicha secuencia de aminoácidos está codificada por una secuencia de ADN condensada en marco con la secuencia de codificación del péptido o, como alternativa,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

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

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

Realizaciones ejemplares

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



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

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

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

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

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

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

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

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

20 En otra realización preferida más, los glucanos unidos a O del péptido se remodelan para que contengan un resto conjugado. El resto conjugado puede ser una molécula de PEG, otro péptido, una molécula pequeña tal como un fármaco, entre otros. En esta realización, la estructura del glucano descrito en la Fórmula 2 se remodela para tener los restos siguientes:

- 25 X^2 es β -SA-R;
 $f = 1$;
 n y $m = 0$;
 en la que R es el grupo conjugado.

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

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

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

- 40 $X^2 = \beta$ -SA;
 $f = 1$;
 m y $n = 0$.

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

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

- 50 $X^2 = H$;
 $f = 0$ o 1 ;
 n y $m = 0$.

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

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



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

En una realización ejemplar, el glucano es el glucano unido a O sobre un péptido expresado en una célula fúngica y se remodela en un glucano humanizado poniendo en contacto el glucano con una endoglucosilasa específica de un enlace aminoácido GalNAc y, después, poniendo en contacto el glucano con una glucosiltransferasa específica de un sitio consenso unido a O y una molécula donadora de GalNAc en presencia de nucleótido-GalNAc; poniendo en contacto el glucano con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de GalNAc y una molécula donadora de galactosa en presencia de nucleótido-Gal; y, después, poniendo en contacto los glucanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de Gal y una molécula donadora de SA en presencia de nucleótido-SA.

Como alternativa, en otra realización ejemplar, el glucano es el glucano unido a O en un péptido expresado en una célula fúngica y se remodela en un glucano humanizado poniendo en contacto el glucano con una proteína O-manosa β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (POMGnT1) en presencia de GlcNAc-nucleótido; poniendo en contacto después el glucano con una galactosiltransferasa en presencia de nucleótido-Gal; y, después, poniendo en contacto el glucano con una sialiltransferasa en presencia de nucleótido-SA.

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

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

C. Glucoconjugación en general

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

Los conjugados de la invención se forman mediante la unión enzimática de un azúcar modificado al péptido glucosilado o no glucosilado. El azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido y el grupo modificador en el

azúcar se convierte en lo que en el presente documento se denomina "grupo de unión a glucosilo intacto". Usando la selectividad exquisita de las enzimas, tal como las glucosiltransferasas, el presente procedimiento proporciona péptidos portadores de un grupo deseado en una o más localizaciones específicas. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, un azúcar modificado se une directamente a un locus seleccionado sobre la cadena peptídica o, como alternativa, el azúcar modificado se cuelga sobre un resto carbohidrato de un péptido. Los péptidos en los que los azúcares modificados están unidos a un carbohidrato peptídico y directamente a un residuo de aminoácido de la estructura peptídica también están dentro del alcance de la presente invención.

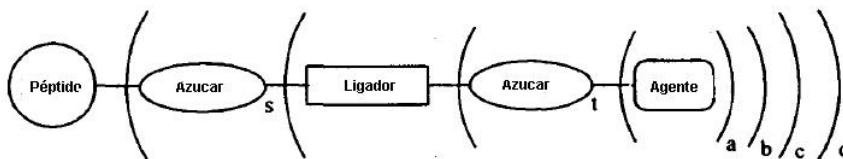
A diferencia de las estrategias de elaboración de péptidos químicas y enzimáticas, los procedimientos de la invención hacen posible unir péptidos y glucopéptidos que tienen un patrón de derivación sustancialmente homogéneo; las enzimas usadas en la invención son, en general, selectivas de un residuo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

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

1. Los conjugados

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

Normalmente, los conjugados de la invención corresponden a la estructura general:



en la que los símbolos a, b, c, d y s representan un número entero positivo distinto de cero y t es 0 o un número entero positivo. El "agente" es un agente terapéutico, un agente bioactivo, un marcador detectable, resto hidrosoluble o similar. El "agente" puede ser un péptido, por ejemplo una enzima, anticuerpo, antígeno etc. El ligador puede ser cualquiera de una amplia gama de grupos de unión, más adelante. Como alternativa, el ligador puede ser un enlace sencillo o un "ligador de orden cero". El péptido es Factor IX. En la Figura 1 se proporcionan ejemplos de péptidos.

En una realización ejemplar, el resto seleccionado es un polímero hidrosoluble que comprende poli(etilenglicol). El polímero hidrosoluble está unido por enlace covalente al péptido a través de un grupo de unión a glucosilo intacto. El grupo de unión a glucosilo está unido por enlace covalente a un residuo aminoácido o un residuo glucosilo del péptido. Como alternativa, el grupo de unión a glucosilo está unido a una o más unidades de glucosilo de un glucopéptido. La invención también proporciona conjugados en los que el grupo de unión a glucosilo está unido a un residuo aminoácido y a un residuo glucosilo.

Además de proporcionar conjugados que se forman a través de un grupo de unión a glucosilo intacto añadido enzimáticamente, la presente invención proporciona conjugados que son altamente homogéneos en sus patrones de

sustitución. Usando los procedimientos de la invención es posible formar conjugados peptídicos en los que esencialmente todos los restos de azúcar modificados en una población de conjugados de la invención están unidos a múltiples copias de un residuo aminoácido o glucosilo estructuralmente idéntico. Por tanto, en un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos polímeros hidrosolubles que están unidos por enlace covalente al péptido a través de un grupo de unión a glucosilo intacto. En un conjugado preferido de la invención, esencialmente cada miembro de la población está unido mediante el grupo de unión a glucosilo a un residuo glucosilo del péptido y cada residuo glucosilo del péptido al que está unido el grupo de unión a glucosilo tiene la misma estructura.

También se proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos polímeros hidrosolubles unidos por enlace covalente al péptido a través de un grupo de unión a glucosilo intacto. En una realización preferida, esencialmente cada miembro de la población de restos polímeros hidrosolubles está unido a un residuo de aminoácido del péptido a través de un grupo de unión a glucosilo intacto y cada residuo de aminoácido que tiene un grupo de unión a glucosilo intacto unido al mismo tiene la misma estructura.

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

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

El conjugado se forma entre un polímero hidrosoluble y un péptido glucosilado o no glucosilado. El polímero está conjugado al péptido a través de un grupo de unión a glucosilo intacto que se interpone entre, y se une por enlace covalente, tanto al péptido como al grupo modificador (es decir, polímero hidrosoluble). El procedimiento incluye poner en contacto el péptido con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una glucosiltransferasa para la cual el azúcar modificado es un sustrato. La reacción se lleva a cabo en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido. El resto azúcar del azúcar modificado se selecciona de azúcares nucleotídicos, azúcares activados y azúcares, que ni son nucleótidos ni están activados.

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

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

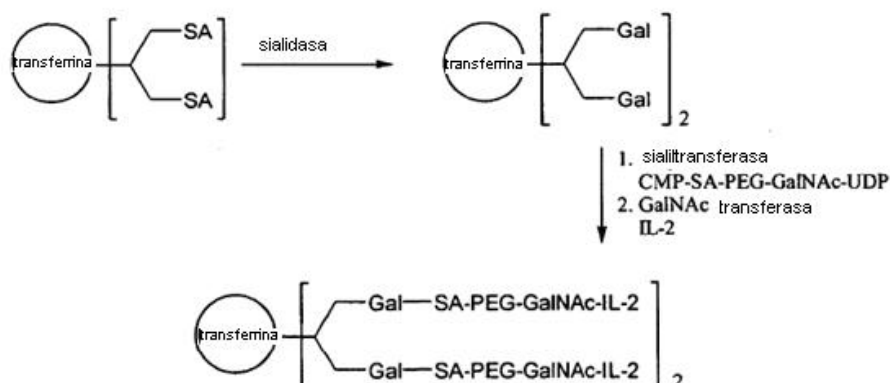
Por tanto, un resto de PEG está funcionalizado en un primer extremo con una primera unidad de glucosilo y un segundo extremo con una segunda unidad de glucosilo. La primera y la segunda unidad de glucosilo son, preferentemente, sustratos para diferentes transferasas, lo que permite la unión ortogonal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

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

tiene como resultado la unión de la GalNAc de la rama ligadora a un residuo de serina y/o treonina en la IL-2.

En otro ejemplo, la transferrina se conjuga con un ácido nucleico para usar en terapia génica.

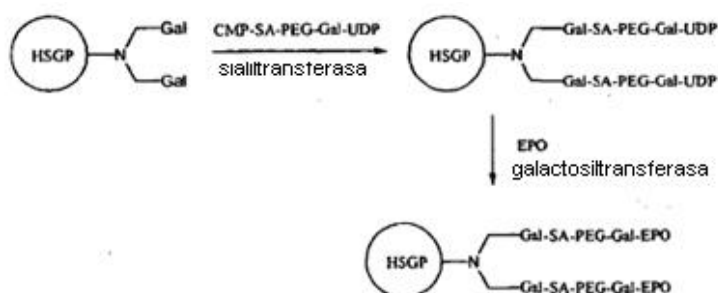
Esquema 1



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

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

15 **Esquema 2**

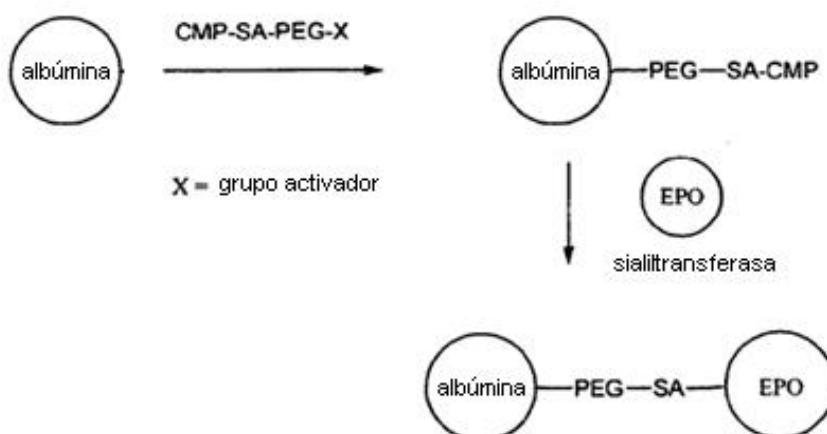


- El uso de derivados reactivos de PEG (u otros ligadores) para unir uno o más restos peptídicos al ligador está dentro del alcance de la presente invención. La invención no está limitada por la identidad del análogo de PEG reactivo. Muchos derivados activados de poli(etilenglicol) están disponibles comercialmente y en la bibliografía. Dentro de las
- 20 capacidades de un experto entra elegir y sintetizar en caso necesario un derivado de PEG activado adecuado con el que preparar un sustrato útil en la presente invención. Véase, Abuchowski y col., Cancer Biochem. Biophys., 7: 175-186 (1984); Abuchowski y col., J. Biol. Chem., 252: 3582-3586 (1977); Jackson y col., Anal. Biochem., 165: 114-127 (1987); Koide y col., Biochem Biophys. Res. Commun., 111: 659-667 (1983), treslato (Nilsson y col., Methods Enzymol., 104: 56-69 (1984); Delgado y col., Biotechnol. Appl. Biochem., 12: 119-128 (1990)); ésteres activos
- 25 derivados de N-hidroxisuccinimida (Buckmann y col., Makromol. Chem., 182: 1379-1384 (1981); Joppich y col., Makromol. Chem., 180: 1381-1384 (1979); Abuchowski y col., Cancer Biochem. Biophys., 7: 175-186 (1984); Katre y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 1487-1491 (1987); Kitamura y col., Cancer Res., 51: 4310-4315 (1991); Boccu y col., Z. Naturforsch., 38C: 94-99 (1983), carbonatos (Zalipsky y col., POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, Harris, Ed., Plenum Press, New York, 1992, pág. 347-370;
- 30 Zalipsky y col., Biotechnol. Appl. Biochem., 15: 100-114 (1992); Veronese y col., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141-152 (1985)), formiatos de imidazolilo (Beauchamp y col., Anal. Biochem., 131: 25-33 (1983); Berger y col., Blood, 71:

1641-1647 (1988)), 4-ditiopiridinas (Woghiren y col., Bioconjugate Chem., 4: 314-318 (1993)), isocianatos (Byun y col., ASAIO Journal, M649-M-653 (1992)) y epóxidos (patente de EE.UU, N° 4.806.595, concedida a Noishiki y col. (1989). Otros grupos de unión incluyen el enlace uretano entre grupos amino y PEG activado. Véase, Veronese, y col., Appl. Biochem. Biotechnol., 11: 141-152 (1985).

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

Esquema 3



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

2. Azúcares modificados

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

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

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

La invención también proporciona procedimientos para sintetizar un péptido modificado usando un azúcar modificado, por ejemplo galactosa, fucosa y ácido siálico modificados. Cuando se usa un ácido siálico modificado, en estos procedimientos se pueden usar una sialiltransferasa o una transialidasa (sólo para el ácido siálico unido en α -2,3).

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

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

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

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

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

A continuación se tratan ejemplos de grupos modificadores. Los grupos modificadores se pueden seleccionar de una o más propiedades deseables. Ejemplos de propiedades incluyen, pero sin limitación, mayor farmacocinética, mayor farmacodinamia, mejor biodistribución, que proporciona una especie polivalente, mejor solubilidad en agua, mayor o menor lipofilicidad y direccionamiento tisular.

D. Conjugados peptídicos

a) Polímeros hidrosolubles

La hidrofiliidad de un péptido seleccionado se potencia mediante conjugación con moléculas polares, tales como moléculas que contienen amina, éster, hidroxilo y polihidroxilo. Ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, polilisina, polietilenimina, poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol). De acuerdo con la presente invención, los polímeros hidrosolubles comprenden poli(etilenglicol). Los polímeros hidrosolubles preferidos son, esencialmente, no fluorescentes o emiten una cantidad tan mínima de fluorescencia que son inadecuados para usar como marcadores fluorescentes en un ensayo. Se pueden usar polímeros que no sean azúcares naturales. Además, también se contempla el uso de un azúcar de otro modo natural que está modificado por la unión covalente de otra entidad (es decir, poli(etilenglicol)).

En la bibliografía se describen procedimientos y químicas para la activación de polímeros y sacáridos hidrosolubles, así como procedimientos para conjugar sacáridos y polímeros a varias especies. Procedimientos de uso habitual para la activación de polímeros incluyen activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, peryodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorohidrina, divinilsulfona, carbodiimida, haluros de sulfonilo, triclorotriazina etc.

(véase, R. F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson y col., (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L., y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

En la técnica se conocen vías para preparar moléculas de PEG reactivo y formar conjugados usando las moléculas reactivas. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.672.662 divulga un conjugado hidrosoluble y aislable de un éster activo de un polímero ácido seleccionado de poli(óxidos de alquileo) lineales o ramificados, poli(polioles oxietilados), poli(alcoholes olefinicos) y poli(acrilomorfolina), en los que el polímero tiene aproximadamente 44 o más unidades recurrentes.

La patente de EE.UU. N° 6,376,604 establece un procedimiento para preparar un éster de 1-benzotriazolcarbonato hidrosoluble de un polímero hidrosoluble y no peptídico haciendo reaccionar un hidroxilo terminal del polímero con carbonato de di(1-benzotriazólo) en un disolvente orgánico. El éster activo se usa para formar conjugados con un agente biológicamente activo, tal como una proteína o péptido.

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

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

Aunque tanto los derivados de PEG reactivo como los conjugados formados usando los derivados se conocen en la técnica, hasta la presente invención no se ha reconocido que se podía formar un conjugado entre PEG (u otro polímero) y otra especie, tal como un péptido o glucopéptido, a través de un grupo de unión a glucosilo intacto.

Los expertos en la técnica conocen muchos polímeros hidrosolubles y son útiles en la práctica de la presente invención. La expresión polímeros hidrosolubles abarca especies tales como sacáridos (p. ej., dextrano, amilasa, ácido hialurónico, ácido poli(silático), heparanos, heparinas etc.), poli(aminoácidos), ácidos nucleicos, polímeros sintéticos (p. ej., ácido poli(acrílico), poli(éteres), por ejemplo poli(etilenglicol), péptidos, proteínas y similares. La presente invención puede llevarse a la práctica con cualquier polímero hidrosoluble que contenga poli(etilenglicol) con la única limitación de que el polímero incluya un punto al cual pueda unirse el resto del conjugado.

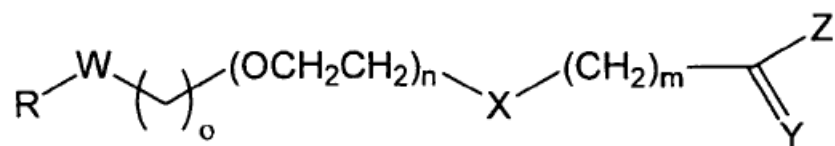
También pueden encontrarse procedimientos para la activación de polímeros en el documento WO 94/17039, en la patente de EE.UU. N° 5.324.844, en los documentos WO 94/18247, WO 94/04193, en las patentes de EE.UU. N° 5.219.564 y 5.122.614, en el documento WO 90/13540, en la patente de EE.UU. N° 5.281.698, y más en el documento WO 93/15189, y para la conjugación entre polímeros y péptidos activados, por ejemplo, Factor de Coagulación VIII (documento WO 94/15625), hemoglobina (documento WO 94/09027), molécula transportadora de oxígeno (patente de EE.UU. N° 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese y col., App. Biochem. Biotech. 11: 141-45 (1985)).

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

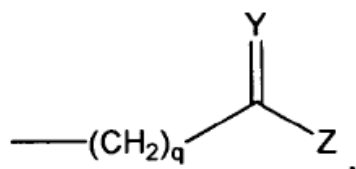
La presente invención se ilustra además por referencia a un conjugado de poli(etilenglicol). Se dispone de varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG. Véase por ejemplo, Harris, Macromol. Chem. Phys. C25: 325-373 (1985); Scouten, Methods in Enzymology 135: 30-65 (1987); Wong y col., Enzyme Microb. Technol. 14: 866-874 (1992); Delgado y col., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249-304 (1992); Zalipsky, Bioconjugate Chem. 6: 150-165 (1995); y Bhadra y col., Pharmazie, 57:5-29 (2002).

Moléculas de poli(etilenglicol) adecuadas para usar en la invención incluyen las descritas por la siguiente Fórmula 3:

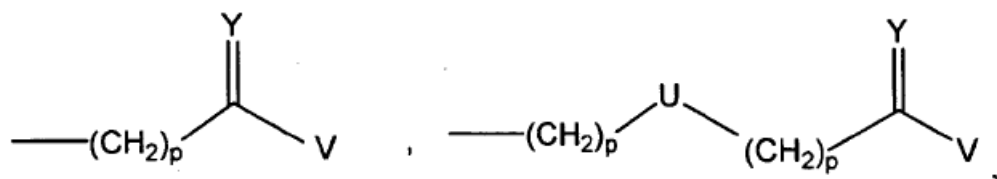
Fórmula 3



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

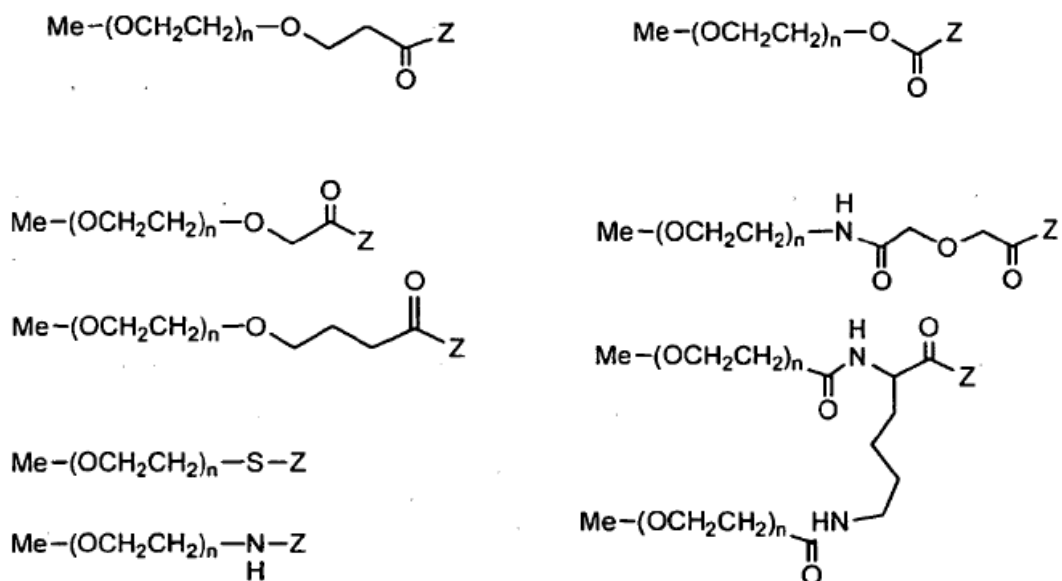


- 5 -azúcar-nucleótido, proteína, metilo, etilo;
 X, Y, W, U (seleccionados de forma independiente) = O, S, NH, N-R';
 R', R'' (seleccionados de forma independiente) = alquilo, bencilo, arilo, alquilo, arilo, piridilo, arilo sustituido, arilalquilo, acilarilo;
 n = 1 a 2.000;
 10 m, q, p (seleccionados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



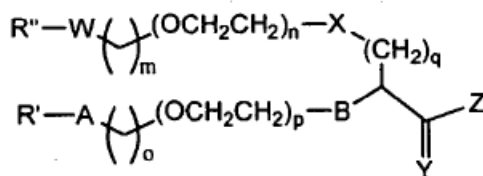
- 15 -azúcar-nucleótido, proteína, imidazol, HOBT, tetrazol, haluro; y
 V = HO, NH₂, halógeno, S-R'', ésteres activados, amidas activadas, -azúcar-nucleótido, proteína.

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

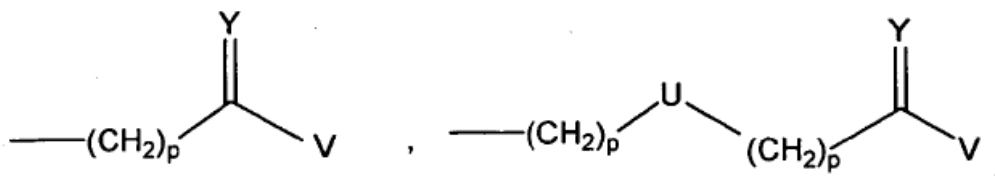


El poli(etilenglicol) útil en la formación del conjugado de la invención es lineal o ramificado. Moléculas de poli(etilenglicol) adecuadas para usar en la invención incluyen las descritas por la siguiente Fórmula:

Fórmula 4



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



-azúcar-nucleótido, proteína;

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

- 15 La semivida *in vivo*, el área bajo la curva y/o el tiempo de residencia de los péptidos terapéuticos también se pueden potenciar con polímeros hidrosolubles tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG). Por ejemplo, la modificación química de proteínas con PEG (PEGilación) aumenta su tamaño molecular y disminuye su accesibilidad en superficie y del grupo funcional, cada uno de los cuales dependen del tamaño del PEG unido a la proteína. Esto tiene como resultado una mejora de las semividas en plasma y de la estabilidad proteolítica y una
- 20 disminución de la inmunogenicidad y la captación hepática (Chaffee y col., J. Clin. Invest. 89: 1643-1651 (1992); Pyatak y col., Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol. 29: 113-127 (1980)). Se ha notificado que la PEGilación de la interleucina-2 aumenta su potencia antitumoral *in vivo* (Katre y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 1487-1491 (1987)) y la PEGilación de un F(ab')₂ derivado del anticuerpo monoclonal A7 ha mejorado su localización tumoral (Kitamura y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 1387-1394 (1990)).
- 25 En una realización preferida, la semivida *in vivo* de un péptido derivado de un polímero hidrosoluble mediante un procedimiento de la invención ha aumentado con respecto a la semivida *in vivo* del péptido no derivado. En otra realización preferida, el área bajo la curva de un péptido derivado de un polímero hidrosoluble usando un procedimiento de la invención ha aumentado con respecto al área bajo la curva del péptido no derivado. En otra
- 30 realización preferida, el tiempo de residencia de un péptido derivado de un polímero hidrosoluble usando un procedimiento de la invención ha aumentado con respecto al tiempo de residencia del péptido no derivado. Las técnicas para determinar la semivida *in vivo*, el área bajo la curva y el tiempo de residencia son bien conocidas en la materia. Descripciones de estas técnicas se pueden encontrar en J.G. Wagner, 1993, Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist, Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster PA.
- 35 El incremento de la semivida *in vivo* del péptido se expresa mejor como un intervalo del porcentaje de incremento en esta cantidad. El extremo inferior del intervalo del porcentaje de incremento es de aproximadamente 40 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 100 % o aproximadamente 150 % o aproximadamente 200 %. El extremo superior del intervalo es de aproximadamente 60 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 150 % o más de aproximadamente 250 %.
- 40 En un ejemplo se desvela una hormona estimulante del folículo PEGilada (Ejemplos 9 y 10). En un ejemplo adicional también se desvela una transferrina PEGilada (Ejemplo 13).

F. Preparación de azúcares modificados

En el presente documento se tratan azúcares modificados útiles en la formación de los conjugados de la invención. La discusión se centra en la preparación de un azúcar modificado con un polímero hidrosoluble. En particular la

discusión se centra en la preparación de azúcares modificados que incluyen un resto de poli(etilenglicol).

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

Grupos funcionales reactivos útiles pendientes de un núcleo de azúcar o grupo modificador incluyen, pero sin limitación:

(a) grupos carboxilo y varios derivados de los mismos, incluidos, entre otros, éteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de acilo, imidazoles de acilo, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo y aromáticos;

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

(c) grupos haloalquilo, en los que el haluro se puede desplazar después con un grupo nucleofílico tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbaanión o un ion alcóximo, de modo que tiene como resultado la unión covalente de un grupo nuevo en el grupo funcional del átomo de halógeno;

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

(e) grupos aldehído y cetona, de modo que es posible la derivación posterior mediante la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o mediante mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquil-litio.

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

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

(h) grupos amina o sulfhidrido que pueden ser, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados;

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

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

Los grupos funcionales reactivos se pueden elegir de un modo tal que no participen ni interfieran en las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o el grupo modificador. Como alternativa, un grupo funcional reactivo se puede proteger de participar en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica entenderán cómo proteger un grupo funcional concreto de un modo tal que no interfiera en un conjunto seleccionado de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo, Greene y col., *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

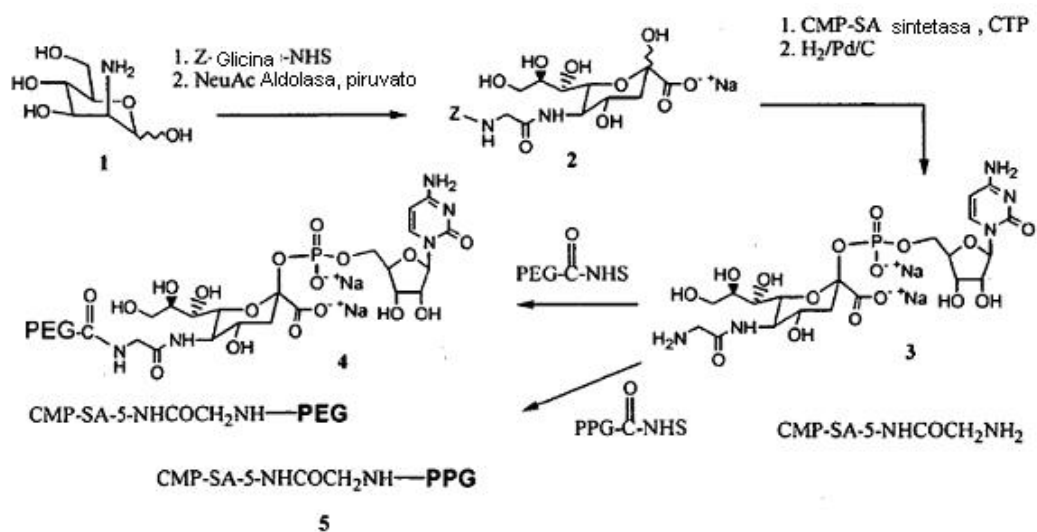
En la discusión siguiente, se expone una serie de ejemplos específicos de azúcares modificados que son útiles en la práctica de la presente invención. En las realizaciones ejemplares se usa un derivado de ácido siálico como núcleo del azúcar al que se une el grupo modificador. El centro de la discusión sobre derivados de ácido siálico es son con fines aclaratorios únicamente y no debe interpretarse como limitantes del ámbito de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden activar u derivar diversos restos de azúcar de un modo análogo al expuesto usando ácido siálico como ejemplo. Por ejemplo se dispone de numerosos procedimientos para modificar galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y fucosa, por nombrar algunos sustratos de azúcar, que se modifican con facilidad mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Elhalabi y col., *Curr. Med. Chem.* 6: 93 (1999); y Schafer y col., *J. Org. Chem.* 65: 24 (2000).

En una realización ejemplar, el péptido que se modifica mediante un procedimiento de la invención es un péptido que se produce en células de mamífero (p. ej., células CHO) o en un animal transgénico y, por tanto, contiene cadenas de oligosacáridos unidos a N y/o unidos a O, que están sialiladas de forma incompleta. Las cadenas de oligosacáridos del glucopéptido que carece de un ácido siálico y que contiene un residuo de galactosa terminal se pueden PEGilar, PPGilar o modificar de otro modo con un ácido siálico modificado.

En el esquema 4, el glucósido manosamina1 se trata con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (p. ej., glicina), que convierte el residuo de amino azúcar en el correspondiente aducto de amida de aminoácido protegido. El aducto se trata con una aldolasa para formar el ácido siálico 2. El compuesto 2 se convierte en el correspondiente derivado de CMP mediante la acción de la CMP-SA sintetasa, seguido de hidrogenación catalítica del derivado de MCP para producir el compuesto 3. La amina introducida mediante la formación del aducto de glicina se usa como un locus de unión de PEG o PPG haciendo reaccionar el compuesto 3 con un derivado de PEG o PPG

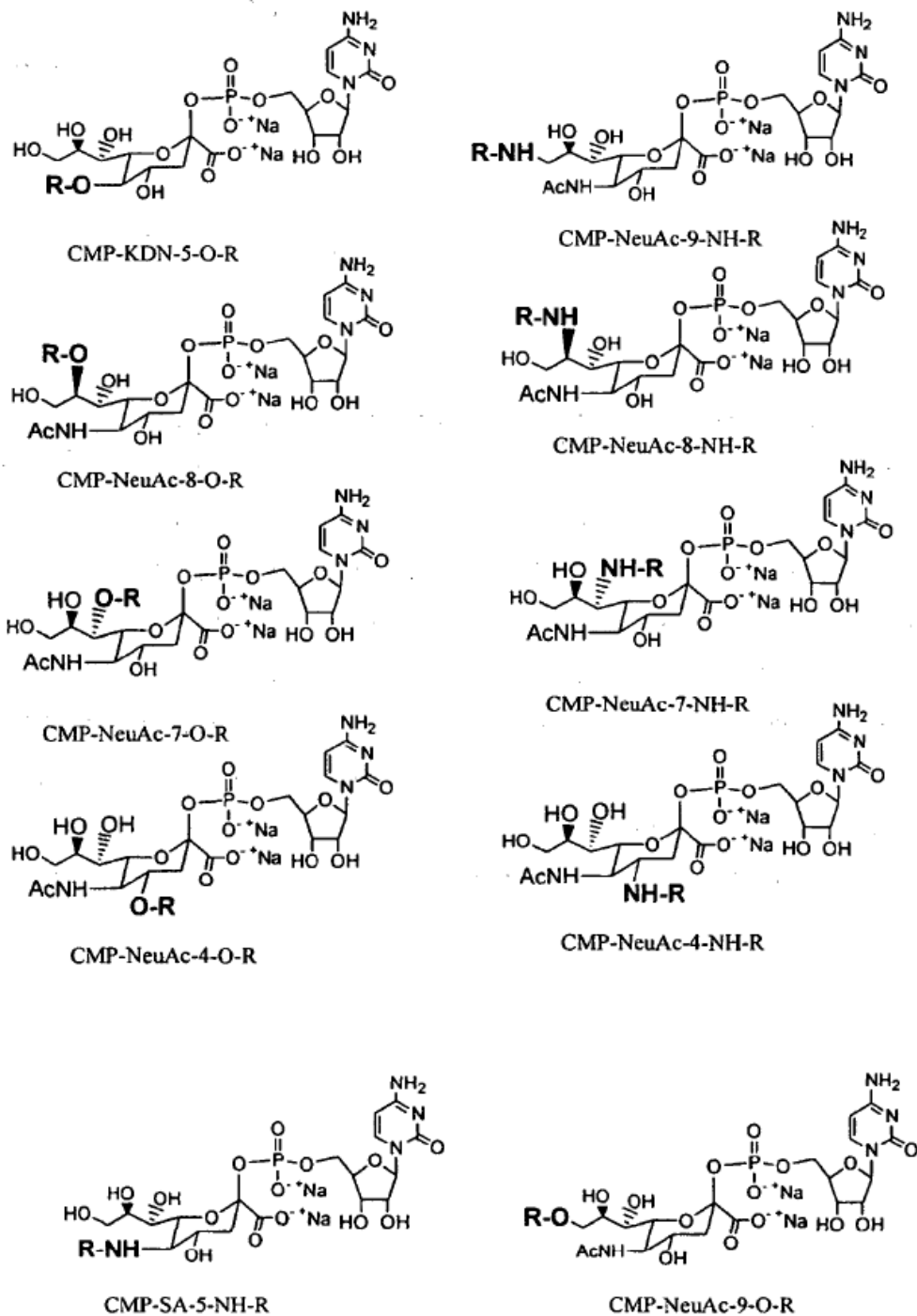
activado (p. ej., PEG-C(O)NHS, PPG-C(O)NHS), produciendo 4 o 5, respectivamente.

Esquema 4



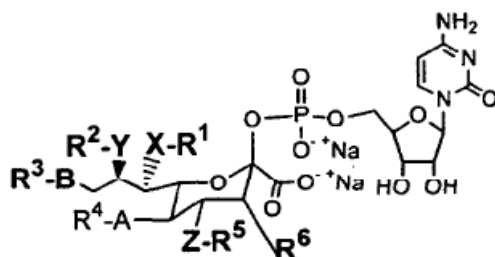
La tabla 2 expone ejemplos representativos de monofosfatos de azúcar que se derivan con un resto de PEG o PPG. Determinados compuestos de la Tabla 2 se preparan mediante el procedimiento del esquema 1. Otros derivados se preparan mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo,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

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



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

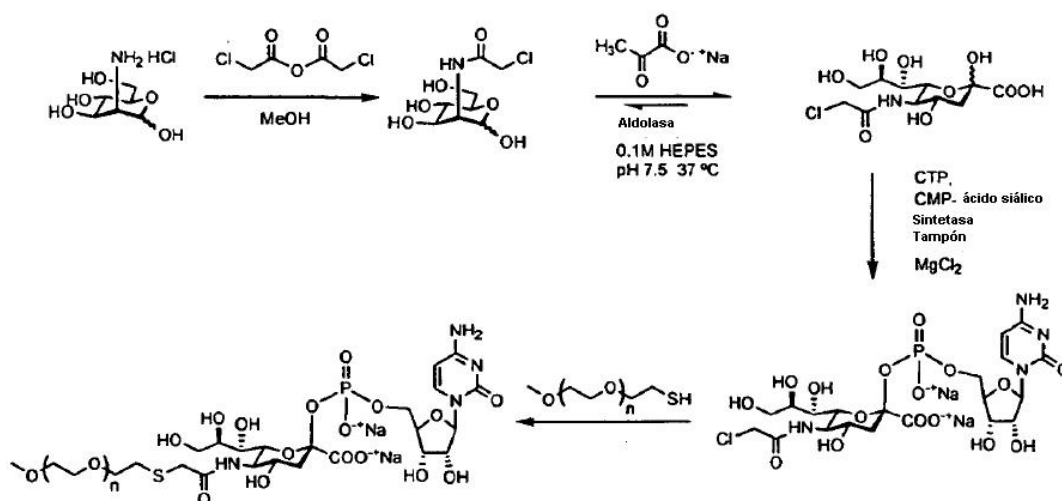
Fórmula 5



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

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

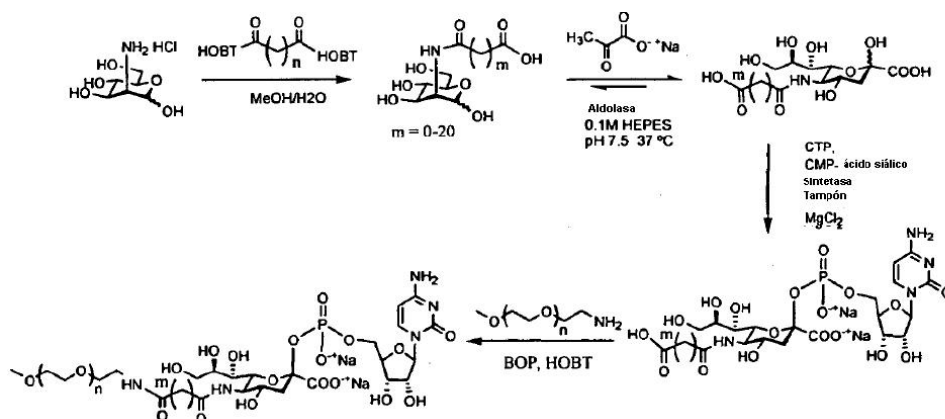
Esquema 5



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

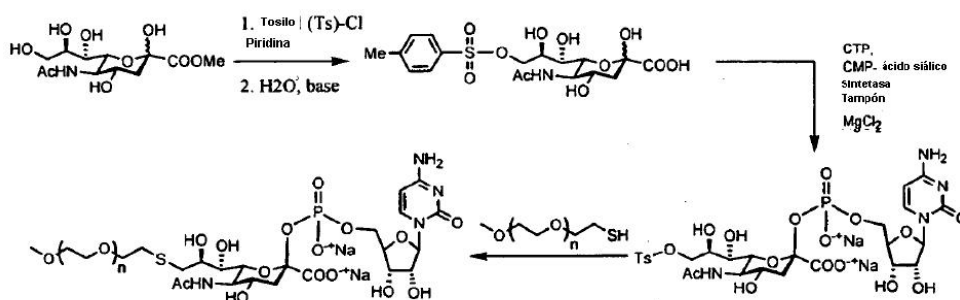
- En una realización ejemplar adicional, como se muestra en el Esquema 6, se acila una manosamina con un bis-HOPT dicarboxilato, produciendo el correspondiente ácido amidoalquilcarbosílico, que después se convierte en un derivado de ácido siálico. El derivado de ácido siálico se convierte en un azúcar de nucleótido y el ácido carboxílico se activa y reacciona con un derivado de PEG nucleofílico, tal como amino-PEG.
- 20

Esquema 6



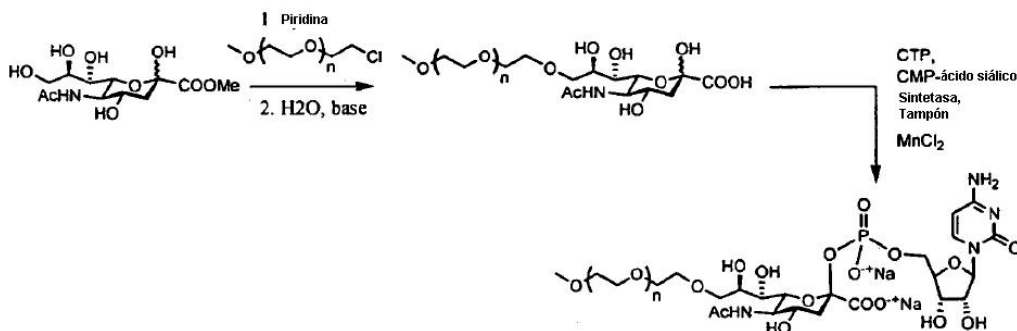
En otra realización ejemplar expuesta en el Esquema 7, un ácido neuramínico protegido con amina y con carboxilo se activa convirtiendo el grupo hidroxilo primario en el correspondiente éster de p-toluenosulfonato y el éster metílico se escinde. El ácido neuramínico activado se convierte en el correspondiente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

Esquema 7

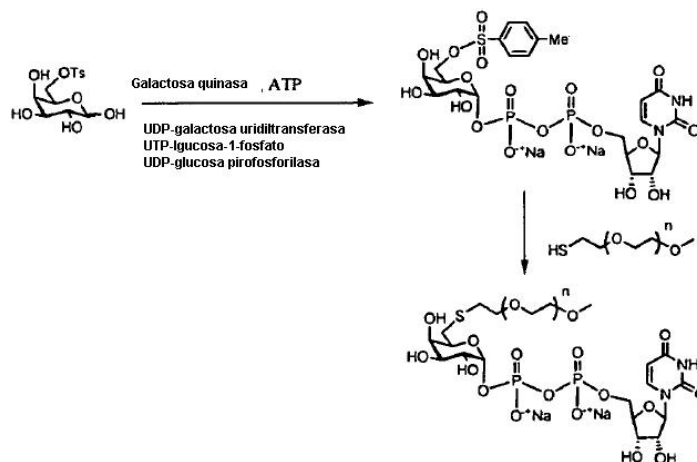


En otra realización ejemplar adicional, como se expone en el Esquema 8, el resto hidroxilo primario de un derivado de ácido neuramínico protegido con amina y con carboxilo se alquila usando un PEG electrofílico, tal como cloro-PEG. Después se escinde el éster metílico y el PEG-azúcar se convierte en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

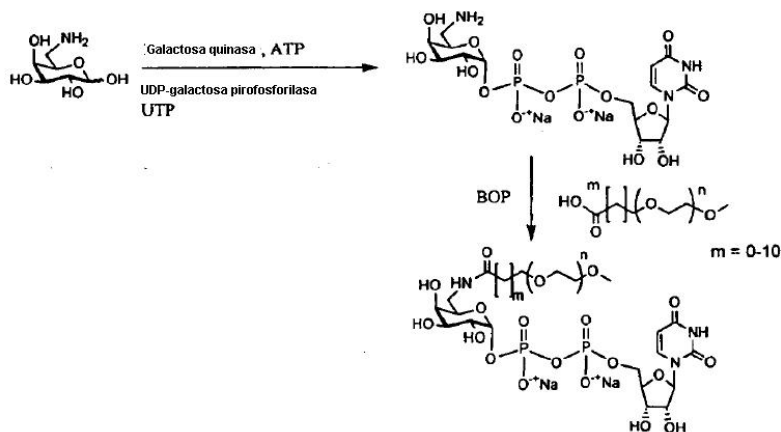
Esquema 8



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

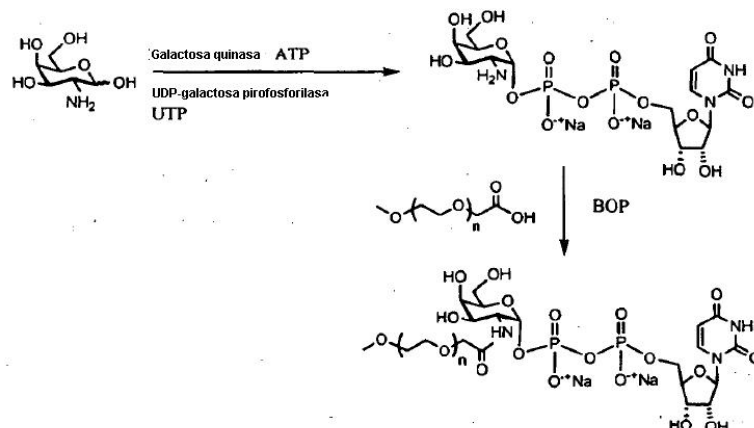
Esquema 9

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

Esquema 10

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

Esquema 11



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

15 Purificación de azúcares, azúcares de nucleótidos y derivados

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

G. Grupos de reticulación

La preparación del azúcar modificado para usar en los procedimientos de la presente invención incluye la unión de un grupo modificador a un residuo de azúcar y la formación de un aducto estable, que es un sustrato de una glucosiltransferasa. Por tanto, a menudo se prefiere usar un agente de reticulación para conjugar el grupo modificador y el azúcar. Compuestos bifuncionales ejemplares que se pueden usar para unir grupos modificadores a los restos carbohidrato incluyen poli(etilenglicoles) bifuncionales, poliamidas, poliéteres, poliésteres y similares. En la bibliografía se conocen los abordajes generales para la unión de carbohidratos a otras moléculas. Véase, por ejemplo, Lee y col., Biochemistry 28: 1856 (1989); Bhatia y col., Anal. Biochem. 178: 408 (1989); Janda y col., J Am. Chem. Soc. 112: 8886 (1990) y Bednarski y col., el documento WO 92/18135. En la siguiente discusión, los grupos reactivos se tratan como que comienzan en el resto de azúcar del azúcar modificado naciente. El centro del análisis se proporciona con fines ilustrativos. Los expertos en la técnica apreciarán que la discusión es también relevante para los grupos reactivos en el grupo modificador.

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

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

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

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

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

2. Sitios específicos preferidos de reactivos de reticulación

a. Grupos reactivos con amino

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

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

Los imidoésteres son los reactivos de acilación más específicos para la reacción con los grupos amina de los componentes de azúcar modificados. A un pH entre 7 y 10, los imidoésteres solo reaccionan con aminas primarias. Las aminas primarias atacan los imidatos nucleofílicamente para producir un intermedio que rompe la amidina a un

pH alto o a un nuevo imidato a un pH bajo. El nuevo imidato puede reaccionar con otra amina primaria, por tanto reticulando dos grupos amino, un caso de un imidato supuestamente monofuncional que reacciona bifuncionalmente. El producto principal de la reacción con las aminas primarias es una amidina que es una base más fuerte que la amina original. Por tanto, la carga positiva del grupo amino original se retiene.

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

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

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

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

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

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

25 b. Grupos reactivos con sulfhidrilo

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

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

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

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

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

c. Residuo reactivo con carboxilo

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

45 3. Sitios no específicos preferidos en reactivos de reticulación

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

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

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

4. Reactivos homobifuncionales

- 25 a. Reticuladores homobifuncionales reactivos con aminas primarias

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

- 30 Ejemplos no limitantes preferidos de ésteres de NHS homobifuncionales incluyen glutamato de disuccinimidilo (DSG), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS), tartarato de disuccinimidilo (DST), tartarato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis-2-(succinimidoxicarboniloxi)etilsulfona (BSOCOES), bis-2-(sulfosuccinimidoxi-carboniloxi)etilsulfona (sulfo-BSOCOES), glucolbis(succinimidilsuccinato) de etileno (EGS), glucolbis(succinimidilsuccinato) de etileno (EGS), ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP) y ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (sulfo-DSP). Ejemplos no limitantes preferidos de imidoésteres homobifuncionales
- 35 incluyen malonimidato de dimetilo (DMM), succinimidato de dimetilo (DMSC), adipimato de dimetilo (DMS), pimelimidato de dimetilo (DMP), suberimidato de dimetilo (DMS), dimetil-3,3'-oxidipropionimidato (DODP), dimetil-3,3'-metilendioxi)dipropionimidato (DMDP), dimetil-3'-(dimetilendioxi)dipropionimidato (DDDP), dimetil-3,3'-(tetrametilendioxo)-dipropionimidato (DTDP) y dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP).

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

Ejemplos no limitantes preferidos de isocianatos homobifuncionales incluyen xilenodiisocianato, tolueno-2,4-diisocianato, tolueno-2-isocianato-4-isotiocianato, 3-metoxidifenilmetano-4,4'-diisocianato, 2,2'-dicarboxi-4,4'-azofenildiisocianato y hexametilendiisocianato.

- 45 Ejemplos no limitantes preferidos de arilhaluros homobifuncionales incluyen 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (DFDNB) y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenil-sulfona.

Ejemplos no limitantes preferidos de reactivos de aldehído alifáticos homobifuncionales incluyen glioxal, malodialdehído y glutaraldehído.

- 50 Ejemplos no limitantes preferidos de reactivos de acilación homobifuncionales incluyen ésteres de nitrofenilo de ácidos dicarboxílicos.

Ejemplos no limitantes preferidos de cloruros de sulfonilo aromáticos homobifuncionales incluyen cloruro de fenol-2,4-disulfonilo y cloruro de α -naftol-2,4-disulfonilo.

Ejemplos no limitantes preferidos de reactivos homobifuncionales reactivos con amino adicionales incluyen eritritolbiscarbonato que reacciona con aminas para dar biscarbamatos.

b. Reactivos reticuladores homobifuncionales con grupos sulfhidrilo libres

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

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

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

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

c. Reticuladores fotoactivables homobifuncionales

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

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

5. Reactivos heterobifuncionales

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En otra realización más, el grupo ligador se proporciona con un grupo que se puede escindir para liberar el grupo modificador del residuo de azúcar. En la técnica se conocen muchos grupos escindibles. Véase, por ejemplo, Jung y col., *Biochem. Biophys. Acta* 761: 152-162 (1983); Joshi y col., *J. Biol. Chem.* 265: 14518-14525 (1990); Zarling y col., *J. Immunol.* 124: 913-920 (1980); Bouzard y col., *Eur. J. Biochem.* 155: 141-147 (1986); Park y col., *J. Biol. Chem.* 261: 205-210 (1986); Browning y col., *J. Immunol.* 143: 1859-1867 (1989). Además, se dispone de un amplio abanico de grupos ligadores bifuncionales (tanto homo como heterobifuncionales) escindibles comercialmente en suministradores tales como Pierce.

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

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

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

La presente invención se pone en práctica usando una única glucosiltransferasa o una combinación de glucosiltransferasas. Por ejemplo, se puede usar una combinación de una sialiltransferasa y una galactosiltransferasa. En dichas realizaciones que usan más de una enzima, las enzimas y sustratos se combinan, preferentemente, en una mezcla de reacción inicial, o las enzimas y reactivos para una segunda reacción enzimática se añaden al medio de reacción una vez que la reacción enzimática está completa o casi completa. Realizando dos reacciones enzimáticas en secuencia en un único vaso, los rendimientos globales mejoran sobre los procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Además, se reduce la limpieza y la eliminación de los disolventes y subproductos sobrantes.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En el siguiente análisis, la invención se ejemplifica mediante la conjugación de los restos de ácido siálico modificados a un péptido glucosilado. El ácido siálico modificado ejemplar está marcado con PEG. El centro del siguiente análisis sobre el uso de ácido siálico modificado con PEG y de péptidos glucosilados es para aclarar la ilustración.

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

Un aceptor para la sialiltransferasa está presente en el péptido que se va a modificar mediante los procedimientos de la presente invención bien como una estructura natural o como una colocada en ese lugar de forma recombinante, enzimática o química. Los aceptores adecuados incluyen, por ejemplo, aceptores de galactosilo tales como Gal β 1,4GlcNAc, Gal β 1,4GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, lacto-Ntetraosa, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,3Ara, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,4Glc (lactosa), y otros aceptores conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Paulson y col., J. Biol. Chem. 253 5617-5624 (1978)).

En una realización, un aceptor para la sialiltransferasa está presente sobre el péptido que se va a modificar tras la síntesis *in vivo* del péptido. Dichos péptidos se pueden sialilar usando los procedimientos reivindicados sin la

modificación previa del patrón de glucosilación del péptido. Como alternativa, los procedimientos de la invención se pueden usar para sialilar un péptido que no incluye un aceptor adecuado; uno primero modifica el péptido para incluir un aceptor por procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. En una realización ejemplar se añade un residuo GalNAc mediante la acción de una GalNAc transferasa.

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

- En otra realización más, los oligosacáridos unidos a péptido se “recortan” primero todo o en parte para exponer un aceptor a la sialiltransferasa o un resto al cual se pueden añadir uno o más residuos adecuados para obtener un aceptor adecuado. Enzimas tales como glucosiltransferasas y endoglucosidasas (véase, por ejemplo, la patente de
15 EE.UU. Nº 5.716.812) son útiles para las reacciones de unión y recorte. En otros lugares del presente documento se proporciona un análisis detallado del “recorte” y remodelado de los glucanos unidos a N y unidos a O.

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

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

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

En otro ejemplo más, se añade un polímero hidrosoluble sobre un residuo Gal usando un ácido siálico modificado.

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

- La Figura 15 expone una realización ejemplar adicional usando un esquema similar al mostrado en la Figura 13 en el que la estructura de alta manosa se “recorta” a la GlcNAc a la cual está unida la primera manosa. La GlcNAc está conjugada a un residuo de Gal portador de un polímero hidrosoluble. Como alternativa, a la GlcNAc, se añade una Gal no modificada, seguida de la adición de un ácido siálico modificado con un azúcar hidrosoluble. En otro ejemplo más, la GlcNAc terminal se conjuga con Gal y la GlcNAc se fucosila después con una fucosa modificada portadora de un polímero hidrosoluble.
40

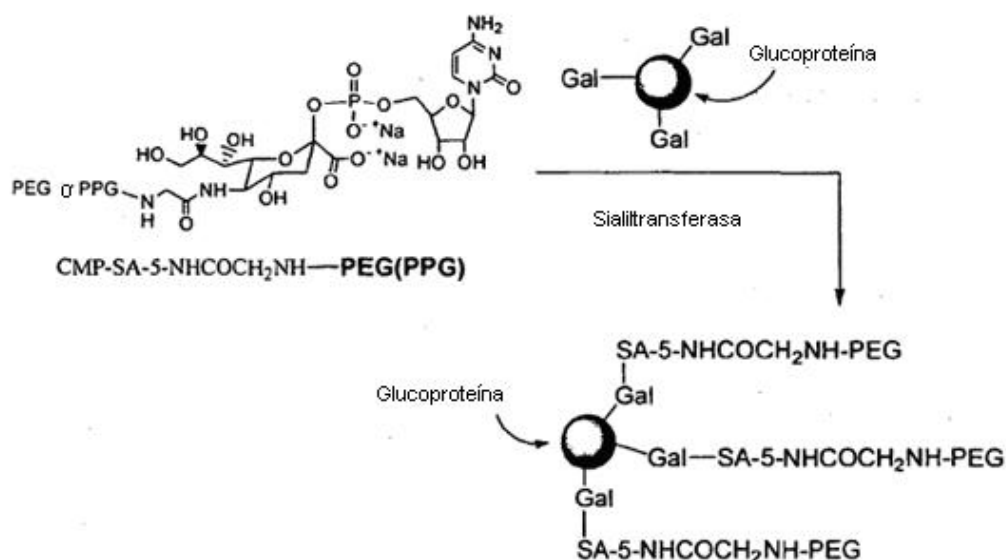
- La Figura 16 es un esquema similar al mostrado en la Figura 13 en el que la estructura de alta manosa se recorta a la primera GlcNAc unida a la Asn del péptido. En un ejemplo, la GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc) está conjugada con una GlcNAc portadora de un polímero hidrosoluble. En otro ejemplo, la GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc) está modificada con Gal, que es portadora de un polímero hidrosoluble. En otra realización más, la GlcNAc está modificada con Gal, seguida de conjugación al Gal de un ácido siálico modificado con polímero hidrosoluble.
45

- Otras realizaciones ejemplares se exponen en las Figuras 17-21. Una ilustración de la matriz de los tipos de reacción con los que la presente invención se puede poner en práctica se proporciona en cada una de las figuras mencionadas anteriormente.
50

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

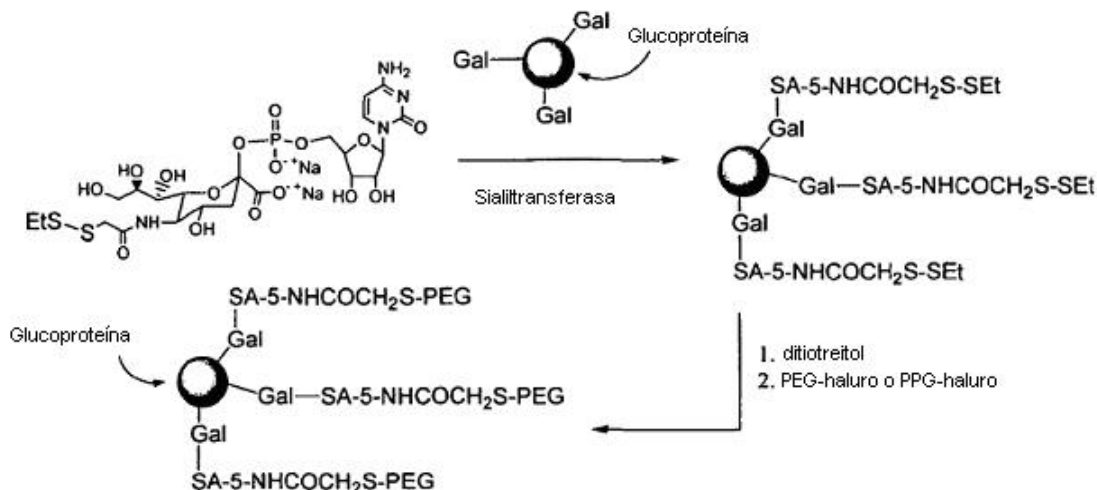
En una realización ejemplar se elimina un ácido siálico existente de un glucopéptido usando una sialidasa, de modo que desenmascara todos o casi todos los residuos de galactosilo subyacentes. Como alternativa, un péptido o glucopéptido se marca con residuos de galactosa o un residuo de oligosacáridos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

Esquema 12



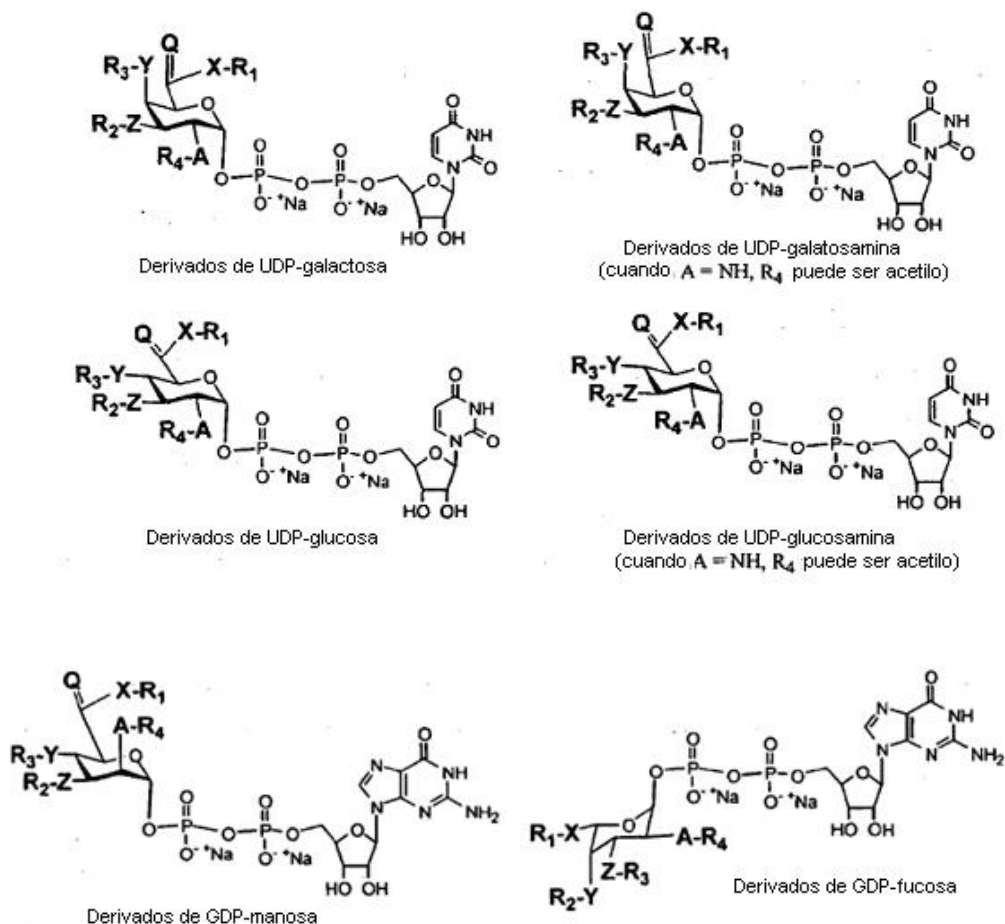
En otro abordaje adicional, resumido en el Esquema 13, una funcionalidad reactiva enmascarada está presente en el ácido siálico. El grupo reactivo enmascarado no está, preferentemente, afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al péptido. Tras la unión covalente del ácido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

Esquema 13



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

Tabla 3



X = O, NH, S, CH₂, N(R₁₋₅)₂.
Y = X; Z = X; A = X; B = X.

Q = H₂, O, S, NH, N-R.

R, R₁₋₄ = H, Ligador-M, M

M = Ligando de interés

Ligando de interés = acil-PEG, acil-PPG, alquil-PEG, acil-alquil-PEG, acil-alquil-PEG, carbamoil-PEG, carbamoil-PPG, PEG, PPG, acil-aril-PEG, acil-aril-PPG, aril-PEG, aril-PPG, Manosa-6-fosfato, heparina, heparán, SLex, manosa, FGF, VFGF, proteína, condroitina, queratán, albúmina, integrinas, péptidos etc.

3F,

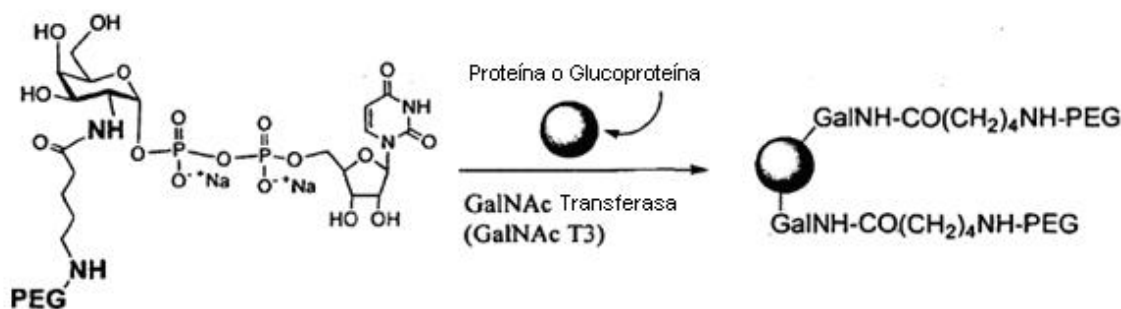
En una realización ejemplar adicional, la UDP-galactosa-PEG reacciona con β 1,4-galactosiltransferasa de leche bovina de modo que transfiere la galactosa modificada a la estructura de N-acetilglucosamina terminal adecuada. Los residuos de GlcNAc terminales sobre el glucopéptido se pueden producir durante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

En otra realización ejemplar se usa una GlcNAc transferasa, como GnTI-V, para transferir PEGilada-GlcNAc a un residuo de manosa en un glucopéptido. En una realización de ejemplo adicional, las estructuras de glicano unidas a

N y/o unidades a O se eliminan enzimáticamente de un glucopéptido para exponer un aminoácido o un residuo glucosilo terminal que después de conjuga con el azúcar modificado. Por ejemplo, se usa una endoglucanasa para eliminar las estructuras unidas a N de un glucopéptido para exponer una GlcNAc terminal como GlcNAc unida a Asn en el glucopéptido. UDP-Gal-PEG y la galactosiltransferasa adecuada se usan para introducir la funcionalidad galactosa-PEGO –PPG en la GlcNAc expuesta.

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

Esquema 14



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

Direccinamiento peptídico con manosa 6-fosfato

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

Las enfermedades del almacenamiento en lisosomas son un grupo de más de 40 trastornos que son el resultado de defectos en genes que codifican enzimas que degradan los productos de deshecho de glucolípidos o polisacáridos dentro de los lisosomas de las células. Los productos enzimáticos, por ejemplo azúcares y lípidos se reciclan después en productos nuevos. Cada uno de estos trastornos es el resultado de un rasgo recesivo autosómico hereditario o ligado al cromosoma X que afecta a los niveles de enzimas en el lisosoma. En general no hay una actividad biológica ni funcional de las enzimas afectadas en las células y tejidos de los individuos afectados. La Tabla 4 proporciona una lista de las enfermedades del almacenamiento representativas y del defecto enzimático asociado con las enfermedades. En estas enfermedades, la deficiencia de la función enzimática crea un depósito sistémico progresivo de sustratos de lípidos o carbohidratos en los lisosomas de las células del cuerpo, lo que en última instancia causa pérdida de función orgánica y la muerte. La etiología genética, las manifestaciones clínicas, la biología molecular y la posibilidad de las enfermedades de almacenamiento lisosómico se detallan en Scriver y col., eds., THE METABOLIC AND MOLECULAR BASIS OF INHERITED DISEASE, 7.ª ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995).

Tabla 4: Enfermedades de almacenamiento lisosómico y defectos enzimáticos asociados

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

*MPS = mucopolisacaridosis

- De duve sugirió primero que la sustitución de la enzima lisosómica ausente con una enzima exógena biológicamente activa podría ser un abordaje viable al tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico (De Duve, Fed. Proc. 23: 1045 (1964). Desde entonces, en varios estudios se ha sugerido que el tratamiento de sustitución enzimático puede ser beneficioso para tratar varias enfermedades de almacenamiento lisosómico. El mejor éxito se ha mostrado en individuos con la enfermedad de Gaucher de tipo 1, que han sido tratados con la enzima exógena (β -glucocerebrosidasa), preparada a partir de placenta (Ceredase™) o más recientemente, de forma recombinante (Cerezyme™). Se ha sugerido que la sustitución enzimática puede también ser beneficiosa para tratar la enfermedad de Fabry, así como otras enfermedades de almacenamiento lisosómico. Véase, por ejemplo, Dawson y col., Ped. Res. 7(8): 684-690 (1973) (in vitro) y Mapes y col. Science 169: 987 (1970) (in vivo). Se han notificado ensayos clínicos de tratamiento de sustitución enzimática para pacientes de Fabry usando perfusiones de plasma normal (Mapes y col., Science 169: 987-989 (1970)), α -galactosidasa A purificada de placenta (Brady y col., N. Eng. J. Med. 279: 1163 (1973)); o α -galactosidasa A purificada de bazo o plasma (Desnick y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76: 5326-5330 (1979)) y han demostrado la eficacia bioquímica de la sustitución enzimática directa para la enfermedad de Fabry. Estos estudios indican el potencial de eliminación, o de reducir significativamente, el almacenamiento patológico de glucolípidos mediante la repetida sustitución de la enzima. Por ejemplo, en un estudio (Desnick y col., ant.), la inyección intravenosa de la enzima purificada tuvo como resultado una reducción temporal de los niveles de plasma del sustrato lipídico almacenado, globotriasilceramida.
- En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de procedimientos para proporcionar cantidades suficientes de enzimas lisosomales biológicamente activas, tales como la α -galactosidasa a, a las células deficientes en la misma. Recientemente se han intentado abordajes recombinantes para abordar estas necesidades, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° . 5.658.567; 5.580.757; Bishop y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 83: 4859-4863 (1986); Medin y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 93: 7917-7922 (1996); Novo, F. J., Gene Therapy. 4: 488-492 (1997); Ohshima y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 94: 2540-2544 (1997); y Sugimoto y col., Human Gene Therapy 6: 905-915, (1995). A través de la dirección mediada por la manosa-6-fosfato de péptidos terapéuticos a los lisosomas, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para liberar cantidades suficientes de péptidos lisosomales biológicamente activos a las células deficientes.
- Por tanto, en una realización ejemplar, la presente invención proporciona un péptido de acuerdo con la Tabla 6 que se obtiene con manosa-6-fosfato (Figura 23 y Figura 24). El péptido se puede preparar de forma recombinante o química. Además, el péptido puede tener la secuencia natural completa o puede estar modificado por, por ejemplo, truncamiento, extensión o puede incluir sustituciones o delecciones. Ejemplos de proteínas que se remodelan usando un procedimiento de la presente invención incluyen la glucocerebrosidasa, la β -glucosidasa, la α -galactosidasa A, la

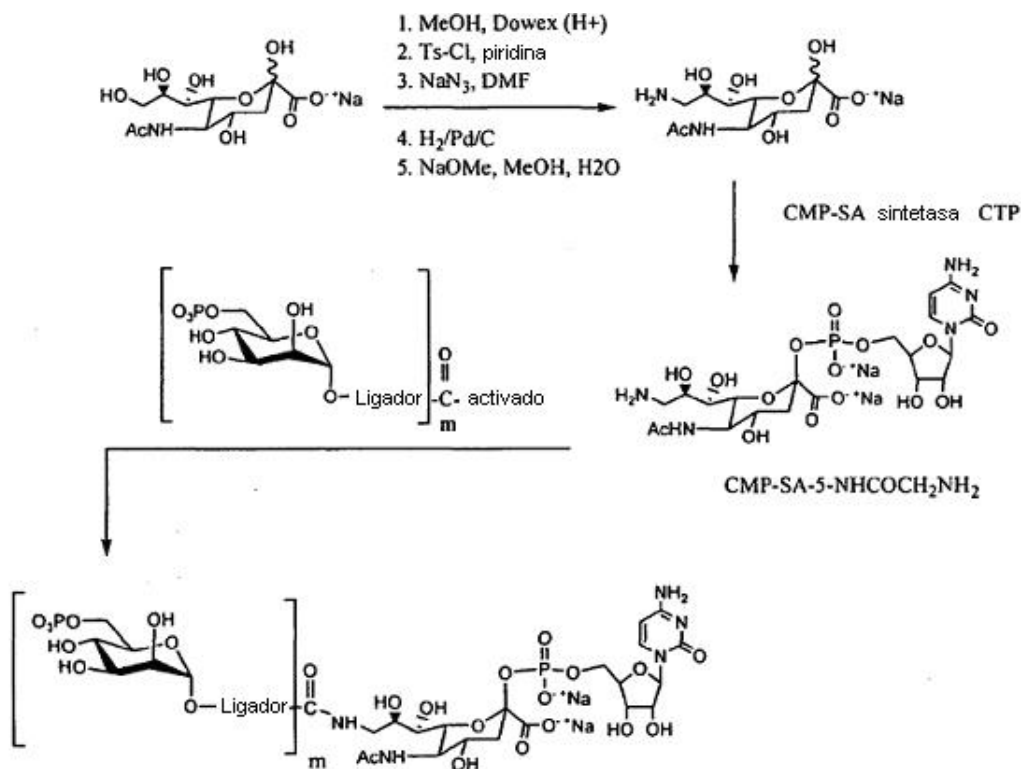
α -glucosidasa ácida (maltasa ácida). Péptidos modificados representativos que están en uso clínico incluyen, pero sin limitación, Ceredase™, Cerezyme™, y Fabryzyme™. Usando un procedimiento de la invención también es posible alterar un grupo glucosilo en péptidos modificados y clínicamente relevantes. La manosa-6-fosfato está unida al péptido a través de un grupo de unión a glucosilo. En una realización ejemplar, el grupo de unión a glucosilo deriva de ácido siálico. En la Tabla 2 se exponen ejemplos de grupos de unión a glucosilo derivados de ácido siálico, en los que uno o más de los restos "R" son manosa-6-fosfato o un grupo espaciador que tiene uno o más restos de manosa-6-fosfato unidos al mismo. El resto de ácido siálico modificado es, preferentemente, el residuo terminal de un oligosacárido unido a la superficie del péptido (Figura 25).

Además de la manosa-6-fosfato, los péptidos de la invención pueden derivarse adicionalmente con un polímero hidrosoluble. Los procedimientos para unir estos y otros grupos se indican en el presente documento. En una realización ejemplar, el grupo distinto a manosa-6-fosfato se une al péptido a través de un derivado de ácido siálico derivado de acuerdo con la Tabla 2, en la que uno o más de los restos "R" son un grupo distinto a manosa-6-fosfato.

En una realización ejemplar, se prepara un resto de ácido siálico modificado con una rama ligadora a base de glicina protegida con Cbz. El correspondiente azúcar del nucleótido se prepara y el grupo Cbz se elimina mediante hidrogenación catalítica. El azúcar del nucleótido resultante tiene una amina reactiva disponible que se pone en contacto con un derivado de manosa-6-fosfato activado, proporcionando un azúcar del nucleótido derivado de manosa-6-fosfato que es útil en la práctica de los procedimientos de la invención.

Como se muestra en el siguiente esquema (esquema 15), un derivado de manosa-6-fosfato activado ejemplar se forma convirtiendo un fosfotriéster protegido con 2-bromo-bencilo en el triflato correspondiente, in situ, y haciendo reaccionar el triflato con un ligador que tiene un resto que contiene oxígeno reactivo, formando un enlace éter entre el azúcar y el ligador. Los grupos protectores bencilo se eliminan mediante hidrogenación catalítica y el éster metílico del ligador se hidroliza, proporcionando el correspondiente ácido carboxílico. El ácido carboxílico se activa por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Un procedimiento de activación ejemplar reside en la conversión del ácido carboxílico en el éster N-hidroxisuccinimida.

Esquema 16



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

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

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

II. PÉPTIDOS/GLUCOPÉPTIDOS DE LA INVENCION

En una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende múltiples copias de un solo péptido que tiene un núcleo de trimanosilo elemental como la estructura de glucano primaria unida al mismo. De acuerdo con la presente invención, el péptido es un péptido de Factor IX. La forma natural del péptido puede comprender glucanos unidos a N complejos o puede ser un glucano rico en manosa. El péptido puede ser un péptido de mamífero y es, preferentemente, un péptido de ser humano.

En la Figura 1 se exponen péptidos ejemplares cuyos glucanos se pueden remodelar usando los procedimientos de la invención, aunque la presente invención solo se refiere a un procedimiento *in vivo* sin células de formación de un conjugado entre un péptido de Factor IX y un grupo modificador. Los otros péptidos solo se desvelan con fines

ilustrativos.

Tabla 5. Péptidos preferidos para remodelado de glucano (formando solo el Factor IX parte de la invención)

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

Tabla 6. Péptidos más preferidos para remodelado de glucano

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

En la Figura 1 se proporciona una lista más detallada de péptidos útiles en la invención y su fuente.

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

Los procedimientos desvelados también son útiles para modificar péptidos quiméricos, incluidos, sin limitación, péptidos quiméricos que incluyen un resto derivado de una inmunoglobulina, tal como IgG.

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

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

También se desvelan procedimientos para modificar el Factor VII o VIIa, tal como se muestra en las Figuras 30A a 30D. En la Figura 30B, el Factor VII o VIIa producido por un sistema de mamífero se trata en primer lugar con sialidasa para acortar los restos de ácido siálico de los extremos, y a continuación se PEGila utilizando ST3Gal3 y un donador de ácido siálico PEGilado. Figura 30C, el Factor VII o VIIa expresado por células de mamífero se trata en primer lugar con sialidasa para acortar los restos de ácido siálico de los extremos, y a continuación se PEGila utilizando ST3Gal3 y un donador de ácido siálico PEGilado. Además, el polipéptido se sialila con ST3Gal3 y un donador de ácido siálico. La Figura 30D ofrece otro esquema de modificación para el factor VII o VIIa producido por células de mamífero; el polipéptido se trata en primer lugar con sialidasa y galactosidasa para acortar sus restos de ácido siálico y galactosa, a continuación se galactosila utilizando una galactosiltransferasa y un donador de galactosa, y a continuación de PEGila utilizando ST3Gal3 y un donador de ácido siálico PEGilado.

La invención proporciona procedimientos para modificar el Factor IX, algunos ejemplos de los cuales se incluyen en las Figuras 31A a 31G. En la Figura 31B, el factor IX producido por células de mamífero se trata en primer lugar con sialidasa para acortar los restos de ácido siálico de los extremos, y a continuación se PEGila con ST3Gal3 utilizando un donador de ácido siálico-PEG. En la Figura 31C, el Factor IX expresado por células de mamífero se trata en primer lugar con sialidasa para acortar los restos de ácido siálico de los extremos, este se PEGila a continuación utilizando ST3Gal3 y un donador de ácido siálico-PEG, y se sialila adicionalmente utilizando ST3Gal1 y un donador de ácido siálico. Se puede encontrar otro esquema para la remodelación de células de mamífero producidas mediante el Factor IX en la Figura 31D. El polipéptido se trata en primer lugar con sialidasa para acortar los restos de ácido siálico de los extremos, a continuación se galactosila utilizando un donador de galactosa y una galactosiltransferasa, se sialila adicionalmente utilizando un donador de ácido siálico y ST3Gal3, y a continuación se PEGila utilizando un donador de ácido siálico PEGilado y ST3Gal1. En la Figura 31E, el Factor IX que se ha expresado en un sistema de mamífero se PEGila mediante el procedimiento de sialilación catalizado por ST3Gal3 utilizando un donador de ácido siálico-PEG. En la Figura 31F, el factor IX expresado en células de mamífero se modifica protegiendo los extremos de los restos de los extremos adecuados con un donador de ácido siálico que está modificado con ácido levulínico, añadiendo una cetona reactiva al donador de ácido siálico. Tras la adición a un resto de glucosilo del péptido, la cetona se derivatiza con un resto tal como hidrazina - PEG o amina- PEG. La Figura 31G proporciona un procedimiento adicional de modificación del Factor IX. El polipéptido, producido por células de mamífero, se PEGila utilizando un donador de ácido siálico-PEG y una α 2,8-sialiltransferasa.

También se desvelan procedimientos para modificar el Factor VIII, tal como se muestra en las Figuras 40A a 40N. En la Figura 40B, el factor VII expresado en células de mamífero se trata en primer lugar con sialidasa para acortar los restos de ácido siálico, y a continuación se PEGila utilizando ST3Gal3 y un donador de ácido siálico-PEG. En la Figura 40C, el Factor VIII expresado en células de mamífero se trata en primer lugar con sialidasa para acortar los restos de ácido siálico, a continuación se PEGila utilizando ST3Gal3 y un donador adecuado, y a continuación se sialila adicionalmente utilizando ST3Gal1 y un donador de ácido siálico.

En la Figura 40E, el Factor VIII producido por células de mamífero se modifica mediante una única etapa de PEGilación, utilizando ST3Gal3 y un donador de ácido siálico PEGilado. La Figura 40F ofrece otro ejemplo de modificación del Factor VIII que se expresa por células de mamífero. La proteína se PEGila utilizando ST3Gal1 y un donador de ácido siálico PEGilado. En la Figura 40G, el Factor VIII expresado por células de mamífero se remodela utilizando el otro esquema siguiente. Se PEGila utilizando una α 2,8 sialiltransferasa y un donador de ácido siálico-PEG. En la Figura 40I, el Factor VIII producido por células de mamífero se modifica protegiendo los extremos de los restos de los extremos adecuados con un donador de ácido siálico que está modificado con ácido levulínico, añadiendo una cetona reactiva al donador de ácido siálico. Tras la adición a un resto de glucosilo del péptido, la cetona se derivatiza con un resto tal como una hidrazina- PEG o amina- PEG. En la Figura 40J, el factor VIII expresado por células de mamífero se trata en primer lugar con Endo-H para acortar los grupos glucosilo. A continuación se PEGila utilizando una galactosiltransferasa y un donador de PEG-galactosa. En la Figura 40K, el factor VIII expresado en un sistema de mamífero se sialila en primer lugar utilizando ST3Gal3 y un donador de ácido siálico, a continuación se trata con Endo-H para acortar los grupos glucosilo, y a continuación se PEGila con una galactosiltransferasa y un donador de PEG-galactosa. En la Figura 40L, el Factor VIII expresado en un sistema de mamífero se trata en primer lugar con manosidasas para acortar los restos de manosilo de los extremos, se añade a continuación un grupo N-acetilglucosamina utilizando un donador adecuado y GnT I y/o II, y se PEGila a continuación utilizando una galactosiltransferasa y un donador de PEG-galactosa. En la Figura 40M, el factor VIII expresado en células de mamífero se trata en primer lugar con manosidasas para acortar las unidades de manosilo, a continuación se añade un grupo N-acetilglucosamina utilizando una N-acetilglucosamina transferasa y un donador adecuado. Se galactosila adicionalmente utilizando una galactosiltransferasa y un donador de galactosa, y a continuación se sialila utilizando ST3Gal3 y un donador de ácido siálico. En la Figura 40N, el Factor VIII se produce por células de mamífero y se modifica como sigue: se trata en primer lugar con manosidasas para acortar los grupos manosilo de los extremos. A continuación se añade un grupo N-acetilglucosamina PEGilado utilizando GnT1 y un donador adecuado de N-acetilglucosamina PEGilada.

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

La presente invención contempla el uso de péptidos en los que el(los) sitio(s) de la(s) cadena(s) de glucano del péptido se ha(n) alterado con respecto al péptido natural. Normalmente, las cadenas de glucano unidas a N se unen a la estructura del péptido primario en los restos de la asparagina en los que el resto de la asparagina está

comprendido en una secuencia de aminoácidos que se reconoce por una glucosiltransferasa unida a membrana en el retículo endoplásmico (ER). Normalmente, el sitio de reconocimiento en la estructura peptídica primaria es la secuencia asparagina-X-serina/treonina en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico. Aunque este sitio de reconocimiento es típico, la invención abarca además péptidos que tienen cadenas de glucano unidas a N y otros sitios de reconocimiento en los que se añaden cadenas unidas a N utilizando glucosiltransferasas naturales o recombinantes.

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

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

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

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

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

En general, la mutagénesis dirigida al emplazamiento se lleva a cabo en primer lugar obteniendo un vector monocatenario o fundiendo las dos hebras de un vector bicatenario que incluye en el interior de su secuencia una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Un cebador de oligonucleótido que soporta la secuencia mutada deseada se prepara por lo general de forma sintética. A continuación, este cebador se hibrida con el vector monocatenario, y se somete a enzimas de polimerización del ADN tales como el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli*, a fin de completar la síntesis de la hebra que soporta la mutación. De esta manera, se forma un heteroduplete en el que una hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hebra soporta la mutación deseada. Este vector heteroduplete se utiliza a continuación para transformar o transfectar las células adecuadas, tales como las células de *E. coli*, y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que soportan la

disposición de la secuencia mutada. Kunkel y col. (1987, Kunkel y col., Methods Enzymol. 154: 367-382) diseñaron un esquema de selección genética para enriquecer los clones que incorporan el oligonucleótido mutagénico. De forma alternativa, el uso de la PCRTM con enzimas termoestables comercialmente disponibles tales como la polimerasa Taq se puede emplear para incorporar un cebador de oligonucleótido mutagénico en un fragmento de ADN amplificado que se puede clonar a continuación en un vector de clonación o expresión adecuado. Los procedimientos de la mutagénesis mediada por la PCRTM de Tomic y col. (1990, Nucl. Acids Res., 12: 1656) y Uppender y col. (1995, Biotechniques, 18: 29-31) proporcionan dos ejemplos de dichos protocolos. Se puede utilizar también una PCRTM que emplea una ligasa termoestable además de una polimerasa termoestable para incorporar un oligonucleótido mutagénico fosforilado en un fragmento de ADN amplificado que se puede clonar a continuación en un vector de clonación o de expresión adecuado. El procedimiento de mutagénesis descrito por (1994, Biotechniques 16:410-412) proporciona un ejemplo de uno de dichos protocolos.

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

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

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

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

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

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

En otro enfoque más, se pueden encontrar sitios ventajosos para nuevos sitios unidos a O en un péptido creando bibliotecas del péptido que contiene diversos sitios unidos a O nuevos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos consenso para la adición de N-acetilgalactosamina mediante una N-acetilgalactosaminiltransferasa depende de la transferasa específica utilizada. Se puede realizar un barrido de la secuencia de aminoácidos de un péptido para identificar los grupos de aminoácidos contiguos que se pueden mutar para generar sitios potenciales para la adición

de cadenas de glucano unidas a O. Se pueden generar estas mutaciones utilizando los procedimientos normalizados conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica tal como se ha descrito anteriormente. Con el fin de determinar si cualquier sitio de glucosilación descubierto se encuentra realmente glucosilado, cada péptido mutado recombinante se expresa a continuación en un sistema de expresión adecuado y se analiza posteriormente para la adición del sitio y/o la presencia de una cadena de glucano unida a O.

C. Síntesis química de péptidos

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

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

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

D. Modificaciones posteriores a la traducción

Una persona normalmente experta en la técnica apreciará que los péptidos pueden experimentar una modificación posterior a la traducción además de la adición a los anteriores de glucanos unidos a N y/o unidos a O. Se contempla que los péptidos que tienen modificaciones posteriores a la traducción diferentes a la glucosilación se pueden utilizar como péptidos de la invención, siempre que la actividad biológica deseada o la función del péptido se mantengan o mejore. Dichas modificaciones posteriores a la traducción pueden ser modificaciones naturales llevadas a cabo normalmente *in vivo*, o modificaciones realizadas mediante genomanipulación del péptido llevadas a cabo *in vitro*. Las modificaciones conocidas contempladas incluyen, pero sin limitación, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de resto heme, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de retículas covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gammacarboxilación, glucosilación, formación de anclaje a GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos a péptidos mediada por ARN de transferencia tal como arginilación, y ubiquitinación. Las enzimas que se pueden utilizar para llevar a cabo muchas de esta modificaciones son bien conocidas en la técnica, y están comercialmente disponibles de compañías tales como Boehringer Mannheim (Indianápolis, IN) y Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), entre otras.

Los expertos en la técnica conocen bien dichas modificaciones que se han descrito con gran detalle en la bibliografía específica. Algunas modificaciones particularmente comunes, glucosilación, unión lipídica, sulfatación, gammacarboxilación o restos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP, por ejemplo, se describen en los textos más básicos, tales como *Peptides--Structure and Molecular Properties*, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H.

Freeman and Company, Nueva York (1993). Muchas revisiones detalladas están disponibles sobre este sujeto, tales como la de Wold, F., Post-translational Covalent Modification of Peptides, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York 1-12 (1983); Seifter y col. (Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990)) y Rattan y col. (Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992)).

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

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

E. Péptidos de fusión /péptidos

Los péptidos útiles en la presente invención pueden comprender péptidos de fusión. Los péptidos de fusión son particularmente ventajosos cuando se desea combinar características biológicas y/o funcionales de dos péptidos en una molécula peptídica. Dichos péptidos de fusión pueden presentar combinaciones de actividad y función biológicas que no se encuentran en la naturaleza para crear moléculas novedosas y útiles de aplicaciones terapéuticas e industriales. Las actividades biológicas de interés incluyen, sin limitación, la actividad enzimática, la actividad del receptor y/o del ligando, motivos inmunógenos y dominios estructurales.

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

F. Generación de moléculas "biológicamente activas" más pequeñas

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

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

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

G. generación de péptidos novedosos

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

H. mutaciones

1. Mutación de diseño lógico

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

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

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

2. Técnicas de mutagénesis aleatorias

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

En la mutagénesis mediante la PCR se utiliza la fidelidad reducida de la polimerasa Taq para introducir mutaciones aleatorias en un fragmento de ADN clonado (Leung y co., 1989, *Technique* 1: 11-15). Este es un procedimiento muy poderoso y relativamente rápido para introducir mutaciones aleatorias en una secuencia de ADN. La región de ADN que se va a mutagenizar se amplifica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en condiciones que reducen la fidelidad de la síntesis de ADN mediante la ADN polimerasa Taq utilizando, por ejemplo, una relación

dGTP/dATP alterada y añadiendo Mn^{2+} a la reacción de la PCR. El combinado de fragmentos de ADN amplificados se inserta en vectores de clonación adecuados para proporcionar bibliotecas de mutantes aleatorios.

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

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

a. Evolución dirigida

Se pueden generar también péptidos útiles en los procedimientos de la invención utilizando técnicas de "evolución dirigida". A diferencia de las técnicas de mutagénesis dirigida al emplazamiento en las que se requiere el conocimiento de la estructura del péptido, en la actualidad existen estrategias para generar bibliotecas de mutaciones a partir de las cuales se puede obtener péptidos con propiedades mejoradas sin conocimiento de las características estructurales del péptido. Estas estrategias se conocen generalmente como tecnologías de "evolución dirigida" y son diferentes de los procedimientos de mutagénesis aleatoria tradicionales que implican someter la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de interés a ciclos repetitivos de mutación, cribado y amplificación.

En algunas técnicas de "evolución dirigida", la diversidad de los ácidos nucleicos obtenidos se genera mediante procedimientos de mutación que crean de forma aleatoria mutaciones puntuales en la secuencia de ácido nucleico. Las técnicas de mutación puntuales incluyen, pero sin limitación, "PCR propensa a errorTM" (Caldwell y Joyce, 1994; PCR Methods Appl. 2: 28-33; y Ke y Madison, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3371-3372), mutagénesis dirigida a oligonucleótidos repetidos (Reidhaar-Olson y col., 1991, Methods Enzymol. 208: 564-586), y cualquiera de los procedimientos de mutagénesis aleatoria anteriormente mencionados.

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

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

b. Transposición de ADN

Se pueden generar también péptidos novedosos útiles en los procedimientos de la invención utilizando las técnicas de transposición de genes, transposición de motivos, transposición de exones, y/o transposición de codones (denominadas en su conjunto "transposición de ADN"). Las técnicas de transposición del ADN también se pueden emplear para modular las actividades de péptidos útiles en la invención y se pueden utilizar para generar péptidos que tengan la actividad alterada. Véanse, generalmente, las Patentes de Estados Unidos N^{os} 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Stemmer y col. (1994, Nature 370(6488): 389-391); Crameri y col. (1998, Nature 391 (6664): 288-291); Zhang y col. (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(9): 4504-4509); Stemmer y col.

(1994, Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (22): 10747-10751), Patten y col. (1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 724-33); Harayama, (1998, Trends Biotechnol. 16 (2): 76-82); Hansson, y col., (1999, J. Mol. Biol. 287: 265-76); y Lorenzo y Blasco (1998, Biotechniques 24(2): 308-13).

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

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

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

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

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

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

c. Procedimientos de cribado

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

d. Combinaciones de técnicas

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

III. GLUCOSIDASAS Y GLUCOSILTRANSFERASAS

A. Glucosidasas

Las glucosidasas son glucotransferasas que utilizan agua como molécula aceptora, y como tales, son normalmente enzimas glucósido -hidrolíticas. Se pueden usar las glucosidasas para la formación de enlaces glucosídicos *in vitro* controlando la termodinámica o la cinética de la mezcla de reacción. Incluso con condiciones modificadas de reacción, fuertes, puede ser difícil trabajar con las reacciones de las glucosidasas, y las glucosidasas tienden a dar bajos rendimientos sintéticos como resultado de la reacción reversible de la transglucosilasa y la reacción hidrolítica competente.

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

Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para determinar la actividad y la especificidad del enlace de cualquier glucosidasa, incluyendo un protocolo de HPLC simplificado (Jacob y Scudder, 1994, *Methods in Enzymol.* 230: 280-300). En *Glycobiology, A Practical Approach*, (1993, Fukuda y Kobata eds., Oxford University Press Inc., Nueva York) se encuentra una discusión general de glucosidasas y tratamiento con glucosidasa.

Las glucosidasas útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, sialidasa, galactosidasa, endoglucanasa, manosidasa (es decir, α y β , ManI, ManII y ManIII), xilosidasa, fucosidasa, β -glucosidasa de *Agrobacterium* sp, manosidasa 2A de *Cellulomonas fimi*, glucosidasa de *Humicola insolens*, glucosidasa de *Sulfolobus solfataricus* y glucosidasa de *Bacillus licheniformis*.

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

B. Glucosiltransferasas

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

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

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

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

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

Se puede obtener el ADN que codifica las glucosiltransferasas mediante síntesis química, cribando transcritos inversos de células o cultivos de líneas celulares adecuadas, cribando bibliotecas genómicas procedentes de células adecuadas, o mediante las combinaciones de estos procedimientos. Se puede llevar a cabo el cribado del ARNm o del ADN genómico utilizando sondas de oligonucleótidos generadas a partir de la secuencia de ácido nucleico de la glucosiltransferasa. Se pueden marcar las sondas con una sonda detectable, tal como, pero sin limitación, un grupo fluorescente, un átomo radioactivo o un grupo quimioluminiscente de acuerdo con procedimientos conocidos y utilizarse en ensayos de hibridación convencionales. Como alternativa, se pueden obtener las secuencias de ácidos nucleicos de las glucosiltransferasas mediante el uso del procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), produciéndose los cebadores de oligonucleótidos de la PCR a partir de la secuencia de ácido nucleico de las glucosiltransferasas. Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 de Mullis y col. y N° 4.683.202 de Mullis.

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

1. Fucosiltransferasas

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

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

2. Galactosiltransferasas

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

Adecuadas también para el uso en los procedimientos de la invención están las $\beta(1,4)$ galactosiltransferasas, que incluyen, por ejemplo EC 2.4.1.90 (LacNAc sintetasa) y EC 2.4.1.22 (lactosa sintetasa) (bovina (D'Agostaro y col., Eur. J. Biochem. 183: 211-217 (1989)), humana (Masri y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 657-663 (1988)), de murino (Nakazawa y col., J. Biochem. 104: 165-168 (1988)), así como E.C. 2.4.1.38 y la ceramida galactosiltransferasa (EC 2.4.1.45, Stahl y col., J. Neurosci. Res. 38: 234-242 (1994)). Otras galactosiltransferasas adecuadas incluyen, por ejemplo, $\alpha(1,2)$ galactosiltransferasas (procedentes, por ejemplo, de *Schizosaccharomyces pombe*, Chapell y col., Mol. Biol. Cell 5: 519-528 (1994)). Para las galactosiltransferasas adicionales adecuadas, véanse Taniguchi y col. (2002, Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, Springer, Tokio), Guo y col. (2001, Glycobiology, 11(10): 813-820), y Breton y col. (1998, J Biochem. 123: 1000-1009).

Es bien conocida la producción de proteínas tales como la enzima GalNAc T_{I-XIV} a partir de genes clonados mediante genomanipulación. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 4.761.371. Un procedimiento implica la recogida de suficientes muestras, a continuación se determina la secuencia de aminoácidos mediante secuenciación del extremo N. A continuación se usa esta información para aislar un clon de ADNc que codifica una transferasa de longitud completa (unida a membrana) que, tras su expresión en la línea Sf9 de células de insecto, da como resultado la síntesis de una enzima completamente activa. A continuación se determina la especificidad del aceptor de la enzima utilizando un análisis semicuantitativo de los aminoácidos que rodean los sitios de glucosilación conocidos en 16 proteínas diferentes seguido por los estudios de glucosilación *in vitro* de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que determinados restos de aminoácidos están representados en exceso en segmentos peptídicos glucosilados y que los restos situados en posiciones específicas que rodean los restos de serina y treonina glucosilados pueden tener una importante influencia sobre la eficacia aceptora de los diferentes restos de aminoácidos.

3. Sialiltransferasas

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

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

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

Sialiltransferasa	Fuente	Secuencia(s) formada(s)	Ref.
ST6Gal I	Mamífero	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	Mamífero	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	1
		NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	
ST3Gal IV	Mamífero	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	1
		NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	
ST6Gal II	Mamífero	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	
ST6Gal II	<i>Photobacterium</i>	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	2

(continuación)

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

Un ejemplo de una sialiltransferasa que es útil en los procedimientos reivindicados es ST3gal III, que se denomina también α (2,3)sialiltransferasa (EC 2.4.99.6). Esta enzima cataliza la transferencia de ácido siálico al Gal de un Gal β 1,3GlcNAc o de un glucósido Gal β 1,4GlcNAc (véase, por ejemplo, Wen y col., J. Biol. Chem. 267: 21011 (1992); Van den Eijnden y col., J. Biol. Chem. 256: 3159 (1991)) y es responsable de la sialilación de los oligosacáridos unidos a asparagina en glucopéptidos. El ácido siálico se une a Gal con la formación de un enlace α entre los dos sacáridos. La unión (el enlace) entre los sacáridos se realiza entre la posición 2 de NeuAc y la posición 3 de Gal. Esta enzima particular se puede aislar del hígado de rata (Weinstein y col., J. Biol. Chem. 257: 13845 (1982)); el ADN humano (Sasaki y col. (1993) J. Biol. Chem. 268: 22782-22787; Kitagawa y Paulson (1994) J. Biol. Chem. 269: 1394-1401) y las secuencias de ADN genómico (Kitagawa y col. (1996) J. Biol. Chem. 271: 931-938) son conocidas, lo que facilita la producción de esta enzima mediante la expresión recombinante. En una realización preferida, los procedimientos de sialilación reivindicados usan una ST3Gal III de rata.

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

Otras sialiltransferasas, incluyendo las relacionadas en la Tabla 7, son también útiles en un procedimiento para la sialilación de glucopéptidos comercialmente importantes económico y eficaz a gran escala. Como una sencilla prueba para encontrar la utilidad de estas otras enzimas, diversas cantidades de cada enzima (1-100 ml/mg de proteína) se hacen reaccionar con asialo- α 1 AGP (a 1-10 mg/ml) para comparar la capacidad de la sialiltransferasa de interés para sialilar glucopéptidos con respecto tanto a ST6Gal I, ST3Gal III de bovino o a ambas sialiltransferasas. De forma alternativa, se pueden usar diferente glucopéptidos o glucopéptidos, u oligosacáridos unidos a N liberados enzimáticamente desde la estructura peptídica en lugar de asialo- α 1 AGP para esta evaluación. Las sialiltransferasas con la capacidad para sialilar oligosacáridos de glucopéptidos unidos a N más eficazmente que ST6al I son útiles en un procedimiento a gran escala para la sialilación del péptido (tal como se ilustra para ST3Gal III en la presente divulgación).

4. Otras glucosiltransferasas

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

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

Las manosiltransferasas son de utilidad para transferir restos de manosa modificados. Las manosiltransferasas incluyen α (1,2) manosiltransferasa, α (1,3) manosiltransferasa, α (1,6) manosiltransferasa, β (1,4) manosiltransferasa, Dol-P-Man sintasa, OCh1, y Pmt1 (véase, Kornfeld y col., Annu. Rev. Biochem. 54: 631-664 (1985)).

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

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

Las glucosiltransferasas procariotas son también útiles en la práctica de la invención. Dichas glucosiltransferasas incluyen las enzimas implicadas en la síntesis de lipooligosacáridos (LOS), que se producen por muchas bacterias

gram negativas. Los LOS tienen normalmente secuencias de glucano en los extremos que imitan los glucoconjugados que se encuentran sobre la superficie de las células epiteliales humanas o en las secreciones del hospedador (Preston y col., Critical Reviews in Microbiology 23(3): 139-180 (1996)). Dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, las proteínas de los operones *rfa* de especies tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, que incluyen una β 1,6 galactosiltransferasa y una β 1,3 galactosiltransferasa (véanse, por ejemplo., EMBL N^{os} de Acceso. M80599 y M86935 (*E. coli*); EMBL N^o de Acceso. S56361 (*S. typhimurium*)), una glucosiltransferasa (Swiss-Prot N^o de Acceso. P25740 (*E. coli*), una β 1,2-glucosiltransferasa (*rfaJ*) (Swiss-Prot n^o de Acceso P27129 (*E. coli*) y Swiss-Prot N^o de Acceso P19817 (*S. typhimurium*)), y una β 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (*rfaK*) (EMBL n^o de Acceso U00039 (*E. coli*). Otras glucosiltransferasas cuyas secuencias de aminoácidos son conocidas incluyen las que están codificadas por operones tales como *rfaB*, que se han caracterizado en organismos tales como *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium leprosum*, y el operón *rh1* de *Pseudomonas aeruginosa*.

Son también adecuadas también para el uso en la presente invención las glucosiltransferasas que están implicadas en la producción de estructuras que contienen lacto-N-neotetraosa D-galactosil- β -1,4-N-acetil-D-glucosaminil- β -1,3-D-galactosil- β -1,4-D-glucosa, y la secuencia de trisacáridos del grupo sanguíneo P^k, D-galactosil- α -1,4-D-galactosil- β -1,4-D-glucosa, que se han identificado en los LOS de los patógenos mucosales *Miseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Scholten y col., J. Med. Microbiol. 41: 236-243 (1994)). Se han identificado los genes de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* que codifican las glucosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de estas estructuras para los inmunotipos L3 y L1 de *N. meningitidis* (Jennings y col., Mol. Microbiol. 18: 729-740 (1995)) y el mutante F62 de *N. gonorrhoeae* (Gotshlich, J. Exp. Med. 180: 2181-2190 (1994)). En *N. meningitidis*, un locus que consta de tres genes, *IgtA*, *IgtB* e *IgE*, codifica las enzimas glucosiltransferasas requeridas para la adición de los últimos tres azúcares a la cadena de la lacto-N-neotetraosa (Wakarchuk y col., J. Biol. Chem. 271: 19166-73 (1996)). Recientemente se ha demostrado la actividad enzimática del producto de los genes *IgtB* e *IgtA*, proporcionando la primera evidencia directa de su función glucosiltransferasa propuesta (Wakarchuk y col., J. Biol. Chem. 271(45): 28271-276 (1996)). En *N. gonorrhoeae* existen dos genes adicionales, *IgtD* que añade β -D-GalNAc en la posición de la galactosa terminal de la estructura de la lacto-N-neotetraosa, e *IgtC* que añade una α -D-Gal terminal al elemento lactosa de un LOS truncado, creando de esta manera la estructura del antígeno del grupo sanguíneo P^k (Gotshlich (1994), *más arriba*). En *N. meningitidis*, un inmunotipo L1 independiente expresa también el antígeno del grupo sanguíneo P^k y se ha demostrado que transporta un gen *Igtc* (Jennings y col., (1995), *más arriba*). Se describen también las glucosiltransferasas de *Miseria* y los genes asociados en el documento USPN 5.545.553 (Gotschlich). Se han caracterizado los genes de la α 1,2-fucosiltransferasa y la α 1,3-fucosiltransferasa de *Helicobacter pylori* (Martin y col., J. Biol. Chem. 272: 21349-21356 (1997)). También, de uso en la presente invención son las glucosiltransferasas de *Campylobacter jejuni* (véase, Taniguchi y col., 2002, Handbook of glycosyltransferases and related genes, Springer, Tokio).

B. Sulfotransferasas

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

C. Glucosiltransferasas unidas a célula

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

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

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

D. Enzimas de fusión

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

E. Enzimas inmovilizadas

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

F. Mutagénesis de glucosiltransferasas

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

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

Los extensos datos estructurales terciarios en las glucosiltransferasas y las glucosidasa hidrolasas pueden dar idea de las mutaciones de estas enzimas que implican intercambios de dominios. Las glucosiltransferasas y glucosidasa hidrolasas son enzimas modulares (véase, Bourne y Henrissat, 2001, Current Opinion in Structural Biology 11:593-600). Las glucosiltransferasas se dividen en dos familias básicas según su estructura: GT-A y GT-B. Las glucosiltransferasas de la familia GT-A comprenden dos dominios disimilares, uno implicado en la unión del nucleótido y el otro en la unión del aceptor. De esta manera, se podría fusionar de forma conveniente la secuencia de ADN que codifica el dominio de un gen en marco con un dominio de un segundo gen para crear un nuevo gen que codifica una proteína con una nueva especificidad aceptora7donador. Dichos intercambios de dominios podrían incluir adicionalmente los módulos de hidratos de carbono y otros dominios accesorios.

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

IV. SISTEMAS DE EXPRESIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*

A. Células para la producción de glucopéptidos

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

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

En general, y para expresar un péptido a partir del ácido nucleico que lo codifica, el ácido nucleico debe incorporarse a un casete de expresión, que comprende un elemento promotor, un elemento terminador, y la secuencia de codificación del péptido unido de manera operable entre los dos. A continuación el casete de expresión se une de manera operable a un vector. Con este fin, se pueden emplear adápteros o enlazadores para unir los fragmentos del nucleótido o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar los sitios de restricción convenientes, la eliminación de nucleótidos superfluos, la eliminación de sitios de restricción, o similares. Con este fin, puede estar implicada la mutagénesis *in vitro*, la reparación del cebador, la restricción, la hibridación, las resustituciones, por ejemplo, transiciones y transversiones. Un vector lanzadera tiene los elementos genéticos necesarios para la replicación en una célula. Algunos vectores pueden replicarse solamente en procariotas, o pueden replicarse en procariotas y eucariotas. Dicho vector de expresión plásmido se mantendrá en uno o más sistemas de replicación, preferiblemente dos sistemas de replicación, que permiten el mantenimiento estable en el interior de una célula hospedadora de levadura para los fines de la expresión, y en el interior de un hospedador procariota para los fines de la clonación. Muchos vectores con características diversas están comercialmente disponibles en la actualidad. Los vectores son normalmente plásmidos o fagos, pero pueden ser también cósmidos o minicromosomas. De forma conveniente, muchos vectores comercialmente disponibles tendrán el promotor y el terminador del casete de expresión ya presente, y un sitio multienlazador en el que puede insertarse la secuencia de codificación del péptido de interés. El vector lanzadera que contiene el casete de expresión se transforma a continuación en *E. coli* donde se replica durante la división celular para generar una preparación de vector que es suficiente para transformar las células hospedadoras de la presente invención del sistema de expresión escogido. La anterior metodología es bien conocida por los expertos en la técnica, y los protocolos por los cuales se lleva a cabo se pueden encontrar en Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

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

Son bien conocidas en la materia las técnicas de clonación molecular. Además, las técnicas para los procedimientos de clonación molecular se pueden encontrar en Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Glover y col., (1985, DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II); Gait y col., (1985, Oligonucleotide Synthesis); Hames y Higgins (1985, Nucleic Acid Hybridization); Hames y Higgins (1984, Transcription And Translation); Freshney y col., (1986, Animal Cell Culture); Perbal, (1986, Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press); Perbal, (1984, A Practical Guide To Molecular Cloning); Ausubel y col. (2002, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.).

B. Hongos y levaduras

Los péptidos producidos en levaduras se glucosilan y las estructuras de glucano presentes en los mismos son principalmente estructuras con un alto contenido en manosa. En el caso de los N-glucanos, las estructuras de glucano producidas en levaduras pueden contener como mucho nueve o más restos de manosa que pueden contener o no azúcares adicionales añadidos a los anteriores. En la Figura 5, lado de la izquierda se muestra un ejemplo del tipo de glucano en los péptidos producidos por células de levadura. Sin tener en cuenta el número de

restos de manosa y el tipo y la complejidad de los azúcares adicionales añadidos a los anteriores, los N-glucanos como componentes de los péptidos producidos en células de levadura comprenden una estructura de un núcleo de trimanosilo tal como se muestra en la Figura 5. Cuando la estructura de glucano de un péptido producido en las células de levadura es una estructura con un alto contenido en manosa, es un tema sencillo para la persona normalmente experta eliminar, *in vitro*, utilizando las enzimas manosidasas disponibles, todos los restos de manosa procedentes de la molécula excepto aquellos que comprenden el núcleo de trimanosilo del glucano, generando de esta forma un péptido que tiene una estructura elemental de núcleo de trimanosilo unida a la anterior. Ahora, utilizando las técnicas disponibles en la materia, y provistos con la presente divulgación, es un tema sencillo añadir enzimáticamente, *in vitro*, restos de azúcar adicionales a la estructura elemental del núcleo de trimanosilo para generar un péptido que tenga una estructura de glucano deseada unida a la anterior. De forma similar, cuando el péptido producido por la célula de levadura comprende una estructura con un alto contenido de manosa además de otros azúcares complejos unidos a la anterior, es un tema sencillo escindir enzimáticamente todos los azúcares adicionales, incluyendo los restos extra de manosa, para llegar a una estructura elemental de núcleo de trimanosilo. Una vez que se produce la estructura elemental de núcleo de trimanosilo, es posible la generación de un péptido que tenga una glucosilación deseada siguiendo las directrices proporcionadas en el presente documento.

Por "levadura", se entiende levaduras ascoesporógenas (Endomicetales), levaduras basidioesporógenas, y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (Blastomicetos). Las levaduras ascoesporógenas se dividen en dos familias *Spermophthoraceae* y *Saccharomycetaceae*. La última está comprendida por cuatro subfamilias, *Schizosaccharomycoideae* (por ejemplo, género *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae*, y *Saccharomycoideae* (por ejemplo, genera *Pichia*, *Kluyveromyces*, y *Saccharomyces*). Las levaduras basidioesporógenas incluyen los géneros *Leucosporidium*, *Rhodospodium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium*, y *Filobasidiella*. Las levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos se dividen en dos familias, *Sporobolomycetaceae* (por ejemplo, géneros *Sporobolomyces*, *Bullera*) y *Cryptococcaceae* (por ejemplo, género *Candida*). De particular interés para la presente invención son las especies comprendidas en los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Kluyveromyces*, de forma especial *K. lactis* y *K. drosophilum*, *Candida*, *Hansenula*, *Schizpsaccaromyces*, *Yarrowia*, y *Chrysosporium*. Debido a que la clasificación de levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de la presente invención, las levaduras deben definirse tal como se describe en Skinner y col., eds. 1980) *Biology and Activities of Yeast* (Soc. App. Bacteriol. Symp. Serie N° 9).

Además de lo anterior, las personas normalmente expertas en la técnica están presumiblemente familiarizadas con la biología de las levaduras y la manipulación de la genética de las levaduras. Véanse, por ejemplo, Bacila y col., eds. (1978, *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Academic Press, New York); y Rose y Harrison. (1987, *The Yeasts* (2ª ed.) Academic Press, Londres). Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para introducir ADN exógeno en levaduras hospedadoras. Existe una amplia variedad de procedimientos para la transformación de levaduras. Hinnen y col (1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1919-1933); Beggs, (1978, *Nature* 275(5676):104-109); y Stinchcomb y col., (Publicación EPO N° 45.573 enseñan la transformación de esferoplastos), Becker y Gaurante, (1991, *Methods Enzymol.* 194:182-187) enseñan la electroporación, Gietz y col. (2002, *Methods Enzymol.* 350: 87-96) y Mount y col. (1996, *Methods Mol Biol.* 53:139-145) enseñan el acetato de litio. Para una revisión de los sistemas de transformación de levaduras no de *Saccharomyces*, véase Wang y col. (*Crit Rev Biotechnol.* 2001;21(3): 177-218). Para los procedimientos generales sobre la genomaniplulación de levaduras, véase Barr y col., (1989, *Yeast genetic engineering*, Butterworths, Boston).

Además de las levaduras naturales y de las células fúngicas, existen también cepas de levaduras y hongos que se han mutado y/o seleccionado para potenciar el nivel de expresión del gen exógeno, y la pureza, el procesamiento posterior a la traducción del péptido resultante, y la recuperación y la pureza del péptido maduro. Puede dirigirse también la expresión de un péptido exógeno hacia la ruta secretora de la célula, tal como se ilustra mediante la expresión de la insulina (véase (Kjeldsen, 2000, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 277-286, y las referencias citadas en el anterior). En general, para dar lugar a que se secrete el péptido exógeno a partir de la célula de levadura, se pueden utilizar las señales de secreción derivadas de los genes de levaduras, tal como aquellos genes de la toxina asesina (Stark y Boyd, 1986, *EMBO J.* 5: 1995-2002) o de la feromona alfa (Kurjan y Herskowitz, 1982, *Cell* 30: 933; Brake y col., 1988, *Yeast* 4: S436).

Con respecto a los hongos filamentosos en general, se pueden encontrar los procedimientos para la manipulación genética en Kinghorn y Turner (1992, *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*, Blackie Academic and Professional, Nueva York). Se pueden encontrar directrices sobre vectores adecuados en Martinelli y Kinghorn (1994, *Aspergillus: 50 años*, Elsevier, Amsterdam).

1. *Saccharomyces*

En *Saccharomyces*, los vectores de levaduras adecuados para el uso que producen un péptido incluyen YRp7 (Struhl y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1035-1039, 1978), YEpl3 (Broach y col., *Gene* 8: 121-133, 1979), vectores POT (Kawasaki y col, Patente de Estados Unidos N° 4.931.373), pJDB249 y pJDB219 (Beggs, *Nature* 275: 104-108, 1978) y sus derivados. Los promotores preferidos para el uso en levaduras incluyen promotores para la expresión del gen glucolítico en levaduras (Hitzeman y col., *J. Biol. Chem.* 255: 12073-12080, 1980; Alber y Kawasaki, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 419-434, 1982; Kawasaki, Patente de Estados Unidos N° 4.599.311) o los genes de la alcohol deshidrogenasa (Young y col., en *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*, Hollaender y

col., (eds.), p. 355, Plenum, Nueva York, 1982; Ammerer, Meth. Enzymol. 101: 192-201, 1983), y el promotor de la ADH2-4^G (Russell y col., Nature 304: 652-654, 1983; Irani y Kilgore, Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de serie 07/784.653, documento CA 1.304.020 y documento EP 284 044). Las unidades de expresión pueden incluir también un terminador de la transcripción. Un terminador de la transcripción preferido es el terminador TPI1 (Alber y Kawasaki, ibid.).

Los ejemplos de vectores lanzadera de levaduras-bacterias incluyen Yep24 (Botstein y col. (1979) Gene 8: 17-24; pC1 (Brake y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4642-4646), e Yrp17 (Stnichomb y col. (1982) J. Mol. Biol. 158:157). Adicionalmente un vector de expresión plásmido puede ser un plásmido de un alto o bajo número de copias, el número de copias varía generalmente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200. En el caso de vectores de levaduras con un alto número de copias, será generalmente al menos de 10, preferiblemente al menos 20, y usualmente no excederá de al menos 150 copias del vector en un único hospedador. Dependiendo del péptido heterólogo seleccionado, puede ser deseable tanto un alto como un bajo número de copias, dependiendo del efecto del vector y del péptido recombinante sobre el hospedador. Véase, por ejemplo, Brake y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4642-4646. Las construcciones de ADN de la presente invención se pueden integrar también en el genoma de la levadura mediante un vector de integración. Se conocen en la técnica ejemplos de dichos vectores. Véase, por ejemplo, Botstein y col. (1979) Gene 8:17-24.

La selección de una levadura adecuada y de otros microorganismos hospedadores para la práctica de la presente invención está comprendida en el conocimiento del experto en la técnica. De particular interés son las especies de *Saccharomyces S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, y *S. oviformis*. Cuando se seleccionan las células hospedadoras de levadura para la expresión de un péptido deseado, las células hospedadoras de levaduras pueden incluir aquellas que muestran, entre otras, una buena capacidad de secreción, baja actividad proteolítica, y vigor global. Las levaduras y otros microorganismos están generalmente disponibles de una variedad de fuentes, que incluyen el Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, Calif.; y la American Type Culture Collection, Manassas VA. Para una revisión, véase Strathern y col., eds. (1981, The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para introducir ADN exógeno en levaduras hospedadoras.

2. *Pichia*

El uso de *Pichia methanolica* como célula hospedadora para la producción de péptidos recombinantes se da a conocer en las Solicitudes PCT WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536, y WO 98/02565. Las moléculas de ADN para uso en *P. methanolica* transformante se preparan comúnmente como plásmidos circulares bicatenarios, que se linealizan de forma preferible antes de la transformación. Para la producción de péptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y el terminador en el plásmido sean el de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen para la utilización de alcohol de *P. methanolica* (AUG1 o AUG2). Otros promotores útiles incluyen los procedentes de los genes de la dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD), y catalasa (CAT), así como los dados a conocer en la Patente de Estados Unidos N° 5.252.726. Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma hospedador, se prefiere tener el segmento de expresión completo del plásmido flanqueado en ambos extremos por secuencias de ADN hospedador. Un marcador seleccionable preferido para uso en *Pichia methanolica* es un gen ADE2 de *P. methanolica*, que codifica la fosforibosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), que permite a las células hospedadoras ade2 crecer en ausencia de adenina. Para los procedimientos industriales a gran escala, en los que es deseable minimizar el uso de metanol, se prefieren las células hospedadoras en las que se eliminan ambos genes de utilización del metanol (AUG1 y AUG2). Se utiliza la electroporación para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un péptido de interés en células de *P. methanolica*. Se prefiere transformar las células de *P. methanolica* mediante electroporación utilizando un campo eléctrico alternante cuya intensidad disminuye de manera exponencial que tiene una fuerza del campo de entre 2,5 a 4,5 kV/cm, preferiblemente de aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (t) de entre 1 a 40 milisegundos, lo más preferible de aproximadamente 20 milisegundos. Para una revisión del uso de *Pichia pastoris* para la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpo, véase Fischer y col., (1999, Biotechnol Appl Biochem. 30 (Pt 2):117-120).

3. *Aspergillus*

Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para expresar péptidos en *Aspergillus* spp., que incluyen, pero no se limitan a aquellos descritos en Carrez y col., 1990, Gene 94: 147-154; Contreras, 1991, Bio/Technology 9: 378-381; Yelton y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474; Tilburn y col., 1983, Gene 26: 205-221; Kelly y. Hynes, 1985, EMBO J. 4: 475-479; Ballance y col., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 112: 284-289; Buxton y col., 1985, Gene 37: 207-214, y la Patente de Estados Unidos N° 4.935.349. Se encuentran ejemplos de promotores útiles en *Aspergillus* en la Patente de Estados Unidos N° 5.252.726. Se encuentran cepas de *Aspergillus* útiles para la expresión de péptidos en la Patente de Estados Unidos N° 4.935.349. La producción comercial de péptidos exógenos está disponible de Novoenzymes para *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*.

4. *Trichoderma*

Trichoderma tiene determinadas ventajas sobre otras especies de células hospedadoras recombinantes para la expresión de los péptidos deseados. Es fácil hacer crecer este organismo en grandes cantidades y tiene la capacidad de glucosilar y secretar eficazmente rendimientos elevados de péptidos de mamífero recombinantes en el medio, haciendo el aislamiento del péptido relativamente fácil. Además, el modelo de glucosilación en los péptidos expresados es más similar al de los péptidos humanos que los péptidos expresados en otros sistemas. Sin embargo, sigue existiendo diferencias en las estructuras de glucanos en los péptidos expresados a partir de estas células. Por ejemplo, los restos de ácido siálico de los extremos son importantes para la función terapéutica de un péptido en un sistema de mamífero, debido a que la presencia de estos restos al extremo de la estructura de glucano impide el aclaramiento peptídico a partir del torrente sanguíneo de mamífero. El mecanismo que retrasa el aumento de la semivida biológica de las moléculas sialiladas se cree que está basado en su reconocimiento disminuido por las lecitinas (Drickamer, 1988, J. Biol. Chem. 263: 9557-9560). Sin embargo, en general, las células fúngicas no añaden restos de ácido siálico de los extremos a los glucanos en los péptidos, y los péptidos sintetizados en las células fúngicas son por tanto asiálicos. De acuerdo con la presente invención, se puede remediar esta deficiencia utilizando los procedimientos de remodelación del glucano *in vitro* de la invención descritos en detalle en otra parte en el presente documento.

Las especies de *Trichoderma* útiles como hospedadores para la producción de péptidos que se van a remodelar incluyen *T. reesei*, tal como QM6a, ALKO2442 o CBS383.78 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, PO Box 273, 3740 AG Baarn, Países bajos, o, ATCC13631 (American Type Culture Collection, Manassas VA, 10852, USA, tipo); *T. viride* (tal como CBS189.79 (det. W. Gams); *T. longibrachiatum*, tal como CBS816.68 (tipo); *T. pseudokoningii* (tal como MUCL19358; Mycotheque de l'Université Catholique de Louvain); *T. saturnisporum* CBS330.70 (tipo); *T. harzianum* CBS316.31 (det. W. Gams); *T. virgalum* (*T. pseudokoningii*) ATCC24961. Lo más preferible, el hospedador es *T. reesei* y de forma más preferible, son las cepas QM9414 de *T. reesei* (ATCC 26921), RUT-C-30 (ATCC 56765), y mutantes muy productivos tales como VTT-D-79125, que se deriva de QM9414 (Nevalainen, Technical Research Centre of Finland Publications 26, (1985), Espoo, Finlandia).

La transformación de *Trichoderma* con ADN se lleva a cabo utilizando cualquier técnica conocida en la materia, que incluye la que se enseña en la patente europea N° EP0244234, Harkki (1989, Bio/Technology 7: 596-601) y Uusitalo (1991, J. Biotech. 17: 35-50). El cultivo de *Trichoderma* está respaldado por una extensa experiencia previa en técnicas de fermentación a escala industrial; por ejemplo, véase Finkelstein, 1992, Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Products, Butterworth-Heinemann, editores, Stoneham, Mass.

5. *Kluyveromyces*

Las levaduras pertenecen al género *Kluyveromyces* se han utilizado como organismos hospedadores para la producción de péptidos recombinantes. Los péptidos producidos por este género de levadura son, en concreto, quimosina (Patente Europea 96 430), taumatina (Patente Europea 96 910), albúmina, interleuquina-1 β , TPA, TIMP (Patente Europea 361 991) y derivados de albúmina que tienen una función terapéutica (Patente Europea 413 622). Las especies de particular interés en el género *Kluyveromyces* incluyen *k. lactis*.

Los procedimientos para expresar péptidos recombinantes en *Kluyveromyces* spp, son bien conocidos en la técnica. Los vectores para la expresión y la secreción de péptidos recombinantes humanos en *Kluyveromyces* son conocidos en la técnica (Yeh, J. Cell. Biochem. Suppl. 14C:68, Abst. H402; Fleer, 1990, Yeast 6 (Volumen Especial):S449) que son procedimientos para la transformación y la expresión de péptidos recombinantes (Ito y col., 1983, J. Bacteriol. 153:163-168; van den Berg, 1990, Bio/Technology 8: 135-139; Patente de Estados Unidos N° 5.633.146, Documentos WO8304050A1, EP0096910, EP0241435, EP0301670, EP0361991). Para una revisión de la manipulación génica del ADN lineal de *Kluyveromyces lactis* mediante referenciación genética e intercambio plásmido véase Schaffarth y col. (FEMS Microbiol Lett. 178(2):201-210, 1999).

6. *Chrysosporium*

El género fúngico *Chrysosporium* se ha utilizado recientemente para la expresión de péptidos recombinantes extraños. Una descripción de los procedimientos por los cuales el experto en la técnica puede usar *Chrysosporium* se puede utilizar para péptidos extraños se encuentra en el documento WO 00/20555). Las especies particularmente adecuadas para el sistema de expresión incluyen, *C. botryoides*, *C. carmichaelii*, *C. crassitunicatum*, *C. europae*, *C. evolceannui*, *F. fastidium*, *C. filiforme*, *C. gerogiae*, *C. globiferum*, *C. globiferum* var. *articulatum*, *C. globiferum* var. *niveum*, *C. hirundo*, *C. hispanicum*, *C. holmii*, *C. indicum*, *C. inops*, *C. keratinophilum*, *C. kreiselii*, *C. kuzurovianum*, *C. lignorum*, *C. lobatum*, *C. lucknowense*, *C. lucknowense* Garg 27K, *C. medium*, *C. medium* var. *spissescens*, *C. mephiticum*, *C. merdarium*, *C. merdarium* var. *roseum*, *C. minor*, *C. pannicola*, *C. parvum*, *C. parvum* var. *crescens*, *C. pilosum*, *C. peodomerderium*, *C. pyriformis*, *C. queenslandicum*, *C. sigleri*, *C. sulfureum*, *C. synchronum*, *C. tropicum*, *C. undulatum*, *C. vallenarense*, *C. vespertilium*, y *C. zonatum*.

7. Otros

En la Patente Europea 394 538 se dan a conocer procedimientos para transformar *Schwanniomyces*. Los procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum* se dan a conocer en la Patente de Estados Unidos N°

5.162.228. Se dan a conocer en la Patente de Estados Unidos N° 4.486.533 los procedimientos para transformar *Neurospora*. Se conoce también un sistema de expresión específico de *Schizosaccharomyces pombe* (Patente europea N° 385 391) Los procedimientos generales para expresar péptidos en la levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe* se pueden encontrar en Giga-Hama y Kumagai (1997, Foreign gene expression in fission yeast: Schizosaccharomyces pombe, Springer, Berlín).

C. Sistemas de mamífero

Como se menciona anteriormente, las células de mamífero producen normalmente una mezcla heterogénea de estructuras de N-glucano que varían con respecto al número y la disposición de azúcares adicionales unidos al núcleo de trimanosilo. Normalmente, las células de mamífero producen péptidos que tienen una estructura de glucano compleja, Tal como la que se muestra en la Figura 4, lado de la derecha. Utilizando los procedimientos de la presente invención, un péptido producido en una célula de mamífero puede remodelarse *in vitro* para generar un péptido que tenga la glucosilación deseada identificando en primer lugar la estructura de glucano y determinando a continuación qué azúcares deben eliminarse con el fin de remodelar la estructura de glucano. Tal como se ha discutido en el presente documento, los azúcares que se van a eliminar determinarán qué enzimas de escisión se utilizarán y de esta manera, las etapas precisas del procedimiento de remodelación variarán dependiendo de la estructura de glucano primaria utilizada como el sustrato inicial. En la Figura 3 se muestra un esquema de ejemplo para remodelar una estructura de glucano comúnmente producida en células de mamífero.

Se ha caracterizado bien la ruta biosintética de N-glucano en células de mamífero (revisado en Moremen, 1994, Glycobiology 4:113-125). Se han identificado muchas de las enzimas necesarias para la síntesis de glucano, y se han aislado líneas de células mutantes defectivas en esta ruta enzimática que incluyen las líneas de células de ovario de hámster chino (CHO) Lec23 (defectivas en alfa-glucosidasa I) y Lec18 (GlcNAc-TVIII novedosa). El modelo de glucosilación de los péptidos producidos por estas células mutantes está alterado con respecto a las células CHO normales. Tal como se discute en el presente documento, los defectos de la glucosilación en estas y otras células mutantes pueden aprovecharse con el fin de producir un péptido que carece de una estructura compleja de glucano. Por ejemplo, los péptidos producidos por células Lec23 carecen de restos de ácido siálico, y por tanto requieren menos manipulación enzimática con el fin de reducir la estructura de glucano a un núcleo de trimanosilo elemental o a Man3GlcNAc4. De esta manera, los péptidos producidos en estas células pueden servir como sustratos preferidos para la remodelación del glucano. Una persona normalmente experta en la técnica podría aislar o identificar otras líneas de células defectivas para la glucosilación basándose en procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento descrito en Stanley y col., 1990, Somatic Cell Mol. Genet., 16: 211-223. El uso de líneas de células defectivas para la glucosilación, unas identificadas y otras todavía sin identificar, se incluye en la invención a fin de generar sustratos peptídicos preferidos para los procedimientos de remodelación descritos en el presente documento.

Son numerosos los vectores de expresión útiles para expresar péptidos exógenos en células de mamíferos, y son bien conocidos de los expertos en la técnica. Muchos vectores de expresión de mamíferos están ahora comercialmente disponibles de compañías, incluyendo Novagen, Inc (Madison, WI), Gene Therapy Systems (San Diego, CA), Promega (Madison, WI), ClonTech Inc. (Palo Alto, CA), y Stratagene (La Jolla, CA), entre otras.

Existen algunas líneas de células de mamíferos que son particularmente adecuadas para expresar péptidos exógenos. Normalmente, las líneas de células de mamíferos originadas a partir de células tumorales que se han llegado a immortalizar, es decir, que se pueden replicar en cultivo esencialmente de forma indefinida. Estas líneas de células incluyen, pero sin limitación, células CHO (Ovario de hámster chino, por ejemplo, CHO-K1, ATCC N° CCL 61) y sus variantes, NS0 (mieloma de ratón), BNK, BHK 570 (ATCC N° CRL 10314), BHK (ATCC N° CRL 1632), Per.C6™ (células humanas immortalizadas, Crucell N.V., Leiden, Países Bajos), COS-1 (ATCC N° CRL 1650), COS-7 (ATCC N° CRL 1651), HEK 293, células L de ratón, Líneas celulares de linfocitos T, células BW5147 y MDCK (riñón canino Madin-Darby), HeLa (ser humano), A549 (carcinoma de pulmón humano), 293 (ATCC N° CRL 1573; Graham y col., 1977, Gen. Virol. 36 :59-72), BGMK (riñón de mono verde Buffalo), Hep-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana), LLC-MK2 (Riñón de Mono Verde Africano), McCoy, NCI-H292 (carcinoma tubular mucoepidermoide pulmonar humano), RD (rabdomiosarcoma), Vero (riñón de Mono verde Africano), HEL (pulmón embrionario humano), Pulmón Fetal Humano-Chang, MRC5 (pulmón embrionario humano), MRHF (prepucio humano), y WI-38 (pulmón embrionario humano, y WI-38 (pulmón embrionario humano). En algunos casos, las células en las que se expresa el péptido terapéutico pueden ser células derivadas del paciente que se va a tratar, o pueden derivarse de otro mamífero relacionado o no relacionado. Por ejemplo, se pueden aislar células de fibroblastos procedentes de tejido de la piel de un mamífero, y cultivarse y transformarse *in vitro*. Esta tecnología está comercialmente disponible de Transkaryotic Therapies, Inc. (Cambridge, MA). Casi todas las líneas celulares actualmente utilizadas están disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y BioWhittaker (Walkersville, Maryland).

Las células de mamífero pueden transformarse con ADN utilizando cualquiera de las diversas técnicas que son bien conocidas en la materia. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación, transformación con fosfato de calcio (Chen y Okayama, 1988 ; Graham Y van der Eb, 1973; Corsaro y Pearson, 1981, Somatic Cell Genetics 7:603), transfección con dextrano-dietilaminoetilo (DEAE) (Fujita y col., 1986; Lopata y col., 1984; Selden y col., 1986), electroporación (Neumann y col., 1982, ; Potter, 1988, ; Potter y col., 1984, ; Wong y Neuman, 1982), transfección de reactivo lípido

catiónico (Elroy-Stein y Moss, 1990; Feigner y col., 1987; Rose y col., 1991; Whitt y col., 1990; Hawley-Nelson y col., 1993, Focus 15: 73; Ciccarone y col., 1993, Focus 15: 80), retroviral (Cepko y col., 1984; Miller y Baltimore, 1986; Pear y col., 1993; Austin y Cepko, 1990; Bodine y col., 1991; Fekete y Cepko, 1993; Lemischka y col., 1986; Turner y col., 1990; Williams y col., 1984; Miller y Rosman, 1989, BioTechniques 7: 980-90; Wang y Finer, 1996, Nature Med. 2:714-6), polibreno (Chaney y col., 1986; Kawai y Nishizawa, 1984), microinyección (Capecchi, 1980), y fusión de protoplastos (Rassoulzadegan y col., 1982; Sandri-Goldin y col., 1981; Schaffer, 1980), entre otros. En general, véase Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) y Ausubel y col. (2002, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York) para las técnicas de transformación

Recientemente, el sistema de baculovirus, popular para la transformación de células de insecto, se ha adaptado para la transformación estable de células de mamífero (véase, para la revisión, Koat y Condreay, 2002, Trends Biotechnol. 20: 173-180, y las referencias citadas en el anterior). Se da a conocer la producción de péptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N^{os} 4.713.339, 4.784.950; 4.579.821; y 4.656.134. Varias compañías ofrecen servicios de transformación y cultivo de células de mamíferos, incluyendo Cell Trends, Inc., (Middletown, MD). Las técnicas para el cultivo de células de mamífero son bien conocidas en la técnica, y también se pueden encontrar en la publicación de Hauser y col. (Mammalian Cell Biotechnology, Walter de Gruyter, Inc., Hawthorne, NY 1997) y Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, así como las referencias citadas en el presente documento.

D. Insecto

Las células de insecto, y en particular, las células de insecto cultivadas, expresan péptidos que tienen estructuras de glucano unidas a N que se sialilan raramente y comprenden normalmente residuos de manosa que pueden tener o no restos de fucosa adicionales unidos a los anteriores. En la Figura 7 se muestran ejemplos de tipos de estructuras de glucano presentes en péptidos producidas en células de insecto cultivadas y glucanos de manosa de los mismos.

Ha llegado a establecerse particularmente bien la expresión mediada por baculovirus en células de insecto para la producción de péptidos recombinantes (Altmann y col., 1999, Glycoconjugate J. 16: 109-123). Con respecto al plegado del péptido y al procesamiento posterior a la traducción, las células de insecto son solo secundarias a las líneas celulares de mamíferos. Sin embargo, tal como se ha señalado anteriormente, la N-glucosilación de los péptidos en células de insecto difiere en muchos aspectos de la N-glucosilación en células de mamífero particularmente en que las células de insecto generan con frecuencia estructuras de glucano truncadas que comprenden oligosacáridos que contienen exactamente tres o algunas veces solo dos restos de manosa. Estas estructuras pueden sustituirse adicionalmente con restos de fucosa.

De acuerdo con la presente invención, un péptido producido en una célula de insecto se puede remodelar *in vitro* para generar un péptido con la glucosilación deseada eliminando opcionalmente en primer lugar cualquier resto de fucosa sustituido utilizando una enzima fucosidasa adecuada. En los casos en los que el péptido comprende una estructura elemental de núcleo de trimanosilo tras la eliminación de los restos de fucosa, todo lo que se requiere a continuación es la adición *in vitro* de los azúcares adecuados a la estructura del núcleo de trimanosilo para generar un péptido que tenga la glucosilación deseada. En los casos donde el péptido puede contener solo dos restos de manosa en la estructura de glucano tras la eliminación de cualquier resto de fucosa, se puede añadir un tercer resto de manosa utilizando una enzima manosiltransferasa y una molécula donadora adecuada tal como GDP-manosa, y posteriormente se añaden los restos adecuados para generar un péptido que tenga la glucosilación deseada.

Son bien conocidos en la técnica los protocolos para el uso de baculovirus para transformar células de insecto. Se han publicado algunos libros que proporcionan los procedimientos para el uso del sistema de baculovirus para expresar péptidos en células de insecto. Estos libros incluyen, pero no se limitan a, Richardson (Baculovirus Expression Protocols, 1998, Methods in Molecular Biology, Vol 39, Humana Pr), O'Reilly y co. (1994, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford Univ Press), y King y Possee (1992, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman & Hall). Además, existen también publicaciones tales como Lucklow (1993, Curr. Opin. Biotechnol. 4:564-572) y Miller (1993, Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 97-101).

Se han presentado también muchas patentes relacionadas con los sistemas de expresión en baculovirus de proteínas extrañas. Estas patentes incluyen, pero sin limitación, la Patente de Estados Unidos N^o. 6.210.966 (Culture medium for insect cells lacking glutamine an contains ammonium salt [Medio de cultivo para células de insecto que carece de glutamina y contiene sal de amonio]), Patente de Estados Unidos N^o 6.090.584 ((Use of BVACs (BaculoVirus Artificial Chromosomes) to produce recombinant peptides [Uso de BVAC (Cromosomas Artificiales de BaculoVirus) para producir péptidos recombinantes]), Patente de Estados Unidos N^o 5.871.986 ((Use of a baculovirus to express a recombinant nucleic acid in a mammalian cell [Uso de un baculovirus para expresar un ácido nucleico recombinante en una célula de mamífero]), Patente de Estados Unidos N^o 5.759.809 (Methods of expressing peptides in insect cells and methods of killing insects [Procedimientos para expresar péptidos en células de insecto y procedimientos para matar insectos]), Patente de Estados Unidos N^o 5.753.220 (Cysteine protease gene defective baculovirus, process for its production, and process for the production of economic peptide by using the same [Baculovirus defectivo en el gen de la cisteína proteasa, procedimiento para su producción, y procedimiento para la producción económica de péptidos utilizando los mismos]), Patente de Estados Unidos.

5.750.383 (Baculovirus cloning system [Sistema de clonación de baculovirus]), Patente de Estados Unidos N° 5.731.182 (Non-mammalian DNA virus to express a recombinant nucleic acid in a mammalian cell [Virus de ADN no de mamífero para expresar un ácido nucleico recombinante en una célula de mamífero]), Patente de Estados Unidos N° 5.728.580 (Methods and culture media for inducing single cell suspension in insect cell lines [Procedimientos y medios de cultivo para inducir una suspensión de células individuales en líneas celulares de insecto]), Patente de Estados Unidos N° 5.583.023 (Modified baculovirus, its preparation process and its application as a gene expression vector [Baculovirus modificados, su procedimiento de preparación y su aplicación como un vector de expresión génica]), Patente de Estados Unidos N° 5.571.709 (Modified baculovirus and baculovirus expression vectors [Baculovirus modificados y vectores de expresión de baculovirus]), Patente de Estados Unidos N° 5.521.299 (Oligonucleotides for detection of baculovirus infection [Oligonucleótidos para la detección de la infección por baculovirus]), Patente de Estados Unidos N° 5.516.657 ((Baculovirus vectors for expression of secretory and membranebound peptides [Vectores de baculovirus para la expresión de péptidos secretorios y unidos a membrana]), Patente de Estados Unidos 5.475.090 (Gene encoding a peptide which enhances virus infection of host insects [Gen que codifica un péptido que potencia la infección por virus de insectos hospedadores]), Patente de Estados Unidos N° 5.472.858 (Production of recombinant peptides in insect larvae [Producción de péptidos recombinantes en larvas de insectos]), Patente de Estados Unidos N° 5.348.886 (Method of producing recombinant eukaryotic viruses in bacteria [Procedimiento para producir virus eucariotas recombinantes en bacterias]), Patente de Estados Unidos N° 5.322.774 (Prokaryotic leader sequence in recombinant baculovirus expression system [Secuencia líder procariota en un sistema de expresión de baculovirus recombinante]), Patente de Estados Unidos N° 5.278.050 (Method to improve the efficiency of processing and secretion of recombinant genes in insect systems [Procedimiento para mejorar la eficacia de procesamiento y la secreción de genes recombinantes en sistemas de insectos]), Patente de Estados Unidos N° 5.244.805 (Baculovirus expression vectors [Vectores de expresión de baculovirus]), Patente de Estados Unidos N° 5.229.293 (Recombinant baculovirus [Baculovirus recombinante]), Patente de Estados Unidos N° 5.194.376 (Baculovirus expression system capable of producing recombinant peptides at high levels [Sistema de expresión de baculovirus capaz de producir péptidos recombinantes a altos niveles]), Patente de Estados Unidos N° 5.179.007 (Method and vector for the purification of recombinant peptides [Procedimiento y vector para la purificación de péptidos recombinantes]), Patente de Estados Unidos N° 5.169.784 (Baculovirus dual promoter expression vector [Vector de expresión del promotor doble de baculovirus]), Patente de Estados Unidos N° 5.162.222 (Use of baculovirus early promoters for expression of recombinant nucleic acids in stably transformed insect cells or recombinant baculoviruses [Uso de promotores tempranos de baculovirus en la expresión de ácidos nucleicos recombinantes en células de insecto transformadas de forma estable o baculovirus recombinantes]), Patente de Estados Unidos N° 5.155.037 (Insect signal sequences useful to improve the efficiency of processing and secretion of recombinant nucleic acids in insect systems [Secuencias señal de insectos útiles para mejorar la eficacia del procesamiento y la secreción de ácidos nucleicos recombinantes en sistemas de insectos]), Patente de Estados Unidos N° 5.147.788 (Baculovirus vectors and methods of use [Vectores de baculovirus y procedimientos de uso]), Patente de Estados Unidos N° 5.110.729 (Method of producing peptides using baculovirus vectors in cultured cells [Procedimiento para la producción de péptidos utilizando vectores de baculovirus en células cultivadas]), Patente de Estados Unidos N° 5.077.214 ((Use of baculovirus early promoters for expression of recombinant genes in stably transformed insect cells [Uso de promotores tempranos de baculovirus para la expresión de genes recombinantes en células de insecto transformadas de manera estable]), Patente de Estados Unidos N° 5.023.328 (Lepidopteran AKH signal sequence [Secuencia señal de AKH de Lepidópteros]), y Patentes de Estados Unidos N° 4.879.236 y 4.745.051 (Method for producing a recombinant baculovirus expression vector [Procedimiento para producir un vector de expresión de baculovirus recombinante]).

Se están usando en la actualidad varias líneas celulares procedentes de insectos de varias especies diferentes para la expresión de péptidos, y estas líneas son bien conocidas de los expertos en la técnica. Las líneas celulares de insecto de interés incluyen, pero no se limitan a, células de insecto de dípteros y lepidópteros en general, Sf9 y sus variantes (palomilla del maíz de *Spodoptera frugiperda*), *Estigmene acrea*, *Trichoplusia ni*, *Bombyx mori*, *Malacosoma disstria*, líneas kc1 y SL2 de *Drosophila* entre otras, y mosquito.

E. Plantas

Las células vegetales como productoras de péptidos presentan un conjunto diferente de características. Mientras que los glucanos unidos a N producidos en plantas comprenden una estructura de núcleo de trimanosilo, esta estructura de pentasacárido puede comprender algunos azúcares diferentes adicionales tal como se muestra en Figura 6. Por ejemplo, en un caso, la estructura de núcleo de trimanosilo está sustituida por un resto de xilosa unido a β 1,2 y un resto de fucosa unido a α 1,3. Además, las células vegetales pueden producir también una estructura Man5GlcNAc2. Los péptidos producidos en células vegetales son frecuentemente muy antigénicos como resultado de la presencia del núcleo de α 1,3 fucosa y xilosa en la estructura de glucano y se aclaran rápidamente a partir del torrente sanguíneo cuando se introducen en un mamífero debido a la ausencia de restos de ácido siálico de los extremos. Por tanto, a no ser que estos péptidos se remodelen utilizando los procedimientos proporcionados en el presente documento, se consideran por lo general inadecuados como agentes terapéuticos en mamíferos. Aunque se ha encontrado que algunos anticuerpos monoclonales expresados en células vegetales no son inmunógenos en ratones, es probable que las cadenas de glucano no sean inmunógenas debido a que se pueden soterrar en la región Fc en estos anticuerpos (Chargelegue y col., 2000, Transgenic Res. 9(3): 187-194).

5 Siguiendo las directrices proporcionadas en el presente documento, es ahora posible generar un péptido producido en una célula vegetal en el que un número creciente de estructuras de glucano presentes en el anterior comprenden una estructura elemental de núcleo de trimanosilo, o una estructura Man3GlcNAc4. Esto se lleva a cabo escindiendo cualquier azúcar adicional *in vitro* utilizando una combinación de glucosidasas adecuadas, que incluyen fucosidasas, hasta que se llega a la estructura elemental de núcleo de trimanosilo o a la estructura de Man3GlcNAc4. Estas reacciones de escisión deben incluir también la eliminación de cualquier resto de fucosa o xilosa de las estructuras a fin de disminuir la antigenicidad del péptido final cuando se introduce en un mamífero. Se conocen en la técnica células vegetales que tienen mutaciones que inhiben la adición de restos de fucosa y xilosa a la estructura del núcleo de trimanosilo (von Schaewen y col., 1993, Plant Physiology 102: 1109-1118). Se contempla por la invención el uso de estas células para producir péptidos que tienen glucanos que carecen de fucosa y xilosa. Tras la producción del núcleo elemental de trimanosilo o de la estructura de Man3GlcNAc4, se pueden añadir a continuación azúcares adicionales al anterior hasta llegar a un péptido que tenga la glucosilación deseada que sea por tanto adecuado para el uso terapéutico en un mamífero.

15 Las plantas transgénicas son consideradas por muchos autores que son el sistema de expresión de elección para péptidos farmacéuticos. Potencialmente, las plantas pueden proporcionar una fuente más barata de péptidos recombinantes. Se ha estimado que los costes de producción de los péptidos recombinantes en plantas podrían ser entre 10 y 50 veces inferiores que los de los mismos péptidos en *E. coli*. Aunque existen ligeras diferencias en la utilización de codones en vegetales en comparación con animales, estas se pueden compensar ajustando las secuencias de ADN recombinante (véanse, Kusnadi y col., 1997, Biotechnol. Bioeng. 56: 473-484; Khoudi y col., 1999, Biotechnol. Bioeng. 135-143; Hood y col., 1999, Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127-147). Además, la síntesis de péptidos, la secreción y la modificación posteriores a la traducción son muy similares en plantas y animales, con solo pequeñas diferencias en la glucosilación en plantas (véase, Fischer y col., 2000, J. Biol. Regul. Homest. Agents 14: 83-92). A continuación, los productos procedentes de plantas transgénicas es menos probable que resulten contaminados por patógenos animales, toxinas microbianas y secuencias oncogénicas.

25 Es bien conocida en la técnica la expresión de péptidos recombinantes en células vegetales. Además de las plantas transgénicas, los péptidos se pueden producir también en cultivos celulares de plantas transgénicas (Lee y col., 1997, Mol. Cell. 7: 783-787), y plantas no transgénicas inoculadas con virus vegetales recombinantes. Se han publicado algunos libros que describen protocolos para la transformación genética de células vegetales: Potrykus (1995, Gene transfer to plants, Springer, Nueva York), Nickoloff (1995, Plant cell electroporation and electrofusion protocols, Humana Press, Totowa, Nueva York) y Draper (1988, Plant genetic transformation, Oxford Press, Boston).

30 Se utilizan en la actualidad varios procedimientos para transformar de manera estable células vegetales con material genético recombinante. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, transformación en *Agrobacterium* Bechtold y Pelletier, 1998; Escudero y Hohn, 1997; Hansen y Chilton, 1999; Touraev y col., 1997), biolísticos (microproyectiles) (Finer y col., 1999; Hansen y Chilton, 1999; Shilito, 1999), electroporación de protoplastos (Fromm y col., 1985, Ou-Lee y col., 1986; Rhodes y col., 1988; Saunders y col., 1989; Trick y col., 1997), tratamiento con polietilenglicol (Shilito, 1999; Trick y col., 1997), microinyección en plantas (Leduc y col., 1996; Zhou y col., 1983), inhibición de semillas (Trick y col., 1997), haz de láser (1996), y limaduras de carburo de silicio (Thompson y col., 1995; Solicitud de Patente de Estados Unidos N°. 20020100077).

40 Muchos tipos de plantas son adecuados para la transformación y expresión de péptidos exógenos. Las plantas de particular interés para expresar los péptidos que se van a usar en el procedimiento de remodelación de la invención *Arabidopsis thaliana*, colza (*Brassica* spp.; Ruiz y Blumwald, 2002, Planta 214: 965-969), soja (*Glycine max*), girasol (*Helianthus annuus*), aceite de palma (*Elaeis guineensis*), maní (cacahuete, *Arachis hypogaea*; Deng y col., 2001, Cell. Res. 11:156-160), coco (*Cocos nucifera*), ricino (*Ricinus communis*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), mostaza (*Brassica* spp. y *Sinapis alba*), coriandro, (*Coriandrum sativum*), calabaza (*Cucurbita maxima*; Spencer y Snow, 2001, Heredity 86(Pt 6):694-702), lino/linaza (*Linum usitatissimum*; Lamblin y col., 2001, Physiol Plant 112:223-232), nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), jojoba (*Simmondsia chinensis*), maíz (*Zea mays*; Hood y col., 1999, Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147; Hood y col., 1997, Mol. Breed. 3: 291-306; Petolino y col., 2000, Transgenic Research 9:1-9), alfalfa (Khoudi y col., 1999, Biotechnol. Bioeng. 64: 135-143), tabaco (*Nicotiana tabacum*; Wright y col., Transgenic Res. 10:177-181; Frigerio y col., 2000, Plant Physiol. 123: 1483-1493; Cramer y col., 1996, Ann. New York Acad. Sci. 792:62-8-71; Cabanes-Macheteau y col., 1999, Glycobiology 9:365-372; Ruggiero y col., 2000, FEBS Lett. 469: 132-136), canola (Bai y col., 2001, Biotechnol. Prog. 17: 168-174; Zhang y col., 2000, J. Anim. Sci. 78: 2868-2878), patata (Tacket y col., 1998, J. Infect. Dis. 182: 302-305; Richter y col., 2000, Nat. Biotechnol. 18: 1167-1171; Chong y col., 2000, Transgenic Res. 9:71-78), alfalfa (Wigdorovitz y col., 1999, Virology 255: 347-353), Guisante (*Pisum sativum*; Perrin y col., 2000, Mol. Breed. 6: 345-352), arroz (*Oryza sativa*; Stoger y col., 2000, Plant Mol. Biol. 42:583-590), algodón (*Gossypium hirsutum*; Korniyev y col., 2001, Physiol Plant 113: 323-331), cebada (*Hordeum vulgare*; Petersen y col., 2002, Plant Mol Biol 49:45-58); trigo (*Triticum* spp.; Pellegrineschi y col., 2002, Genome 45:421-430) y judía (*Vicia* spp.; Saalbach y col., 1994, Mol Gen Genet 242: 226-236).

60 Si se desea la expresión del ácido nucleico recombinante en una planta completa en lugar de en células cultivadas, las células vegetales se transforman en primer lugar con el ADN que codifica el péptido, tras lo cual, la planta se regenera. Esto implica procedimientos de cultivo de tejidos que se optimizan normalmente para cada especie de planta. Se conocen bien ya en la técnica para muchas especies los protocolos para regenerar plantas. Además, un experto en la técnica puede desarrollar protocolos para otras especies utilizando la experimentación rutinaria. Están

disponibles numerosos manuales de laboratorio que describen procedimientos para la regeneración de plantas, incluyendo, pero sin limitación, Smith (2000, *Plant tissue culture: techniques and experiments*, Academic Press, San Diego), Bhojwani y Razdan (1996, *Plant tissue culture: theory and practice*, Elsevier Science Pub., Amsterdam), Islam (1996, *Plant tissue culture*, Oxford & IBH Pub. Co., New Delhi, India), Dodds y. Roberts (1995, *Experiments in plant tissue culture*, Nueva York : Cambridge University Press, Cambridge Inglaterra), Bhojwani (*Plant tissue culture: applications and limitations*, Elsevier, Amsterdam, 1990), Trigiano y Gray (2000, *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*, CRC Press, Boca Raton, Fla), y Lindsey (1991, *Plant tissue culture manual: fundamentals and applications*, Kluwer Academic, Boston).

Aunque la purificación de péptidos recombinantes a partir de plantas puede ser potencialmente costosa, se han desarrollado algunos sistemas que minimizan estos costes. Un procedimiento dirige el péptido sintetizado al endospermo de la semilla desde el cual este puede extraerse fácilmente (Wright y col., 2001, *Transgenic Res.* 10:177-181, Guda y col., 2000, *Plant Cell Res.* 19: 257-262; y la Patente de Estados Unidos Nº 5.767.379). Una solución alternativa es la extracción simultánea del péptido recombinante con productos vegetales convencionales tales como almidón, harina o aceite. En el aceite de colza, un péptido de fusión de oleosina-hurudina cuando se expresa en la planta, se une al cuerpo oleoso de la semilla, y se puede extraer de la semilla de la planta junto con el aceite (Parmenter, 1995, *Plant Mol. Biol.* 29: 1167-1180; Patentes de Estados Unidos Nºs. 5.650.554, 5.792.922, 5.948.682 y 6.288.304, y la Solicitud de Estados Unidos 2002/0037303). En una variación sobre esta solución, la oleosina se fusiona a un péptido para la expresión simultánea exógena del péptido de interés (Patente de Estados Unidos Nº 5.856.452).

La expresión de péptidos recombinantes en plástidos vegetales, tales como el cloroplasto, genera péptidos que no tienen estructuras de glucano unidas a los anteriores, de manera similar a lo que sucede en los procariotas. Sin embargo, el rendimiento de dichos péptidos es muy grande cuando se expresa en estos orgánulos de las células vegetales, y de esta manera, este tipo de sistema de expresión puede tener ventajas sobre otros sistemas. Para una revisión general de la tecnología de expresión de plástidos de péptidos exógenos en plantas superiores, véase Hager y Beck (2000, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 302-310, y las referencias citadas en los anteriores. La expresión de plástidos ha sido particularmente satisfactoria en tabaco (véase, por ejemplo, Staub y col., 2000, *Nat. Biotechnol.* 18: 333-338).

F. Animales transgénicos

Se puede llevar a cabo la introducción de un ADN recombinante en el huevo fertilizado de un animal (por ejemplo, un mamífero) utilizando cualquier tipo de técnica normalizada en la tecnología de animales transgénicos. Véase, por ejemplo, Hogan y col., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986; y Patente de Estados Unidos Nº 5.811.634. De forma más común, el ADN recombinante se introduce en el embrión por medio de una inyección pronuclear (Gordon y col., 1980, *PNAS* 77: 7380-7384; Gordon y Ruddle, 1981, *Science* 214: 1244-1246; Brinster y col., 1981, *Cell* 27: 223-231; Costantini y Lacy, 1981, *Nature* 294: 92-94). La microinyección tiene la ventaja de ser aplicable a una amplia variedad de especies. Se puede transformar también el preimplante de embriones con retrovirus (Jaenisch y Mintz, 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 1250-1254; Jaenisch y col., 1976, *Hamatol Bluttransfus.* 19: 341-356; Stuhlmann y col., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 7151-7155). La transformación mediada por retrovirus tiene la ventaja de añadir copias individuales del ácido nucleico recombinante a la célula, pero produce un grado elevado de mosaicismos. De forma más reciente, se han utilizado técnicas mediadas por embriocitoblastos (Gossler y col., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 9065-9069), transferencia de segmentos cromosómicos completos (Lavitrano y col., 1989, *Cell* 57: 717-723), y transfección de gametos junto con fertilización *in vitro* (Lavitrano y col., 1989, *Cell* 57: 717-723). Se han publicado algunos manuales de procedimientos de laboratorio que dan a conocer estas técnicas Cid-Arregui y García-Carrancá (1998, *Microinjection and Transgenesis: Strategies and Protocols*, Springer, Berlín), Clarke (2002, *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ), y Pinkert (1994, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press, San Diego).

Una vez que se introduce el ADN recombinante en el huevo, el huevo se incuba durante un corto periodo de tiempo y a continuación se transfiere a un animal pseudoembarazado de la misma especie a partir de la cual se obtuvo el huevo (Hogan y col., más arriba). En el caso de mamíferos, se inyectan normalmente 125 huevos por experimento, aproximadamente dos tercios de los cuales sobrevivirán al procedimiento. Se transfieren veinte huevos viables a un mamífero pseudoembarazado, cuatro de diez de los cuales se desarrollaran en progenie viva. Normalmente, 10-30% de la progenie (en el caso de ratones) transporta el ADN recombinante.

Aunque se puede utilizar el animal completo como un sistema de expresión para los péptidos de la invención, en una realización preferida, el péptido exógeno se acumula en productos del animal, a partir de los cuales se puede recoger sin causar ninguna lesión al animal. En las realizaciones preferidas, el péptido exógeno se acumula en leche, huevos, pelo, sangre y orina.

Si el péptido recombinante está previsto para su acumulación en la leche del animal, los mamíferos adecuados son rumiantes, ungulados, mamíferos domesticados, y animales de granja. Los animales particularmente preferidos son cabras, ovejas, camellos, vacas, cerdos, caballos, bueyes, y llamas. Son bien conocidos los procedimientos para generar vacas transgénicas que acumulan un péptido recombinante en su leche; véanse Newton (1999, *J. Immunol.*

Methods 231: 159-167), Ebert y col. (1991, Biotechnology 9: 835-838), y Patentes de Estados Unidos N^{os} 6.210.736, 5.849.992, 5.843.705, 5.827.690, 6.222.094. La generación de animales transgénicos que producen un péptido recombinante deseado se encuentra comercialmente disponible de GTC Biotherapeutics, Framingham, MA.

Si el péptido recombinante se ha de acumular en huevos, entre las aves apropiadas se incluyen, pero sin limitación, pollos, gansos, pavos. Otros animales de interés incluyen, pero sin limitación, otras especies de aves, reptiles y anfibios. La introducción de ADN recombinante en pollos mediante transformación retroviral es bien conocida en la técnica: Thoraval y col. (Transgenic Research 4: 369-376, 1995) Bosselman (Science 234: 533-535, 1989), Petropoulos y col. (J. Virol. 66: 3391-3397, 1992), Patente US n. 5.162,251. También se ha conseguido la transformación exitosa de pollos con ADN recombinante, en la cual se introduce ADN en células blastodermas y las células blastodermas son introducidas en embriones: Brazolot y col. (Mol Reprod. Dev. 30: 304-312, 1991), Fraser y col. (Int. J. Dev. Biol. 37:381-385, 1993) y Petite y col. (Development 108:185-189, 1990) Se ha desarrollado tecnología de alto rendimiento para evaluar si los pollos transgénicos expresan el péptido deseado (Harvey y col., Poult Sci. 81:202-212, 2002, Patente US n. 6,423,488). Usando transformación retroviral de gallinas con ADN recombinante, se acumuló beta-lactamasa exógena en clara de huevos de gallina (Harvey y col. 2002, Nat. Biotechnol 20(4):396-399, 2002). La producción de gallinas productoras de péptidos exógenos en huevos está comercialmente disponible en AviGenics, Inc. Athens, Ga.

G. Bacterias

Los péptidos expresados de forma recombinante producidos en bacterias no están generalmente glucosilados. Sin embargo, son cada vez más evidentes los sistemas de bacterias capaces de glucosilar péptidos, y por tanto, es probable que se puedan producir péptidos recombinantes glucosilados en bacterias en el futuro.

Se conocen en la técnica numerosos sistemas de expresión bacteriana. Las especies bacterianas preferidas incluyen *E. coli* y especies de *Bacillus*.

Es bien conocida en la técnica la expresión de péptidos recombinantes en *E. coli*. Se encuentran protocolos de sistemas de expresión basados en *E. coli* en la Solicitud de Estados Unidos N^o 20020064835, en las Patentes de Estados Unidos N^{os} 6.245.539, 5.606.031, 5.420.027, 5.151.511, y en el documento RE33.653, entre otros. Los procedimientos para transformar bacterias incluyen, pero sin limitación, cloruro de calcio (Cohen y col., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 2110-2114; Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166:557-580; Mandel y Higa, 1970, J. Mol. Biol. 53: 159-162) y electroporación (Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), y aquellos descritos en Sambrook y col., 2001 (más arriba). Para una revisión de los protocolos de laboratorio sobre transformación microbiana y sistemas de expresión, véase Saunders y Saunders (1987, Microbial Genetics Applied to Biotechnology : Principles and Techniques of Gene Transfer and Manipulation, Croom Helm, London), Pühler (1993, Genetic Engineering of Microorganisms, Weinheim, Nueva York), Lee y co., (1999, Metabolic Engineering, Marcel Dekker, Nueva York), Adolph (1996, Microbial Genome Methods, CRC Press, Boca Raton), y Birren y Lai (1996, Nonmammalian Genomic Analysis : A Practical Guide, Academic Press, San Diego),

Para una revisión general sobre la bibliografía de la expresión de péptidos en *E. coli*, véase (2001, Mol. Biotechnol. 19: 251-267). Algunas compañías ofrecen ahora cepas bacterianas seleccionadas para la expresión de péptidos de mamíferos, tales como las cepas RosettaTM de *E. coli* (Novagen, inc., Madison, WI; con un aumento de expresión de codones eucarióticos no utilizados normalmente en células bacterianas, y una potenciación en la formación del enlace disulfuro

H. Genomanipulación celular

Será evidente a partir de la presente divulgación que cuánto más uniforme sea el material de partida producido por una célula, más eficaz será la generación *in vitro* de grandes cantidades de péptidos que tengan la glucosilación deseada. De esta manera, la genomanipulación de las células hospedadoras para producir péptidos uniformemente glucosilados como material de partida de las reacciones enzimáticas *in vitro* dadas a conocer en el presente documento proporciona una significativa ventaja sobre el uso de un material de partida de péptidos que tengan un conjunto heterogéneo de estructuras de glucano unidas al anterior. Un material de partida de péptido preferido para uso en la presente invención es un péptido que tiene principalmente moléculas de glucano que consisten únicamente en una estructura elemental de núcleo de trimanosilo. Otro material de partida preferido es Man3GlcNAc4. Tras el procedimiento de remodelación, los péptidos preferidos proporcionarán un aumento de la cantidad mayor de péptidos que tenga la glucosilación deseada, y de esta manera, una eficacia clínica mejorada. Sin embargo, otro material de partida de glucano es también adecuado para el uso en los procedimientos descritos en el presente documento, en que por ejemplo, se puede reducir fácilmente, *in vitro*, un alto contenido de glucanos de manosa a estructuras elementales de núcleos de trimanosilo utilizando una serie de manosidasas. Tal como se describe en otra parte en el presente documento, también se puede usar otro material de partida de glucano, con la condición de que sea posible escindir todos los restos de azúcar extraños de tal manera que se genera una estructura elemental de núcleo de trimanosilo o Man3GlcNAc4. De esta manera, el fin de usar células genomanipuladas para la producción de los péptidos de la presente invención es generar péptidos que tengan una estructura de glucano tan uniforme como sea posible unida a la anterior, en la que la estructura de glucano se puede remodelar *in vitro* para generar un péptido que tenga la glucosilación deseada. Esto dará como resultado una

drástica reducción en los costes de producción de estos péptidos. Debido a que los glucopéptidos producidos utilizando esta metodología tendrán predominantemente la misma estructura de glucano unida a N, el protocolo de modificación posterior a la producción puede normalizarse y optimizarse para producir una mayor consistencia entre los lotes del producto final. Como resultado, los productos finales de la cadena completados pueden ser menos heterogéneos que aquellos que se encuentran actualmente disponibles. Los productos tendrán una semivida biológica y bioactividad aumentadas en comparación con los productos de la técnica anterior. De forma alternativa, si se desea, se puede utilizar la invención para introducir una heterogeneidad limitada y específica, por ejemplo, seleccionando las condiciones de reacción que dan como resultado la adición diferencial de restos de azúcares.

De forma preferible, aunque no como requerimiento rígido, la célula genomanipulada es aquella que produce péptidos que tienen estructuras de glucano comprendidas principalmente por una estructura elemental de núcleo de trimanosilo o Man3GlcNAc4. Como mínimo, la proporción de estas estructuras preferidas producidas por la célula genomanipulada debe ser suficiente para dar como resultado un péptido que tenga una glucosilación deseada tras el protocolo de remodelación.

En general, se puede modificar cualquier tipo de célula eucariota para que se convierta en una célula hospedadora de la presente invención. En primer lugar, se determina el modelo de glucosilación de los glucopéptidos endógenos y recombinantes producidos por el organismo con el fin de identificar adiciones/eliminaciones adecuadas de actividades enzimáticas que den como resultado la producción de glucopéptidos elementales de núcleos de trimanosilo o glucopéptidos de Man3GlcNAc4. Esto implicará normalmente actividades de eliminación que utilizan glucopéptidos de trimanosilo como sustratos para la reacción de la glucosiltransferasa y actividades enzimáticas de inserción que degradan los glucanos unidos a N más complejos para producir cadenas más cortas. Además, las células genomanipuladas pueden producir altos contenidos de glucanos de manosa, que pueden escindir-se mediante la manosidasa para producir las estructuras de glucano de partida deseadas. La manosidasa puede ser activa *in vivo* en la célula (es decir, la célula puede genomanipularse para producirla), o se puede utilizar en las reacciones producción posteriores *in vitro*.

Son bien conocidas las técnicas para modificar genéticamente las células hospedadoras para alterar el perfil de glucosilación de los péptidos expresados. Véanse, por ejemplo, Altmann y col. (1999, Glycoconjugate J. 16: 109-123), Ailor y col. (2000, Glycobiology 10(8): 837-847), Jarvis y col., (Conferencia *In vitro* gen, marzo de, 1999, resumen), Hollister y Jarvis, (2001, Glycobiology 11(1): 1-9), y Palacpac y col., (1999, PNAS USA 96: 4697), Jarvis y col., (1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 528-533), Gerngross (Publicación de Patente de Estados Unidos Nº. 20020137134), todos los cuales dan a conocer las técnicas para "asimilar a sistemas de expresión de mamíferos" sistemas de expresión de células de insecto o vegetales transfecando células de insecto o vegetales con genes de la glucosiltransferasa.

Existen también técnicas para alterar genéticamente el perfil de la glucosilación de los péptidos expresados en *E. coli*. *E. coli* se ha genomanipulado con diversas glucosiltransferasas procedentes de la bacteria *Miseria meningitidis* y *Azorhizobium* para producir oligosacáridos *in vivo* (Bettler y col., 1999, Glycoconj. J. 16: 205-212). Una *E. coli* que se ha genomanipulado para expresar en exceso el gen *IgtA* de la β 1,3 N acetil glucoaminiltransferasa de *Miseria meningitidis* glucosilará eficazmente la lactosa exógena (Priem y col., 2002, Glycobiology 12: 235-240).

También se han genomanipulado células de hongos para producir glucosiltransferasas exógenas (Yoshida y col., 1999, Glycobiology, 9(1):53-58; Kalsner y col., 1995, Glycoconj. J. 12:360-370; Schwientek y Ernst, 1994, Gene 145 (2):299-303; Chiba y col., 1995, Biochem J. 308:405-409).

De esta manera, en un aspecto, la presente invención proporciona una célula que glucosila una población de glucopéptidos de tal manera que una proporción de los glucopéptidos producidos de esta forma tiene un núcleo elemental de trimanosilo o una estructura Man3GlcNAc4. De forma preferible, la célula produce un péptido que tiene una estructura de glucano comprendida únicamente por un núcleo elemental de trimanosilo. Como mínimo, la proporción de péptidos que tienen un núcleo elemental de trimanosilo o una estructura Man3GlcNAc4 es suficiente para dar como resultado péptidos que tengan una glucosilación deseada tras el procedimiento de remodelación. La célula ha introducido en sí misma una o más unidades de expresión de ácidos nucleicos heterólogos, cada una de las cuales puede comprender uno o más glucanos complejos unidos a N o puede ser simplemente un glucano con un alto contenido de manosa.

La célula puede ser cualquier tipo de célula y es preferiblemente una célula eucariota. La célula puede ser una célula de mamífero tal como de ser humano, ratón, rata, conejo, hámster u otro tipo de célula de mamífero. Cuando la célula es una célula de mamífero, la célula de mamífero puede derivarse o estar incluida en un mamífero transgénico no humano en el que la célula en el mamífero codifica el glucopéptido deseado y una variedad de enzimas glucosilantes y glucosidasa según sea necesario para la producción de las moléculas de glucopéptido deseadas. Además, la célula puede ser una célula de hongo, preferiblemente, una célula de levadura, o la célula puede ser una célula de insecto o de planta. De forma similar, cuando la célula es una célula vegetal, la célula vegetal puede derivarse o estar incluida en una planta transgénica, en la que la planta codifica el glucopéptido deseado y una variedad de enzimas glucosilantes y glucosidasa, según sea necesario para la producción de las moléculas de glucopéptido deseadas.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora puede ser una célula eucariota que expresa una o más enzimas glucosiltransferasa heterólogas y/o una o más enzimas glucosidasas heterólogas, en las que la expresión de un glucopéptido recombinante en la célula hospedadora da como resultado la producción de un glucopéptido recombinante que tienen una estructura elemental de trimanosilo como la estructura primaria de glucano unida al anterior

En algunas realizaciones, la enzima glucosiltransferasa heteróloga útil en la célula se puede seleccionar de un grupo que consiste en cualquier enzima glucosiltransferasa conocida incluida por ejemplo, en la lista de familias de glucosiltransferasas disponible en Taniguchi y col. (2002, Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, Springer, Nueva York).

En otras realizaciones, se puede seleccionar la enzima glucosilasa heteróloga de un grupo que consiste en manosidasa 1, manosidasa 2, manosidasa 3, y otras manosidasas, que incluyen, pero no se limitan a, manosidasas microbianas. Se proporciona en otra parte en el presente documento una divulgación adicional con respecto a las enzimas útiles en la presente invención.

En otras realizaciones adicionales, la célula hospedadora puede ser una célula eucariota en la que se han activado una o más enzimas de glucosilación endógenas y una o más enzimas glucosidasas endógenas de tal manera que la expresión de un glucopéptido recombinante en la célula hospedadora da como resultado la producción de un glucopéptido recombinante que tiene una estructura elemental de trimanosilo como la estructura primaria de glucano unida al anterior.

En las realizaciones adicionales, la célula hospedadora puede expresar enzimas glucosiltransferasa heterólogas y/o enzimas glucosidasas aunque, al mismo tiempo, una o más enzimas glucosiltransferasa endógenas y/o enzimas glucosidasas estén inactivadas. Las enzimas glucosiltransferasas endógenas y/o las enzimas glucosidasas pueden inactivarse utilizando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, técnicas de sentido contrario y técnicas que implican la inserción de ácidos nucleicos en el genoma de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, las enzimas endógenas se pueden seleccionar de un grupo que consiste en GnT-I, una selección de manosidasas, xilosiltransferasas, núcleo de α 1,3 fucosiltransferasa, y serina/treonina O-manosiltransferasas.

De forma alternativa, se puede aprovechar un sistema de expresión que glucosila péptidos de manera natural, de tal manera que los glucanos unidos a N son predominantemente de tipo núcleo de trimanosilo, o de tipo Man3GlcNAc4. Un ejemplo de un tipo de célula que produce núcleos de trimanosilo es el de las células Sf9. Se pueden identificar otros sistemas de expresión de este tipo analizando glucopéptidos que se expresan de forma natural o recombinante en células y seleccionando aquellos que presentan características de glucosilación deseadas. La invención debe construirse para incluir cualquiera y todas las células mencionadas para la producción de los péptidos de la presente invención.

V. PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS GLUCOCONJUGADOS Y/O REMODELADOS CON GLUCANO

Si la glucoproteína modificada se produce o se secreta intracelularmente, como primera etapa, los residuos de material particulado, ya sean las células hospedadoras o los fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, la proteína se puede concentrar con un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, seguido por la separación de la variante del péptido de otras impurezas mediante una o más etapas seleccionadas entre cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (por ejemplo, en dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo). Cromatografía en Blue-Sefarosa, CN Blue-Sefarosa, MONO-Q, MONO-S, lentil lectina-Sefarosa, WGA-Sefarosa, Con A-Sefarosa, Éter Toyopearl, Butil Toyopearl, fenil Toyopearl, a proteína A Sefarosa. Cromatografía en SDS-PAGE, cromatografía en gel de sílice, cromatofocalización, HPLC en fase inversa (RP-HPLC), filtración en gel utilizando, *por ejemplo*, un tamiz molecular de Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en columnas que se unen selectivamente al péptido, y etanol, pH o precipitación con sulfato de amonio, filtración en membrana y diversas técnicas.

Los péptidos modificados producidos en el cultivo se aíslan normalmente mediante extracción inicial de células, enzimas, etc., seguida por una o más concentraciones, desalinización, intercambio iónico en disolución acuosa, o etapas de cromatografía de exclusión por tamaño. Adicionalmente, la glucoproteína modificada puede purificarse mediante cromatografía de afinidad. A continuación, se puede emplear HPLC para las etapas finales de la purificación.

Se puede incluir un inhibidor de la proteasa, por ejemplo, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en cualquiera de las anteriores etapas para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de los contaminantes accidentales.

En otra realización, los sobrenadantes del sistema que producen el péptido modificado de la invención se concentran en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede

comprender un ligando para el péptido, una lectina o una molécula de anticuerpo unida a un soporte adecuado. De forma alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos DEAE colgantes. Las matrices adecuadas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa, u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. De forma alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren particularmente grupos sulfopropilo.

A continuación, se puede utilizar una o más etapas de RP-HPLC que emplean medios de RP-HPLC hidrófobos, *por ejemplo*, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes para purificar adicionalmente una composición de un péptido variante. Se pueden emplear alguna o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una glucoproteína modificada homogénea.

El péptido modificado de la invención resultante de una fermentación a gran escala se puede purificar mediante procedimientos análogos a los dados a conocer por Urdal y col., J Chromatog. 296: 171 (1984). Esta referencia describe dos etapas de RP-HPLC secuenciales para la purificación de la IL-2 humana recombinante en una columna de HPLC preparativa. De forma alternativa, se pueden utilizar técnicas tales como la cromatografía de afinidad para purificar la glucoproteína modificada

VI. PÉPTIDOS PREFERIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN PÉPTIDOS PREFERIDOS

La presente invención incluye ácidos nucleicos aislados que codifican el Factor IX y proteínas, y moléculas similares o sus fragmentos. Otros péptidos que no forman parte de la invención son el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el interferón alfa humano (IFN-alfa), el interferón beta humano (IFN-beta), el Factor VII humano (Factor VII), la hormona estimuladora del folículo humana (FSH), la eritropoyetina humana (EPO), el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), el interferón gamma humano (IFN-gamma), el inhibidor de la proteasa alfa-1 humana (conocido también como alfa-1-antitripsina o inhibidor de la alfa-1-tripsina; A-1-PI), la glucocerebrosidasa, el activador de tipo tisular humano (TPA), la interleuquina-2 humana (IL-2), Factor VIII humano (Factor VIII), un receptor del factor de necrosis tumoral de 75 kDa fusionado a una porción Fc de la inmunoglobulina IgG humana, conocida comercialmente como ENBREL™ o ETANERCEPT™ (TNFR quimérico), la uroquinasa humana (uroquinasa), un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal quimérico humano/de ratón que se une de forma específica a la glucoproteína IIb/IIIa y el receptor alfa_v beta₃ de la vitronectina, conocido comercialmente como REOPRO™ o ABCIXIMAB (antiglucoproteína IIb/IIIa quimérica) un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón/ser humano que se une de forma específica a HER2, conocido comercialmente como HERCEPTIN™ (dirigido contra HER-2 quimérico), un anticuerpo quimérico humano/de ratón que se une de forma específica al sitio antigénico A o a la proteína F o al virus sincitial respiratorio comercialmente conocido como SYNAGIS™ o PALIVIZUMAB (dirigido contra RSV quimérico) un anticuerpo monoclonal humano/de ratón quimérico que se une de forma específica a las células CD20 o a los linfocitos B humanos, comercialmente conocido como RITUXAN™ o RITUXAMAB (dirigido contra CD20 quimérico), una ADNasa recombinante humana (ADNasa), un anticuerpo monoclonal humano/de ratón quimérico que se une de forma específica al factor de necrosis tumoral humano, comercialmente conocido como REMICADE™ o INFlixIMAB (dirigido contra TNF quimérico), insulina humana, el antígeno superficial de un virus de la hepatitis B (subtipo adw; HBsAg), y la hormona del crecimiento humana (HGH) y similares.

El ácido nucleico aislado de la invención debe construirse de forma que incluya una secuencia de ARN o una secuencia de ADN que codifica cualquiera de los anteriores péptidos identificados de la invención, y cualquiera de sus formas modificadas, incluyendo las modificaciones químicas del ADN o del ARN que convierten la secuencia de nucleótidos en más estable cuando está exenta de células o cuando está asociada a una célula. Como ejemplo no limitante, se sabe que los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato confieren al oligonucleótido una resistencia mejorada a las nucleasas. Los ejemplos específicos de oligonucleótidos modificados incluyen aquellos que contienen fosforotioato, fosfotriéster, metil fosfonato, enlaces entre alquil azúcares o cicloalquil azúcares de cadena corta, o enlaces entre azúcares heteroaromáticos o heterocíclicos de cadena corta ("estructura"). Además, se pueden utilizar también oligonucleótidos que tengan estructuras de esqueleto de morfolino (Patente de Estados Unidos Nº 5.034.506) o estructuras de esqueleto de poliamida (Nielsen y col., 1991, Science 254: 1497).

Se pueden usar también modificaciones químicas de nucleótidos para aumentar la eficacia con la que una secuencia de nucleótido es capturada por una célula o la eficacia con la que se expresa en una célula. Se contemplan cualquiera y todas las combinaciones de modificaciones de las secuencias de nucleótidos en la presente invención.

La presente invención no debe considerarse como limitada únicamente a las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos dadas a conocer en el presente documento. Tal como se describe con más detalle en otra parte en el presente documento, una vez provistos con la presente invención, será fácilmente evidente para un experto en la técnica que se pueden obtener otros ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la presente invención siguiendo los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, mutagénesis dirigida al emplazamiento, mutaciones de cambio de marco y similares), y procedimientos que son bien conocidos en la técnica.

Se incluyen también ácidos nucleicos aislados que codifican fragmentos de péptidos en los que los fragmentos de péptidos retienen la actividad biológica deseada del péptido. Además, aunque se dan a conocer en el presente documento los ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican los péptidos preferidos en relación con las SEC ID N^{os} específicas, la invención no debe considerarse en forma alguna como limitada a cualquier ácido nucleico específico dado a conocer en el presente documento. En su lugar, debe considerarse que la invención incluye todas y cada una de las moléculas de ácido nucleico que tengan un porcentaje de identidad suficiente con las secuencias dadas a conocer en el presente documento de tal manera que estos ácidos nucleicos codifican también un péptido que tiene la actividad biológica deseada dada a conocer en el presente documento. Se contemplan también los ácidos nucleicos aislados que sean más cortos que los ácidos nucleicos de longitud completa, en los que se retiene embargo la actividad biológica del péptido codificado. Los procedimientos para determinar el porcentaje de identidad entre un ácido nucleico y otro se dan a conocer en otra parte en el presente documento dado que son ensayos para la determinación de la actividad biológica de cualquier péptido preferido específico.

También se dan a conocer también en otra parte en el presente documento cualesquiera otro tipo de procedimientos que se pueden utilizar para la generación de derivados, mutantes, o formas variantes de los péptidos de la presente invención que utilizan la metodología de ADN recombinante bien conocida en la técnica tal como, por ejemplo, la descrita en Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y Ausubel y col. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green & Wiley, Nueva York). Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para la introducción de cambios de aminoácidos en el péptido o el polipéptido alterando la secuencia de ADN que codifica el péptido, y se describen también en Sambrook y col. (1989, *supra*); Ausubel y col. (1997, *más arriba*).

La invención incluye un ácido nucleico que codifica el Factor IX, en el que un ácido nucleico que codifica un péptido etiqueta se une de forma covalente al anterior. Esto es, la invención abarca un ácido nucleico quimérico en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido etiqueta se une de forma covalente al ácido nucleico que codifica un péptido de la presente invención. Dichos péptidos etiqueta son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP), myc, myc-piruvato quinasa (myc-PK), His6, proteína de unión a maltosa (MBP), y polipéptido etiqueta de la hemaglutinina del virus de la gripe, un polipéptido con la etiqueta flag (FLAG) y un polipéptido etiqueta de la glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, la etiqueta no debe considerarse en forma alguna limitada a los ácidos nucleicos que codifican los péptidos etiqueta anteriormente relacionados. En su lugar, cualquier secuencia que codifica un péptido que puede funcionar de una manera sustancialmente similar a estos péptidos etiqueta se debe considerar como incluida en la presente invención.

El ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido etiqueta se puede utilizar para localizar un péptido de la presente invención en una célula, un tejido, y/o un organismo completo (por ejemplo, un embrión de mamífero), detectar un péptido de la presente invención secretado a partir de una célula, y estudiar el(los) papel(es) del péptido en una célula. Además, la adición de un péptido etiqueta facilita el aislamiento y la purificación del péptido "etiquetado" de tal manera que se pueden producir los péptidos de la invención y purificarse fácilmente.

La invención incluye el siguiente péptido de Factor IX aislado.

Se debe considerar también que la presente invención abarca "derivados", "mutantes", y "variantes" de los péptidos de la invención (o del ADN que codifica los mismos) cuyos derivados, mutantes, y variantes son péptidos que están alterados en uno o más aminoácidos (o, cuando se hace referencia a la secuencia de nucleótidos que codifica los mismos, están alterados en uno o más pares de bases) de tal manera que el péptido (o ADN) resultante no es idéntico a las secuencias enumeradas en el presente documento, pero tiene la misma propiedad biológica que los péptidos dados a conocer en el presente documento, en que el péptido tiene las propiedades biológicas/bioquímicas del Factor IX.

Se incluyen además fragmentos de péptidos que retienen la actividad biológica deseada del péptido sin tener en cuenta la longitud del péptido. Se encuentra comprendido en el conocimiento del experto en la técnica el cómo aislar formas de longitud inferiores a la completa a partir de cualquiera de los péptidos útiles en la invención, y para determinar, utilizando los ensayos proporcionados en el presente documento, qué fragmentos aislados retienen una actividad biológica deseada y son por tanto péptidos útiles en la invención.

Debe considerarse que una propiedad biológica de una proteína de la presente invención incluye, pero sin limitación, la capacidad del péptido para funcionar en el ensayo biológico y en los entornos descritos en el presente documento, tales como la reducción de la inflamación, la estimulación de una respuesta inmune, la coagulación de la sangre, aumento de la salida hematopoyética, inhibición de la proteasa, modulación del sistema inmune, unión a un antígeno, crecimiento, alivio del tratamiento de una enfermedad, escisión del ADN y similares.

D. Factor IX

La presente invención abarca además un procedimiento para remodelar y/o modificar el Factor IX. Tal como se ha descrito anteriormente, el Factor IX es fundamental en la cascada de coagulación de la sangre. Una deficiencia de Factor IX en el cuerpo caracteriza un tipo de hemofilia (tipo B). El tratamiento de esta enfermedad está limitado normalmente a la transfusión intravenosa de concentrados de proteínas plasmáticas humanas del Factor IX. Sin

embargo, además de las desventajas prácticas de tiempo y los elevados costes, la transfusión de concentrados sanguíneos implica el riesgo de transmisión de hepatitis vírica, síndrome de inmunodeficiencia adquirida o enfermedades tromboembólicas al receptor.

Aunque se ha demostrado que el propio Factor IX es un compuesto importante y útil para aplicaciones terapéuticas, los procedimientos actuales para la producción del Factor IX a partir de células recombinantes (Patente de Estados Unidos Nº 4.770.999) dan como resultado un producto con una vida biológica más bien corta, un modelo de glucosilación impreciso que podría conducir potencialmente a la inmunogenicidad, pérdida de la función, un aumento en la necesidad de dosis más grandes y más frecuentes a fin de conseguir el mismo efecto y similar.

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos del factor IX se muestran en el presente documento como SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 10 (Figura 56A y 56b, respectivamente). La presente invención no está limitada de ninguna manera a las secuencias que se muestran en el presente documento. Son bien conocidas en la técnica las variantes del Factor IX, tal como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nºs 4.770.999, 5.521.070 en las que una tirosina está sustituida por una alanina en la primera posición, la Patente de Estados Unidos Nº 6.037.452, en la que el Factor IX está unido a un grupo de óxido de alquileño, y la Patente de Estados Unidos Nº 6.046.380, en la que el ADN que codifica el Factor IX está modificado en al menos un sitio de corte y empalme. Tal como se demuestra en el presente documento, son bien conocidas en la técnica las variantes del Factor IX, y la presente divulgación abarca aquellas variantes conocidas o que se van a desarrollar o a descubrir en el futuro.

Los procedimientos para determinar la actividad de un Factor IX modificado preparado de acuerdo con los procedimientos de la presente invención se pueden llevar a cabo utilizando los procedimientos descritos anteriormente, o de forma adicional, utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, tal como un ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activado en una etapa tal como se describe, por ejemplo en, Biggs (1972, Human Blood Coagulation Haemostasis and Thrombosis (Ed. 1), Oxford, Blackwell, Scientific, pg. 614). De forma breve, para evaluar la actividad biológica de la molécula de un Factor IX desarrollada de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, se puede llevar a cabo el ensayo con volúmenes iguales del reactivo de tromboplastina parcial activado, plasma deficiente en factor IX aislado de un paciente con hemofilia B utilizando las técnicas de la flebotomía estéril bien conocidas en la materia, y plasma combinado normal como patrón, o la muestra. En este ensayo, una unidad de afinidad se define como la cantidad presente en un mililitro de plasma combinado normal. Además, se puede llevar a cabo un ensayo basado en la actividad biológica sobre la capacidad del Factor IX para reducir el tiempo de coagulación del plasma de pacientes deficientes en Factor IX a normales, tal como se describe en, por ejemplo, Proctor y Rapaport (1961, Amer. J. Clin. Path. 36: 212).

VII. COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un polímero hidrosoluble de origen no natural y un péptido glucosilado o sin glucosilar. El polímero se conjuga con el péptido mediante un grupo de enlace de glucosilo intacto interpuesto entre, y unido por enlace covalente, tanto al péptido como al polímero, al resto terapéutico o a la biomolécula.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para su uso en una diversidad de sistemas de administración de fármacos. Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. (1985). Para una breve revisión de los procedimientos para la administración de fármacos, véase, Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier manera de administración apropiada, incluyendo por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo comprende preferentemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se pueden usar cualquiera de los vehículos mencionados anteriormente o un vehículo sólido, tales como, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, y carbonato de magnesio. También se pueden usar microesferas biodegradables (*por ejemplo*, polilactato, poliglucolato) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Las microesferas biodegradables adecuadas se desvelan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.897.268 y Nº 5.075.109.

Comúnmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, *por ejemplo*, por vía intravenosa. De este modo, la invención proporciona composiciones para su administración parenteral que comprenden el compuesto disuelto o suspendido en un vehículo aceptable, preferentemente, un vehículo acuoso, *por ejemplo*, agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como el ajuste del pH y agentes de tamponamiento, agentes para el ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden filtrar de forma estéril. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso como tal, o liofilizadas, siendo la

preparación liofilizada combinada con un vehículo acuoso estéril antes de su administración. El pH de las preparaciones típicamente estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9 y lo más preferentemente entre 7 y 8.

En algunas realizaciones, los péptidos de la invención se pueden incorporar en liposomas formados a partir de lípidos convencionales formadores de vesículas. Una diversidad de procedimientos está disponible para preparar liposomas, como se describe, *por ejemplo*, en Szoka y col., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), Patentes de Estados Unidos N° 4.235.871, N° 4.501.728 y N° 4.837.028. La dirección de liposomas que usan una diversidad de agentes de direccionamiento (por ejemplo, los galactósidos de sialilo de la invención) es bien conocida en la técnica (véanse, *por ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos N° 4.957.773 y N° 4.603.044).

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

Los mecanismos de direccionamiento generalmente necesitan que los agentes de direccionamiento se puedan colocar en la superficie del liposoma de tal manera que los restos diana estén disponibles para la interacción con la diana, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Los hidratos de carbono de la invención se pueden unir a una molécula de lípido antes de que se forme el liposoma usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia (*por ejemplo*, alquilación o acilación de un grupo hidroxilo presente en el hidrato de carbono con un haluro de alquilo de cadena larga o con un ácido graso, respectivamente). Como alternativa, el liposoma se puede formar de tal manera que una porción del conector se incorpora primero en la membrana en el momento de la formación de la membrana. La porción del conector debe tener una porción lipofílica, que está firmemente embebida y anclada en la membrana. También debe tener una porción reactiva, que está químicamente disponible en la superficie acuosa del liposoma. La porción reactiva está seleccionada de modo que será químicamente adecuada para formar un enlace químico estable con un agente de direccionamiento o con un hidrato de carbono, que se añade posteriormente. En algunos casos, es posible unir el agente diana a la molécula del conector directamente, pero en la mayoría de los casos es más adecuado usar una tercera molécula que actúe como un puente químico, uniendo de este modo la molécula conectora que está en la membrana con el agente diana o con el hidrato de carbono que está extendido, tridimensionalmente, fuera de la superficie de la vesícula. Los intervalos de dosificación para la administración de los péptidos de la invención son aquellos lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado en los que los síntomas de la respuesta inmune muestran algún grado de inhibición. La dosificación no debería ser demasiado elevada como para causar efectos secundarios. Generalmente, la dosificación variará con la edad, condición, sexo y extensión de la enfermedad en el animal y lo puede determinar alguien experto en la materia. La dosificación la puede ajustar el médico individual en el caso de cualquier contraindicación.

Se pueden usar procedimientos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción. Las preparaciones de liberación controlada se pueden conseguir mediante el uso de polímeros para conjugar, formar complejos o adsorber el péptido. La administración controlada se puede ejercer mediante la selección de macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, poliamino carboximetilcelulosa, y sulfato de protamina) y mediante la concentración de macromoléculas así como los procedimientos de incorporación para controlar la liberación. Otro procedimiento posible para controlar la duración de la acción mediante preparaciones de liberación controlada es incorporar el péptido en partículas de un material polimérico tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli (ácido láctico) o copolímeros de vinilacetato de etileno.

Para proteger los péptidos de la unión con proteínas plasmáticas, es preferente que los péptidos estén atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, o en sistemas coloidales de administración de fármacos, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas o en macroemulsiones. Dichas enseñanzas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences (16ª Ed., A. Oslo, ed., Mack, Easton, Pa., 1980).

Los péptidos de la invención son muy adecuados para su uso en sistemas de administración de fármacos dirigibles tales como polímeros sintéticos o naturales en forma de complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, o perlas, y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, liposomas, y eritrocitos liberados. Estos sistemas se conocen colectivamente como sistemas coloidales de administración de fármacos. Típicamente, dichas partículas coloidales que contienen los péptidos dispersos tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm-2 μ m. El tamaño de las partículas coloidales les permite su administración por vía intravenosa tal como por inyección, o en forma de un aerosol. Los materiales usados en la preparación de sistemas coloidales son típicamente esterilizables mediante esterilización por filtración, no tóxicos, y biodegradables, por ejemplo albúmina, etilcelulosa, caseína, gelatina, lecitina, fosfolípidos, y aceite de soja. Los sistemas coloidales poliméricos se preparan mediante un procedimiento similar a la coacervación de microencapsulación.

En una realización ejemplar, los péptidos son componentes de un liposoma, usado como un sistema de administración dirigida. Cuando los fosfolípidos se dispersan suavemente en medios acuosos, se hinchan, se hidratan, y forman espontáneamente vesículas multilaminares de bicapas concéntricas con fases de medios acuosos que separan la bicapa lipídica. Dichos sistemas normalmente se denominan liposomas multilaminares o

vesículas multilaminares (MLV) y tienen diámetros que varían de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 4 µm. Cuando se sonican las MLV, se forman pequeñas vesículas unilaminares (SUVS) con diámetros en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nm, que contienen una solución acuosa en el núcleo de la SUV.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, y fosfatidiletanolamina. Son particularmente útiles los diacilfosfatidilgliceroles, en los que el resto lipídico contiene 14-18 átomos de carbono, particularmente 16-18 átomos de carbono, y están saturados. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y distearoilfosfatidilcolina de huevo.

En la preparación de liposomas que contienen los péptidos de la invención, se deberían considerar variables tales como la eficacia de encapsulación del péptido, labilidad del péptido, homogeneidad y tamaño de la población resultante de liposomas, relación de péptido a lípido, inestabilidad a la permeabilidad de la preparación, y aceptabilidad farmacéutica de la formulación. Szoka, y col, Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 9: 467 (1980); Deamer, y col., en LIPOSOMES, Marcel Dekker, Nueva York, 1983, 27: Hope, y col., Chem. Phys. Lipids, 40: 89 (1986)).

El sistema de administración dirigida que contiene los péptidos de la invención se puede administrar a un huésped en una diversidad de formas, particularmente a un huésped mamífero, tal como por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravascular, por vía tópica, por vía intracavitaria, por vía transdérmica, por vía intranasal, y por inhalación. La concentración de los péptidos variará con la aplicación en particular, la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración, o similares. El péptido de sistema encapsulado para su administración dirigida se puede proporcionar en una formulación que comprende otros compuestos apropiados y un medio acuoso fisiológicamente aceptable, por ejemplo, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, o similares.

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

Ejemplos experimentales

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes Ejemplos. Estos Ejemplos se proporcionan solamente con fines de ilustración y la invención no se debería interpretar de ninguna manera como limitada a estos Ejemplos, sino que más bien se debería interpretar que incluye cualquiera y todas las variaciones que sean evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

A. Glucosilación

Los materiales y los procedimientos usados en los experimentos presentados en este Ejemplo se describen a continuación.

1. Sialilación y Fucosilación de TP10 (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone la preparación de TP10 con restos de sialil Lewis X y el análisis de la actividad biológica potenciada.

La interrupción del flujo sanguíneo al cerebro, incluso durante un breve periodo de tiempo, puede desencadenar episodios inflamatorios dentro de la microvasculatura cerebral que puede empeorar el daño tisular cerebral. El daño al tejido que se acumula se amplifica mediante la activación de las cascadas tanto de inflamación como de coagulación. En un modelo murino de apoplejía, el aumento de la expresión de P-selectina e ICAM-1 promueve el reclutamiento de leucocitos. sCR1 es una forma recombinante del dominio extracelular del Receptor 1 del Complemento (CR-1). sCR-1 es un potente inhibidor de la activación del complemento. sCR1sLe^x (CD20) es una forma alternativamente glucosilada de sCR1 que se glucosila alternativamente para mostrar antígeno de Lewis^x sialilado. Anteriormente, se encontró que sCR-1sLe^x, que se expresó y se glucosiló *in vivo* en células CHO Lec11 sometidas a ingeniería genética, localizaba correctamente los microvasos cerebrales isquémicos y las neuronas que expresan C1q, inhibiendo de este modo los neutrófilos y la acumulación de plaquetas y reduciendo los volúmenes del infarto cerebral (Huang y col., 1999, Science 285: 595-599). En Este ejemplo, sCR1sLe^x que se preparó *in vitro* mediante la remodelación de glucanos, exhibió actividad biológica potenciada similar a la de sCRsLe^x glucosilado *in vivo*.

El péptido TP10 se expresó en células CHO DUK B11. Esta línea celular CHO produce el péptido TP10 con la glucosilación típica de las células CHO, con muchos, pero no todos los glucanos protegidos con ácido siálico.

Sialilación de 66 mg de TP10. TP10 (2,5 mg/ml), CMPSA (5 mM), y ST3Gal3 (0,1 U/ml) se incubaron a 32 °C en Tris 50 mM, NaCl 0,15M, azida sódica al 0,05%, pH 7,2 durante 48 horas. El ácido siálico CMP radiomarcado se añadió a una pequeña alícuota para controlar la incorporación. TP10 se separó a partir de azúcar de nucleótidos por

HPLC SEC. Las muestras analizadas a las 24 horas y 48 horas demostraron que la reacción se completó después de 24 horas. La mezcla de reacción se congeló después. Los productos de reacción se sometieron a análisis por Electroforesis de Hidratos de Carbono Asistida por Fluoróforos (FACE[®]; Glyko, Inc, Novato CA) (Figura 86).

Estudios farmacocinéticos. Se adquirieron ratas con una cánula en la vena yugular. Se administraron 10 mg/kg de péptido TP 10 de sialilación previa o de sialilación posterior mediante una inyección en la vena de la cola a tres ratas para cada tratamiento (n = 3). Se tomaron catorce muestras de sangre de 0 a 50 horas. La concentración en la sangre del péptido TP10 de sialilación posterior fue mayor que la que la del TP10 de sialilación previa en cada punto temporal pasadas 0 horas (Figura 87). La adición de ácido siálico duplicó el área bajo la curva de concentración de plasma-tiempo (AUC) de la curva farmacocinética en comparación con el material de partida (Figura 88).

Fucosilación de TP10 sialilado. 10 ml (25 mg de TP10) de la mezcla de sialilación anterior se descongelaron, y se añadió GDP-fucosa a 5 mM, MnCl₂ a 5 mM, y FTVI (fucosiltransferasa VI) a 0,05 U/ml. La reacción se incubó a 32 °C durante 48 horas. Los productos de reacción se sometieron a análisis por Electroforesis de Hidratos de Carbono Asistida por Fluoróforos (FACE[®]; Glyko, Inc, Novato CA) (Figura 89). A una pequeña alícuota, se añadió GDP-fucosa radiomarcada para controlar la incorporación. TP10 se separó a partir de azúcar de nucleótidos por HPLC SEC. Las muestras analizadas a las 24 horas y 48 horas demostraron que la reacción se completó a las 24 horas. Un ensayo *in vitro* que mide la unión a E-selectina indica que la adición de fucosa puede producir un ligando de E-selectina biológicamente activo (Figura 90).

2. Sialilación de Glucoproteínas Recombinantes (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone la preparación de formas sialiladas de varios péptidos recombinantes.

Sialilación de Glucoproteínas Recombinantes Usando ST3Gal III. Se examinó la capacidad de varias glucoproteínas para ser sialiladas mediante ST3Gal III recombinante de rata. Para cada una de estas glucoproteínas, la sialilación será una etapa valiosa del procedimiento en el desarrollo de las respectivas glucoproteínas como productos comerciales.

Condiciones de Reacción. Las condiciones de reacción fueron como se resumen en la Tabla 9. Las reacciones de sialiltransferasa se realizaron durante 24 horas a una temperatura entre temperatura ambiente y 37 °C. Se estableció el grado de sialilación mediante la determinación de la cantidad de ¹⁴C-NeuAc incorporada en los oligosacáridos unidos a glucoproteína. Véase la Tabla 9 para las condiciones de reacción para cada proteína.

Tabla 9. Condiciones de reacción.

Proteína	Fuente	Proteína Total (mg)	Conc. Proteína (mg/ml)	ST (mU/ml)	ST/Proteína (mU/mg)	CMP-NeuAc de "ciclo" ¹
ATIII	Genzima Transgenics	8,6	4,3	210	48	ciclo
ATIII	Genzima Transgenics	860	403	53	12	ciclo
Asialo-fetuína	Sigma	0,4	105	20	13	10 mM
asialo-AAAT	PPL	0,4	0,5	20	20	20 mM

¹ "Ciclo" se refiere a la generación de CMP-NeuAc "in situ" que usa enzimáticamente condiciones convencionales como se describe en la memoria descriptiva (NeuAc 20 mM y CMP2 mM). El tampón fue HEPES 0,1 M, pH 7,5.

Los resultados presentados en la Tabla 10 demuestran que se consiguió un grado notable de sialilación en cada caso, a pesar de los bajos niveles de enzima usada. Básicamente, se obtuvo la sialilación completa, en base a la estimación de la galactosa terminal disponible. La Tabla 10 muestra los resultados de las reacciones de sialilación. La cantidad de enzima usada por cada mg de proteína (mU/mg) como una base de comparación para los diversos estudios. En varios de los ejemplos que se muestran, solamente se necesitaron 7-13 mU de ST3Gal III por cada mg de proteína para dar básicamente la sialilación completa después de 24 horas.

Tabla 10. Resultados analíticos

Proteína	Fuente	Gal Terminal ¹ mol/mol	NeuAc Incorp. ² mol/mol	% de Rxn ³	Otra caracterización
ATIII ⁴	Genzima Transgenics	102	104	117	Ninguna
ATIII ⁴	Genzima Transgenics	102	1.3	108	SDS-geles: pureza de la proteína FAC: glucoformas de hidratos de carbono
Asialo-fetuína	Sigma	802	905	116	Ninguna
asialo-AAAT ⁵	PPL	7	7,0	100	SDS-geles: pureza de la proteína

¹ Contenido de Gal (expuesto) terminal en los oligosacáridos unidos a N determinado por el proveedor, o a partir de los valores de las bibliografías (fetuína, asialo-AAAT).

² NeuAc incorporada determinada mediante la incorporación de ¹⁴C-NeuAc después de la separación a partir de precursores libres radiomarcados por filtración en gel.

³ El % de Rxn se refiere a un % de finalización de la reacción en base al contenido de Gal terminal como un máximo teórico.

⁴ Antitrombina III.

⁵ α 1 Antitripsina.

Estos resultados están en marcado contraste con los indicados en estudios detallados con ST6Gal I bovina en los que menos de 50 mU/mg de proteína dieran menos de un 50% de sialilación, y 1070 mU/mg de proteína dieron aproximadamente un 85-90% de sialilación en 24 horas. Paulson y col. (1977) J. Biol. Chem. 252: 2363-2371; Paulson y col. (1978) J. Biol. Chem. 253: 5617-5624. Un estudio de sialiltransferasas α 2,3 y α 2,6 de rata por otro grupo reveló que la sialilación completa de asialo-AGP necesitaba concentraciones de enzima de 150-250 mU/mg de proteína (Weinstein y col. (1982) J. Biol. Chem. 257: 13845-13853). Estos estudios anteriores tomados en conjunto sugieren que la sialiltransferasa ST6Gal I necesita una cantidad mayor que 50 mU/mg y hasta 150 mU/mg para conseguir la sialilación completa.

Este ejemplo demuestra que la sialilación de las glucoproteínas recombinantes que usan sialiltransferasa ST3 Gal III necesita mucha menos enzima de lo esperado. Para una reacción a escala de un kilogramo, se necesitarían aproximadamente 7.000 unidades de sialiltransferasa ST3Gal III, en lugar de las 100.000-150.000 unidades que indicaban los estudios anteriores. La purificación de estas enzimas a partir de fuentes naturales es prohibitiva, con rendimientos de sólo 1-10 unidades para una preparación a gran escala después de 1-2 meses de trabajo. Suponiendo que las sialiltransferasas tanto ST6Gal I como ST3Gal III se producen como sialil-transferasas recombinantes, consiguiendo los mismos niveles de expresión de las dos enzimas, se necesitaría una escala de fermentación 14-21 veces mayor (o superior) para la sialiltransferasa ST6Gal I con respecto a la sialiltransferasa ST3Gal III. Para la sialiltransferasa ST6Gal I, se han indicado niveles de expresión de 0,3 U/l en levaduras (Borsig y col. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 210: 14-20). Se han conseguido niveles de expresión de 1000 U/litro de sialiltransferasa ST3 Gal III en *Aspergillus niger*. A los niveles actuales de expresión se necesitarían 300-450.000 litros de fermentación de levadura para producir suficiente enzima para la sialilación de 1 kg de la glucoproteína usando la sialiltransferasa ST6Gal I. En contraste, se necesitarían menos de 10 litros de fermentación de *Aspergillus niger* para la sialilación de 1 kg de glucoproteína usando la sialiltransferasa ST3Gal III. Por lo tanto, la capacidad de fermentación necesaria para producir la sialiltransferasa ST3Gal III para una reacción de sialilación a gran escala sería 10-100 veces menor que la necesaria para producir la ST6Gal I; el coste de producción de la sialiltransferasa se reduciría proporcionalmente.

3. Fucosilación para crear Sialil Lewis X (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone la preparación de Activador del Plasminógeno de tipo Tisular (TPA) con antígeno de sialil Lewis X unido a N.

Sialilación. El TPA expresado en células de mamíferos a menudo contiene una gran parte de glucanos que terminan en ácido siálico, pero para asegurar la sialilación completa, sería beneficioso realizar primero una sialilación *in vitro*. Se incubaba TPA en un tampón adecuado (más preferentemente a pH entre 5,5 y 9, por ejemplo solución salina tamponada con Tris, pH 7,2) con ácido CMP siálico y sialiltransferasa durante un tiempo suficiente para convertir cualquier glucano que carece de ácido siálico en las especies sialiladas. Las condiciones típicas serían 1 mg/ml de TPA, ácido CMP siálico 3 mM, 0,02 U/ml de ST3Gal3, 32 °C durante 24 horas. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o mediante la inclusión de azida sódica al 0,02%. La concentración

de TPA está más preferentemente en el intervalo de 0,1 mg/ml hasta el límite de solubilidad del péptido. La concentración de CMP-AS debería ser suficiente para que haya exceso sobre los sitios disponibles, y puede variar de 50 μ M hasta 50 mM, y la temperatura de 2 °C hasta 40 °C. El tiempo necesario para completar la reacción dependerá de la temperatura, las cantidades relativas de enzima a sustrato aceptor, la concentración de sustrato donador, y el pH. Otras sialiltransferasas que pueden ser capaces de añadir ácido siálico en la unión 2,3 incluyen ST3Gal4; también se podrían usar transferasas microbianas.

Fucosilación. Las condiciones típicas para la fucosilación serían 1 mg/ml de TPA, GDP-fucosa 3 mM, 0,02 U/ml de FTVI, MnCl₂ 5 mM, 32 °C durante 24 h en solución salina tamponada con Tris. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o mediante la inclusión de azida sódica al 0,02%. La concentración de TPA está más preferentemente en el intervalo de 0,1 mg/ml hasta el límite de solubilidad del péptido. La concentración de GDP-fucosa debería ser suficiente para que haya exceso en los sitios disponibles, y podría variar desde 50 μ M hasta 50 mM, y la temperatura de 2 °C hasta 40 °C. El tiempo necesario para completar la reacción dependerá de la temperatura, las cantidades relativas de enzima a sustrato aceptor, la concentración de sustrato donador, y el pH. Otras fucosiltransferasas que pueden ser capaces de preparar sialil Lewis x incluyen FTVII, FTV, FTIII, así como que también se podrían usar transferasas microbianas.

4. Reducción de la estructura del núcleo de alta manosa a tri-manosa: Activador del plasminógeno de tipo Tejido producido en CHO (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone la preparación de Activador del Plasminógeno de tipo Tejido con un núcleo de trimanosa por reducción a partir de un glucano de alta manosa.

El activador del plasminógeno de tipo tejido (TPA) se produce actualmente en células de ovario de hámster chino (CHO) y contiene una baja cantidad de oligosacárido unido a N de alta manosa. Las manosas se pueden reducir usando una diversidad de manosidasas específicas. La primera etapa es generar Man5GlcNAc2(Fuc0-1) a partir de Man9GlcNAc2(Fuc0-1). Esto se puede hacer usando manosidasa I. Después se usa GlcNAcT1 (GlcNAc transferasa I) para preparar GlcNAc1Man5GlcNAc2(Fuc0-1) o se usa Manosidasa III para preparar Man3GlcNAc2(Fuc0-1). A partir de Man3GlcNAc2(Fuc0-1), se puede producir GlcNAc1Man3-GlcNAc2(Fuc0-1) usando GlcNAcT1 o a partir de GlcNAc1Man5GlcNAc2(Fuc0-1), se puede producir GlcNAc1Man3GlcNAc2 (Fuc0-1) usando Manosidasa II. Después, GlcNAc1Man3GlcNAc2(Fuc0-1) se convierte en GlcNAc2Man-3GlcNAc2(Fuc0-1) usando GlcNAcTransferasa II (GlcNAcTII). Los dos restos de GlcNAc terminal después se galactosilan usando GalTI y después se sialilan con AS-PEG usando ST3GalIII.

A la inversa, se puede producir TPA en sistemas de levaduras o fúngicos. Se necesitaría un procesamiento similar para el material derivado de hongos.

5. Adición de GlcNAc a EPO (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone la adición de un resto de GlcNAc sobre un núcleo de tri-manosilo.

Adición de GlcNAc a EPO. EPO se expresó en células de insecto SF-9 y se purificó (Protein Sciences, Meriden, CT). La conversión de un 100% a partir de la glucoforma de tri-manosilo de Epo al "núcleo de tri-manosilo + 2 GlcNAc" (Pico 1, P1 en la Figura 91) se consiguió en 24 horas de incubación a 32 °C con 100 mU/ml de GlcNAcT-I y 100 mU/ml de GlcNAcT-II en las siguientes concentraciones finales de reacción:

MES 100 mM a pH 6,5, o Tris 100 mM a pH 7,5

UDP-GlcNAc 5 mM

MnCl₂ 20 mM

100 mU/ml de GlcNAcT-I

100 mU/ml de GlcNAcT-II

1 mg/ml de EPO (purificada, expresada en células Sf9, adquirida en Protein Sciences).

Análisis de glucoformas. El presente ensayo es una ligera modificación en K-R Anumula y ST Dhume, Glycobiology 8 (1998) 685-69. N-glucanos liberados por N-glicanasa (PNGasa) se marcaron reductoramente con ácido antranílico. Los N-glucanos aaminados reductoramente se inyectaron en una amino columna Shodex Asahipak NH2P-50 4D (4,6 mm x 150 mm). Se usaron dos disolventes para la separación: A) ácido acético al 5% (v/v), tetrahidrofurano al 1%, y trietilamina al 3% en agua, y B) ácido acético al 2% y tetrahidrofurano al 1% en acetonitrilo. La columna después se eluyó isocráticamente con B al 70% durante 2,5 minutos, seguido de un gradiente lineal durante un periodo de 97,5 minutos yendo de B del 70 al 5% y una elución isocrática final con B al 5% durante 15 minutos. Los picos eluidos se detectaron usando detección por fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 230 nm y de emisión de 420 nm.

En estas condiciones, el núcleo de trimanosilo presentaba un tiempo de retención de 22,3 minutos, y el producto de la reacción de GnT presenta un tiempo de retención de 26,3 minutos. El material de partida fue exclusivamente núcleo de trimanosilo con núcleo de GlcNAc (Figura 91).

6. Remodelación de N-glucanos de alta manosa para hibridar y formar complejos de N-glucanos: RNasa pancreática bovina (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone la preparación de RNasa de páncreas bovino con N-glucanos híbridos o complejos. Los glucanos de alta manosa unidos a la RNasa se digieren enzimáticamente y se elaboran para crear glucanos híbridos unidos a N. Adicionalmente, los glucanos unidos a N de alta manosa de la RNasa se digieren enzimáticamente y se elaboran con más detalle para crear glucanos complejos unidos a N.

Las estructuras de alta manosa de oligosacáridos unidos a N en glucopéptidos se pueden modificar a formas híbridas o complejas usando la combinación de α -manosidasas y glucosiltransferasas. Este ejemplo resume los resultados de dichos esfuerzos usando un N-Glucano sencillo como un sustrato modelo.

La ribonucleasa B (RNasa B) purificada a partir de páncreas bovino (Sigma) es un glucopéptido que consiste en 124 restos de aminoácido. Tiene un único sitio de N-glucosilación potencial modificado con estructuras de alta manosa. Debido a su simplicidad y su bajo peso molecular (13,7 kDa a 15,5 kDa), la ribonucleasa B es un buen candidato para demostrar la viabilidad de la remodelación de N-Glucano a partir de estructuras de alta manosa para hibridar para formar complejos de oligosacáridos unidos a N. El espectro de MALDI-TOF de la RNasaB y el perfil por HPLC para los oligosacáridos escindidos a partir de RNasaB mediante N-Glicanasa (Figura 92) indicaron que, aparte de una pequeña porción del péptido no modificada, la mayoría de los sitios de N-glucosilación del péptido se modifican con oligosacáridos de alta manosa que consisten en 5 a 9 restos de manosa.

Conversión de N-Glucanos de alta manosa en N-Glucanos híbridos. N-Glucanos de alta manosa se convirtieron en N-Glucanos híbridos usando la combinación de α 1,2-manosidasa, GlcNAcT-I (β -1,2-N-acetil glucosaminil transferasa), GalT-I (β 1,4-galactosiltransferasa) y α 2,3-sialiltransferasa /o α 2,6-sialiltransferasa como se muestra en la Figura 93.

Como un ejemplo, las estructuras de alta manosa en la RNasaB se convirtieron satisfactoriamente en estructuras híbridas.

Man₅GlcNAc₂-R se obtuvo a partir de Man₅₋₉GlcNAc₂-R catalizada mediante una sola α 1,2-manosidasa clonada a partir de *Trichoderma reesei* (Figura 94). La RNasa B (1 g, aproximadamente 67 μ mol) se incubó a 30 °C durante 45 h con 15 mU de la α 1,2-manosidasa de *T. reesei* recombinante en tampón MES (50 mM, pH 6,5) en un volumen total de 10 ml. Las estructuras Man₆₋₉GlcNAc₂-proteína se han convertido satisfactoriamente en Man₅GlcNAc₂-proteína con alta eficacia mediante la manosidasa recombinante.

Como alternativa, Man₅GlcNAc₂-R se obtuvo a partir de Man₅₋₉GlcNAc₂-R catalizada mediante una sola α 1,2-manosidasa purificada a partir de *Aspergillus saitoi* (Figura 95). RNasa B (40 μ g, aproximadamente 2,7 nmol) se incubó a 37 °C durante 42,5 h con 25 μ U de la α 1,2-manosidasa de *A. saitoi* comercial (Glyko o CalBioChem) en tampón NaOAc (100 mM, pH 5,0) en un volumen total de 20 μ l. Las estructuras de Man₆₋₉GlcNAc₂-proteína se convirtieron satisfactoriamente en Man₅GlcNAc₂-proteína mediante la manosidasa disponible en el mercado. Sin embargo, un nuevo pico que corresponde con la GlcNAc-proteína aparece en el espectro, indicando la posible contaminación de la endoglucosidasa H en la preparación. Aunque se necesitaron varias alfa-manosidasas de mamífero para conseguir esta etapa, la α 1,2-manosidasa fúngica fue muy eficaz para retirar todos los restos de manosa unidos en α 1,2.

A continuación, GlcNAcT-I añadió un resto de GlcNAc a la Man₅GlcNAc₂-R (Figura 96). La mezcla de reacción después de la reacción de la α 1,2-manosidasa de *T. reesei* que contenía RNasa B (600 μ g, aproximadamente 40 nmol) se incubó con GlcNAcT-I recombinante no purificada (34 mU) en tampón MES (50 mM, pH 6,5) que contenía MnCl₂ (20 mM) y UDP-GlcNAc (5 mM) en un volumen total de 400 μ l. a 37 °C durante 42 h. Un resto de GlcNAc se añadió cuantitativamente a Man₅GlcNAc₂-proteína mediante la GlcNAcT-I recombinante.

Después se añadió un resto de Gal usando GalT 1 (Figura 97). La mezcla de reacción después de la reacción de GnT-I que contenía RNasa B (120 μ g, aproximadamente 8 nmol) se incubó a 37 °C durante 20 h con 3,3 mU de la GalT-1 recombinante en tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7,3) que contenía UDP-Gal (7,5 mM) y MnCl₂ (20 mM) en un volumen total de 100 μ l. Se añadió un resto de Gal a aproximadamente un 98% de la GlcNAc-Man₅GlcNAc₂-proteína mediante la GalT 1 recombinante.

La siguiente etapa fue la adición de un ácido siálico usando una α 2,3-sialiltransferasa o una α 2,6-sialiltransferasa (Figura 98). Como un ejemplo, se usó ST3Gal III, una α 2,3-sialiltransferasa. La mezcla de reacción después de la reacción de la GalT-1 que contenía RNasa B (13 μ g, aproximadamente 0,87 nmol) se incubó a 37 °C durante 16 h con 8,9 mU de ST3Gal III recombinante en tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7,3) que contenía CMP-Ácido siálico (5 mM) y MnCl₂ (20 mM) en un volumen total de 20 μ l. Se añadió un resto de ácido siálico a aproximadamente un 90% de la Gal-GlcNAc-Man₅GlcNAc₂-proteína mediante ST3Gal III recombinante usando CMP-AS como el donador. El rendimiento se puede mejorar adicionalmente ajustando las condiciones de reacción.

Por conveniencia, no fue necesaria etapa de purificación o de diálisis después de cada reacción que se ha descrito anteriormente. De forma más interesante, GalT 1 y ST3Gal III se pueden combinar en una reacción en un solo recipiente. Se obtuvieron rendimientos similares en comparación con las reacciones separadas. La mezcla de

reacción después de la reacción de GlcNAcT-I que contenía RNasa B (60 µg, aproximadamente 4 nmol) se incubó a 37° C durante 20 h con 1,7 mU de GalT 1 recombinante, 9,8 mU de ST3Gal III recombinante en tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7,3) que contenía UDP-Gal (7,5 mM), CMP-ácido siálico (5 mM) y MnCl₂ (20 mM) en un volumen total de 60 µl.

Como se muestra en la Figura 99, AS-PEG (10 kDa) se añadió satisfactoriamente a la RNasa B. La mezcla de reacción después de la reacción de GalT-1 que contenía RNasa B (6,7 µg, aproximadamente 0,45 nmol) se dializó frente a H₂O durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubó a 37 °C durante 15,5 horas con 55 mU de la ST3Gal III recombinante en tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,3) que contenía CMP-AS-PEG (10 kDa) (0,25 mM) y MnCl₂ (20 mM) en un volumen total de 20 µl. Los restos de ácido siálico modificado con PEG se añadieron satisfactoriamente al Gal-GlcNAc-Man₅GlcNAc₂-péptido mediante la ST3Gal III recombinante. El rendimiento se puede mejorar adicionalmente ajustando las condiciones de reacción.

Conversión de N-Glucanos de alta manosa en N-Glucanos complejos. Para conseguir esta conversión, se obtiene un compuesto intermedio de GlcNAcβ1,2Man₃GlcNAc₂-péptido. Como se muestra en la Figura 100, existen al menos cuatro rutas factibles para realizar la reacción a partir de Man₅GlcNAc₂-péptido hasta este compuesto intermedio:

Ruta I: El Man₅GlcNAc₂-péptido producido mediante la α 1,2 manosidasa fúngica es un sustrato de GlcNAc transferasa I (GlcNAcT-I, enzima 2) que añade una GlcNAc. Los restos de manosa terminal unidos a α1,3- y α1,6- del GlcNAcMan₅GlcNAc₂-péptido se retiran mediante α-manosidasa II de Golgi (ManII, enzima 5). Esta ruta es una parte de la secuencia natural para el procesamiento de oligosacáridos unidos a N realizada en organismos superiores.

Ruta II: Dos restos de manosa se retiran primero mediante una α-manosidasa (enzima 6), después se añade una GlcNAc mediante GlcNAcT-1 (enzima 2). Aparte de su aceptor natural Man₅GlcNAc₂-R, GlcNAcT-I también puede reconocer a Man₃GlcNAc₂-R como su sustrato y añadir una GlcNAc a la estructura del núcleo de manosa para formar GlcNAcMan₃GlcNAc₂-péptido.

Ruta III: La manosa unida a α1,6 se retira mediante una α1,6-manosidasa, seguido de la adición de GlcNAc mediante GlcNAcT-1 y retirada de la manosa terminal unida a α1,3 mediante una α1,3-manosidasa. A partir de los datos experimentales obtenidos, GlcNAcT-I puede reconocer este Man₄GlcNAc₂-péptido como aceptor y añadir un resto de GlcNAc para formar GlcNAcMan₄GlcNAc₂-péptido.

Ruta IV: De forma similar a la Ruta III, la manosa unida a α1,3 se retira mediante una α1,3-manosidasa, seguido de reacción de GlcNAcT-I. Después la manosa terminal unida a α1,6 se puede retirar mediante una α1,6-manosidasa.

Después de la función de GlcNAcT-I (responsable de la adición de la GlcNAc unida a β1,2 a la α1,3-manosa en el núcleo de manosa) y GlcNAcT-II (responsable de la adición de una segunda GlcNAc unida a β1,2 a la α1,6-manosa en el núcleo de manosa), el GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-péptido se puede procesar mediante GalT 1 y sialiltransferasa para formar N-Glucanos biantenarios complejos. Otras GlcNAc transferasas tales como GlcNAcT-IV, GlcNAcT-V, y/o GlcNAcT-VI (Figura 100 y Figura 101) también pueden glucosilar el GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-péptido. La glucosilación adicional mediante GalT 1 y sialiltransferasas formarán N-glucanos poliantenarios complejos. La enzima GlcNAcT-III cataliza la inserción de una GlcNAc bisectriz, previniendo de este modo las acciones de ManII, GlcNAcT-II, GlcNAcT-IV y GlcNAcT-V.

7. Preparación de EPO con glucanos complejos poliantenarios (no forma parte de la invención).

Este ejemplo expone la preparación de EPO biantenaria, PEGilada, y EPO sialilada, triantenaria a partir de EPO expresada en células de insectos.

La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) a partir del sistema de expresión de baculovirus/Sf9 (Protein Sciences Corp., Meriden, CT) se sometió a análisis de glucanos y los glucanos resultantes mostraron que eran el núcleo principal de trimanosilo con núcleo de fucosa, con un pequeño porcentaje de glucanos que también tenían una única GlcNAc (EPO 1).

Adición de N-acetilglucosamina con GnT-I y GnT-II. Dos lotes de rhEPO (1 mg/ml) se incubaron con GnT-I y GnT-II, UDP-glcNAc 5 mM; MnCl₂ 20 mM, y azida sódica al 0,02% en MES 100 mM a pH 6,5 a 32 °C durante 24h. El lote A contenía 20 mg de EPO, y 100 mU/ml de GnT-I y 60 mU/ml de GnT-II. El lote B contenía 41 mg de EPO, y 41 mU/ml de GnT-1 + 50 mU/ml de GnT-II. Después de la reacción, la muestra se desalinizó mediante filtración con gel (columnas PD 10, Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ).

Glucanos de EPO analizados mediante establecimiento de perfiles por 2-AA HPLC. Este ensayo es una ligera modificación en Anumula y Dhume, Glycobiology 8 (1998) 685-69. Los N-glucanos aminorados reductoramente se inyectaron en una amino columna Shodex Asahipak NH2P-50 4D (4,6 mm x 150 mm). Se usaron dos disolventes para la separación, A) ácido acético al 5% (v/v), tetrahidrofurano al 1%, y trietilamina al 3% en agua y B) ácido acético al 2% y tetrahidrofurano al 1% en acetonitrilo. La columna después se eluyó isocráticamente con B al 70% durante 2,5 min, seguido de un gradiente lineal durante un periodo de 100 min yendo del 70 al 5% de B, y una elución isocrática final con B al 5% durante 20 min. Se detectaron los picos eluidos usando detección por

fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 230 nm y de emisión de 420 nm. Los glucanos unidos a N no-sialilados entran en el intervalo de LC de 23-34 min, monosialilados de 34-42 min, disialilados de 42-52 min, trisialilados de 55-65 min y tetrasialilados de 68 -78 min.

- 5 El establecimiento de perfiles de glucanos por 2AA HPLC reveló que el lote A se convirtió en un 92% en una estructura biantenaria con dos GlcNAc (el equilibrio tenía un único GlcNAc. El lote B mostró un 97% de conversión al producto deseado (Figuras 102A y 102B).

- 10 **Introducción de una tercera rama antenaria con GnT-V.** EPO (1 mg/ml del lote B) a partir del producto de las reacciones de GnT-I y GnT-II, después de desalinizar en columnas PD-10 y posterior concentración, se incubó con 10 mU/ml de GnT-V y UDP-GlcNAc 5 mM en MES 100 mM a pH 6,5 que contenía $MnCl_2$ 5 mM y azida sódica al 0,02% a 32 °C durante 24 h. El análisis por 2AA HPLC demostró que la conversión se produjo con una eficacia de un 92% (Figura 103).

Después de desalinizar (PD-10) y concentrar, se añadió galactosa con rGalTI: EPO (1 mg/ml) se incubó con 0,1 U/ml de GalT1, UDP-galactosa 5 mM, $MnCl_2$ 5 mM a 32 °C durante 24 h.

- 15 **Análisis MALDI de N-glucanos aaminados reductoramente a partir de EPO.** Una pequeña alícuota de los N-glucanos liberados por PNGasa a partir de EPO que se había marcado reductoramente con ácido antranílico Se dializó durante 45 min en un filtro de membrana MF-Millipore (0,025 μ m de poro, 47 mm de diámetro), que estaba flotando en agua. La alícuota dializada se secó en una concentradora speedvac, se volvió a disolver en una pequeña cantidad de agua, y se mezcló con una solución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (10 g/l) disuelto en agua/acetonitrilo (50:50). La mezcla se secó sobre el objetivo y se analizó usando un espectrómetro de masas DE-Pro MALDI-TOF de Applied Biosystems funcionando en modo lineal/ió n negativo. Los oligosacáridos se asignaron en base a la relación de masa a carga observada y en la bibliografía precedente.

El análisis de los glucanos liberados por MALDI mostró que la galactosa se añadió cuantitativamente a todos los sitios disponibles (Figura 104). La EPO galactosilada a partir de lo anterior se purificó después mediante filtración en gel en una columna Superdex 1,6/60 en Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 6.

- 25 **Sialilación.** Después de concentrar y desalinizar (PD-10), 10 mg de EPO galactosilada (1 mg/ml) se incubó con ST3Gal3 (0,05 U/ml), y CMP-AS (3 mM) en Tris50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2 que contenía azida sódica al 0,02%. Una alícuota separada contenía CMP-AS radiomarcado. La marca resultante incorporada y la marca libre se separaron por cromatografía de exclusión por tamaño isocrática/HPLC a 0,5 ml/min en MeOH al 45%, TFA al 0,1% (columna de 7,8 mm x 30 cm, tamaño de partícula de 5 μ m, TSK G2000SW_{XL}, Toso Haas, Ansys Technologies Lake Forest, CA). Usando este procedimiento, se incorporaron un 12% de las cuentas (360 micromolar, a EPO 33 micromolar, o aproximadamente 10,9 moles/mol). Incorporación teórica (3 sitios unidos a N, tri-antenario) es aproximadamente 9 moles/mol. Estos tienen correspondencia dentro de los límites del procedimiento. En una reacción idéntica con ST6Gal1 en lugar de ST3Gal3, se incorporó un 5,7% de la radiomarca en la EPO galactosilada, o aproximadamente un 48% en comparación con ST3Gal3.

35 **B. GlucoPEGilación**

8. Preparación de CMP-AS-PEG

Este ejemplo expone la preparación de CMP-AS-PEG.

- 40 **Preparación de 2-(benciloxicarboxamido)-glicilamida-2-desoxi-D-manopiranos.** Se añadió éster de N-benciloxicarbonil-glicil-N-hidroxisuccinimida (3,125 g, 10,2 mmol) a una solución que contenía D-manosamina-HCl (2 g, 9,3 mmol) y trietilamina (1,42 ml, 10,2 mmol) disuelta en MeOH (10 ml) y H₂O (6 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y se concentró usando evaporación rotatoria. La cromatografía (sílice, MeOH/CH₂Cl₂ al 10%) produjo 1,71 g (rendimiento de un 50%) de producto en forma de un sólido de color blanco: R_f = 0,62 (sílice; CHCl₃:MeOH:H₂O, 6/4/1); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ 3,24-3,27 (m, 2H), 3,44 (t, 1H), 3,55 (t, 1H), 3,63-3,66 (m, 1H), 3,76-3,90 (m, 6H), 3,91 (s, 2H), 4,0 (dd, 2 H), 4,28 (d, 1H, J = 4,4), 4,41 (d, 1H, J = 3,2), 5,03 (s, 1H), 5,10 (m, 3H), 7,29-7,38 (m, 10H).

- 50 **Preparación de 5-(N-benciloxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopirano suronato.** 2-(N-Benciloxicarboxamido) glicilamida-2-desoxi-D-manopiranos (1,59 g, 4,3 mmol) se disolvió en una solución de HEPES 0,1 M (12 ml, pH 7,5) y piruvato sódico (4,73 g, 43 mmol). Ácido neuramínico aldolasa (540 U de enzima en 45 ml de solución tamponada con fosfato 10 mM que contenía NaCl 0,1 M a pH 6,9) y la mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 24 h. La mezcla de reacción después se centrifugó y el sobrenadante se cromatografió (sílice C18, gradiente de H₂O (100%) a MeOH al 30%/agua). Las fracciones apropiadas se combinaron, se concentraron y el residuo se cromatografió (sílice, gradiente de MeOH al 10%/CH₂Cl₂ a CH₂Cl₂/MeOH/H₂O a 6/4/1). Las fracciones apropiadas se recogieron, se concentraron y el residuo se volvió a suspender en agua. Después de liofilización, se obtuvo el producto (1,67 g, rendimiento de un 87%) en forma de un sólido de color blanco: R_f = 0,26 (sílice, CHCl₃/MeOH/H₂O a 6/4/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,82 (t, 1H), 2,20 (m, 1H), 3,49 (d, 1H), 3,59 (dd, 1H), 3,67-3,86 (m, 2H), 3,87 (s, 2H), 8,89-4,05 (m, 3H), 5,16 (s, 2H), 7,45 (m, 5H).

Preparación de 5-glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato. 5-(N-Benciloxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (1,66 g, 3,6 mmol) se disolvió en 20 ml de agua/metanol al 50%. El matraz se evacuó repetidamente y se colocó en atmósfera de argón y después se añadió Pd al 10%/C (0,225 g). Tras la evacuación repetida, después se añadió hidrógeno (aproximadamente 1 atm) al matraz y la mezcla de reacción se agitó durante 18 h. La mezcla de reacción se filtró a través de celite, se concentró por evaporación rotatoria y se liofilizó para producir 1,24 g (rendimiento de un 100%) de producto en forma de un sólido de color blanco: $R_f = 0,25$ (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,83 (t, 1H, J = 9,9), 2,23 (dd, 1H, J = 12,9, 4,69), 3,51-3,70 (m, 2H), 3,61 (s, 2H), 3,75-3,84 (m, 2H), 3,95-4,06 (m, 3H).

Preparación de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-fluorenilmetoxi-carboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Una solución que contiene 5-glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (0,55 g, 1,70 mmol) disuelto en 20 ml de H₂O se añadió a una solución de Tris (1,38 g, 11,4 mmol), MgCl₂ 1 M (1,1 ml) y BSA (55 mg). El pH de la solución se ajustó a 8,8 con NaOH 1 M (2 ml) y se añadió CTP-2Na⁺ (2,23 g, 4,2 mmol). El pH de la mezcla de reacción se controló con un controlador de pH que administraba NaOH 1 M según la necesidad para mantener un pH 8,8. La proteína de fusión (sialiltransferasa/CMP-ácido neuramínico sintetasa) se añadió a la solución y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 días, se añadió una cantidad adicional de proteína de fusión y la reacción se agitó un periodo adicional de 40 horas. La mezcla de reacción se precipitó en EtOH y el precipitado se lavó 5 veces con EtOH frío para producir 2,3 gramos de un sólido de color blanco. Aproximadamente 1,0 g del producto en bruto se disolvió en 1,4 dioxano (4 ml), H₂O (4 ml) y NaHCO₃ saturado (3 ml) y se añadió gota a gota una solución de FMOC-Cl (308 mg, 1,2 mmol) disuelta en 2 ml de dioxano. Después de agitar durante 16 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 6 ml por evaporación rotatoria y se purificó usando cromatografía (sílice C18, gradiente de H₂O al 100% a MeOH al 30%/H₂O). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron. El residuo se disolvió en agua y liofilizó para producir 253 mg de un sólido de color blanco: $R_f = 0,50$ (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,64 (dt, 1H, J = 12,0, 6,0), 2,50 (dd, 1H, J = 13,2, 4,9), 3,38 (d, J = 9,67, 1H), 3,60 (dd, J = 11,65, 6,64, 1H), 3,79 (d, J = 4,11, 1H), 3,87 (dd, J = 12,24, 1,0, 1H), 3,97 (m, 2H), 4,07 (td, J = 10,75, 4,84, 1H), 4,17 (dd, J = 10,68, 1,0, 1H), 4,25 (s, 2H), 4,32 (t, J = 4,4, 1H), 4,37 (t, J = 5,8, 1H), 4,6-4,7 (m, oscurecido por el pico de disolvente), 5,95 (d, J = 4, 1H), 6,03 (d, J = 7,4, 1H), 7,43-7,53 (m, 3H), 7,74 (m, 2H), 7,94 (c, J = 7, 3H). MS (ES); calc. Para C₃₅H₄₂N₅O₁₈P ([M-H]⁻), 851,7; encontrado 850,0.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato). Se añadió diisopropilamina (83 μ L, 0,587 μ mol) a una solución de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-fluorenil-metoxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato] (100 mg, 0,117 mmol) disuelto en agua (3 ml) y metanol (1 ml). La mezcla de reacción se agitó 16 h a temperatura ambiente y el metanol de la reacción se retiró de la mezcla de reacción por evaporación rotatoria. La mezcla de reacción en bruto se filtró a través de una columna de gel de sílice C 18 usando agua y el eluyente se recogió y se liofilizó para producir (87 mg, 100%) de producto en forma de un sólido de color blanco: $R_f = 0,21$ (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H, J = 5,3), 2,50 (dd, 1H, J = 13,2, 4,6), 3,43 (d, J = 9,58, 1H), 3,63 (dd, J = 11,9, 6,44, 1H), 3,88 (dd, J = 11,8, 1,0, 1H), 3,95 (td, J = 9,0, 2,3, 1H), 4,10 (t, J = 10,42, 1H), 4,12 (td, J = 10,34, 4,66, 1H), 4,18 (d, J = 10,36, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,31 (t, J = 4,64, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J = 4,37, 1H), 6,13 (d, J = 7,71, 1H), 7,98 (d, J = 7,64, 1H). MS (ES); calc. para C₂₁H₃₂N₅O₁₁P ([M-H]⁻), 629,47; encontrado 627,9.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-metoxi-polioxi-etileno-(1 KDa)-3-oxipropionamido)-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Se añadió hexafluorofosfato de benciltriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfonio (BOP, 21 mg, 48 μ mol) a una solución de ácido metoxipolioxietileno-(peso molecular medio de 1 KDa)-3-oxipropiónico (48 mg, 48 μ mol) disuelto en DMF anhidra (700 μ L) y trietilamina (13 μ L, 95 μ mol). Después de 30 min, se añadió una solución que contenía citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato) (30 mg, 48 μ mol), agua (400 μ L) y trietilamina (13 μ L, 95 μ mol). Esta solución se agitó 20 min a temperatura ambiente y después se cromatografió (sílice C 18, gradiente de metanol/agua). Las fracciones apropiadas se recogieron, se concentraron, el residuo se disolvió en agua y se liofilizó para producir 40 mg (rendimiento de un 50%) de un sólido de color blanco: $R_f = 0,36$ (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H, J = 5,3), 2,50 (dd, 1H, J = 13,2, 4,6), 2,64 (t, J = 5,99, 3H), 3,43 (d, J = 9,58, 1H), 3,63 (m, 1H), 3,71 (s, 70H), 3,79 (m, oscurecido por un pico a 3,71), 3,82 (t, J = 6,19, 1H), 3,88 (dd, J = 11,8, 1,0, 1H), 3,95 (td, J = 9,0, 2,3, 1H), 3,98 (t, J = 5,06, 1H), 4,12 (td, J = 10,34, 4,66, 1H), 4,18 (d, J = 10,36, 1H), 4,23 (d, J = 4,85, 2H), 4,31 (t, J = 4,64, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J = 4,55, 1H), 6,13 (d, J = 7,56, 1H), 7,98 (d, J = 7,54, 1H). MS (MALDI), observado [M-H]⁻; 1594,5, 1638,5, 1682,4, 1726,4, 1770,3, 1814,4, 1858,2, 1881,5, 1903,5, 1947,3.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-metoxi-polioxi-etileno-(10 KDa)-oxicarboxamido)-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Se añadió citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato) (2,5 mg, 4 μ mol) y agua (180 μ L) a una solución de éster de (Metoxipolioxietileno-(10 KDa, peso molecular medio)-oxicarbonil-(N-oxibenzotriazol) (40 mg, 4 μ mol) en DMF anhidra (800 μ L) que contiene trietilamina (1,1 μ L, 8 μ mol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se diluyó con agua (8 ml) y se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C 18 sílice, gradiente de metanol/agua). Las fracciones apropiadas se combinaron, se concentraron, el

residuo se disolvió en agua y se liofilizó produciendo 20 mg (rendimiento de un 46%) de producto en forma de un sólido de color blanco: $R_f = 0,35$ (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H), 2,50 (dd, 1H), 2,64 (t, 3H) 3,55-3,7 (m, oscurecido por un pico a 3,71), 3,71 (s, 488H), 3,72-4,0 (m, oscurecido por un pico a 3,71), 4,23 (m, 3H), 4,31 (t, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J = 4,77, 1H), 6,12 (d, J = 7,52, 1H), 7,98 (d, J = 7,89, 1H). MS (MALDI), observado [M- CMP+Na]; 10780.

9. GlucoPEGilación de FSH derivada de pituitaria humana (no forma parte de la invención)

Este ejemplo ilustra el ensamblaje de un conjugado de la invención. La Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) se desialila y después se conjuga con CMP-(ácido siálico)-PEG.

Desialilación de Hormona Estimuladora de los Folículos. Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) (Pituitaria Humana, Calbiochem N° de Cat. 869001), 1 mg, se disolvió en 500 μ l de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM. Esta solución, 375 μ l, se transfirió a un tubo de plástico pequeño y se le añadieron 263 mU de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*). La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 15 horas a 32 °C. La mezcla de reacción se añadió a conjugado de ácido N-(p-aminofenil) oxámico-agarosa, 600 μ l, equilibrado previamente con Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM y NaN₃ al 0,05% y se hizo girar suavemente durante 6,5 horas a 4 °C. La suspensión se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavaron 5 veces con 0,5 ml del tampón y todos los sobrenadantes se combinaron. La solución enzimática se dializó (7000 MWCO) durante 15 horas a 4 °C con 2 l de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%, y después dos veces durante 4 horas a 4 °C en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución se concentró a 2 μ g/ μ l mediante Speed Vac y se almacenó -20 °C. Las muestras de reacción se analizaron mediante geles de IEF (pH 3-7) (Invitrogen) (Figura 105).

Preparación de AS-FSH derivada de pituitaria humana y PEG-AS-Hormona Estimuladora de los Folículos. FSH desialilada (100 μ g, 50 μ l) y CMP-ácido siálico o CMP-AS-PEG (1 kDa o 10 kDa) (0,05 μ mol) se disolvieron en 13,5 μ l de H₂O (ajustado a pH 8 con NaOH) en tubos de plástico de 0,5 ml. Los tubos se agitaron vorticialmente brevemente y se añadieron 40 mU de ST3Gal3 (36,5 μ l) (volumen total de 100 μ l). Los tubos se agitaron vorticialmente de nuevo y se agitaron suavemente durante 24 horas a 32 °C. Las reacciones se detuvieron por congelación a -80 °C. Las masas de reacción de 15 μ g se analizaron por SDS-PAGE (Figura 106), geles de IEF (Figura 107) y MALDI-TOF. También se analizó la FSH nativa por SDS-PAGE (Figura 108).

Análisis de SDS PAGE e IEF en Geles de los Productos de Reacción. Geles de 1 mm de Tris-Glicina al 8-16% de Novex para análisis de SDS PAGE se adquirieron en Invitrogen. 7,5 μ l (15 μ g) de muestras de reacción de FSH se diluyeron con 5 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tampón NaN₃ al 0,05%, se mezclaron con 15 μ l de tampón de carga de muestras y 1 μ l de μ -mercaptoetanol 9 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se realizaron según las indicaciones de Invitrogen y se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Invitrogen).

Muestras de FSH (15 μ g) se diluyeron con 5 μ l de tampón Tris y se mezclaron con 15 μ l de tampón de carga de muestras (Figura 105). Después las muestras se aplicaron a Geles de Isoelectroenfoco (pH 3-7) (Invitrogen) (Figura 108). Los geles se realizaron y se fijaron según las indicaciones de Invitrogen y después se tiñeron con Tinte Azul Coloidal.

10. GlucoPEGilación de FSH recombinante producida recombinantemente en células CHO (no forma parte de la invención)

Este ejemplo ilustra el ensamblaje de un conjugado de la invención. FSH disialilada se conjugó con CMP-(ácido siálico)-PEG.

Preparación de Asialo-Hormona Estimuladora de los Folículos recombinante. La Hormona Estimuladora de los Folículos recombinante (rFSH) producida a partir de CHO se usó en estos estudios. Las 7.500 IU de Gonadotropina (Gonal-F) se disolvieron en 8 ml de agua. La solución de FSH se dializó en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM y se concentró a 500 μ l en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. Una porción de esta solución (400 μ l) (~ 0,8 mg de FSH) se transfirió a un tubo de plástico pequeño y se le añadieron 275 mU de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*). La mezcla de reacción se mezcló durante 16 horas a 32 °C. La mezcla de reacción se añadió a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa lavado previamente (800 μ l) y se hizo girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavaron 3 veces con 0,6 ml de tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinaron. El sobrenadante se dializó a 4 °C frente a 2 l de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05% y después dos veces más frente a Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución dializada se concentró después a 420 μ l en un filtro centrífugo Centricon Plus 20 y se almacenó a -20 °C.

Las muestras de rFSH nativa y desialilada se analizaron por SDS-PAGE e IEF (Figura 109). Los geles de 1 mm de Tris-Glicina al 8-16% de Novex se adquirieron en Invitrogen. Las muestras (7,5 μ l, 15 μ g) se diluyeron con 5 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tampón NaN₃ al 0,05%, se mezclaron con 15 μ l de tampón de carga de muestras y 1 μ l de β -mercaptoetanol 9 M y calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se realizaron según las indicaciones de Invitrogen y se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Invitrogen). Los Geles de Isoelectroenfoco (pH 3-7) se adquirieron en Invitrogen. Las muestras (7,5 μ l, 15 μ g) se diluyeron con 5 μ l de tampón Tris y se mezclaron con

15 μ l tampón de carga de muestras. Los geles se cargaron, se desarrollaron y se fijaron según las indicaciones de Invitrogen. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal. Las muestras de FSH nativa y desialilada también se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF.

Sialil-PEGilación de Hormona Estimuladora de los Folículos recombinante. FSH desialilada (100 μ g, 54 μ l) y
5 CMP-AS-PEG (1 kDa o 10 kDa) (0,05 μ mol) se disolvieron en 28 μ l Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN_3 al 0,05%,
pH 7,2 en tubos de plástico de 0,5 ml. Los tubos se agitaron vorticialmente brevemente y se añadieron 20 mU de
ST3Gal3 (volumen total de 100 μ l). Los tubos se agitaron vorticialmente de nuevo, se mezcló suavemente durante
24 horas a 32 °C y las reacciones se detuvieron por congelación a -80 °C. Las muestras de esta reacción se
10 analizaron como se ha descrito anteriormente por geles de SDS-PAGE (Figura 110), geles de IEF (Figura 111) y
MALDI-TOF MS.

También se realizó MALDI en la rFSH PEGilada. Durante la ionización, AS-PEG se elimina partir de la estructura del
N-glucano de la glucoproteína. La FSH nativa dio un pico a 13928; AS-rFSH (13282); r-FSH resialilada (13332);
PEG100-rFSH (13515; 14960 (1); 16455 (2); 17796 (3); 19321 (4)); y PEG 10000 (23560 (1); 24790 (2); 45670 (3); y
56760 (4)).

15 11. Estudio Farmacocinético de FSH GlucoPEGilada (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone el ensayo de las propiedades farmacocinéticas de la Hormona Estimuladora de los Folículos
(FSH) glucoPEGilada preparada de acuerdo con los procedimientos de la invención en comparación con la FSH no
PEGilada.

FSH, FSH-AS-PEG (1 KDa) y FSH-AS-PEG (10 KDa) se radioionizaron usando condiciones convencionales
20 (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) y se formularon en solución salina tamponada con fosfato que
contenía BSA al 0,1%. Después de dilución en tampón de fosfato hasta la concentración apropiada, cada una de las
proteínas FSH del ensayo (0,4 μ g, cada una) se inyectó por vía intravenosa en ratas hembra de Sprague Dawley
(250-300 g de peso corporal) y se extrajo sangre en los puntos temporales de 0 a 80 horas. Se analizó la
25 radiactividad en las muestras de sangre usando un contador gamma y se analizó la farmacocinética usando
procedimientos convencionales (Figura 112). FSH se aclaró a partir de la sangre mucho más rápidamente que FSH-
PEG (1 KDa), que a su vez era transparente en cierto modo más rápidamente que FSH-PEG (10 KDa).

12. Bioensayo para péptidos de FSH (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone un bioensayo para la actividad de la Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) en base a
30 células de Sertoli cultivadas. Este ensayo es útil para determinar la bioactividad de FSH después de la remodelación
de glucanos, incluyendo la glucoconjugación.

Este bioensayo se basa en la relación dosis-respuesta que existe entre la cantidad de estradiol producido cuando la
FSH, pero no la hormona lutenizante (LH), se añade a células de Sertoli cultivadas obtenidas a partir de ratas viejas
inmaduras. La testosterona exógena se convierte en 17 β -estradiol en presencia de FSH.

Ratas Sprague-Dawley con siete a 10 días se usaron para obtener células de Sertoli. Después de sacrificarlas, los
35 testículos se desencapsularon y el tejido se dispersó por incubación en colagenasa (1 mg/ml), tripsina (1 mg/ml),
hialuronidasa (1 mg/ml) y DNasas (5 μ g/ml) durante 5 a 10 min. Los fragmentos de túbulos se asentaron en el fondo
del matraz y se lavaron en PBS (1x). Los fragmentos de túbulos se volvieron a incubar durante 20 min con un medio
que contenía las mismas enzimas: colagenasa (1 mg/ml), tripsina (1 mg/ml), hialuronidasa (1 mg/ml) y DNasas (5
 μ g/ml).

Los fragmentos de túbulos se homogeneizaron y se sembraron en una placa de 24 pocillos en un medio sin suero.
40 Se dispersaron 5 x 10⁵ células por pocillo. Después de 48 h de incubación a 37 °C y CO₂ al 5%, se añadió medio
recién preparado a las células. Composición del medio sin suero: DMEM (1 vol), mezcla de nutrientes F10 de Ham
(1 vol), insulina 1 μ g/ml, Transferrina 5 μ g/ml, EGF 10 ng/ml, T4 20 pg/ml, Hidrocortisona 10⁻⁸ M, Ácido retinoico 10⁻⁶
M.

El experimento de estimulación consiste en una incubación de 24 horas con FSH convencional o con muestras a 37
45 °C y CO₂ al 5%. El coeficiente de variación medio dentro de los ensayos es de un 9% y el coeficiente de variación
media entre los ensayos es de un 11%.

El Kit DE2000 para calcular 17B-estradiol por Elisa (R&D Systems, Minneapolis, MN) se usó para cuantificar el nivel
de estradiol después de incubación con FSH, FSH-AS-PEG (1 KDa) y FSH-AS-PEG (10 KDa).

El procedimiento fue como sigue a continuación: 100 μ l de Estradiol Convencional (proporcionado con el kit y
50 preparado según las instrucciones con el kit) o una muestra se pipeteó en pocillos de la placa o las placas para Elisa
para 17B-estradiol; se añadieron a cada pocillo 50 μ l de Conjugado de 17B-estradiol (proporcionado con el kit,
preparado según las instrucciones con el kit); se añadieron a cada pocillo 50 μ l de solución de Anticuerpos de 17B-
estradiol (proporcionada con el kit, preparado según las instrucciones con el kit); las placas se incubaron durante 2
55 horas a temperatura ambiente a 200 rpm; el líquido se aspiró de cada pocillo; los pocillos se lavaron 4 veces usando

la solución de lavado; todo el líquido se retiró de los pocillos; 200 µl de sustrato de pNPP (proporcionado con el kit, preparado según las instrucciones con el kit) se añadieron a todos los pocillos y se incubó durante 45 min; se añadieron 50 µl de solución de Parada (proporcionada con el kit, preparado según las instrucciones con el kit) y las placas se leyeron a 405 nm (Figura 113). Mientras que FSH-PEG (10 KDa) presentaba una estimulación discreta de las células de Sertoli, a 1 µg/ml, FSH-PEG (1 KDa) estimuló las células de Sertoli hasta un 50% más que la FSH sin PEGilar.

13. GlucoPEGilación de Transferrina (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone la preparación de asialotransferrina y su sialilación con PEG-CMP-ácido siálico.

Preparación de Asialo-transferrina. Holo-Transferrina derivada de ser humano, (10 mg) se disolvió en 500 µl de NaOAc 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 5,5. A esta solución se añadieron 500 mU de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) y la mezcla de reacción se agitó suavemente durante 20,5 horas a 37 °C. La mezcla de reacción se añadió al conjugado lavado previamente de ácido N-(p-aminofenil) oxámico-agarosa (600 µl) y las perlas lavadas se hicieron girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. La mezcla de reacción se ajustó a EDTA 5 mM mediante la adición de 100 µl de EDTA 30 mM a las perlas lavadas, que se hicieron girar suavemente durante 20 horas a 4 °C. La suspensión se centrifugó Durante 2 minutos a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavaron 5 veces con 0,35 ml de NaOAc 50 mM, CaCl₂ 5 mM, EDTA 5 mM, pH 5,5 y todos los sobrenadantes se combinaron. La solución enzimática y dializó dos veces a 4 °C en Tris-HCl 15 mM, NaCl 1 M, pH 7,4. Se retiraron 0,3 ml de la solución de transferrina (3,3 ml en total) y se dializó dos veces frente a agua. El resto se dializó dos veces más a 4 °C frente a solución salina tamponada con fosfato. La solución dializada se almacenó a -20 °C. Las muestras de proteínas se analizaron por IEF Electroforesis. Las muestras (9 µl, 25 µg) se diluyeron con 16 µl de tampón Tris y se mezclaron con 25 µl del tampón de carga de muestras y se aplicó a Geles de Isoelectroenfoque (pH 3-7). Los geles se desarrollaron y se fijaron usando procedimientos convencionales. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal.

Sialil-PEGilación de asialo-Transferrina. Transferrina desialilada (250 µg) y CMP-ácido siálico o CMP-AS-PEG (1 kDa o 10 kDa) (0,05 µmol) se disolvieron en 69 µl de Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2 en tubos de plástico de 1,5 ml. Los tubos se agitaron vorticialmente brevemente y se añadieron 100 mU de ST3Gal3 (90 µl) (volumen total de 250 µl). Los tubos se agitaron vorticialmente de nuevo y se mezcló suavemente durante 24 horas a 32 °C. Las reacciones se detuvieron por congelación a -80 °C. Se usaron geles de 1 mm de Tris-Glicina al 8-16% de Novex para el análisis SDS PAGE (Figura 114). Las muestras (25 µl, 25 µg) se mezclaron con 25 µl de tampón de carga de muestras y 0,4 µl de β-mercaptoetanol y se calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se desarrollaron usando condiciones convencionales y se tiñeron con Tinte Azul Coloidal. Los geles para IEF también se realizaron como se ha descrito anteriormente (Figura 115). Las muestras también se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF.

Resultados. También se realizó MALDI. Transferrina nativa (78729); asialotransferrina (78197); transferrina resialilada (79626/80703); con AS-PEG 1k (79037 (1); 80961 (2); 82535 (3); 84778 (4)); con AS-PEG 5k (90003 (2); 96117 (3); 96117 (4)); con AS-PEG 10k (100336 (2); 111421 (3); 122510(4)).

14. GlucoPEGilación de Factor VIIa Recombinante producido en células BHK (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone la PEGilación del Factor VIIa recombinante producida en células CHO.

Preparación de Asialo-Factor VIIa. El Factor VIIa recombinante se produjo en células BHK (células renales de cría de hámster). El Factor VIIa (14,2 mg) se disolvió a 1 mg/ml en solución tampón (pH 7,4, Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 0,001 M, NaN₃ al 0,05%) y se incubó con 300 mU/ml de conjugado de sialidasa (*Vibrio cholerae*)-agarosa durante 3 días a 32 °C. Para controlar la reacción, se diluyó una pequeña alícuota de la reacción con el tampón apropiado y se realizó un gel para IEF de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen (Figura 116). La mezcla se centrifugó a 3.500 rpm y se recogió el sobrenadante. La resina se lavó tres veces (3 x 2 ml) con la solución tampón anterior (pH 7,4, Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%) y los lavados combinados se concentraron en un Centricon-Plus-20. La solución restante se cambió de tampón con Tris 0,05 M (pH 7,4), NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05% hasta un volumen final de 14,4 ml.

Preparación de Factor VIIa-AS-PEG (1 KDa y 10 KDa). La solución de desialilación del rFactor VIIa se dividió en dos muestras iguales de 7,2 ml. A cada muestra se añadió CMP-AS-5-PEG (1 KDa) (7,4 mg) o CMP-AS-5-PEG (10 KDa) (7,4 mg). Se añadió ST3Gal3 (1,58 U) a ambos tubos y las mezclas de reacción se incubaron a 32 °C durante 96 h. La reacción se controló por gel para SDS-PAGE usando los reactivos y las condiciones descritos por Invitrogen. Cuando la reacción se completó, la mezcla de reacción se purificó usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. Las fracciones combinadas que contenían el producto se concentraron a 4 °C en filtros centrífugos Centricon-Plus-20 (Millipore, Bedford, MA) y la solución concentrada se volvió a formular para producir 1,97 mg (ensayo de proteínas del ácido bicinonínico, ensayo BCA, Sigma-Aldrich, St. Louis MO) de Factor VIIa-PEG. El producto de la reacción se analizó usando análisis de SDS-PAGE y de IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos suministrados por Invitrogen. Las muestras se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF. La Figura 117 muestra los

resultados por MALDI para el Factor VIIa nativo. La Figura 118 contiene los resultados por MALDI para el Factor VIIa PEGilado con PEG de 1 KDa en los que el Factor VIIa PEGilado con PEG de 1 KDa es evidente. La Figura 119 contiene los resultados por MALDI para el Factor VIIa PEGilado con PEG de 10 KDa en los que es evidente un pico para el Factor VIIa PEGilado con PEG de 10 KDa. La Figura 120 representa el análisis de SDS-PAGE de todos los productos de reacción, en el que es evidente una banda para el Factor VIII-AS-PEG (10-KDa).

15. GlucoPEGilación del Factor IX producido en células CHO

Este ejemplo expone la preparación de asialoFactor IX y su sialilación con PEG-CMP-ácido siálico.

Desialilación del rFactor IX. Una forma recombinante del Factor IX de Coagulación (rFactor IX) se preparó en células CHO. 6000 IU de rFactor IX se disolvieron en un total de 12 ml de USP H₂O. Esta solución se transfirió a un filtro centrífugo PL-10, Centricon Plus 20, con otros 6 ml de USP H₂O. La solución se concentró a 2 ml y después se diluyó con 15 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05% y después se volvió a concentrar. La dilución/concentración se repitió 4 veces para cambiar eficazmente el tampón hasta un volumen final de 3,0 ml. De esta solución, se transfirieron 2,9 ml (aproximadamente 29 mg de rFactor IX) a un tubo de plástico pequeño y se le añadieron 530 mU de conjugado de α 2-3,6,8-Neuraminidasa-agarosa (*Vibrio cholerae*, Calbiochem, 450 μ l). La mezcla de reacción se hizo girar suavemente durante 26,5 horas a 32 °C. La mezcla se centrifugó 2 minutos a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas de agarosa (que contenían neuraminidasa) se lavaron 6 veces con 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,12, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. Los lavados y los sobrenadantes combinados se centrifugaron de nuevo durante 2 minutos a 10.000 rpm para retirar cualquier resina de agarosa residual. La solución de proteínas desialilada, combinada se diluyó a 19 ml con el mismo tampón y se concentró por debajo de ~ 2 ml en un filtro centrífugo PL-10 Centricon Plus 20. La solución se diluyó dos veces con 15 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05% y se volvió a concentrar hasta 2 ml. La solución final de rFactor IX desialilado se diluyó hasta un volumen final de 3 ml (~10 mg/ml) con el Tampón Tris. Las muestras de rFactor IX nativo y desialilado se analizaron por IEF-Electroforesis. Los Geles de Isoelectroenfoco (pH 3-7) se desarrollaron usando muestras de 1,5 μ l (15 μ g) diluidas primero con 10 μ l de tampón Tris y mezcladas con 12 μ l de tampón de carga de muestras. Los geles se cargaron, se desarrollaron y se fijaron usando procedimientos convencionales. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Figura 121), mostrando una banda para el Factor IX desialilado.

Preparación de PEG (1 kDa y 10 kDa)-AS-Factor IX. rFactor-IX desialilado (29 mg, 3 ml) se dividió en dos muestras de 1,5 ml (14,5 mg) en dos tubos para centrifuga de 15 ml. Cada solución se diluyó con 12,67 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05% y se añadió CMP-AS-PEG-1k o 10k (7,25 μ mol). Los tubos se invirtieron suavemente para mezclar y se añadieron 2,9 U de ST3Gal3 (326 μ l) (volumen total 14,5 ml). Los tubos se invirtieron de nuevo y se hicieron girar suavemente durante 65 horas a 32 °C. Las reacciones se detuvieron por congelación a -20 °C. Se analizaron muestras de 10 μ g de las reacciones por SDS-PAGE. Las proteínas PEGiladas se purificaron en una columna Toso Haas Biosep G3000SW (21,5 x 30 cm, 13 μ m) para HPLC con Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco, pH 7,1 (Gibco), 6 ml/min. La reacción y la purificación se controlaron usando SDS Page y geles para IEF. Se cargaron geles de 1 mm de Tris-Glicina al 4-20% de Novex con 10 μ l (10 μ g) de muestras después de dilución con 2 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tampón NaN₃ al 0,05% y se mezcló con 12 μ l de tampón de carga de muestras y 1 μ l de DTT 0,5 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Figura 122) mostrando una banda para PEG (1 kDa y 10 kDa)-AS-Factor IX.

16. Sialil-GlucoPEGilación Directa de Factor-IX

Este ejemplo expone la preparación de sialil-glucoPEGilación de péptidos sin tratamiento anterior con sialidasa. Aquí, el Factor-IX es el péptido ejemplar.

Sialil-PEGilación Directa (10 KDa) de Factor-IX. Se disolvió Factor IX (1100 IU) en 5 ml de histidina 20 mM, tampón de glicina 520 mM que contenía sacarosa al 2%, NaN₃ al 0,05%, y polisorbato 80 al 0,01%, pH 5,0. El CMP-AS-PEG (10 KDa) (27,8 mg, 3,5 μ mol) se añadió después a esta solución, la mezcla de reacción se invirtió suavemente para mezclar y se añadieron 1,4 U de ST3Gal3. La mezcla de reacción se hizo girar suavemente durante 19 horas a 32 °C y la reacción se detuvo por congelación. La mezcla de reacción se analizó por geles para SDS-PAGE usando las condiciones de desarrollo y tinción (Azul Coloidal) descritas por Invitrogen. Brevemente, se mezclaron muestras (10 μ l) con 12 μ l de tampón de carga de muestras y 2 μ l de DTT 0,5 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C (Figura 123, líneas 8, 9 y 10). El producto se purificó en una columna 10/20 Superdex 200 (Amersham, Uppsala, Suecia) con Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco, pH 7,1 (Gibco), 6 ml/min. Figura (Figura 123 contiene una banda (línea 5) del Factor-IX PEGilado purificado por HPLC.

17. Protección con ácido siálico de Factor IX GlucoPEGilado (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone el procedimiento para la protección con ácido siálico de péptidos sialil-glucoPEGilados. Aquí, el Factor-IX es el péptido ejemplar.

Protección con ácido siálico de Glucanos de Factor-IX-AS-PEG (10 KDa) unidos a N y unidos a O. Se concentró r-Factor-IX-PEG purificado (10 KDa) (2,4 mg) en un filtro centrífugo PL-10 Centricon® Plus 20 (Millipore

Corp., Bedford, MA) y el tampón se cambió por Tris-HCl 50 mM a pH 7,2, NaCl 0,15 M, Na₂S₂O₃ al 0,05% hasta un volumen final de 1,85 ml. La solución de proteínas se diluyó con 372 µl del mismo tampón Tris y se añadieron 7,4 mg de CMP-AS (12 µmol) en forma de un sólido. La solución se invirtió suavemente para mezclar y se añadieron 0,1 U de ST3Gal1 y 0,1 U de ST3Gal3. La mezcla de reacción se hizo girar suavemente durante 42 horas a 32 °C.

- 5 Una muestra de 10 µg de la reacción se analizó por SDS-PAGE. Se desarrollaron geles de 1 mm de Tris-Glicina al 4-12% de Novex y se tiñeron usando Azul Coloidal tal como lo describe Invitrogen. En resumen, muestras de 10 µl (10 µg), se mezclaron con 12 µl de tampón de carga de muestras y 1 µl de DTT 0,5 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C (Figura 123, línea 4).

10 **18. GlucoPEGilación de Proteínas expresadas en Sistemas de Mamíferos o de Insectos: EPO, Interferón α e Interferón β (no forma parte de la invención)**

Este ejemplo expone la preparación de péptidos PEGilados que se expresan en sistemas de mamíferos y de insectos.

- 15 **Preparación de aceptor a partir de sistemas de expresión en mamíferos.** Los péptidos a glucoPEGilar usando CMP-ácido siálico PEG necesitan tener glucanos que terminen en galactosa. La mayoría de péptidos procedentes de sistemas de expresión en mamíferos tendrán ácido siálico terminal que primero necesita ser retirado.

- 20 **Digestión con sialidasa.** El péptido se desialida usando una sialidasa. Un procedimiento típico implica la incubación de una solución de 1 mg/ml del péptido en solución salina tamponada con Tris, pH 7,2, con CaCl₂ 5 mM añadido, con 0,2 U/ml de sialidasa inmovilizada a partir de *Vibrio cholera* (Calbiochem) a 32 °C durante 24 horas. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o por la inclusión de azida sódica al 0,02%. La resina después se retira por centrifugación o por filtración, y después se lava para recuperar el péptido atrapado. En este punto, se puede añadir EDTA a la solución para inhibir cualquier sialidasa que se haya lixiviado a partir de la resina.

- 25 **Preparación a partir de sistemas de expresión en insectos.** EPO, interferón-alfa, e interferón-beta también se pueden expresar en sistemas no mamíferos tales como levadura, plantas, o células de insectos. Los péptidos a glucoPEGilar usando CMP-ácido siálico PEG necesitan tener glucanos que terminen en galactosa. La mayoría de los N-glucanos en péptidos expresados en células de insectos, por ejemplo, son el núcleo de trimanosilo. Estos glucanos se construyen primero en glucanos que terminan en galactosa antes de que sean aceptores para la sialiltransferasa.

- 30 **Construcción de glucanos aceptores a partir de núcleo de trimanosilo.** Péptido (1 mg/ml) en solución salina tamponada con Tris, pH 7,2, que contiene MnCl₂ 5 mM, UDP-glcNAc 5 mM, 0,05 U/ml de GLCNACT I, 0,05 U/ml de GLCNACT II, se incubaba a 32 °C durante 24 horas o hasta que la reacción está básicamente completa. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o por la inclusión de azida sódica al 0,02%. Después de intercambio de tampón para retirar UDP y otras moléculas pequeñas, cada uno de UDP-galactosa y MnCl₂ se añaden a 5 mM, galactosiltransferasa se añade a 0,05 U/ml, y se incubaba a 32 °C durante 24 H o hasta que la reacción esté básicamente completa. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o por la inclusión de azida sódica al 0,02%. Los péptidos entonces están listos para la glucoPEGilación.

- 40 **Construcción de glucanos unidos a O.** Una estrategia similar se puede usar para que el interferón alfa produzca enzimáticamente el O-glucano Gal-GalNAc deseado. Si fuera necesario, GalNAc unida a serina o a treonina se puede añadir al péptido usando péptido GalNAc transferasas adecuadas (por ejemplo, GalNAc T1, GalNAc T2, T3, T4, etc.) y UDP-GalNAc. Además, si fuera necesario, se puede añadir galactosa usando galactosiltransferasa y UDP-galactosa.

- 45 **GlucoPEGilación usando sialiltransferasa.** Los glucopéptidos (1 mg/ml) que soportan galactosa terminal en solución salina tamponada con Tris + azida sódica al 0,02% se incuban con CMP-AS-PEG (0,75 mM) y 0,4 U/ml de sialiltransferasa (ST3Gal3 o ST3Gal4 para N-glucanos en EPO e interferón beta; ST3Gal4, o ST3Gal1 para O-glucanos en interferón alfa) a 32 °C durante 24 horas. Otras transferasas que pueden funcionar incluyen la 2,6 sialiltransferasa a partir de *Photobacterium damsella*. La concentración del péptido aceptor está más preferentemente en el intervalo de 0,1 mg/ml hasta el límite de solubilidad del péptido. La concentración de CMP-AS-PEG debería ser suficiente para que hubiera un exceso sobre los sitios disponibles, pero no tan alto como para causar problemas de solubilidad del péptido debido al PEG, y puede variar de 50 pM hasta 5 mM, y la temperatura puede variar de 2 °C hasta 40 °C. El tiempo requerido para completar la reacción dependerá de la temperatura, las cantidades relativas de enzima a sustrato aceptor, la concentración de sustrato donador, y el pH.

19. GlucoPEGilación de EPO producida en células de insectos (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone la preparación de EPO biantenaria PEGilada a partir de EPO expresada en células de insecto.

- 55 La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) a partir del sistema de expresión de baculovirus/Sf9 (Protein Sciences Corp., Meriden, CT) se sometió a análisis de glucanos y los glucanos resultantes mostraron ser principalmente núcleo de trimanosilo con núcleo de fucosa, con un pequeño porcentaje de glucanos que también presentan una única GlcNAc (Figura 124).

Adición de N-acetilglucosamina con GnT-I y GnT-II. Dos lotes de rhEPO (1 mg/ml) se incubaron con GnT-I y GnT-II, UDP-glcNAc 5 mM, MnCl₂ 20 mM, y azida sódica al 0,02% en MES 100 mM a pH 6,5 a 32 °C durante 24 h. El lote A contenía 20 mg de EPO, y 100 mU/ml de GnT-I y 60 mU/ml de GnT-II. El lote B contenía 41 mg de EPO, y 41 mU/ml de GnT-I + 50 mU/ml de GnT-II. Después de la reacción, la muestra se desalinizó por filtración en gel (columnas PD10, Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ).

El establecimiento de perfiles de glucanos por 2AA HPLC reveló que el lote A se convirtió en un 92% en una estructura biantenaria con dos GlcNAc (el equilibrio tiene una única glcNAc. El lote B mostró una conversión de un 97% en el producto deseado (Figuras 102A y 102B.).

Galactosilación del lote A de EPO. EPO (~16 mg del lote A) se trató con GnTII para completar la adición de GlcNAc. La reacción se realizó en Tris 50 mM a pH 7,2 que contenía NaCl 150 mM, EPO mg/ml, UDP-GlcNAc 1 mM, MnCl₂ 5 mM, azida sódica al 0,02% y 0,02 U/ml de GnTII a 32 °C durante 4 h. Después se efectuó la galactosilación de EPO mediante la adición de UDP-galactosa a 3 mM y GalT1 a 0,5 U/ml y la incubación continuó a 32 °C durante 48 h.

La EPO galactosilada después se purificó por filtración en gel en una columna Superdex 1,6/60 en Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 6. El pico que contiene EPO se analizó después por 2AA HPLC. En base a los datos por HPLC ~85% de los glucanos contiene dos galactosas y ~15% de los glucanos no presenta ninguna galactosa después de la reacción de galactosilación.

Sialilación de EPO galactosilada. La sialilación de EPO galactosilada se realizó en Tris 100 mM a pH que contenía NaCl 150 mM, 0,5 mg/ml de EPO, 200 mU/ml de ST3Gal3 y CMP-NAN 0,5 mM o CMP-NAN-PEG (1 KDa) o CMP-NAN-PEG (10 KDa) durante 48 horas a 32 °C. Casi todos los glucanos que tienen dos restos de galactosa se sialilaron totalmente (2 ácidos siálicos / glucano) después de la reacción de sialilación con CMP-NAN. El análisis por MALDI-TOF confirmó los datos por HPLC.

PEGilación de EPO galactosilada. Para las reacciones de PEGilación que usan CMP-NAN-PEG (1 KDa) y CMP-NAN-PEG (10 KDa), se analizó una alícuota de la mezcla de reacción por SDS-PAGE (Figura 125). El peso molecular del péptido de EPO aumentó con la adición de cada azúcar, y aumentó más radicalmente en el peso molecular después de las reacciones de PEGilación.

Bioensayo de EPO *in vitro*. El bioensayo de EPO *in vitro* (adaptado a partir de Hammerling y col, 1996, J. Pharm. Biomed. Anal. 14: 1455-1469) se basa en la respuesta de la línea celular TF-1 a niveles múltiples de EPO. Las células TF-1 proporcionan un buen sistema para investigar la proliferación y la diferenciación de células progenitoras mieloides. Esta línea celular fue establecida por T. Kitamura y col. en Octubre de 1987 a partir de la muestra de aspiración de médula ósea heparinizada a partir de un varón Japonés de 35 años con pancitopenia grave. Estas células son totalmente dependientes de la Interleuquina 3 o del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

La línea celular TF-1 (ATCC, N° de Cat. CRL-2003) se cultivó en RPMI + FBS al 10% + GM-CSF (12 ng/ml) y se incubó a 37 °C con CO₂ al 5%. Las células estuvieron en suspensión a una concentración de 5000 células/ml de medios, y se dispensaron 200 µl en una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron con diversas concentraciones de EPO (de 0,1 µg/ml a 10 µg/ml) durante 48 horas. Un Ensayo de Viabilidad de MTT se realizó mediante la adición de 25 µl de MTT a 5 mg/ml (SIGMA M5655), incubando la placa a 37 °C durante 20 min a 4 horas, añadiendo 100 µl de solución de isopropanol/HCl (100 ml de isopropanol + 333 µl de HCl 6 N), leyendo la DO a 570 nm, y a 630 nm o a 690 nm, y restando las lecturas a 630 nm o a 690 nm a partir de las lecturas a 570 nm.

La Figura 126 contiene los resultados obtenidos cuando EPO sialilada, y EPO glucoPEGilada con PEG de 1 KDa o 10 KDa se sometió a un ensayo de bioactividad de EPO *in vitro*. La EPO glucoPEGilada con PEG de 1 KDa presentaba casi la misma actividad que la EPO sin glucoPEGilar cuando ambas estaban a una concentración de aproximadamente 5 µg/ml. La EPO glucoPEGilada con PEG de 10 KDa presentaba aproximadamente la mitad de la actividad de la EPO sin glucoPEGilar cuando ambas estaban a una concentración de aproximadamente 5 µg/ml.

20. GlucoPEGilación de Interferón α producido en células CHO (no forma parte de la invención)

Preparación de Asialo-Interferón α . El interferón alfa producido a partir de células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM y se concentra a 500 µl en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. La solución se incuba con 300 mU/ml de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, se diluye una pequeña alícuota de la reacción con el tampón apropiado y una realización en gel para IEF. La mezcla de reacción se añade después a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa lavado previamente (800 µl/ml de volumen de reacción) y las perlas lavadas se hicieron girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinaron. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05% y después dos veces más frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución dializada se concentra después usando un filtro centrífugo Plus 20 Centricon y se almacena -20 °C. Las condiciones para el gel para IEF se desarrollan de acuerdo con los procedimientos y reactivos

proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y desialidado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Interferón-alfa-(alfa2,3)-Sialil-PEG. Interferón-alfa desialidado se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal1 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de Interferón-alfa nativo y desialidado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Interferón-alfa-(alfa2,8)-Sialil-PEG. El Interferón-alfa producido en CHO, que contiene un glucano unido a O alfa2,3-sialilado, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de CST-II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presenta CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de Interferón-alfa nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Interferón-alfa-(alfa2,6)-Sialil-PEG. Interferón-alfa, que contiene solamente GalNAc unida a O, se disolvió a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST6GalNAc o II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis de SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de Interferón-alfa nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

21. GlucoPEGilación de G-CSF producido en células CHO (no forma parte de la invención)

Preparación de Asialo-Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF). G-CSF producido en células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM y se concentra a 500 µl en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. La solución se incuba con 300 mU/ml de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y se desarrolla un gel para IEF. La mezcla de reacción se añade después a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa lavado previamente (800 µl/ml de volumen de reacción) y las perlas lavadas se hacen girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinan. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05% y después dos veces más frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución dializada se concentra después usando un filtro centrífugo Centricon Plus 20 y se almacena a -20 °C. Las condiciones para el gel para IEF se desarrollaron de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y desialidado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de G-CSF-(alfa2,3)-Sialil-PEG. G-CSF desialidado se disolvió a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal1 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de G-CSF-(alfa2,8)-Sialil-PEG. G-CSF producido en células CHO, que contienen un glucano unido a O alfa2,3-sialilado, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incubaba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de CST-II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presenta CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de G-CSF-(alfa2,6)-Sialil-PEG. G-CSF, que contiene solamente GalNAc unida a O, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incubaba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST6GalNAc I o II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presenta CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando Análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

22. GlucoPEGilación de Glucanos de EPO unidos a O producidos en Células CHO

Preparación de EPO-AS-PEG unido a O (10 KDa). Asialo-EPO, producida originalmente en células CHO, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incubaba con CMP-AS 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal3 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico en los glucanos unidos a N, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-¹⁴C añadido; el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G2000SW usando metanol, agua y el producto detectado usando un detector de radiación. Cuando la reacción es completa, la solución se concentra usando un filtro Centricon-20. Se intercambia el tampón en la solución restante con Tris 0,05 M (pH 7,2), NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05% hasta un volumen final de 7,2 ml hasta que el CMP-AS ya no se puede detectar. El retenido después se vuelve a suspender en Tris 0,05 M (pH 7,2), NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05% a 2,5 mg/ml de proteína. La solución se incubaba con CMP-AS-PEG 1 mM (10 KDa) y ST3Gal1, para glucosilar el sitio unido a O, a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción se separa por filtración en gel usando una columna analítica Toso Haas TSK-gel-3000 eluyendo con PBS a pH 7,0 y analizando por detección de UV. Cuando la reacción se completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,0) recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

23. GlucoPEGilación de un anticuerpo (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone los procedimientos para PEGilar los glucanos unidos a O de una molécula de anticuerpo. Aquí, se usa Enbrel™ como un ejemplo, sin embargo un experto en la materia observará que este procedimiento se puede usar con muchas moléculas de anticuerpos.

Preparación de Enbrel™-AS-PEG (10 KDa). Enbrel™ (TNF-receptor-IgG₁-quimera), con los glucanos unidos a O sialilados antes de la PEGilación o no, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incubaba con UDP-galactosa 5 mM y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días para proteger los glucanos de la región Fc con galactosa. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando de ¹⁴C-galactosa-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G2000SW en metanol y agua. La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

Cuando la reacción se completa, la solución se incubaba con CMP-ácido siálico-engarce-PEG 1 mM (10 KDa) y 0,1 U/ml de ST3Gal3 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-engarce-PEG, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). Cuando la reacción está completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. Las fracciones que contienen el producto se combinan, se concentran, se intercambia el tampón y después se liofilizan. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

24. GlucoPEGilación de anticuerpo Remicade™ (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone el procedimiento para glucoPEGilar una molécula de anticuerpo recombinante mediante la introducción de moléculas de PEG a los glucanos de la región Fc. Aquí, Remicade™, una proteína de fusión de la región Fc con TNF-R:IgG, es el péptido ejemplar.

- 5 Preparación de Remicade™-Gal-PEG (10 KDa). Remicade™ se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con UDP-galactosa-PEG 1 mM (10 KDa) y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días para introducir el PEG en los glucanos de la región Fc. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando ¹⁴C-galactosa-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica
- 10 Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

- 15 Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. Las fracciones que contienen el producto se combinan, se concentran, se intercambia el tampón y después se liofilizan. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

25. Generación y PEGilación de estructuras de GlcNAc-ASN: TPA producido en Levaduras

Este ejemplo expone la preparación de estructuras de GlcNAc-Asn PEGilada en un péptido tal como TPA expresado en levaduras.

- 20 Se espera que la expresión en levaduras de como resultado un TPA que contiene una única estructura de tipo manano unida a N. Esta glucoproteína recombinante se trata primero con endoglucosidasa H para generar estructuras de GlcNAc en los restos de asparagina (Asn) en el péptido.

- 25 Las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína se modifican después con galactosa o galactosa-PEG usando UDP-galactosa o UDP-galactosa-6-PEG, respectivamente, y una galactosiltransferasa tal como GalT1. En un caso, la galactosa-PEG es el resto terminal. En el segundo caso, la galactosa se modifica adicionalmente con AS-PEG usando un donador de CMP-AS-PEG y una sialiltransferasa tal como ST3GalIII. En otra realización, las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína pueden estar galactosiladas y sialiladas como se ha descrito anteriormente, y después sialiladas adicionalmente usando CMP-AS-PEG y una α2,8-sialiltransferasa, tal como la enzima codificada por el gen cst-II de *Campylobacter jejuni*.

- 30 **26. Generación y PEGilación de Estructuras de GlcNAc-ASN: GM-CSF producidas en *Saccharomyces* (no forma parte de la invención)**

Este ejemplo expone la preparación de Activador del tipo Tejido con estructuras PEGiladas de GlcNAc-Asn.

- 35 Se espera que GM-CSF recombinante expresado en levaduras contenga 2 glucanos unidos a N y 2 glucanos unidos a O. Los glucanos unidos a N deberían ser del tipo manano ramificado. Esta glucoproteína recombinante se trata con una endoglucosidasa a partir del grupo que consiste en endoglucosidasa H, endoglucosidasa-F1, endoglucosidasa-F2, endoglucosidasa-F3, endoglucosidasa-M solas o en combinación con las manosidasas I, II y III para generar núcleos de GlcNAc en los restos de asparagina (Asn) en la cadena principal de péptido/proteína.

- 40 Las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína se modifican después con galactosa o galactosa-PEG usando UDP-galactosa o UDP-galactosa-6-PEG, respectivamente, y una galactosiltransferasa tal como GalT1. En un caso, la galactosa-PEG es el resto terminal. En el segundo caso, la galactosa se modifica adicionalmente con AS-PEG usando un donador de CMP-AS-PEG y una sialiltransferasa tal como ST3GalIII. En otra realización las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína pueden estar galactosiladas y sialiladas como se ha descrito anteriormente, y después sialiladas adicionalmente usando CMP-AS-PEG y una α2,8-sialiltransferasa tal como la enzima codificada por el gen cst-II de *Campylobacter jejuni*.

- 45 **C. Gluco-Conjugación de Moléculas Pequeñas**

27. Síntesis de CMP-AS-Levulinato

Este ejemplo expone el procedimiento para la síntesis de CMP-AS-levulinato.

- 50 **Preparación de 2-levulinamido-2-desoxi-D-manopiranos.** Cloroformiato de isobutilo (100 µl, 0,77 mmol) se añadió gota a gota a una solución de ácido levulínico (86 µl, 0,84 mmol), THF anhidro (3 ml) y trietilamina (127 µl, 0,91 mmol). Esta solución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se añadió después gota a gota a una solución que contenía hidrócloruro de D-manosamina (151 mg, 0,7 mmol), trietilamina (127 µl, 0,91 mmol), THF (2 ml) y agua (2 ml). La mezcla de reacción se agitó 15 horas y después se concentró a sequedad por evaporación rotatoria. Se usó cromatografía (sílice, gradiente de la etapa de MeOH/CH₂Cl₂ al 5-15%) para aislar el producto produciendo 0,156 g (rendimiento de un 73%) de un sólido de color blanco: R_f = 0,41 (sílice, CHCl₃/MeOH/agua a

6/4/1); RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) δ 2,23 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,57 (td, J = 6,54, 3,68, 2H), 2,63 (t, J = 6,71, 2H), 2,86-2,90 (m, 4H), 3,42 (m, 1H), 3,53 (t, J = 9,76, 1H), 3,64 (t, J = 9,43, 1H), 3,80-3,91 (m, 4H), 4,04 (dd, J = 9,79, 4,71, 1H), 4,31 (dd, J = 4,63, 1,14, 1H), 4,45 (dd, J = 4,16, 1,13, 1H), 5,02 (d, J = 1,29, 1H), 5,11 (s, J = 1,30, 1H), MS (ES); calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_7$, 277,27; encontrado $[\text{M}+1]$ 277,9.

5 Preparación de 5-levulinamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato. Se añadieron piruvato sódico (0,616 g, 5,6 mmol) y ácido N-acetilneuramínico aldolasa (50 U) a una solución de 2-levulinamido-2-desoxi-D-manopiranososa (0,156 g, 0,56 mmol) en HEPES 0,1 M (pH 7,5). La mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 20 horas y después se congeló. La mezcla de reacción se filtró después a través de sílice C 18, se congeló y se liofilizó. El sólido en bruto se purificó usando cromatografía ultrarrápida (sílice, usando primero $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ al 10-40% y después $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me-OH}/\text{H}_2\text{O}$ a 6/4/0,5). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron produciendo 45 mg (rendimiento de un 80%) de un sólido de color blanco: R_f = 0,15 (sílice, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{agua}$ a 6/4/1); RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) δ 1,82 (t, J = 11,9, 1H), 2,21 (dd, J = 13,76, 4,84, 1H), 2,23 (s, 3H), 2,57 (c aparente, J = 6,6, 2H), 2,86-2,95 (m, 2H), 3,15-3,18 (m, 1H), 3,28-3,61 (complejo, 1H), 3,60 (dd, J = 11,91, 6,66, 1H), 3,75 (td, J = 6,65, 2,62, 1H), 3,84 (dd, J = 11,89, 2,65, 1H), 3,88-4,01 (complejo, 2H), 4,04 (td, J = 11,18, 4,67, 1H), MS (ES); calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_{10}$, 365,33; encontrado $[\text{M}-1]$, 363,97.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-(5-levulinamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato). Se disolvió 5-Levulinamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (50 mg, 137 μmol) en 2 ml de tampón HEPES 100 mM a pH 7,5 y se añadió MnCl_2 1 M (300 μl , 300 μmol). Se disolvió CTP- 2Na^+ (79 mg, 1,5 μmol) en 5 ml de tampón HEPES y se añadió al azúcar. Se añadió la enzima de fusión de sialiltransferasa/CMP-ácido neuramínico sintetasa (11 U) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro MWCO 10.000 y el filtrado, que contenía el producto de la reacción, se usó directamente sin purificación adicional: R_f = 0,35 (sílice, IPA/agua/ NH_4OH a 7/2/1).

28. Glucocerebrosidasa-manosa-6-fosfato producida en células CHO

Este ejemplo expone el procedimiento para glucoconjugar manosa-6-fosfato a un péptido producido en células CHO tal como glucocerebrosidasa.

Preparación de asialo-glucoceramidasa. La glucocerebrosidasa producida en células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, y se incuba con 300 mU/ml de conjugado de sialidasa-agarosa durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y un gel para IEF y se realiza SDS-PAGE de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y el sobrenadante se recoge. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA, y una vez con 0,2 ml de tampón Tris-EDTA. Todos los sobrenadantes se combinan. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN_3 al 0,05% y después dos veces más frente a Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN_3 al 0,05%. La solución dializada después se concentra usando un filtro centrífugo Centricon Plus 20. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Glucocerebrosidasa-AS-engarce-Manosa-6-fosfato (procedimiento 1). Asialo-glucocerebrosidasa a partir de lo mencionado anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN_3 al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-engarce-Man-6-fosfato 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-engarce-Man-6-fosfato, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-SA-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de una marca libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Glucocerebrosidasa-SA-engarce-Manosa-6-fosfato (procedimiento 2). Glucocerebrosidasa, producida en CHO pero sialilada de forma incompleta, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN_3 al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-engarce-Man-6-fosfato 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-engarce-Man-6-fosfato, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-SA-PEG-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de una marca libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

29. Glucoconjugación de mitramicina a un anticuerpo (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone los procedimientos para glucoconjugar una molécula pequeña, tal como mitramicina a glucanos de la región Fc de una molécula de anticuerpo producida en células de mamífero. Aquí, se usa el anticuerpo Herceptin™, pero un experto en la materia observará que el procedimiento se puede usar con otros muchos anticuerpos.

Preparación de Herceptin™-Gal-engarce-mitramicina. Herceptin™ se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, 5 mM MnCl₂, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con UDP-galactosa-engarce-mitramicina 1 mM y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días para introducir la mitramicina en los glucanos de la región Fc. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando de ¹⁴C-galactosa-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. Las fracciones que contienen el producto se combinan, se concentran, se intercambia el tampón y después se liofilizan. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

30. Glucoconjugación de geldanamicina a un anticuerpo

Este ejemplo expone la glucoconjugación de una molécula pequeña, tal como geldanamicina, a los glucanos de la región Fc de un anticuerpo producido en células CHO, tal como Rituxan™. Aquí, se usa el anticuerpo Rituxan™, pero un experto en la materia observará que el procedimiento se puede usar con otros muchos anticuerpos.

Preparación de Rituxan™-Gal-engarce-geldanamicina. Rituxan™ se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con UDP-galactosa-engarce-geldanamicina 1 mM y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días para introducir la geldanamicina en los glucanos de la región Fc. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando ¹⁴C-galactosa-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. Las fracciones que contienen el producto se combinan, se concentran, se intercambia el tampón y después se liofilizan. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

D. Glucoconjugación de péptidos**31. Transferrina-GDNF (no forma parte de la invención)**

Este ejemplo expone los procedimientos para la glucoconjugación de proteínas, y en particular, la transferrina se glucoconjugua a GDNF. Transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP se prepara a partir de transferrina. El resto de galactosa se retira a partir de glucanos de GDNF, y Transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP se conjuga a glucanos de GDNF usando una galactosil-transferasa.

Preparación de agalacto-GDNF. GDNF producido en células NSO (células de mieloma murino NSO) se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, y se incuba con 300 mU/ml de conjugado de beta-galactosidasa-agarosa durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y se realiza un gel para IEF de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y el sobrenadante se recoge. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05% y después dos veces más frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución dializada después se concentra usando un filtro centrífugo Centricon Plus 20 y se almacena a -20 °C. Las condiciones para el gel para IEF se desarrollan de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP. Asialo-transferrina se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-engarce-Gal-UDP (cantidad molar para añadir 1 equivalente molar de azúcar de nucleótido a transferrina) y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando de ¹⁴C-AS-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

La solución se incuba con CMP-ácido siálico 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 (para proteger cualquier glucano de transferrina sin reaccionar) a 32 °C durante 2 días. La incorporación en el péptido se cuantifica usando un detector de UV en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Transferrina-AS-Engarce-Gal-GDNF. La transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP preparada como se ha descrito anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con 2,5 mg/ml de agalacto-GDNF y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando de ¹⁴C-galactosa-UDP añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la marca radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

Cuando la reacción es completa, la solución se incuba con UDP-Gal 5 mM y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa (para proteger cualquier glucano de transferrina sin reaccionar) a 32 °C durante 2 días seguido de la adición de CMP-AS 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13. Después de 2 días adicionales, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

32. Glucocerebrosidasa-transferrina

Este ejemplo expone los procedimientos para la glucoconjugación de proteínas, y en particular, la transferrina se glucoconjugua a glucocerebrosidasa. Las estructuras de GlcNAc-ASN se crean en glucoceraminidasa, y Transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP se conjuga a estructuras de GlcNAc-ASN de GDNF usando galactosiltransferasa.

Preparación de GlcNAc-glucocerebrosidasa (Cerezyme™). Cerezyme™ (glucocerebrosidasa) producida en células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, y se incuba con 300 mU/ml de conjugado de Endo-H-agarosa durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y un gel para IEF y se realiza SDS-PAGE de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y el sobrenadante se recoge. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris -EDTA y todos los sobrenadantes se combinan. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05% y después dos veces más frente a Tris -HCl 50 mM al pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05%. La solución dializada se concentra después usando un filtro centrífugo Centricon Plus 20. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Transferrina-AS-Engarce-Gal-glucocerebrosidasa. Transferrina-AS-Engarce-Gal-UDP a partir de lo mencionado anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con 2,5 mg/ml de GlcNAc-glucocerebrosidasa y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de glucocerebrosidasa, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y el producto se detecta por absorción de UV. La mezcla de reacción después se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) recogiendo fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

33. EPO-Transferrina (no forma parte de la invención)

Este ejemplo expone los procedimientos para la glucoconjugación de proteínas a glucanos unidos a O, y en particular, la transferrina se glucoconjugua a EPO. El resto de ácido siálico se retira a partir de glucano de EPO unido a O, y se prepara EPO-AS-engarce-AS-CMP. EPO-AS-engarce-AS-CMP se glucoconjugua a asialotransferrina con ST3Ga13.

Preparación de asialo-EPO unida a O. EPO (eritropoyetina) producida en células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, y se incuba con 300 mU/ml de conjugado de sialidasa (*Vibrio cholera*)-agarosa durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y un gel para IEF desarrollado de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y el sobrenadante se recoge. El sobrenadante se concentra a una concentración de EPO de aproximadamente 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-ligando fluorescente añadido; la marca incorporada en el péptido se separa a partir de la marca libre por filtración en gel en una columna analítica Toso

Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS

Preparación de EPO-AS-engarce-AS-CMP. Los 2,5 mg/ml de asialo-EPO unida a O en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con CMP-ácido siálico-engarce-AS-CMP 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal1 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-engarce-AS-CMP, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1).

Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

Preparación de Transferrina-AS-Engarce-AS-EPO. EPO-AS-Engarce-AS-CMP a partir de lo mencionado anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con 2,5 mg/ml de asialo-transferrina y 0,1 U/ml de ST3Ga13 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de transferrina, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y el producto se detecta por absorción de UV. Cuando la reacción es completa, la solución se incuba con CMP-AS 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 (para proteger cualquier glucano de transferrina sin reaccionar) a 32 °C durante 2 días. La mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS.

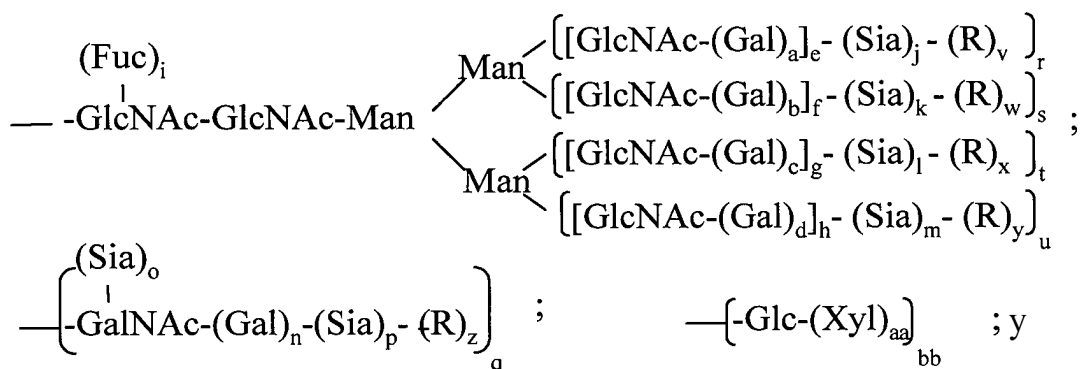
34. EPO-GDNF (no forma parte de la invención)

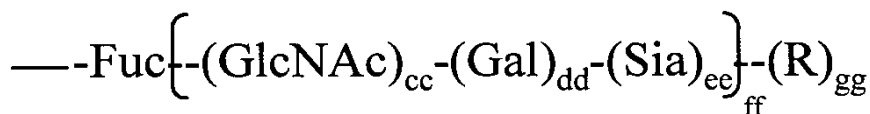
Este ejemplo expone los procedimientos para la glucoconjugación de proteínas, y en particular, la preparación de EPO-AS-Engarce-AS-GDNF.

Preparación de EPO-AS-Engarce-AS-GDNF. EPO-AS-Engarce-AS-CMP a partir de lo mencionado anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%, pH 7,2. La solución se incuba con 2,5 mg/ml de GDNF (producida en NSO) y 0,1 U/ml de ST3Gal3 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de GDNF, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y el producto se detecta por absorción de UV. Cuando la reacción es completa, la solución se incuba con CMP-AS 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Ga13 (para proteger cualquier glucano de GDNF sin reaccionar) a 32 °C durante 2 días. La mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) recogiendo las fracciones en base a la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE y IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por MALDI-TOF MS. Aunque la invención se ha desvelado con referencia a realizaciones específicas, es obvio que otros expertos en la técnica puedan diseñar otras realizaciones y variaciones de esta invención si alejarse de su ámbito. Las reivindicaciones adjuntas pretenden incluir todas estas realizaciones y variaciones equivalentes.

Adicionalmente la invención comprende las siguientes realizaciones ejemplares.

167. Un procedimiento para formar un conjugado entre un péptido de Factor IX y un grupo modificador, en el que dicho grupo modificador está unido por enlace covalente a dicho péptido de Factor IX a través de un grupo de unión a glucosilo, comprendiendo dicho péptido de Factor IX un residuo de glucosilo que tiene una fórmula que es un miembro seleccionado de:





en la que

a, b, c, d, i, n, o, p, q, r, s, t, u, bb, cc, dd, ee, ff y gg son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1;
e, f, g, h y aa son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 0 a 6;
j, k, l y m son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 0 a 20;
v, w, x, y y z son 0;

R es un grupo modificador, una manosa o una oligomanosa.

comprendiendo dicho procedimiento:

(a) poner en contacto dicho péptido de Factor IX con una glucosiltransferasa y un donador de glucosilo modificado, que comprende un resto glucosilo que es un sustrato para la glucosiltransferasa unido por enlace covalente a dicho grupo modificador, en condiciones apropiadas para la formación de dicho grupo de enlace de glucosilo intacto.

168. El procedimiento de la realización 167, que adicionalmente comprende:

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

169. El procedimiento de la realización 167, que adicionalmente comprende:

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

170. El procedimiento de la realización 168, que adicionalmente comprende:

(d) poner en contacto el producto de la etapa (b) con una galactosiltransferasa y un donador de galactosa en condiciones apropiadas para transferir dicha galactosa a dicho producto

171. El procedimiento de la realización 170, que adicionalmente comprende:

(e) poner en contacto el producto de la etapa (d) con STG3Gal3 y un donador de ácido siálico en condiciones apropiadas para transferir el ácido siálico a dicho producto.

172. El procedimiento de la realización 167, que adicionalmente comprende:

(d) poner en contacto el producto de la etapa (a) con un resto que reaccione con dicho grupo modificador, formando de este modo un conjugado entre dicho grupo de enlace glucosilo intacto y dicho resto.

173. El procedimiento de la realización 167, en el que dicho grupo de modificador es un miembro seleccionado de un polímero, una toxina, un radioisótopo, un resto terapéutico y un glucoconjugado.

174. El procedimiento de la realización 167, en el que

a, b, c, y d son 1;
e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j, k, l, m, i, n, o, p, q, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1;
v, w, x, y, z y gg son 0.

175. El procedimiento de la realización 167, en el que

a, b, c, d, n, q son independientemente seleccionados de 0 y 1;
aa, e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4;
bb, cc, dd, ee, ff, j, k, l, m, i, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y
v, w, x, y, z y gg son 0.

176. El procedimiento de la realización 167, en el que

a, b, c, d, n, bb, cc, dd y ff son 1;

e, f, g, h y aa son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4;
q, ee, i, j, k, l, m, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y v, w, x, y, z y gg son 0.

177. El procedimiento de la realización 167, en el que

- 5 a, b, c, d y q son 1;
e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j, k, l, m, i, n, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y
v, w, x, y, z y gg son 0.

178. El procedimiento de la realización 167, en el que

- 10 a, b, c, d, q, bb, cc, dd y ff son 1;
aa, e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4;
ee, i, j, k, l, m, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y

179. Un conjugado de péptido de Factor IX formado por el procedimiento de la realización 167.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Neose Technologies, Inc.
DeFrees, Shawn
Zopf, David
Bayer, Robert
20 Bowe, Caryn
Hakes, David
Chen, Xi
- <120> REMODELACIÓN Y GLUCOCONJUGACIÓN DE PÉPTIDOS
- 25 <130> 040853-01-5050WO
- <150> US 60/328.523
<151> 10-10-2001
- 30 <150> US 60/344.692
<151> 19-10-2001
- <150> US 60/334.233
35 <151> 08-11-2001
- <150> US 60/334,301
<151> 08-11-2001
- 40 <150> US 60/387,292
<151> 2002-06-07
- <150> US 60/391.777
45 <151> 26-06-2002
- <150> US 60/396.594
<151> 17-07-2002
- <150> US 60/404.249
50 <151> 16-08-2002
- <150> US 60/407.527
<151> 28-8-2002
- 55 <160> 62
- <170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
<211> 525
60 <212> ADN
<213> Homo sapiens

ES 2 619 371 T3

<400> 1

```

acccccctgg gccctgccag ctccctgcc cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa      60
gtgaggaaga tccagggcga tggcgccagc ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag     120
ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc     180

ctgagcagct gccccagcca ggccctgcag ctggcagget gcttgagcca actccatagc     240
ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt     300
cccaccttgg acacactgca gctggacgtc gccgactttg ccaccaccat ctggcagcag     360
atggaagaac tgggaatggc ccctgcctg cagcccaccc agggtgccat gcgggccttc     420
gcctctgctt tccagcgccg ggcaggaggg gtcttggttg cctcccatct gcagagcttc     480
ctggaggtgt cgtaccgcgt tctacgccac cttgccccagc cctga                          525

```

5 <210> 2
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 619 371 T3

Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys
1				5					10					15	
Cys	Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln
			20					25					30		
Glu	Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val
	35						40					45			
Leu	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Cys
	50					55					60				
Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser
65					70					75					80
Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser
				85					90					95	
Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp
			100					105					110		
Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro
		115					120					125			
Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Phe	Ala	Ser	Ala	Phe
	130					135					140				
Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser	Phe
145						150				155					160
Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Gln	Pro		
				165					170						

<210> 3
 <211> 1733
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3

gcgcctctta tgtaccacaca aaaatctatt ttcaaaaaag ttgctctaag aatatagtta 60
tcaagttaag taaaatgtca atagcctttt aatttaattt ttaattgttt tatcattctt 120
tgcaataata aaacattaac ttatactttt ttaatttaat gtatagsata gagatatata 180
taggatatgt aaatagatac acagtgtata tgtgattaaa atataaaggg agattcaatc 240
agaaaaaagt ttctaataag gctctggggg aaaagaggaa ggaaacsata atgaaaaaaa 300
tgtggtgaga aaaacagctg aaaacccatg taaagagtgt ataaagsaag caaaaagaga 360
agtagaaagt aacacagggg catttggaag atgtaaacga gtatgtttcc tatttaaggc 420
taggcacaaa gcaaggctct cagagaacct ggagcctaag gtttaggctc acccatttca 480
accagtctag cagcatctgc aacatctaca atggccttga cctttgcttt actggtggcc 540
ctcctgggtg tcagctgcaa gtcaagctgc tctgtgggct gtgacttggc tcaaaccac 600
agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc 660
tcctgcttga aggacagaca tgactttgga ttccccagg aggagtttgg caaccagttc 720
caaaaggctg aaaccatccc tgtctccat gagatgatcc agcagattct caatctcttc 780
agcaciaaagg actcatctgc tgcttgggat gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa 840
ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc tgtgtgatac aggggggtgg ggtgacagag 900
actcccctga tgaaggagga ctccattctg gctgtgagga aatactttcca aagaatcact 960
ctctatctga aagagaagaa atacagccct tgtgcctggg aggttggtcag agcagaaatc 1020
atgagatctt ttcttttgc aacaaacttg caagaaagtt taagaagtta ggaatgaaaa 1080
ctggttcaac atggaaatga ttttcattga ttogtatgcc agctcaactt tttatgatct 1140
gccatttcaa agactcatgt ttctgctatg accatgacac gatttaaatc ttttcaaatg 1200
tttttaggag tattaatcaa cattgtattc agctcttaag gcaactagtcc cttacagagg 1260
accatgctga ctgatccatt atctatttaa atatttttaa aatattttt atttaactat 1320
ttataaaaca acttattttt gtcatatta tgtcatgtgc acctttgcac agtggttaat 1380
gtaataaaat gtgttctttg tatttggtta atttattttg tgttggtcat tgaacttttg 1440
ctatggaact tttgtacttg tttattcttt aaaatgaaat tccaagccta attgtgcaac 1500
ctgattacag aataactggg acacttcatt tgtccatcaa tattatattc aagatataag 1560
taaaaataaa ctttctgtta accaagttgt atgttgact caagataaca gggatgaacct 1620
aaciaatata attctgctct cttgtgtatt tgatttttgt atgaaaaaaa ctaaaaatgg 1680
taatcatact taattatcag ttatggtaaa tggatgaag agaagaagga acg 1733

<210> 4
<211> 188
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 619 371 T3

<400> 4

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
20 25 30

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
35 40 45

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
50 55 60

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
65 70 75 80

Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
85 90 95

Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
100 105 110

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
115 120 125

Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
130 135 140

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
145 150 155 160

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
165 170 175

Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
180 185

5

<210> 5

<211> 757

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 5

ES 2 619 371 T3

```

atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgtt gcttctccac tacagctctt    60
tccatgagct acaacttgct tggattccta caaagaagca gcaattttca gtgtcagaag    120
ctcctgtggc aattgaatgg gaggcctgaa tattgcctca aggacaggat gaactttgac    180
atccctgagg agattaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc attgaccatc    240
tatgagatgc tccagaacat ctttgctatt ttcagacaag attcatctag cactggctgg    300
aatgagacta ttgttgagaa cctcctggct aatgtctatc atcagataaa ccatctgaag    360
acagtcctgg aagaaaaact ggagaaagaa gattttacca ggggaaaact catgagcagt    420
ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa ggagtacagt    480
cactgtgcct ggaccatagt cagagtggaa atcctaagga acttttactt cattaacaga    540
cttacagggt acctccgaaa ctgaagatct cctagcctgt ccctctggga ctggacaatt    600
gcttcaagca ttcttcaacc agcagatgct gtttaagtga ctgatggcta atgtactgca    660
aatgaaagga cactagaaga ttttgaaatt tttattaaat tatgagttat ttttatttat    720
ttaaatttta ttttggaata taaattattt ttggtgc                                757

```

<210> 6
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 6

Met	Thr	Asn	Lys	Cys	Leu	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Phe	Ser
1				5					10					15	

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
20 25 30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
50 55 60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
65 70 75 80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
100 105 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
115 120 125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
130 135 140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
145 150 155 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
165 170 175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
180 185

<210> 7
<211> 1332
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7

atggtctccc aggcctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60
gcagtcttcg taaccacagga ggaagccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120
gcgttccttg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180
tccttcgagg aggcccgga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

```

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctccctgcaag 300
gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360
acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420
agtgaccaca cggggaccaa gcgtccctgt cgggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480
gacgggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540
aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaagggtgtg ccccaaaggg 600
gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660
atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720
aacctgatcg cgggtgctggg cgagcacgac ctacgcgagc acgacgggga tgagcagagc 780
cggcggtgtg cgcaggtcct catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840
atcgcgtgct tccgcctgca ccagcccgtg gtctctactg accatgtggt gccctctctg 900
ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960
ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt gctcaacgtg 1020
ccccggctga tgaccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080
atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140
gacagtggag gccacatgc caccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgct 1200
agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260
tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gccaggagt cctcctgcga 1320
gccccatttc cc 1332

```

<210> 8
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 8

```

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1           5           10           15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20           25           30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35           40           45

```

ES 2 619 371 T3

Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	50	55	60	
Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	65	70	75	80
Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	85	90	95	
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	100	105	110	
Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	115	120	125	
Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	130	135	140	
Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	145	150	155	160
Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	165	170	175	
Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	180	185	190	
Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	195	200	205	
Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	210	215	220	
Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	225	230	235	240
Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	245	250	255	
Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	260	265	270	

ES 2 619 371 T3

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
435 440

<210> 9

<211> 1437

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaagcc tcatcaccat ctgcctttta 60

ggatatctac tcagtgtga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120

ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaaacctt 180

gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaac cacgagaagt ttttgaaaac 240
 actgaaaaga caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300
 ccatgtttta atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttgggtgtccc 360
 tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420
 tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaagggtg tttgctcctg tactgagggg 480
 tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540
 gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgagg ctgtttttcc tgatgtggac 600
 tatgtaaatt ctactgaagc tgaaaccatt ttggataaca tctactcaagg cacccaatca 660
 tttaatgact tctactcgggt tgttggtgga gaagatgcc aaccagggtca attcccttgg 720
 caggttggtt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780
 tggattgtaa ctgctgcccc ctgtgttgaa actgggtgta aaattacagt tgcgcaggt 840
 gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgagcaatt 900
 attcctcacc acaactacaa tgcagctatt aataagtaca accatgacat tgccttctg 960
 gaactggacg aacccttagt gctaaacagc tacgttacac ctatttgcac tgctgacaag 1020
 gaatacacga acatcttctc caaatttgga tctggctatg taagtggctg ggcaagagtc 1080
 ttccacaaag ggagatcagc tttagttctt cagtacctta gagttccact tgttgaccga 1140
 gccacatgct ttcgatctac aaagttcacc atctataaca acatgttctg tgctggcttc 1200
 catgaaggag gtagagattc atgtcaagga gatagtggg gaccccatgt tactgaagtg 1260
 gaagggacca gtttcttaac tggaattatt agctggggtg aagagtgtgc aatgaaaggc 1320
 aaatatggaa tatataccaa ggtatcccgg tatgtcaact ggattaagga aaaaacaaag 1380
 ctcacttaat gaaagatgga ttccaaggt taattcattg gaattgaaaa ttaacag 1437

<210> 10
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Met	Gln	Arg	Val	Asn	Met	Ile	Met	Ala	Glu	Ser	Pro	Ser	Leu	Ile	Thr
1				5					10					15	
Ile	Cys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Cys	Thr	Val	Phe	Leu
			20					25					30		

5

10

Asp	His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asn	35	40	45	
Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	50	55	60	
Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Pro	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn	65	70	75	80
Thr	Glu	Lys	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln	85	90	95	
Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile	100	105	110	
Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys	115	120	125	
Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe	130	135	140	
Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly	145	150	155	160
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe	165	170	175	
Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala	180	185	190	
Glu	Ala	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Pro	Thr	Glu	Ala	Glu	195	200	205	
Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Gly	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe	210	215	220	
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp	225	230	235	240
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile	245	250	255	

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ala Ile Ile Pro His His
290 295 300

Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu
305 310 315 320

Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys
325 330 335

Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly
340 345 350

Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu
355 360 365

Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu
370 375 380

Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe
385 390 395 400

His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His
405 410 415

Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp
420 425 430

Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val
435 440 445

Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
450 455 460

<210> 11
<211> 603
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 619 371 T3

```

atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctgggtca cattgtcggg gtttctgcat      60
gttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca      120
ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattg gctgctgctt ctctagagca      180
tatcccactc cactaagggt caagaagacg atgttgggtcc aaaagaacgt cacctcagag      240
tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatggggggg tttcaaagtg      300
gagaaccaca cggcgtgcca ctgcagtact tgttattatc acaaattctta aatgttttac      360
caagtgtgtg cttgatgact gctgattttc tggaatggaa aattaagttg tttagtgttt      420
atggctttgt gagataaaac tctccttttc cttaccatac cactttgaca cgcttcaagg      480
atatactgca gctttactgc cttctcctt atcctacagt acaatcagca gtctagttct      540
tttcatttgg aatgaataca gcattaagct tgttccactg caaataaagc cttttaaatc      600
atc                                                                603

```

<210> 12
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

```

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
1          5          10          15

Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
20          25          30

Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
35          40          45

Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
50          55          60

Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
65          70          75          80

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
85          90          95

Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
100         105         110

Tyr His Lys Ser
115

```

<210> 13
<211> 390
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5

<400> 13

```

atgaagacac tccagttttt cttccttttc tgttgcctgga aagcaatctg ctgcaatagc      60
tgtgagctga ccaacatcac cattgcaata gagaaagaag aatgtcgttt ctgcataagc      120
atcaacacca cttgggtgtgc tggctactgc tacaccaggg atctgggtgta taaggaccca      180
gccaggccca aaatccagaa aacatgtacc ttcaaggaac tggatatatga aacagtgaga      240
gtgccccggc gtgctcacca tgcagattcc ttgtatacat acccagtggc caccagtgt      300
cactgtggca agtgtgacag cgacagcact gattgtactg tgcgaggcct gggggcccagc      360
tactgtcctt ttggtgaaat gaaagaataa                                     390

```

10

<210> 14
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 14

```

Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile
 1              5              10              15

Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys
      20              25              30

Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly
      35              40              45

Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys
      50              55              60

Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg
      65              70              75              80

Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
      85              90              95

Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys
      100             105             110

Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys
      115             120             125

Glu

```

ES 2 619 371 T3

<210> 15
 <211> 1342
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15

```

cccggagccg gaccggggcc accgcgcccg ctctgctccg acaccgcgcc ccctggacag      60
ccgccctctc ctccaggccc gtggggctgg ccctgcaccg ccgagcttcc cgggatgagg      120
gcccccggtg tggtcacccg gcgcgccccca ggtcgctgag ggaccccggc caggcgcgga      180
gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgctccc      240
tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcacc tgtgacagcc gagtcctgga      300
gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacc acgggctgtg ctgaacactg      360
cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag      420
gatggagggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaagc      480
tgtcctgcgg ggccaggccc tgttgggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct      540
gcatgtggat aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg      600
agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat      660
cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttccctcc ggggaaagct      720
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggacaga tgaccagggtg tgtccacctg      780
ggcatatcca ccacctccct caccaacatt gcttgtgcca caccctcccc cgccactcct      840
gaaccccgtc gaggggctct cagctcagcg ccagcctgtc ccatggacac tccagtgcc      900
gcaatgacat ctacggggcc agaggaactg tccagagagc aactctgaga tctaaggatg      960
tcacagggcc aacttgaggg ccagagcag gaagcattca gagagcagct ttaaactcag     1020
ggacagagcc atgctgggaa gacgcctgag ctcactcggc accctgcaaa atttgatgcc     1080
aggacacgct ttggaggcga ttacctgtt ttcgcacctc ccatcaggga caggatgacc     1140
tgagagaactt aggtggcaag ctgtgacttc tccaggtctc acgggcatgg gactccctt     1200
ggtggcaaga gcccccttga caccgggggtg gtgggaacca tgaagacagg atgggggctg     1260
gcctctggct ctcatggggt ccaagttttg tgtattcttc aacctcattg acaagaactg     1320
aaaccaccaa aaaaaaaaaa aa                                             1342

```

10

<210> 16
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 16

ES 2 619 371 T3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

5

<210> 17
<211> 435
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17

ES 2 619 371 T3

```

atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc      60
cgctcgccca gcccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccg      120
cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcac      180
tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag      240
cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggccctt tgaccatgat ggccagccac      300
tacaagcagc actgcctcc aaccccgga acttctctgt caaccagat tatcaccttt      360
gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgta tccccttga ctgctgggag      420
ccagtccagg agtga                                          435

```

<210> 18
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

```

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1           5           10           15

```

```

Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
          20           25           30

```

```

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
          35           40           45

```

```

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
50           55           60

```

```

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
65           70           75           80

```

```

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
          85           90           95

```

```

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
          100          105          110

```

```

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
          115          120          125

```

```

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
          130          135          140

```

<210> 19
 <211> 501
 <212> ADN

ES 2 619 371 T3

<213> Homo sapiens

<400> 19

```

atgaaatata caagttatat cttggctttt cagctctgca tcgttttggg ttctcttggc      60
tgttactgcc aggaccata tgtaaaagaa gcagaaaacc ttaagaaata ttttaatgca      120
ggtcattcag atgtagcgga taatggaact cttttcttag gcattttgaa gaattggaaa      180
gaggagagtg acagaaaaat aatgcagagc caaattgtct ccttttactt caaacttttt      240
aaaaacttta aagatgacca gagcatccaa aagagtgtgg agaccatcaa ggaagacatg      300
aatgtcaagt ttttcaatag caacaaaaag aaacgagatg acttcgaaaa gctgactaat      360
tattcggtaa ctgacttgaa tgtccaacgc aaagcaatac atgaactcat ccaagtgatg      420
gctgaactgt cgccagcagc taaaacaggg aagcgaaaaa ggagtcagat gctgtttcga      480
ggtcgaagag catcccagta a                                          501

```

5

<210> 20

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 20

```

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
1           5           10           15

```

```

Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu

```

ES 2 619 371 T3

	20		25		30										
Asn	Leu	Lys	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ala	Gly	His	Ser	Asp	Val	Ala	Asp	Asn
	35					40					45				
Gly	Thr	Leu	Phe	Leu	Gly	Ile	Leu	Lys	Asn	Trp	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp
	50					55					60				
Arg	Lys	Ile	Met	Gln	Ser	Gln	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe
65					70				75						80
Lys	Asn	Phe	Lys	Asp	Asp	Gln	Ser	Ile	Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Thr	Ile
				85					90					95	
Lys	Glu	Asp	Met	Asn	Val	Lys	Phe	Phe	Asn	Ser	Asn	Lys	Lys	Lys	Arg
			100					105					110		
Asp	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu	Thr	Asn	Tyr	Ser	Val	Thr	Asp	Leu	Asn	Val
		115					120					125			
Gln	Arg	Lys	Ala	Ile	His	Glu	Leu	Ile	Gln	Val	Met	Ala	Glu	Leu	Ser
	130					135					140				
Pro	Ala	Ala	Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Lys	Arg	Ser	Gln	Met	Leu	Phe	Arg
145					150				155						160
Gly	Arg	Arg	Ala	Ser	Gln										
				165											

<210> 21
 <211> 1352
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 21

ctgggacagt	gaatcgacaa	tgccgtcttc	tgtctcgtgg	ggcatcctcc	tgctggcagg	60
cctgtgctgc	ctggtccttg	tctccctggc	tgaggatccc	cagggagatg	ctgcccagaa	120
gacagataca	tcccaccatg	atcaggatca	cccaaccttc	aacaagatca	cccccaacct	180
ggctgagttc	gccttcagcc	tataccgcca	gctggcacac	cagtccaaca	gcaccaatat	240
cttctttctc	ccagttagca	tcgctacagc	ctttgcaatg	ctctccctgg	ggaccaaggc	300
tgacactcac	gatgaaatcc	tggagggcct	gaatttcaac	ctcacggaga	ttccggaggc	360

```

tcagatccat gaaggcttcc aggaactcct ccgtaccctc aaccagccag acagccagct 420
ccagctgacc accggcaatg gcctgttcct cagcgagggc ctgaagctag tggataagtt 480
tttggaggat gttaaaaagt tgtaccactc agaagccttc actgtcaact tcggggacac 540
cgaagaggcc aagaaacaga tcaacgatta cgtggagaag ggtactcaag ggaaaattgt 600
ggatttggtc aaggagcttg acagagacac agtttttgct ctgggtgaatt acatcttctt 660
taaaggcaaa tgggagagac cttttgaagt caaggacacc gaggaagagg acttccacgt 720
ggaccaggtg accaccgtga aggtgcctat gatgaagcgt ttaggcatgt ttaacatcca 780
gcactgtaag aagctgtcca gctgggtgct gctgatgaaa tacctgggca atgccaccgc 840
catcttcttc ctgcctgatg aggggaaact acagcacctg gaaaatgaac tcaccacga 900
tatcatcacc aagttcctgg aaaatgaaga cagaaggctc gccagcttac atttacccaa 960
actgtccatt actggaacct atgatctgaa gagcgtcctg ggtcaactgg gcctcactaa 1020
ggtcttcagc aatggggctg acctctccgg ggtcacagag gaggcacccc tgaagctctc 1080
caaggccgtg cataaggctg tgctgaccat cgacgagaaa gggactgaag ctgctggggc 1140
catgttttta gagggcctac ccatgtctat ccccccgag gtcaagttca acaaaccctt 1200
tgtcttctta atgattgaac aaaataccaa gtctccctc ttcattggaa aagtgggtgaa 1260
tcccacccaa aaataactgc ctctcgctcc tcaaccctc ccctccatcc ctggccccct 1320
ccctggatga cattaaagaa gggttgagct gg 1352

```

<210> 22
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

```

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys
1           5           10           15

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala
          20           25           30

Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn
          35           40           45

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

```

ES 2 619 371 T3

Leu	Ala	His	Gln	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Ile	Phe	Phe	Ser	Pro	Val	Ser	
65					70					75					80	
Ile	Ala	Thr	Ala	Phe	Ala	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Ala	Asp	Thr	
				85					90					95		
His	Asp	Glu	Ile	Leu	Glu	Gly	Leu	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Pro	
			100					105					110			
Glu	Ala	Gln	Ile	His	Glu	Gly	Phe	Gln	Glu	Leu	Leu	Arg	Thr	Leu	Asn	
		115					120					125				
Gln	Pro	Asp	Ser	Gln	Leu	Gln	Leu	Thr	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Phe	Leu	
	130					135					140					
Ser	Glu	Gly	Leu	Lys	Leu	Val	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Lys	
145				150						155					160	
Leu	Tyr	His	Ser	Glu	Ala	Phe	Thr	Val	Asn	Phe	Gly	Asp	Thr	Glu	Glu	
				165					170					175		
Ala	Lys	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Tyr	Val	Glu	Lys	Gly	Thr	Gln	Gly	Lys	
			180					185					190			
Ile	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Glu	Leu	Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Phe	Ala	Leu	
		195					200					205				
Val	Asn	Tyr	Ile	Phe	Phe	Lys	Gly	Lys	Trp	Glu	Arg	Pro	Phe	Glu	Val	
	210					215					220					
Lys	Asp	Thr	Glu	Glu	Glu	Asp	Phe	His	Val	Asp	Gln	Val	Thr	Thr	Val	
225					230					235					240	
Lys	Val	Pro	Met	Met	Lys	Arg	Leu	Gly	Met	Phe	Asn	Ile	Gln	His	Cys	
				245					250					255		
Lys	Lys	Leu	Ser	Ser	Trp	Val	Leu	Leu	Met	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asn	Ala	
			260					265					270			
Thr	Ala	Ile	Phe	Phe	Leu	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	Leu	Gln	His	Leu	Glu	
		275					280					285				

ES 2 619 371 T3

Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp
290 295 300

Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr
305 310 315 320

Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe
325 330 335

Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys
340 345 350

Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly
355 360 365

Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile
370 375 380

Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu
385 390 395 400

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr
405 410 415

Gln Lys

<210> 23
<211> 2004
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 23

gctaacctag tgccatatagc taaggcaggt acctgcatcc ttgtttttgt ttagtggatc 60
ctctatcctt cagagactct ggaacccttg tggctctctc ttcactaat gacctgagg 120
ggatggagtt ttcaagtcct tccagagagg aatgtcccaa gcctttgagt agggtaagca 180
tcatggctgg cagcctcaca ggtttgcttc tacttcaggc agtgtcgtgg gcatcagggtg 240
cccgccctg catccctaaa agcttcggct acagctcggg ggtgtgtgtc tgcaatgcc 300
catactgtga ctcccttgac ccccgacct ttctgacct tggtagcttc agccgctatg 360
agagtacacg cagtggggcg cggatggagc tgagtatggg gcccatccag gctaatacaca 420
cgggcacagg cctgctactg accctgcagc cagaacagaa gttccagaaa gtgaagggat 480

ES 2 619 371 T3

```

ttggaggggc catgacagat gctgctgctc tcaacatcct tgccctgtca cccctgccc 540
aaaatttgct acttaaatcg tacttctctg aagaaggaat cggatataac atcatccggg 600
taccatggc cagctgtgac ttctecatcc gcacctacac ctatgcagac acccctgatg 660
atttcagtt gcacaacttc agcctcccag aggaagatac caagctcaag ataccctga 720
ttcaccgagc cctgcagttg gccagcgtc cggtttact ccttgccagc ccctggacat 780
caccacttg gctcaagacc aatggagcgg tgaatgggaa ggggtcactc aaggacagc 840
ccggagacat ctaccaccag acctgggcca gatactttgt gaagttcctg gatgcctatg 900
ctgagcacia gttacagttc tgggcagtga cagctgaaaa tgagccttct gctgggctgt 960
tgagtggata ccccttccag tgccctgggt tcaccctga acatcagoga gacttcattg 1020
cccgtagcct aggtcctacc ctgcacaaca gtactacca caatgtccgc ctactcatgc 1080
tggtgacca acgcttgctg ctgccccact gggcaaagggt ggtactgaca gaccagaag 1140
cagctaaata tgttcattggc attgctgtac attggtacct ggactttctg gctccagcca 1200
aagccacct aggggagaca caccgctgt tcccaacac catgctcttt gcctcagagg 1260
cctgtgtggg ctccaagttc tgggagcaga gtgtgaggct aggtcctgg gatcgaggga 1320
tgagtagacg ccacagcacc atcacgaacc tcctgtacca tgtggtcggc tggaccgact 1380
ggaaccttg cctgaacccc gaaggaggac ccaattgggt gcgtaacttt gtcgacagtc 1440
ccatcattgt agacatcacc aaggacacgt ttacaaaaca gccatgttc taccaccttg 1500
gccacttcag caagttcatt cctgagggt cccagagagt ggggctggtt gccagtcaga 1560
agaacgacct ggacgcagtg gactgatgc atcccgatgg ctctgctgtt gtggctgtgc 1620
taaaccgctc ctctaaggat gtgcctctta ccatcaagga tcctgctgtg ggcttcttg 1680
agacaatctc acctggctac tccattcaca cctacctgtg gcacgcccag tgatggagca 1740
gatactcaag gaggcactgg gctcagcctg ggcattaaag ggacagagtc agctcacacg 1800
ctgtctgtga ctaaagaggg cacagcaggg ccagtgtgag cttacagcga cgtaagccca 1860
ggggcaatgg tttgggtgac tcactttccc ctctaggtgg tgcccagggc tggaggcccc 1920
tagaaaaaga tcagtaagcc ccagtgtccc cccagcccc atgcttatgt gaacatgcgc 1980
tgtgtgctgc ttgctttgga aact 2004

```

<210> 24
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

ES 2 619 371 T3

Met	Glu	Phe	Ser	Ser	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Cys	Pro	Lys	Pro	Leu	Ser	1	5	10	15
Arg	Val	Ser	Ile	Met	Ala	Gly	Ser	Leu	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Gln	20	25	30	
Ala	Val	Ser	Trp	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	Pro	Cys	Ile	Pro	Lys	Ser	Phe	35	40	45	
Gly	Tyr	Ser	Ser	Val	Val	Cys	Val	Cys	Asn	Ala	Thr	Tyr	Cys	Asp	Ser	50	55	60	
Phe	Asp	Pro	Pro	Thr	Phe	Pro	Ala	Leu	Gly	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr	Glu	65	70	75	80
Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Arg	Arg	Met	Glu	Leu	Ser	Met	Gly	Pro	Ile	Gln	85	90	95	
Ala	Asn	His	Thr	Gly	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	100	105	110	
Lys	Phe	Gln	Lys	Val	Lys	Gly	Phe	Gly	Gly	Ala	Met	Thr	Asp	Ala	Ala	115	120	125	
Ala	Leu	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Pro	Ala	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	130	135	140	
Lys	Ser	Tyr	Phe	Ser	Glu	Glu	Gly	Ile	Gly	Tyr	Asn	Ile	Ile	Arg	Val	145	150	155	160
Pro	Met	Ala	Ser	Cys	Asp	Phe	Ser	Ile	Arg	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Asp	165	170	175	
Thr	Pro	Asp	Asp	Phe	Gln	Leu	His	Asn	Phe	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Asp	180	185	190	
Thr	Lys	Leu	Lys	Ile	Pro	Leu	Ile	His	Arg	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gln	195	200	205	
Arg	Pro	Val	Ser	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Trp	Leu				

ES 2 619 371 T3

210	215	220
Lys Thr Asn Gly Ala Val	Asn Gly Lys Gly Ser	Leu Lys Gly Gln Pro
225	230	235 240
Gly Asp Ile Tyr His	Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu	
	245	250 255
Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu		
	260	265 270
Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu		
	275	280 285
Gly Phe Thr Pro Glu His Gln Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly		
	290	295 300
Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu		
	305	310 315 320
Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr		
	325	330 335
Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr		
	340	345 350
Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg		
	355	360 365
Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser		
	370	375 380
Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met		
	385	390 395 400
Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly		
	405	410 415
Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp		
	420	425 430
Val Arg Asn Phe Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp		
	435	440 445

ES 2 619 371 T3

Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys
450 455 460

Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys
465 470 475 480

Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val
485 490 495

Val Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys
500 505 510

Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile
515 520 525

His Thr Tyr Leu Trp His Arg Gln
530 535

<210> 25
<211> 1726
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 25

```
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccagcc aggaaatcca tgcccgattc agaagaggag ccagatctta ccaagtgatc 120
tgacagagatg aaaaaacgca gatgatatac cagcaacatc agtcatggct gcgccctgtg 180
ctcagaagca accgggtgga atattgctgg tgcaacagtg gcagggcaca gtgccactca 240
gtgcctgtca aaagttgcag cgagccaagg tgtttcaacg ggggcacctg ccagcaggcc 300
ctgtacttct cagatttcgt gtgccagtgc cccgaaggat ttgctgggaa gtgctgtgaa 360
atagatacca gggccacgtg ctacgaggac cagggcatca gctacagggg cacgtggagc 420
acagcggaga gtggcgccga gtgcaccaac tggaacagca gcgcgttggc ccagaagccc 480
tacagcgggc ggaggccaga cgccatcagg ctgggcctgg ggaaccacaa ctactgcaga 540
aaccagatc gagactcaaa gccctggtgc tacgtcttta aggcggggaa gtacagctca 600
gagttctgca gcacccctgc ctgctctgag ggaaacagtg actgctactt tgggaatggg 660
tcagcctacc gtggcacgca cagcctcacc gagtcgggtg cctcctgcct cccgtggaat 720
tccatgatcc tgataggcaa ggtttacaca gcacagaacc ccagtgccca ggcactgggc 780
```

```

ctgggcaaac ataattactg ccggaatcct gatgggggatg ccaagccctg gtgccacgtg      840
ctgaagaacc gcaggctgac gtgggagtag tgtgatgtgc cctcctgctc cacctgcggc      900
ctgagacagt acagccagcc tcagtttcgc atcaaaggag ggctcttcgc cgacatcgcc      960
tcccacccct ggcaggetgc catctttgcc aagcacagga ggtcgccggg agagcgggttc     1020
ctgtgcgggg gcatactcat cagctcctgc tggattctct ctgccgcca ctgcttccag     1080
gagaggtttc cgccccacca cctgacggtg atcttgggca gaacataccg ggtggtcctt     1140
ggcgaggagg agcagaaatt tgaagtcgaa aaatacattg tccataagga attcgatgat     1200
gacacttacg acaatgacat tgcgctgctg cagctgaaat cggattcgtc ccgctgtgcc     1260
caggagagca gcgtgggtccg cactgtgtgc cttcccccg cggacctgca gctgccggac     1320
tggacggagt gtgagctctc cggctacggc aagcatgagg ccttgtctcc tttctattcg     1380
gagcggctga aggaggctca tgtcagactg taccatcca gccgctgcac atcacaacat     1440
ttacttaaca gaacagtcac cgacaacatg ctgtgtgtg gagacactcg gagcggcggg     1500
ccccaggcaa acttgacga cgctgccag ggcgattcgg gaggccccct ggtgtgtctg     1560
aacgatggcc gcatgacttt ggtgggcac atcagctggg gcctgggctg tggacagaag     1620
gatgtcccg gtgtgtacac caaggttacc aactacctag actggattcg tgacaacatg     1680
cgaccgtgac caggaacacc cgactcctca aaagcaaatg agatcc                      1726

```

<210> 26
 <211> 562
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

```

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1              5              10              15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Gln Glu Ile His Ala Arg Phe Arg Arg
      20              25              30

Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met
      35              40              45

Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn
 50              55              60

```

ES 2 619 371 T3

Arg	Val	Glu	Tyr	Cys	Trp	Cys	Asn	Ser	Gly	Arg	Ala	Gln	Cys	His	Ser
65					70					75					80
Val	Pro	Val	Lys	Ser	Cys	Ser	Glu	Pro	Arg	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Thr
			85						90					95	
Cys	Gln	Gln	Ala	Leu	Tyr	Phe	Ser	Asp	Phe	Val	Cys	Gln	Cys	Pro	Glu
			100					105					110		
Gly	Phe	Ala	Gly	Lys	Cys	Cys	Glu	Ile	Asp	Thr	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr
		115					120					125			
Glu	Asp	Gln	Gly	Ile	Ser	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	Ser	Thr	Ala	Glu	Ser
	130					135					140				
Gly	Ala	Glu	Cys	Thr	Asn	Trp	Asn	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala	Gln	Lys	Pro
145					150					155					160
Tyr	Ser	Gly	Arg	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Arg	Leu	Gly	Leu	Gly	Asn	His
				165					170					175	
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Arg	Asp	Ser	Lys	Pro	Trp	Cys	Tyr	Val
			180					185					190		
Phe	Lys	Ala	Gly	Lys	Tyr	Ser	Ser	Glu	Phe	Cys	Ser	Thr	Pro	Ala	Cys
		195					200					205			
Ser	Glu	Gly	Asn	Ser	Asp	Cys	Tyr	Phe	Gly	Asn	Gly	Ser	Ala	Tyr	Arg
	210					215					220				
Gly	Thr	His	Ser	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Ala	Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	Asn
225					230					235					240
Ser	Met	Ile	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Thr	Ala	Gln	Asn	Pro	Ser	Ala
			245						250					255	
Gln	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Lys	His	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly
		260						265					270		
Asp	Ala	Lys	Pro	Trp	Cys	His	Val	Leu	Lys	Asn	Arg	Arg	Leu	Thr	Trp
		275					280					285			
Glu	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Ser	Cys	Ser	Thr	Cys	Gly	Leu	Arg	Gln	Tyr

ES 2 619 371 T3

290	295	300
Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala 305 310 315 320		
Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro 325 330 335		
Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile 340 345 350		
Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu 355 360 365		
Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu 370 375 380		
Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp 385 390 395 400		
Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser 405 410 415		
Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro 420 425 430		
Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly 435 440 445		
Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys 450 455 460		
Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His 465 470 475 480		
Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr 485 490 495		
Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp 500 505 510		
Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val 515 520 525		

ES 2 619 371 T3

Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
530 535 540

Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
545 550 555 560

Arg Pro

<210> 27
<211> 825
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 27

atcactctct ttaatcacta ctcacattaa cctcaactcc tgccacaatg tacaggatgc 60
aactcctgtc ttgcattgca ctaattcttg cacttgtcac aaacagtgca cctacttcaa 120
gttcgacaaa gaaaacaaag aaaacacagc tacaactgga gcattttactg ctggattttac 180
agatgatttt gaatggaatt aataattaca agaatcccaa actcaccagg atgctcacat 240
ttaagtttta catgcccag aaggccacag aactgaaaca gcttcagtgt ctagaagaag 300
aactcaaacc tctggaggaa gtgctgaatt tagctcaaag caaaaacttt cacttaagac 360
ccagggactt aatcagcaat atcaacgtaa tagttctgga actaaagggga tctgaaacaa 420
cattcatgtg tgaatatgca gatgagacag caaccattgt agaatttctg aacagatgga 480
ttaccttttg tcaaagcatc atctcaacac taacttgata attaagtgtc tcccacttaa 540
aacatatcag gccttctatt tatttattta aatatttaaa ttttatattt attggttgaat 600
gtatgggttg tacctattgt aactattatt cttaatctta aaactataaa tatggatctt 660
ttatgattct ttttgtaagc cctaggggct ctaaaatggt ttacottatt tatcccaaaa 720
atatttatta ttatgttgaa tgttaaatat agtatctatg tagattgggt agtaaaacta 780
tttaataaat ttgataaata taaaaaaaaa aaacaaaaaa aaaaa 825

<210> 28
<211> 156
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu

ES 2 619 371 T3

1	5	10	15
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Lys Lys	20	25	30
Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu	35	40	45
Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr	50	55	60
Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys Gln Leu Gln	65	70	75
Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala	85	90	95
Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile	100	105	110
Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys	115	120	125
Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp	130	135	140
Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr	145	150	155

<210> 29
 <211> 7931
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 29

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtgga ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgagggtttat	300
gatacagtggt tcattacact taagaacatg gcttccatc ctgtcagttc tcatgctgtt	360

ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
 gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctcctg 480
 aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540
 gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag cctactagt atgtagagaa 600
 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgcgtga 660
 tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact cttgatgca ggatagggat 720
 gctgcacctg ctggggcctg gcctaaaatg cacacagtca atgggttatgt aaacaggtct 780
 ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtcctatt ggcatgtgat tggaatgggc 840
 accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat 900
 cgccaggcgt ccttggaaat ctgcccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960
 gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa 1020
 gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
 gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggg caggtttgat 1140
 gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200
 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc 1260
 cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320
 aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatat acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380
 attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaggttg agacacactg 1440
 ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
 gatgtccgtc ctttgtatc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560
 ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
 actaaatcag atcctcggtg cctgaccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga 1680
 gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740
 agaggaaaac agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgtttctgt atttgatgag 1800
 aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttct tccccaatcc agctggagtg 1860
 cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920
 tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980
 attggagcac agactgactt ctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
 atgggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100

atggaaaacc	caggtctatg	gattctgggg	tgccacaact	cagactttcg	gaacagaggc	2160
atgaccgcct	tactgaaggt	ttctagttgt	gacaagaaca	ctggtgatta	ttacgaggac	2220
agttatgaag	atatttcagc	atacttgctg	agtaaaaaaca	atgccattga	accaagaagc	2280
ttctcccaga	attcaagaca	ccgtagcact	aggcaaaaagc	aatttaatgc	caccacaatt	2340
ccagaaaatg	acatagagaa	gactgaccct	tggtttgcac	acagaacacc	tatgcctaaa	2400
atacaaaatg	tctcctctag	tgatttggtg	atgctcttgc	gacagagtcc	tactccacat	2460
gggctatcct	tatctgatct	ccaagaagcc	aaatatgaga	ctttttctga	tgatccatca	2520
cctggagcaa	tagacagtaa	taacagcctg	tctgaaatga	cacacttcag	gccacagctc	2580
catcacagtg	gggacatggt	atttaccctt	gagtcaggcc	tccaattaag	attaaatgag	2640
aaactgggga	caactgcagc	aacagagttg	aagaaacttg	atttcaaagt	ttctagtaca	2700
tcaaaataatc	tgatttcaac	aattccatca	gacaatttgg	cagcaggtac	tgataataca	2760
agttccttag	gacccccaag	tatgccagtt	cattatgata	gtcaattaga	taccactcta	2820
tttggcaaaa	agtcactctc	ccttactgag	tctggtggac	ctctgagctt	gagtgaagaa	2880
aataatgatt	caaagttggt	agaatcaggt	ttaatgaata	gccaagaaag	ttcatgggga	2940
aaaaatgtat	cgtcaacaga	gagtggtagg	ttattttaaag	ggaaaagagc	tcattggacct	3000
gctttgttga	ctaaagataa	tgccctattc	aaagttagca	tctctttggt	aaagacaaac	3060
aaaacttcca	ataattcagc	aactaataga	aagactcaca	ttgatggccc	atcattatta	3120
attgagaata	gtccatcagt	ctggcaaaat	atattagaaa	gtgacactga	gttttaaaaaa	3180
gtgacacctt	tgattcatga	cagaatgctt	atggacaaaa	atgctacagc	tttgaggcta	3240
aatcatatgt	caaataaaaac	tacttcatca	aaaaacatgg	aatgggtcca	acagaaaaaa	3300
gagggcccca	ttccaccaga	tgacacaaaat	ccagatatgt	cgttctttta	gatgctattc	3360
ttgccagaat	cagcaagggtg	gatacaaaag	actcatggaa	agaactctct	gaactctggg	3420
caaggcccca	gtccaaagca	attagtatcc	ttaggaccag	aaaaatctgt	ggaagggtcag	3480
aatttcttgt	ctgagaaaaa	caaagtggta	gtaggaaaag	gtgaatttac	aaaggacgta	3540
ggactcaaag	agatggtttt	tccaagcagc	agaaacctat	ttcttactaa	cttgggataat	3600
ttacatgaaa	ataatacaca	caatcaagaa	aaaaaaattc	aggaagaaat	agaaaagaag	3660
gaaacattaa	tccaagagaa	tgtagttttg	cctcagatac	atacagtgac	tggcactaag	3720
aatttcatga	agaacctttt	cttactgagc	actaggcaaa	atgtagaagg	ttcatatgac	3780

```

ggggcatatg ctccagtact tcaagatddd aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca 3840
aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaaa ggggaggaag aaaacttgga aggcttgga 3900
aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatatt tctaataca 3960
agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaaacaatt cagactccca 4020
ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtgggtcc 4080
aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactacaa tgagaaggag 4140
aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct 4200
caagcaaata gatctccatt acccattgca aaggatcat catttccatc tattagacct 4260
atatatctga ccagggtcct attccaagac aactcttctc atcttccagc agcatcttat 4320
agaaagaaag attctggggt ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat 4380
aacctttctt tagccattct aaccttgag atgactggtg atcaaagaga ggttggtcc 4440
ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctcccg 4500
aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat 4560
cagaaggacc tatteccctac ggaaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcgtg 4620
gaaggagacc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct 4680
ggaaaagttc cttttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta 4740
ttggatctct ttgcttgga taacctat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa 4800
tccaagaga agtcaccaga aaaaacagct ttaagaaaa aggataccat ttgtccctg 4860
aacgcttggt aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaa taagcccgaa 4920
atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaaccacca 4980
gtcttgaaac gccatcaacg ggaaataact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa 5040
attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat 5100
gaggatgaaa atcagagccc ccgagcttt caaaagaaaa cagacacta tttattgct 5160
gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaaacagg 5220
gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag aaagttgttt tccaggaatt tactgatggc 5280
tctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaatgaac atttgggact cctggggcca 5340
tatataagag cagaagttga agataatatc atggtaactt tcagaaatca ggcctctcgt 5400
ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa 5460
cctagaaaaa actttgtcaa gctaatgaa accaaaactt acttttgaa agtgcaacat 5520

```

catatggcac	ccactaaaga	tgagtttgac	tgcaaagcct	gggcttattt	ctctgatgtt	5580
gacctggaaa	aagatgtgca	ctcaggcctg	attggacccc	ttctgggtctg	ccacactaac	5640
aaactgaacc	ctgctcatgg	gagacaagtg	acagtacagg	aatttgctct	gtttttcacc	5700
atctttgatg	agacccaaaag	ctgggtacttc	actgaaaata	tggaaagaaa	ctgcagggct	5760
ccctgcaata	tccagatgga	agatcccact	tttaaagaga	attatcgctt	ccatgcaatc	5820
aatggctaca	taatggatac	actacctggc	ttagtaatgg	ctcaggatca	aaggattcga	5880
tggtatctgc	tcagcatggg	cagcaatgaa	aacatccatt	ctattcattt	cagtggacat	5940
gtgttcactg	tacgaaaaaa	agaggagtat	aaaatggcac	tgtacaatct	ctatccaggt	6000
gtttttgaga	cagtggaaat	gttaccatcc	aaagctggaa	tttggcgggt	ggaatgcctt	6060
attggcgagc	atctacatgc	tgggatgagc	acactttttc	tgggtgtacag	caataagtgt	6120
cagactcccc	tgggaatggc	ttctggacac	attagagatt	ttcagattac	agcttcagga	6180
caatatggac	agtgggcccc	aaagctggcc	agacttcatt	attccggatc	aatcaatgcc	6240
tggagcacca	aggagccctt	ttcttggatc	aagggtggatc	tgttggcacc	aatgattatt	6300
cacggcatca	agaccagggg	tgcccgctcag	aagttctcca	gcctctacat	ctctcagttt	6360
atcatcatgt	atagtcttga	tgggaagaag	tggcagactt	atcgaggaaa	ttccactgga	6420
accttaatgg	tcttcttttg	caatgtggat	tcactctggga	taaaacacaa	tatttttaac	6480
cctccaatta	ttgctcgata	catcogtttg	cacccaactc	attatagcat	tcgcagcact	6540
cttcgcatgg	agttgatggg	ctgtgattta	aatagttgca	gcatgccatt	gggaatggag	6600
agtaaagcaa	tatcagatgc	acagattact	gcttcaccc	actttaccac	tatgtttgcc	6660
acctggtctc	cttcaaaaagc	tcgacttcac	ctccaaggga	ggagtaatgc	ctggagacct	6720
caggtgaata	atccaaaaga	gtggctgcaa	gtggacttcc	agaagacaat	gaaagtcaca	6780
ggagtaacta	ctcagggagt	aaaatctctg	cttaccagca	tgtatgtgaa	ggagttcctc	6840
atctccagca	gtcaagatgg	ccatcagtg	actctctttt	ttcagaatgg	caaagtaaag	6900
gtttttcagg	gaaatcaaga	ctccttcaca	cctgtggtga	actctctaga	cccaccgtta	6960
ctgactcgct	accttcgaat	tcacccccag	agttgggtgc	accagattgc	cctgaggatg	7020
gaggttctgg	gctgcgaggc	acaggacctc	tactgaggg	ggccactgea	gcacctgcca	7080
ctgccgtcac	ctctccctcc	tcagctccag	ggcagtgctc	ctccctggct	tgccttctac	7140
ctttgtgcta	aatcctagca	gacactgcct	tgaagcctcc	tgaattaact	atcatcagtc	7200

ctgcatttct ttggtggggg gccaggaggg tgcaccaat ttaacttaac tcttacctat 7260
 ttctctgcagc tgctcccaga ttactccttc cttccaatat aactaggcaa aaagaagtga 7320
 ggagaaacct gcatgaaagc attcttcctt gaaaagttag gcctctcaga gtcaccactt 7380
 cctctgttgt agaaaaacta tgtgatgaaa ctttgaaaaa gatatttatg atgttaacat 7440
 ttcagggttaa gcctcatatg tttaaaataa aactctcagt tgtttattat cctgatcaag 7500
 catggaacaa agcatgtttc aggatcagat caatacaatc ttggagtcaa aaggcaaatc 7560
 atttgacaaa tctgcaaaat ggagagaata caataactac tacagtaaag tctgtttctg 7620
 cttccttaca catagatata attatgttat ttagtcatta tgaggggcac attcttatct 7680
 ccaaaactag cattcttaaa ctgagaatta tagatggggg tcaagaatcc ctaagtcccc 7740
 tgaaattata taaggcattc tgtataaatg caaatgtgca tttttctgac gagtgtccat 7800
 agatataaag ccatttggtc ttaattctga ccaataaaaa aataagtcag gaggatgcaa 7860
 ttgttgaaag ctttgaaata aaataacaat gtcttcttga aatttgtgat ggccaagaaa 7920
 gaaaatgatg a 7931

<210> 30
 <211> 2351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
 1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
 20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
 35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
 50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
 65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
 85 90 95

ES 2 619 371 T3

Ala	Glu	Val	Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser	100	105	110
His	Pro	Val	Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser	115	120	125
Glu	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	130	135	140
Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu	145	150	155
Lys	Glu	Asn	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser	165	170	175
Tyr	Leu	Ser	His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	180	185	190
Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	195	200	205
Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly	210	215	220
Lys	Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp	225	230	235
Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr	245	250	255
Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val	260	265	270
Tyr	Trp	His	Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile	275	280	285
Phe	Leu	Glu	Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser	290	295	300
Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met	305	310	315

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335
 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg

545		550		555		560									
Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu
				565					570					575	
Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val
			580					585					590		
Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu
		595					600					605			
Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp
	610					615					620				
Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val
625					630					635				640	
Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp
				645					650					655	
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe
			660					665					670		
Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr
		675					680					685			
Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro
	690					695					700				
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly
705					710					715				720	
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp
				725					730					735	
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys
			740					745					750		
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Arg
		755					760					765			
Ser	Thr	Arg	Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp
	770					775					780				

ES 2 619 371 T3

Ile	Glu	Lys	Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys	785	790	795	800
Ile	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Gln	Ser	805	810	815	
Pro	Thr	Pro	His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Tyr	820	825	830	
Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn	835	840	845	
Ser	Leu	Ser	Glu	Met	Thr	His	Phe	Arg	Pro	Gln	Leu	His	His	Ser	Gly	850	855	860	
Asp	Met	Val	Phe	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	865	870	875	880
Lys	Leu	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	885	890	895	
Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Asn	Leu	Ile	Ser	Thr	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	900	905	910	
Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Asn	Thr	Ser	Ser	Leu	Gly	Pro	Pro	Ser	Met	915	920	925	
Pro	Val	His	Tyr	Asp	Ser	Gln	Leu	Asp	Thr	Thr	Leu	Phe	Gly	Lys	Lys	930	935	940	
Ser	Ser	Pro	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu	945	950	955	960
Asn	Asn	Asp	Ser	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Leu	Met	Asn	Ser	Gln	Glu	965	970	975	
Ser	Ser	Trp	Gly	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	Phe	980	985	990	
Lys	Gly	Lys	Arg	Ala	His	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Lys	Asp	Asn	Ala	995	1000	1005	

ES 2 619 371 T3

Leu	Phe	Lys	Val	Ser	Ile	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	Asn	Lys	Thr	Ser
1010						1015					1020			
Asn	Asn	Ser	Ala	Thr	Asn	Arg	Lys	Thr	His	Ile	Asp	Gly	Pro	Ser
1025						1030					1035			
Leu	Leu	Ile	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Val	Trp	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu
1040						1045					1050			
Ser	Asp	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Val	Thr	Pro	Leu	Ile	His	Asp	Arg
1055						1060					1065			
Met	Leu	Met	Asp	Lys	Asn	Ala	Thr	Ala	Leu	Arg	Leu	Asn	His	Met
1070						1075					1080			
Ser	Asn	Lys	Thr	Thr	Ser	Ser	Lys	Asn	Met	Glu	Met	Val	Gln	Gln
1085						1090					1095			
Lys	Lys	Glu	Gly	Pro	Ile	Pro	Pro	Asp	Ala	Gln	Asn	Pro	Asp	Met
1100						1105					1110			
Ser	Phe	Phe	Lys	Met	Leu	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Ala	Arg	Trp	Ile
1115						1120					1125			
Gln	Arg	Thr	His	Gly	Lys	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly	Gln	Gly	Pro
1130						1135					1140			
Ser	Pro	Lys	Gln	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Pro	Glu	Lys	Ser	Val	Glu
1145						1150					1155			
Gly	Gln	Asn	Phe	Leu	Ser	Glu	Lys	Asn	Lys	Val	Val	Val	Gly	Lys
1160						1165					1170			
Gly	Glu	Phe	Thr	Lys	Asp	Val	Gly	Leu	Lys	Glu	Met	Val	Phe	Pro
1175						1180					1185			
Ser	Ser	Arg	Asn	Leu	Phe	Leu	Thr	Asn	Leu	Asp	Asn	Leu	His	Glu
1190						1195					1200			
Asn	Asn	Thr	His	Asn	Gln	Glu	Lys	Lys	Ile	Gln	Glu	Glu	Ile	Glu
1205						1210					1215			

ES 2 619 371 T3

Lys	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Leu	Pro	Gln	Ile
1220						1225					1230			
His	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Asn	Phe	Met	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu
1235						1240					1245			
Leu	Ser	Thr	Arg	Gln	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr
1250						1255					1260			
Ala	Pro	Val	Leu	Gln	Asp	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asn
1265						1270					1275			
Arg	Thr	Lys	Lys	His	Thr	Ala	His	Phe	Ser	Lys	Lys	Gly	Glu	Glu
1280						1285					1290			
Glu	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Ile	Val	Glu
1295						1300					1305			
Lys	Tyr	Ala	Cys	Thr	Thr	Arg	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Gln
1310						1315					1320			
Asn	Phe	Val	Thr	Gln	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg
1325						1330					1335			
Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Val	Asp
1340						1345					1350			
Asp	Thr	Ser	Thr	Gln	Trp	Ser	Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Thr	Pro
1355						1360					1365			
Ser	Thr	Leu	Thr	Gln	Ile	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Gly	Ala
1370						1375					1380			
Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Asp	Cys	Leu	Thr	Arg	Ser	His	Ser
1385						1390					1395			
Ile	Pro	Gln	Ala	Asn	Arg	Ser	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Lys	Val	Ser
1400						1405					1410			
Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe
1415						1420					1425			
Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys

ES 2 619 371 T3

1430		1435		1440
Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys				
1445		1450		1455
Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly				
1460		1465		1470
Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser				
1475		1480		1485
Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp				
1490		1495		1500
Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His				
1505		1510		1515
Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser				
1520		1525		1530
Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr				
1535		1540		1545
Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val				
1550		1555		1560
Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser				
1565		1570		1575
Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln				
1580		1585		1590
Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys				
1595		1600		1605
Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys				
1610		1615		1620
Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys				
1625		1630		1635
Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg				
1640		1645		1650

ES 2 619 371 T3

Leu	Cys	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu
1655						1660					1665			
Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr
1670						1675					1680			
Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
1685						1690					1695			
Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
1700						1705					1710			
Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
1715						1720					1725			
Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
1730						1735					1740			
Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
1745						1750					1755			
Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu
1760						1765					1770			
His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp
1775						1780					1785			
Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser
1790						1795					1800			
Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly
1805						1810					1815			
Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr
1820						1825					1830			
Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu
1835						1840					1845			
Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu
1850						1855					1860			

ES 2 619 371 T3

Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His
1865						1870					1875			
Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln
1880						1885					1890			
Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp
1895						1900					1905			
Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn
1910						1915					1920			
Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His
1925						1930					1935			
Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met
1940						1945					1950			
Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser
1955						1960					1965			
Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr
1970						1975					1980			
Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr
1985						1990					1995			
Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly
2000						2005					2010			
Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly
2015						2020					2025			
Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro
2030						2035					2040			
Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala
2045						2050					2055			
Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His
2060						2065					2070			

ES 2 619 371 T3

Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser
2075						2080					2085			
Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile
2090						2095					2100			
Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser
2105						2110					2115			
Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr
2120						2125					2130			
Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn
2135						2140					2145			
Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile
2150						2155					2160			
Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg
2165						2170					2175			
Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys
2180						2185					2190			
Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln
2195						2200					2205			
Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser
2210						2215					2220			
Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp
2225						2230					2235			
Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe
2240						2245					2250			
Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys
2255						2260					2265			
Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser
2270						2275					2280			
Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys

ES 2 619 371 T3

2285		2290		2295
Val Lys	Val Phe Gln Gly	Asn Gln Asp Ser Phe Thr	Pro Val Val	
2300		2305	2310	
Asn Ser	Leu Asp Pro Pro	Leu Leu Thr Arg Tyr	Leu Arg Ile His	
2315		2320	2325	
Pro Gln	Ser Trp Val His	Gln Ile Ala Leu Arg	Met Glu Val Leu	
2330		2335	2340	
Gly Cys	Glu Ala Gln Asp	Leu Tyr		
2345		2350		

<210> 31
 <211> 1471
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 31

```

atggcgcccg tcgccgtctg ggccgcgctg gccgtcggac tggagctctg ggctgcggcg      60
cacgccttgc cgcgccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccg gagcacatgc      120
cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaattg ctgcgccggc      180
caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac      240
agcacatata ccagctctg gaactgggtt cccgagtgtc tgagctgtgg ctcccgtgt      300
agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc      360
agggccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gcgggctgtg cgcgccgctg      420
cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg      480
tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg      540
ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc      600
acgtccacgt cccccaccg gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg      660
tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaacca gcactgtctc aagcacctcc      720
ttcctgctcc caatgggccc cagcccccca gctgaaggga gcactggcga cttcgctctt      780
ccagttggac tgattgtggg tgtgacagcc ttgggtctac taataatagg agtgggtgaac      840
tgtgtcatca tgaccaggt gaaaaagaag cccttgtgcc tgcagagaga agccaagggtg      900
cctcacttgc ctgccgataa ggccccgggt acacagggcc ccgagcagca gcacctgctg      960
  
```

atcacagcgc cgagctccag cagcagctcc ctggagagct cggccagtgc gttggacaga 1020
 agggcgccca ctcggaacca gccacaggca ccaggcgtgg aggccagtgg ggccggggag 1080
 gcccgggcca gcaccgggag ctacagattct tcccctggtg gccatgggac ccagggtcaat 1140
 gtcacctgca tcgtgaacgt ctgtagcagc totgaccaca gctcacagtg ctctcccaa 1200
 gccagctcca caatgggaga cacagattcc agcccctcgg agtccccgaa ggacgagcag 1260
 gtcccccttct ccaaggagga atgtgccttt cggtcacagc tggagacgcc agagaccctg 1320
 ctggggagca ccgaagagaa gccctgccc cttggagtgc ctgatgctgg gatgaagccc 1380
 agttaaccag gccggtgtgg gctgtgtcgt agccaaggtg ggctgagccc tggcaggatg 1440
 accctgcgaa ggggcctcgg tccttcagg c 1471

<210> 32
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15
 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30
 Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45
 Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60
 Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80
 Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95
 Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110
 Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125

ES 2 619 371 T3

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
245 250 255

Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
260 265 270

Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
275 280 285

Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
290 295 300

Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
305 310 315 320

Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
325 330 335

Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
340 345 350

ES 2 619 371 T3

Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
355 360 365

Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
370 375 380

Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
385 390 395 400

Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
405 410 415

Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
420 425 430

Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
435 440 445

Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
450 455 460

<210> 33
<211> 1475
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 33

tccacctgtc cccgcagcgc cggctcgcgc cctcctgccg cagccaccga gccgcctct	60
agcgccccga cctcgccacc atgagagccc tgctggcgcg cctgcttctc tgcgtcctgg	120
tcgtgagcga ctccaaaggc agcaatgaac ttcataagtc tccatcgaac tgtgactgtc	180
taaatggagg aacatgtgtg tccaacaagt acttctccaa cattcactgg tgcaactgcc	240
caaagaaatt cggagggcag cactgtgaaa tagataagtc aaaaacctgc tatgagggga	300
atggtcactt ttaccgagga aaggccagca ctgacaccat gggccggccc tgccctgcct	360
ggaactctgc cactgtcctt cagcaaactg accatgccca cagatctgat gctcttcagc	420
tgggcctggg gaaacataat tactgcagga acccagacaa ccggaggcga ccctgggtgct	480
atgtgcaggt gggcctaaag ccgcttgtcc aagagtgcac ggtgcatgac tgcgagatg	540
gaaaaaagcc ctctctctct ccagaagaat taaaatttca gtgtggccaa aagactctga	600
ggccccgctt taagattatt gggggagaat tcaccaccat cgagaaccag ccctgggttg	660
cggccatcta caggaggcac cgggggggct ctgtcaccta cgtgtgtgga ggcagcctca	720

```

tcagcccttg ctgggtgatc agcgccacac actgcttcat tgattaccca aagaaggagg 780
actacatcgt ctacctgggt cgctcaaggc ttaactccaa cagcaaggg gagatgaagt 840
ttgaggtgga aaacctcatc ctacacaagg actacagcgc tgacacgctt gctcaccaca 900
acgacattgc cttgctgaag atccgttcca aggagggcag gtgtgcgcag ccatcccgga 960
ctatacagac catctgcctg ccctcgatgt ataacgatcc ccagtttggc acaagctgtg 1020
agatcactgg ctttggaaaa gagaattcta ccgactatct ctatccggag cagctgaaga 1080
tgactgttgt gaagctgatt tcccacggg agtgtcagca gcccactac tacggctctg 1140
aagtcaccac caaaatgctg tgtgctgctg acccacagt gaaaacagat tcctgccagg 1200
gagactcagg gggacccctc gtctgttccc tccaaggccg catgactttg actggaattg 1260
tgagctgggg ccgtggatgt gccctgaagg acaagccagg cgtctacacg agagtctcac 1320
acttcttacc ctggatccgc agtcacacca aggaagagaa tggcctggcc ctctgaggg 1380
ccccagggag gaaacgggca ccaccgctt tcttgctggt tgtcattttt gcagtagagt 1440
catctccatc agctgtaaga agagactggg aagat 1475

```

<210> 34
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34

```

Met Arg Ala Leu Leu Ala Arg Leu Leu Leu Cys Val Leu Val Val Ser
1           5           10          15

Asp Ser Lys Gly Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp
20           25          30

Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile
35           40          45

His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile
50           55          60

Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly
65           70          75          80

Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser
85           90          95

```

Ala	Thr	Val	Leu	Gln	Gln	Thr	Tyr	His	Ala	His	Arg	Ser	Asp	Ala	Leu
			100					105					110		
Gln	Leu	Gly	Leu	Gly	Lys	His	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Arg
		115					120					125			
Arg	Arg	Pro	Trp	Cys	Tyr	Val	Gln	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Val	Gln
	130					135					140				
Glu	Cys	Met	Val	His	Asp	Cys	Ala	Asp	Gly	Lys	Lys	Pro	Ser	Ser	Pro
145					150					155					160
Pro	Glu	Glu	Leu	Lys	Phe	Gln	Cys	Gly	Gln	Lys	Thr	Leu	Arg	Pro	Arg
				165					170					175	
Phe	Lys	Ile	Ile	Gly	Gly	Glu	Phe	Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Gln	Pro	Trp
			180					185					190		
Phe	Ala	Ala	Ile	Tyr	Arg	Arg	His	Arg	Gly	Gly	Ser	Val	Thr	Tyr	Val
		195					200					205			
Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Cys	Trp	Val	Ile	Ser	Ala	Thr	His
	210					215					220				
Cys	Phe	Ile	Asp	Tyr	Pro	Lys	Lys	Glu	Asp	Tyr	Ile	Val	Tyr	Leu	Gly
225					230					235					240
Arg	Ser	Arg	Leu	Asn	Ser	Asn	Thr	Gln	Gly	Glu	Met	Lys	Phe	Glu	Val
				245					250					255	
Glu	Asn	Leu	Ile	Leu	His	Lys	Asp	Tyr	Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Ala	His
		260						265					270		
His	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Lys	Ile	Arg	Ser	Lys	Glu	Gly	Arg	Cys
		275					280					285			
Ala	Gln	Pro	Ser	Arg	Thr	Ile	Gln	Thr	Ile	Cys	Leu	Pro	Ser	Met	Tyr
		290				295					300				
Asn	Asp	Pro	Gln	Phe	Gly	Thr	Ser	Cys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Gly	Lys
305					310					315					320

ES 2 619 371 T3

Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val
325 330 335

Val Lys Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly
340 345 350

Ser Glu Val Thr Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys
355 360 365

Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu
370 375 380

Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys
385 390 395 400

Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu
405 410 415

Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu
420 425 430

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

5

10

ES 2 619 371 T3

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 37

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

ES 2 619 371 T3

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

5
<210> 39
<211> 1039
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 39

```
tccctgcacag gcagtgcctt gaagtgcctt ttcagagacc tttcttcata gactactttt 60
ttttcttttaa gcagcaaaag gagaaaattg tcatcaaagg atattccaga ttcttgacag 120
cattctcgtc atctctgagg acatcaccat catctcagga tgaggggcat gaagctgctg 180
ggggcgctgc tggcactggc ggccctactg cagggggccg tgtccctgaa gatcgcagcc 240
ttcaacatcc agacatttgg ggagaccaag atgtccaatg ccaccctcgt cagctacatt 300
gtgcagatcc tgagccgcta tgacatcgcc ctgggtccagg aggtcagaga cagccacctg 360
actgccgtgg ggaagctgct ggacaacctc aatcaggatg caccagacac ctatcactac 420
gtggtcagtg agccactggg acggaacagc tataaggagc gctacctgtt cgtgtacagg 480
cctgaccagg tgtctcggtt ggacagctac tactacgatg atggctgcga gccctgcggg 540
aacgacacct tcaaccgaga gccagccatt gtcaggttct tctcccggtt cacagaggtc 600
agggagtttg ccattgttcc cctgcatgag gccccggggg acgcagtagc cgagatcgac 660
gctctctatg acgtctacct ggatgtccaa gagaaatggg gcttggagga cgtcatgttg 720
atgggcgact tcaatgcggg ctgcagctat gtgagaccct ccagtggtc atccatccgc 780
ctgtggacaa gcccacactt ccagtggctg atccccgaca gcgctgacac cacagctaca 840
cccacgcact gtgcctatga caggatcgtg gttgcaggga tgctgctccg aggcgcggtt 900
gttcccgact cggtctttcc ctttaacttc caggctgcct atggcctgag tgaccaactg 960
gccaagcca tcagtgacca ctatccagtg gaggtgatgc tgaagtgage agccctccc 1020
cacaccagtt gaactgcag 1039
```

10

15
<210> 40
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Arg Gly Met Lys Leu Leu Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu

ES 2 619 371 T3

1	5	10	15
Leu Gln Gly Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr	20	25	30
Phe Gly Glu Thr Lys Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val	35	40	45
Gln Ile Leu Ser Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp	50	55	60
Ser His Leu Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp	65	70	75
Ala Pro Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn	85	90	95
Ser Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser	100	105	110
Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly Asn	115	120	125
Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser Arg Phe	130	135	140
Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala Ala Pro Gly	145	150	155
Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asp Val	165	170	175
Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu Met Gly Asp Phe Asn	180	185	190
Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln Trp Ser Ser Ile Arg Leu	195	200	205
Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr	210	215	220
Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly	225	230	235
			240

ES 2 619 371 T3

Met Leu Leu Arg Gly Ala Val Val Pro Asp Ser Ala Leu Pro Phe Asn
245 250 255

Phe Gln Ala Ala Tyr Gly Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile Ser
260 265 270

Asp His Tyr Pro Val Glu Val Met Leu Lys
275 280

<210> 41
<211> 678
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 41

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60
ttctcctgca gggccagtc gttcgttggc tcaagcatcc actggatatca gcaaagaaca 120
aatggttctc caaggcttct cataaagtat gttcttgagt ctatgtctgg gatcccttcc 180
aggtttagtg gcagtggatc agggacagat tttactctta gcatcaacac tgtggagtct 240
gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtcatagct ggccattcac gttcggtctg 300
gggacaaatt tggaagtaaa agaagtgaag cttgaggagt ctggaggagg cttggtgcaa 360
cctggaggat ccatgaaact ctctgtgtt gcctctggat tcattttcag taaccactgg 420
atgaactggg tccgccagtc tccagagaag gggcttgagt gggttgctga aattagatca 480
aaatctatta attctgcaac acattatgct gagtctgtga aaggagggtt caccatctca 540
agagatgatt ccaaaagtgc tgtctacctg caaatgaccg acttaagaac tgaagacact 600
ggcgtttatt actgttccag gaattactac ggtagtacct acgactactg gggccaaggc 660
accactctca cagtctcc 678

<210> 42
<211> 226
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser

ES 2 619 371 T3

	20		25		30												
Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile		
	35						40					45					
Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Met	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50					55					60						
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Thr	Val	Glu	Ser		
65					70					75					80		
Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Ser	Trp	Pro	Phe		
				85					90					95			
Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Lys	Leu	Glu		
			100					105					110				
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Met	Lys	Leu	Ser		
		115					120					125					
Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Ser	Asn	His	Trp	Met	Asn	Trp	Val		
	130					135					140						
Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Glu	Ile	Arg	Ser		
145					150					155					160		
Lys	Ser	Ile	Asn	Ser	Ala	Thr	His	Tyr	Ala	Glu	Ser	Val	Lys	Gly	Arg		
				165					170					175			
Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Tyr	Leu	Gln	Met		
			180					185					190				
Thr	Asp	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Asn		
		195					200					205					
Tyr	Tyr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr		
	210					215					220						
Val	Ser																
	225																

<210> 43
 <211> 450
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 43

```

gctgcatcag aagaggccat caagcacatc actgtccttc tgccatggcc ctgtggatgc      60
gectcctgcc cctgctggcg ctgctggccc totggggacc tgaccagcc gcagcctttg      120
tgaaccaaca cctgtgcggc tcacacctgg tggaagctct ctacctagtg tgcggggaac      180
gaggcttctt ctacacaccc aagaccgcc gggaggcaga ggacctgcag gtggggcagg      240
tgagagctgg cggggggcct ggtgcaggca gcctgcagcc cttggccctg gaggggtccc      300
tgcagaagcg tggcattgtg gaacaatgct gtaccagcat ctgctccctc taccagctgg      360
agaactactg caactagacg cagcccgagc gcagccccc acccgccgc tcctgcaccc      420
agagagatgg aataaagccc ttgaaccagc      450

```

<210> 44

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

```

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1          5          10          15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
          20          25          30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
          35          40          45

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
          50          55          60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
65          70          75          80

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
          85          90          95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
          100          105          110

```

<210> 45

<211> 1203

<212> ADN

<213> Hepatitis B virus

<400> 45

```

atgggaggtt ggtcttccaa acctcgacaa ggcatgggga cgaatcttct tgttcccaat    60
cctctgggat tctttcccgga tcaccagttg gacctgcgt tcggagccaa ctcaaacaat    120
ccagattggg acttcaaccc caacaaggat cactggccag aggcaatcaa ggtaggagcg    180
ggagacttctg ggccagggtt caccaccacca caccggcggtc ttttggggtg gagccctcag    240
gtcaggggca tattgacaac agtgccagca gcgcctcctc ctgtttccac caatcggcag    300
tcaggaagac agcctactcc catctctcca cctctaagag acagtcctcc tcaggccatg    360
cagtgggaact ccacaacatt ccaccaagct ctgctagatc ccagagttag gggcctatat    420
tttctgtctg gtggctccag ttccggaaca gtaaaccctg ttccgactac tgtctcacc    480
atatcgtcaa tcttctcgag gactggggac cctgcaccga acatggagag cacaacatca    540
ggattcctag gacctctgt cgtgttacag gcggggtttt tcttggtgac aagaatcctc    600
acaataccac agagtctaga ctgctgggtg acttctctca attttctagg gggagcaacc    660
acgtgtcctg gccaaaattc gcagtcacca acctccaatc actcaccaac ctcttgctct    720
ccaatttgct ctggttatcg ctggatgtgt ctgcggcggt ttatcatatt cctcttcate    780
ctgctgctat gcctcatctt cttgttggtt cttctggact accaaggtat gttgcccggt    840
tgtctctac ttccagggaac atcaactacc agcacgggac catgcaagac ctgcacgatt    900
cctgtctcaag gaacctctat gtttccctct tgttgctgta caaaccttc ggacgggaaac    960
tgcacttgta ttcccatccc atcatcctgg gctttcgcaa gattcctatg ggagtgggccc    1020
tcagtccgtt tctcctgggt cagtttacta gtgccatttg ttcagtgggt cgcaggggtt    1080
tccccactg tttggcttct agttatatgg atgatgtggt attgggggccc aagtctgtac    1140
aacatcttga gtcccttttt acctctatta ccaattttct tttgtctttg ggtatacatt    1200
tga                                                                    1203

```

<210> 46
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> virus de la Hepatitis B
 <400> 46

```

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
1           5           10           15

```

Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
 20 25 30

Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
 35 40 45

Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Ile Lys Val Gly Ala Gly Asp Phe Gly
 50 55 60

Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln
 65 70 75 80

Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Val Ser
 85 90 95

Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu
 100 105 110

Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His
 115 120 125

Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly
 130 135 140

Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Val Ser Pro
 145 150 155 160

Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu
 165 170 175

Ser Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly
 180 185 190

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser
 195 200 205

Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly
 210 215 220

Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro
 225 230 235 240

ES 2 619 371 T3

Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile
245 250 255

Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu
260 265 270

Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser
275 280 285

Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly
290 295 300

Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn
305 310 315 320

Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu
325 330 335

Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro
340 345 350

Phe Val Gln Trp Phe Ala Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val
355 360 365

Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser
370 375 380

Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
385 390 395 400

<210> 47
<211> 799
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 47

cgaaccactc agggctcctgt ggacagctca cctagctgca atggctacag gctcccggac 60
gtccctgctc ctggcttttg gcctgctctg cctgccctgg cttcaagagg gcagtgcctt 120
cccaaccatt cccttatcca ggctttttga caacgctatg ctccgcgcce atcgtctgca 180
ccagctggcc ttgacacct accaggagtt tgaagaagcc tatatcccaa aggaacagaa 240
gtattcattc ctgcagaacc ccagacctc cctctgtttc tcagagtcta ttccgacacc 300

ctccaacagg gaggaaacac aacagaaatc caacctagag ctgctccgca tctccctgct 360
 gctcatccag tcgtggctgg agcccgtgca gttcctcagg agtgtcttcg ccaacagcct 420
 ggtgtacggc gcctctgaca gcaaogtcta tgacctccta aaggacctag aggaaggcat 480
 ccaaacgctg atggggaggc tggaagatgg cagcccccg actgggcaga tcttcaagca 540
 gacctacagc aagttcgaca caaactcaca caacgatgac gcactactca agaactacgg 600
 gctgctctac tgcttcagga aggacatgga caaggtcgag acattcctgc gcatcgtgca 660
 gtgccgctct gtggagggca gctgtggctt ctagctgccc gggtggcac cctgtgaccc 720
 ctccccagtg cctctcctgg ccctggaagt tgccactcca gtgcccacca gccttgctct 780
 aataaaatta agttgcatc 799

<210> 48
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 20 25 30
 Ser Arg Pro Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 35 40 45
 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 50 55 60
 Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 65 70 75 80
 Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 100 105 110
 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 115 120 125

ES 2 619 371 T3

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
210 215

<210> 49
<211> 963
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 49

```
atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacgtcaggg gagggccccc gagcctgcgg ggcagggacg cgccagcccc caagccctgc      120
gtcccggccc agtgcttcga cctgctggtc cgccactgcg tggcctgcgg gctcctgcgc      180
acgccgcggc cgaaaccggc cggggccagc agccctgcgc ccaggacggc gctgcagccc      240
caggagtcgg tgggcgcggg ggccggcgag gcggcggtcg aaaaaactca cacatgccca      300
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtc tctcttccc cccaaaaccc      360
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc      420
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc      480
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc      540
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc      600
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag      660
gtgtacaccc tgccccatc cgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc      720
ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc      780
```

ES 2 619 371 T3

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ttggactcgg acggctcctt cttcctctac 840
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 900
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tcccgggaaa 960
tga 963

<210> 50
<211> 320
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Val Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg
20 25 30

Asp Ala Pro Ala Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu
35 40 45

Leu Val Arg His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro
50 55 60

Lys Pro Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro
65 70 75 80

Gln Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Val Asp Lys Thr
85 90 95

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
100 105 110

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
115 120 125

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
130 135 140

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
145 150 155 160

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

ES 2 619 371 T3

165

170

175

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
180 185 190

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
195 200 205

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
210 215 220

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
225 230 235 240

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
245 250 255

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
260 265 270

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
275 280 285

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
290 295 300

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
305 310 315 320

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

5

10

ES 2 619 371 T3

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
100 105

<210> 52

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ile Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 54

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gly Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

ES 2 619 371 T3

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 55

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 56

<211> 448

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

5

10

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

ES 2 619 371 T3

340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445

<210> 57
 <211> 8540
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 57

gacgtcgagg ccgctctagg cctccaaaaa agcctcctca ctacttctgg aatagctcag	60
aggccgaggg ggcctcggcc tctgcataaa taaaaaaaat tagtcagcca tgcattggggc	120
ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg gcgaggttag gggcgggact	180
atggttgctg actaattgag atgcatgctt tgcatacttc tgctgctgg ggagcctggg	240
gactttccac acctggttgc tgactaattg agatgcatgc tttgcatact tctgctgct	300
ggggagcctg gggactttcc acaccctaac tgacacacat tccacagaat taattccct	360
agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc	420
gttacataac ttacggtaaa tgccccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc cggccattg	480
acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa	540
tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtag atcaagtgt tcatatgcca	600
agtaccccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtag	660
atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc	720

atggtgatgc ggTTTTggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga	780
tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg	840
gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta	900
cggTgggagg totatataag cagagctggg tacgtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc	960
catcacagat ctctcaccat gagggTcccc gctcagctcc tggggctcct gctgctctgg	1020
ctccaggtg cagcatgtga tggTaccaag gtggaaatca aacgtacggT ggctgcacca	1080
tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttTgtg	1140
Tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaaggT ggataacgcc	1200
ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac	1260
agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc	1320
Tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaagagcttcaa caggggagag	1380
Tgttgaattc agatccgtta acggttacca actacctaga ctggattcgt gacaacatgc	1440
ggccgtgata tctacgtatg atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt	1500
gtttgcccct ccccgTgcc ttccttgacc ctggaaggTg ccaTccccac Tgtcctttcc	1560
Taataaaatg aggaaattgc atcgattgt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggT	1620
ggggTggggc aggacagcaa gggggaggat Tgggaagaca atagcaggca Tgctggggat	1680
gcggTgggct ctatggaacc agctggggct cgacagctat gccaaagtacg cccctattg	1740
acgtcaatga cggTaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact	1800
ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggTg atgcggTTTT	1860
ggcagtacat caatgggcgt ggatagcggT ttgactcacg gggatttcca agtctccacc	1920
ccattgacgt caatgggagt ttgtttTggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc	1980
gtaacaactc cgccccattg acgcaaattg gcggtaggcg TgtacggTgg gaggtctata	2040
Taagcagagc Tgggtacgtc ctcacattca gtgatcagca ctgaaacacag acccgTcgac	2100
atgggtTgga gcctcatctt gctcttctt gtogctgtTg ctacgcgtgt cgctagcacc	2160
aaggggcccat cggTcttccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	2220
gccctgggct gcctggTcaa ggactacttc ccogaaccgg TgacggTgtc gtggaactca	2280
ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagTctc aggactctac	2340
Tccctcagca gcgtggTgac cgtgccctcc agcagctTgg gcaccagac ctacatctgc	2400
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagcagagcc caaatctTgt	2460

gacaaaactc acacatgcc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 2520
 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 2580
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 2640
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 2700
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggactacaag 2760
 tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 2820
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccagg 2880
 aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag 2940
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc 3000
 gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 3060
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 3120
 ctctccctgt ctccgggtaa atgaggatcc gttaacggtt accaactacc tagactggat 3180
 tcgtgacaac atgcggccgt gatatctacg tatgatcagc ctgactgtg cttctagtt 3240
 gccagccatc tgttggttgc cctcccccg tgccttcctt gacctggaa ggtgccactc 3300
 ccactgtcct ttctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt 3360
 ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca 3420
 ggcattgctg ggatgcggtg ggctctatgg aaccagctgg ggctcgacag cgctggatct 3480
 cccgatcccc agctttgctt ctcaatttct tatttgcata atgagaaaaa aaggaaaatt 3540
 aattttaaca ccaattcagt agttgattga gcaaatgcgt tgccaaaaag gatgcttttag 3600
 agacagtgtt ctctgcacag ataaggacaa acattattca gagggagtac ccagagctga 3660
 gactcctaag ccagtgagtg gcacagcatt ctaggagaaa atatgcttgt catcaccgaa 3720
 gcctgattcc gtagagccac accttggtaa gggccaatct gctcacacag gatagagagg 3780
 gcaggagcca gggcagagca tataagggtga ggtaggatca gttgctctc acatttgctt 3840
 ctgacatagt tgtgttggga gcttgatag cttggacagc tcagggtgc gatttcgcgc 3900
 caaacttgac ggcaatccta gcgtgaaggc tggtaggatt ttatccccgc tgccatcatg 3960
 gttcgaccat tgaactgcat cgtcgccgtg tcccaaaata tggggattgg caagaacgga 4020
 gacctaccct ggctccgtc caggaaacgag ttcaagtact tccaaagaat gaccacaacc 4080
 tcttcagtgg aaggtaaaca gaatctggtg attatgggta ggaaaacctg gttctccatt 4140

cctgagaaca atcgaccttt aaaggacaga attaatatag ttctcagtag agaactcaaa 4200
 gaaccaccac gaggagctca ttttcttgcc aaaagtttgg atgatgcctt aagacttatt 4260
 gaacaaccgg aattggcaag taaagtagac atggtttggg tagtcggagg cagttctggt 4320
 taccaggaag ccatgaatca accaggccac cttagactct ttgtgacaag gatcatgcag 4380
 gaatttgaaa gtgacacgtt tttcccagaa attgatttgg ggaaatataa acttctccca 4440
 gaatacccag gcgtcctctc tgagggtccag gaggaaaaag gcatcaagta taagtttgaa 4500
 gtctacgaga agaaagacta acaggaagat gctttcaagt tctctgctcc cctcctaaag 4560
 tcatgcattt ttataagacc atgggacttt tgctggcttt agatcagcct cgactgtgcc 4620
 ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccgtg ccttccttga ccttgggaagg 4680
 tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag 4740
 gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga 4800
 caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggaa ccagctgggg ctcgagctac 4860
 tagctttgct tctcaatttc ttatttgcac aatgagaaaa aaaggaaaat taattttaac 4920
 accaattcag tagttgattg agcaaatgcg ttgccaaaaa ggatgcttta gagacagtgt 4980
 tctctgcaca gataaggaca aacattattc agagggagta ccagagctg agactcctaa 5040
 gccagtgagt ggcacagcat tctagggaga aatatgcttg tcatcaccga agcctgattc 5100
 cgtagagcca caccttggtg agggccaatc tgctcacaca ggatagagag ggcaggagcc 5160
 agggcagagc atataagggtg aggtaggatc agttgctcct cacatttgct tctgacatag 5220
 ttgtgttggg agcttgatc gatcctctat ggttgaacaa gatggattgc acgcaggttc 5280
 tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg 5340
 ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac 5400
 cgacctgtcc ggtgcctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc 5460
 cagcagggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg 5520
 gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgcoga 5580
 gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg 5640
 cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaaaccgg 5700
 tottgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt 5760
 cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc 5820
 ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg 5880

gctgggtgtg gcggaaccgt atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga 5940
 gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac ggtatcgccg cttcccgaatt 6000
 cgcagcgcat cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctgggggtt 6060
 cgaaatgacc gaccaagcga cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc 6120
 cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca 6180
 gcgcggggat ctcatgctgg agttcttcgc ccaccccaac ttgtttattg cagcttataa 6240
 tggttacaaa taaagcaata gcatacaaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca 6300
 ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tctatcttat catgtctgga tcgcggccgc 6360
 gatcccgctc agagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat 6420
 ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggagcataaa gtgtaaagcc tggggcgctt 6480
 aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgctttc cagtcgggaa 6540
 acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta 6600
 ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggc 6660
 gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacgggttat cacagaatca ggggataacg 6720
 caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 6780
 tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 6840
 gtcagagggt gcgaaaccgc acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 6900
 cctcgtgctg ctctctgtt ccgaccctgc cgcttacccg atacctgtcc gcctttctcc 6960
 cttcgggaag cgtggcgctt tctcaatgct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtagg 7020
 tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccg tccagccgac cgctgcgcct 7080
 tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg cactggcag 7140
 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga 7200
 agtggtgccc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga 7260
 agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg 7320
 gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag 7380
 aagatccttt gatcttttct acggggctct acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag 7440
 ggatttttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcacctg gatcctttta aattaaaaat 7500
 gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct 7560

taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttctg ttcattccata gttgcctgac	7620
tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa	7680
tgataaccgag agacccacgc tcaccggctc cagatttattc agcaataaac cagccagccg	7740
gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt	7800
gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca	7860
ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttgggtat ggcttcattc agctccgggt	7920
cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct	7980
tgggtcctcc gatcgttggtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atgggttatgg	8040
cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg	8100
agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccg	8160
cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgcgc atcattggaa	8220
aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt	8280
aacccactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt	8340
gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt	8400
gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggg tattgtctca	8460
tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat	8520
ttccccgaaa agtgccacct	8540

<210> 58
 <211> 9209
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 <400> 58

gacgtcgcgg ccgctctagg cctccaaaaa agcctcctca ctacttctgg aatagctcag	60
aggccgaggg ggcctcggcc tctgcataaa taaaaaaaat tagtcagcca tgcattggggc	120
ggagaatggg cggaactggg cggagttagg ggcgggatgg gcggagttag gggcgggact	180
atgggttgctg actaattgag atgcatgctt tgcatacttc tgcctgctgg ggagcctggg	240
gactttccac acctgggtgc tgactaattg agatgcatgc tttgcatact tctgctgct	300
ggggagcctg gggactttcc acaccctaac tgacacacat tccacagaat taattcccct	360
agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gccatatat ggagttccgc	420
gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgccattg	480

acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	acgccaatag	ggactttcca	ttgacgtcaa	540
tgggtggact	atttacggta	aactgcccac	ttggcagtac	atcaagtgtg	tcatatgcc	600
agtacgcccc	ctattgacgt	caatgacggg	aaatggcccc	cctggcatta	tgcccagtac	660
atgaccttat	gggactttcc	tacttggcag	tacatctacg	tattagtc	cgctattacc	720
atggtgatgc	ggttttggca	gtacatcaat	gggcgtggat	accggtttga	ctcacgcgga	780
tttccaagtc	tccaccccat	tgacgtcaat	gggagtttgt	tttggcacca	aaatcaacgg	840
gactttccaa	aatgtcgtaa	caactccgcc	ccattgacgc	aaatgggcgg	taggcgtgta	900
cgggtgggagg	tctatataag	cagagctggg	tacgtgaacc	gtcagatcgc	ctggagacgc	960
catcacagat	ctctcactat	ggattttcag	gtgcagatta	tcagcttcc	gctaatacgt	1020
gcttcagtc	taatgtccag	aggacaaatt	gttctctccc	agtctccage	aatcctgtct	1080
gcatctccag	gggagaaggt	cacaatgact	tgagggcca	gctcaagtgt	aagttacatc	1140
cactggttcc	agcagaagcc	aggatcctcc	cccaaaccct	ggatttatgc	cacatccaac	1200
ctggcttctg	gagtcctgt	tcgcttcagt	ggcagtggt	ctgggacttc	ttactctctc	1260
acaatcagca	gagtgaggcc	tgaagatgct	gccacttatt	actgccagca	gtggactagt	1320
aaccacacca	cgttcggagg	ggggaccaag	ctggaaatca	aacgtacggg	ggctgcacca	1380
tctgtcttca	tcttcccgcc	atctgatgag	cagttgaaat	ctggaactgc	ctctgttgtg	1440
tgctgctga	ataacttcta	tcccagagag	gccaaagtac	agtggaaggt	ggataacgcc	1500
ctccaatcgg	gtaactccca	ggagagtgtc	acagagcagg	acagcaagga	cagcacctac	1560
agcctcagca	gcaccctgac	gctgagcaaa	gcagactacg	agaaacacaa	agtctacgcc	1620
tgcaagtca	cccatcaggg	cctgagctcg	cccgtcacaa	agagcttcaa	caggggagag	1680
tggtgaattc	agatccgtta	acggttacca	actacctaga	ctggattcgt	gacaacatgc	1740
ggcgtgata	tctacgtatg	atcagcctcg	actgtgcctt	ctagttgcca	gccatctgtt	1800
gtttgcccct	ccccgtgcc	ttccttgacc	ctggaaggtg	ccactcccac	tgtcctttcc	1860
taataaaatg	aggaaattgc	atcgatttgt	ctgagtaggt	gtcattctat	tctggggggg	1920
gggggtgggg	aggacagcaa	gggggaggat	tgggaagaca	atagcaggca	tgctggggat	1980
gcggtgggct	ctatggaacc	agctggggct	cgacagctat	gccaagtacg	ccccctattg	2040
acgtcaatga	cggtaaatgg	ccgcctggc	attatgccca	gtacatgacc	ttatgggact	2100
ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcacgctat	taccatggtg	atgcggtttt	2160
ggcagtacat	caatgggcgt	ggatagcggg	ttgactcacg	gggatttcca	agtctccacc	2220

ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc	2280
gtaacaactc ogccccattg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata	2340
taagcagagc tgggtacgtc ctcacattca gtgatcagca ctgaacacag acccgtcgac	2400
atgggttga gcctcatctt gctcttctt gtcgtgttg ctacgcgtgt cctgtcccag	2460
gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc	2520
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct	2580
ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatcccgaa atggtgatac ttcctacaat	2640
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg	2700
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac	2760
tacggcggtg actggtactt caatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctctgca	2820
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	2880
ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	2940
tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtccctca	3000
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	3060
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agcagagccc	3120
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccc cgtgcccag cacctgaact cctgggggga	3180
ccgtcagctt tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcattgatct ccggaccct	3240
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	3300
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc gcggggagga gcagtacaac	3360
agcagctacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	3420
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc	3480
aaagccaaag ggcagcccc agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag	3540
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	3600
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg	3660
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg	3720
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	3780
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgaggatccg ttaacgggta ccaactacct	3840
agactggatt cgtgacaaca tgcggccgtg atatctacgt atgatcagcc tgactgtgc	3900

cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccgt gccttccttg accctggaag 3960
 gtgccactcc cactgtcctt tctaataaaa atgaggaaat tgcacgcat tgtctgagta 4020
 ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaag 4080
 acaatagcag gcatgctggg gatgcgggtg gctctatgga accagctggg gctcgacagc 4140
 gctggatctc ccgatcccca gctttgcttc tcaatttctt atttgcataa tgagaaaaaa 4200
 agggaaaatta attttaacac caattcagta gttgattgag caaatgcgtt gccaaaaagg 4260
 atgctttaga gacagtgttc tctgcacaga taaggacaaa cattattcag agggagtacc 4320
 cagagctgag actcctaagc cagtgagtgg cacagcattc tagggagaaa tatgcttgctc 4380
 atcacccaag cctgattccg tagagccaca ccttggttag ggccaatctg ctcacacagg 4440
 atagagaggg caggagccag ggcagagcat ataaggtag gtaggatcag ttgctcctca 4500
 catttgcttc tgacatagtt gtgttgggag cttggatagc ttggacagct cagggtctgg 4560
 atttcgcgcc aaacttgacg gcaatcctag cgtgaaggct ggtaggattt tatccccgtc 4620
 gccatcatgg ttcgaccatt gaactgcac gtgcgcgtgt cccaaaatat ggggattggc 4680
 aagaacggag acctaccctg gcctccgtc aggaacgagt tcaagtactt ccaagaatg 4740
 accacaacct cttcagtggg aggtaaacag aatctggtga ttatgggtag gaaaacctgg 4800
 ttctccattc ctgagaagaa tcgaccttta aaggacagaa ttaatatagt tctcagtaga 4860
 gaactcaaag aaccaccacg aggagctcat tttcttgcca aaagtttggg tgatgcctta 4920
 agacttattg aacaaccgga attggcaagt aaagtagaca tgggttggat agtcggaggc 4980
 agttctgttt accaggaagc catgaatcaa ccaggccaac ttagactctt tgtgacaagg 5040
 atcatgcagg aatttgaaag tgacacgttt tcccagaaa ttgatttggg gaaatataaa 5100
 cttctccag aatacccagg cgtcctctct gaggtccagg agggaaaagg catcaagtat 5160
 aagtttgaag tctacgagaa gaaagactaa caggaagatg ctttcaagtt ctctgctccc 5220
 ctactaaagc tatgcatttt tataagacca tgggactttt gctggcttta gatcagcctc 5280
 gactgtgctt tctagtgtgc agccatctgt tgtttgcccc tccccgtgc ctcccttgac 5340
 cctggaaggt gccactcca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaattg catcgcatg 5400
 totgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga 5460
 ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcgggtggc tctatggaac cagctggggc 5520
 tcgagctact agctttgctt ctcaatttct tatttgcata atgagaaaaa aaggaaaatt 5580
 aattttaaca ccaattcagt agttgattga gcaaatgcgt tgccaaaaag gatgctttag 5640

agacagtgtt ctctgcacag ataaggacaa acattattca gaggagtagc ccagagctga 5700
 gactcctaag ccagttagtg gcacagcatt ctaggagaaa atatgcttgt catcacggaa 5760
 gcctgattcc gtagagccac accttggtta gggccaatct gctcacacag gatagagagg 5820
 gcaggagcca gggcagagca tataaggtga ggtaggatca gttgctcttc acatttgctt 5880
 ctgacatagt tgtgttggga gcttggatcg atcctctatg gttgaacaag atggattgca 5940
 cgcaggttct cgggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac 6000
 aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcggc cggttctttt 6060
 tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc 6120
 gtggctggcc acgacggggc ttcccttgcc agctgtgctc gacgttgctc ctgaagcggg 6180
 aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctcaccttgc 6240
 tcctgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc 6300
 ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat 6360
 ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc 6420
 cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgaccca 6480
 tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggg ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga 6540
 ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat 6600
 tgctgaagag cttggcggcg aatgggtgta ccgcttcttc gtgctttacg gtatcgccgc 6660
 tcccgattcg cagcgcatcg ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gagcgggaact 6720
 ctgggggttc aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga ttctgattcc 6780
 accgccgcct tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg 6840
 atcctccagc gcgggggatct catgctggag ttcttcgccc accccaactt gtttattgca 6900
 gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcaciaaatt tcacaaataa agcatttttt 6960
 tcaactgcatt ctagtgtggg tttgtccaaa ctcatcaatc tatcttatca tgtctggatc 7020
 gcggccgcga tcccgtcgag agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa 7080
 attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct 7140
 ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc 7200
 agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg 7260
 gtttgcgat tgggcgctct tccgcttctc cgctcactga ctgcgtgcgc tcggctgttc 7320

ggctgcggcg agcgggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag	7380
gggataacgc aggaagaagc atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa	7440
aggccgcggt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc	7500
gacgctcaag tcagagggtg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc	7560
ctggaagctc cctcgtgccc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaaccga tacctgtccg	7620
cctttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt ctcaatgttc acgctgtagg tatctcagtt	7680
cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc	7740
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc	7800
cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag	7860
agttcttgaa gtgggtggct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg	7920
ctctgctgaa gccagttacc ttccgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa	7980
ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag	8040
gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggctctga cgctcagtggt aacgaaaact	8100
cacgttaagg gattttggct atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa	8160
attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt	8220
accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag	8280
ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca	8340
gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc	8400
agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcttgcaac tttatccgcc tccatccagt	8460
ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg	8520
ttgttgccat tgctacaggc atcgtgggtg cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca	8580
gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttggtg aaaaaagcgg	8640
ttagctcctt cggtcctccg atcgttgctc gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca	8700
tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg	8760
tgactgggtg gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct	8820
cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca	8880
tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca	8940
gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg	9000
tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggggaata agggcgacac	9060
ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt	9120
attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc	9180
cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacct	9209

<210> 59
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 59

```

atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc      60
agaggggcaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag      120
gtcacaaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tccactgggt ccagcagaag      180
ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcctt      240
gttcgcttca gtggcagtggt gtctgggact tcttactctc tcacaatcag cagagtggag      300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggacta gtaaccacc caggttcgga      360
ggggggacca agctggaaat caaa                                           384

```

10

<210> 60
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 60

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1              5              10              15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
          20              25              30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
          35              40              45

Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
          50              55              60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65              70              75              80

Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
          85              90              95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
          100              105              110

Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          115              120              125

```

ES 2 619 371 T3

<210> 61
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 61

```

atggggttgga gctcatctt gctcttctt gtcgctgttg ctacgcgtgt cctgtcccag    60
gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc    120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct    180
ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatcccgaa atggtgatac ttctacaat    240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg    300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac    360
tacggcggtg actggtactt caatgtctgg ggcgagggga ccacggtcac cgtctctgca    420
  
```

10

<210> 62
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 62

```

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
1           5           10           15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
20           25           30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35           40           45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
50           55           60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
65           70           75           80
  
```

ES 2 619 371 T3

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

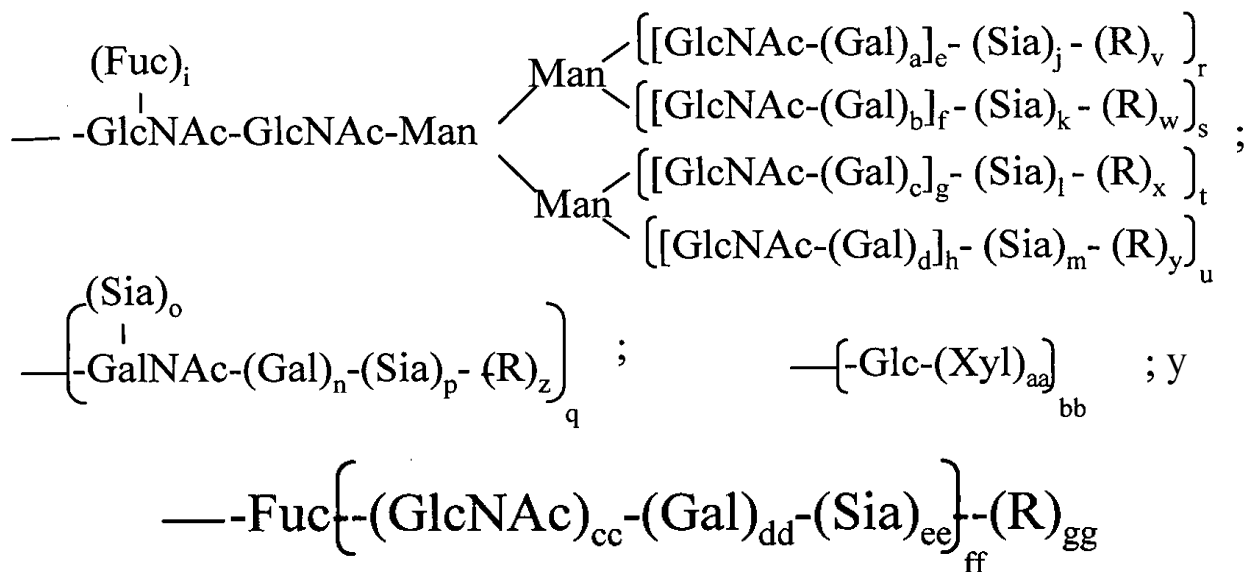
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado covalente entre un Factor IX y un grupo modificador que altera una propiedad de dicho Factor IX, en el que dicho grupo modificador está unido por enlace covalente a dicho Factor IX en un resto glucosilo o de aminoácido preseleccionado de dicho péptido mediante un grupo de enlace glucosilo intacto, en el que dicho grupo modificador comprende poli(etilenglicol), y en el dicho grupo de enlace glucosilo intacto es un residuo de ácido siálico.

2. Un procedimiento *in vitro* sin células para formar un conjugado entre un péptido de Factor IX y un grupo modificador, en el que dicho grupo modificador está unido por enlace covalente dicho péptido de Factor IX a través de un grupo de enlace glucosilo intacto, comprendiendo dicho péptido de Factor IX un residuo glucosilo que tiene una fórmula que es un miembro seleccionado de:



en las que

a, b, c, d, i, n, o, p, q, r, s, t, u, bb, cc, dd, ee, ff y gg son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1;
e, f, g, h y aa son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 0 a 6;
j, k, l y m son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 0 a 20;
v, w, x, y y z son 0;
R es un grupo modificador, una manosa o una oligomanosa;

comprendiendo dicho procedimiento:

(a) poner en contacto dicho péptido de Factor IX con una glucosiltransferasa y un donador de glucosilo modificado, que comprende un resto de glucosilo que es un sustrato para dicha glucosiltransferasa unida por enlace covalente a dicho grupo modificador, en condiciones apropiadas para la formación de dicho grupo de enlace glucosilo intacto;
(b) antes de la etapa (a), poner en contacto dicho péptido de Factor IX con una sialidasa en condiciones apropiadas para retirar dicho ácido siálico dicho péptido de Factor IX;
(c) poner en contacto el producto formado en la etapa (a) con una sialiltransferasa y un donador de ácido siálico en condiciones apropiadas para transferir el ácido siálico a dicho producto;

en el que dicho grupo modificador es un polímero hidrosoluble, y el polímero hidrosoluble comprende poli(etilenglicol).

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha sialiltransferasa es ST3Gal3.

4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que

a, b, c, y d son 1;
e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j, k, l, m, i, n, o, p, q, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y
v, w, x, y, z y gg son 0.

5. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que
a, b, c, d, n, q se seleccionan independientemente de 0 y 1;
aa, e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4;
bb, cc, dd, ee, ff, j, k, l, m, i, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y
v, w, x, y, z y gg son 0.
5
6. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que
a, b, c, d, n, bb, cc, dd y ff son 1;
e, f, g, h y aa son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4;
q, ee, i, j, k, l, m, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y
v, w, x, y, z y gg son 0.
10
7. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que
a, b, c, d y q son 1;
e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j, k, l, m, i, n, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y
v, w, x, y, z y gg son 0.
15
8. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que
a, b, c, d, q, bb, cc, dd y ff son 1;
aa, e, f, g y h son miembros independientemente seleccionados de los números enteros de 1 a 4;
ee, i, j, k, l, m, o, p, r, s, t y u son miembros independientemente seleccionados de 0 y 1; y
v, w, x, y, z y gg son 0.
20
9. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho poli(etilenglicol) se selecciona de poli(etilenglicol) lineal y poli(etilenglicol) ramificado.
10. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho poli(etilenglicol) tiene un grado de polimerización de 1 a 5000.
- 25 11. Un conjugado de péptido de Factor IX formado por el procedimiento de la reivindicación 2.
12. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado covalente de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 10 y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

12AP1/E5 -- Viventia Biotech	AI-201-Autoimmune
1964-Aventis	AI-301-Autoimmune
hormona del crecimiento 20K - AMUR	Vacuna del SIDA - ANPS, CIBG, Hesed
28P6/E6 - Viventia Biotech	Biomed, Hollis-Eden, Roma, United
3-Hidroxifalcoil-beta-lactoglobulina-	Biomedical, American Home Products,
terapia génica con ligando 4-IBB -	Maxygen
conjugado 64-Cu MAb TETA-1A3 -	ligando de receptores de las vías respiratorias -
Mallinckrodt Institute of Radiology	IC Innovations
conjugado 64-Cu MAb TETA-CT84.66	- AJvW 2 -- Ajinomoto
conjugado 64-Cu Trastuzumab TETA -	AK30NGF-Alkermes
Genentech	Albuferon - Human Genome Sciences
A200-Amgen	albúmina - Biogen, DSM Anti-Infectives,
A10255-EN Liliy	Genzyme Transgenics, PPL Therapeutics,
A1PDX- Hedral Therapeutics	TranXenoGen, Welfide Corp.
A6 -- Angstrom	aldesleukina - Chiron
aaAT-III - Genzyme	alefacept - Biogen
Abciximab - Centocor	Alemtuzumab -
ABI.001 -Atlantic BioPharmaceuticals	Terapia para la alergia - ALK-Abello/Maxygen,
ABT-828-Abbott	ALK-Abello/RP Scherer
Acutina	vacunas de alergia - Allergy Therapeutics
Actinohivina	Alnidofibatida - Aventis Pasteur
activina - Biotech Australia, Human	Alnorine-SRC VB VECTOR
Therapeutics	ALP 242 -- Gruenenthal
activina - Curis	Alfa antitripsina - Arriva/Hyland
AD439-Tanox	Immuno/ProMetic/Protease Sciences
AD519-Tanox	Alfa-1 antitripsina - Cutter, Bayer, PPL
Adalimumab - Cambridge Antibody Tech.	Therapeutics, Profile, ZymoGenetics,
Vacuna de Adenocarcinoma - Biomira - NIS	Arriva
Antagonistas del receptor de Adenosina A2B -	inhibidor de Alfa-1 proteasa - Genzyme
Adenosine Therapeutics	Transgenics, Welfide Corp.
ADP-001 -Axis Genetics	Proteína de fusión alfa-galactosa -
AF 13948-Affymax	Immunomedics
Afelimomab - Knoll	Alfa-galactosidasa A - Research
AFP-SCAN - Immunomedics	Corporation Technologies
AG2195-Corixa	Alfa-glucosidasa- Genzyme, Novazyme
agalsidasa alfa - Transkaryotic Therapies	Alfa-lactoalbúmina
agalsidasa beta - Genzyme	Alfa-L-iduronidasa -- Transkaryotic
AGENT-Antisoma	Therapies, BioMarin
AI 300 - Autoimmune	alteplasa -- Genentech
AI-101-Teva	alvircept sudotox -- NIH
AI-102-Teva	ALX1-11 -sNPS Pharmaceuticals
	terapia génica para Enfermedad de Alzheimer -

FIG. 1A

AM-133-AMRAD	conjugado MAb Anti-B4 -DC1 -- ImmunoGen
conj. inmunoestim Amb a 1 - Dynavax	anticuerpo PRIMATIZADO Anti-B7 - IDEC
AMD 3100 -AnorMED-NIS	MAb Anti-B7-1 16-10A1
AMD 3465-AnorMED-NIS	MAb Anti-B7-11G10
AMD 3465-AnorMED-NIS	MAb Anti-B7-2 GL-1
AMD Fab - Genentech	Anti-B7-2- inmunotoxina gelonina -
Amediplasa - Menarini, Novartis	Antibacterianos/antifúngicos --
AM-F9	Diversa/IntraBiotics
Vacuna de la amebiasis	anticuerpos monoclonales Anti-beta-amiloide -
Anfiregulina - Octogene	Cambridge Antibody Tech., Wyeth-Ayerst
anakinra - Amgen	anticuerpos Anti-BLyS - Cambridge
analgésico - Nobex	Antibody Tech. /Human Genome Sciences
ancestim - Amgen	conjugados anticuerpo-fármaco - Seattle
AnergiX.RA - Corixa, Organon	Genetics/Eos
Angiocidina - InKine	MAb Anti-C5 BB5-1 - Alexion
inhibidores de angiogénesis - ILEX	MAb Anti-C5 N19-8-Alexion
AngioMab - Antisoma	MAb Anti-C8
Angiopoyetinas - Regeneron/Procter &	citoquinas antiCáncer - BioPulse
Gamble	matriz antiCáncer - Telios Integra
angiostatina - EntreMed	Anticuerpos monoclonales antiCáncer - ARIUS,
terapia génica con Angiostatina/endostatina --	Immunex
Genetix Pharmaceuticals	péptidos antiCáncer - Maxygen, Micrologix
angiotensina-II, tópica - Maret	Profármaco antiCáncer Tech. - Alexion
Ántrax - EluSys Therapeutics/US Army	Anticuerpo Technologies
Medical Research Institute	Troy-Bodies antiCáncer -- Affile - Affitech
vacuna del ántrax	vacuna antiCáncer - NIH
Anticuerpos monoclonales Anti-factor de	antiCáncer es -- Epimmune
crecimiento derivado de plaquetas D humano -	MAb de oveja Anti-CCR5/CXCR4 -- KS
CuraGen	Biomedix Holdings
MAb Anti-17-1A 3622W94 --	MAb Anti-CD11a KBA-
GlaxoSmith Kline	MAb Anti-CD11a M17
MAb Anti-2C4 - Genentech	MAb Anti-CD11a TA-3-
anticuerpos monoclonales anti-4-1BB -- Bristol	MAb Anti-CD11a WT.1-
Myers Squibb	MAb Anti-CD11b -- Pharmacia
Plataforma Anti-Adhesión Tech. - Cytovax	MAb Anti-CD11b LM2
MAb Anti-adipocito- Cambridge Anticuerpo	MAb Anti-CD154 --Biogen
Tech./ObeSys	MAb Anti-CD16-anti-CD30 -- Biotest
antialérgicos - Maxygen	MAb Anti-CD18 - Pharmacia
vacuna antialergia -- Acambis	MAb Anti-CD19 B43-
MAb Anti-alfa-4-integrina	conjugado MAb Anti-CD19 -
anticuerpos monoclonales Anti-angiogénesis -	butirato de sodio liposomal
KS Biomedix/Schering AG	

FIG 1B

conjugado MAb Anti-CD19 -saporina -	MAb Anti-CD4 KT6
Anti-CD19-dsFv-PE38-inmunotoxina -	MAb Anti-CD4 OX38
MAb Anti-CD2 12-15-	conjugado MAb Anti-CD4 PAP -- Bristol-
MAb Anti-CD2 B-E2 - Diaclone	Myers Squibb
MAb Anti-CD2 OX34-	MAb Anti-CD4 RIB 5-2
MAb Anti-CD2 OX54-	MAb Anti-CD4 W3/25
MAb Anti-CD2 OX55-	MAb Anti-CD4 YTA 3.1.2
MAb Anti-CD2 RM2-1	MAb Anti-CD4 YTS177-9
MAb Anti-CD2 RM2-2	MAb Anti- ligando CD40 5c8 -- Biogen
MAb Anti-CD2 RM2-4	MAb Anti-CD40
MAb Anti-CD20 BCAB20	MAb Anti-CD40 5D12-Tanox
MAb biespecifico Anti-CD20-anti-Fc alfa RI -	-MAb Anti-CD44 A3D8
Medarex, Tenovus	MAb Anti-CD44 GKWA3
complejo MAb Anti-CD22 -saporina-6 -	MAb Anti-CD44 IM7
inmunotoxina Anti-CD3 -	MAb Anti-CD44 KM81
MAb Anti-CD3 145-2C11 -- Pharming	anticuerpos monoclonales variante MAb Anti-CD44
conjugado MAb Anti-CD3 CD4IgG --	Corixa/Hebrew University
Genentech	MAb Anti-CD45 BC8-I-131
MAb Anti-CD3 humanizado - Protein	MAb Anti-CD45RB
Design, RW Johnson	MAb Anti-CD48 HuLy-m3
MAb Anti-CD3 WT32	MAb Anti-CD48 WM-63
conjugado MAb Anti-CD3 --cadena-A-ricina	MAb Anti-CD5 - Becton Dickinson
conjugado MAb Anti-CD3 -xantina-oxidasa	MAb Anti-CD5 OX19
conjugado	
MAb Anti-CD30 BerH2 -- Medac	MAb Anti-CD6
conjugado MAb Anti-CD30 -saporina	conjugado MAb Anti-CD7 -PAP
Anti-CD30-scFv-ETA'-inmunotoxina	conjugado MAb Anti-CD7 - cadena-A-ricina
MAb Anti-CD38 AT13/5	MAb Anti-CD8 - Amerimmune, Cytodyn,
conjugado MAb Anti-CD38 -saporina	Becton Dickinson
MAb biespecifico Anti-CD3-anti-CD19	MAb Anti-CD8 2-43
MAb Anti-CD3-anti-EGFR	MAb Anti-CD8 OX8
MAb Anti-CD3-anti- receptor de interleuquina-2-	MAb Anti-CD80 P16C10-IDEC
MAb Anti-CD3-anti-MOv18 - Centocor	MAb Anti-CD80 P7C10 - ID Vaccine
MAb biespecifico Anti-CD3-anti-SCLC	conjugado MAb Anti-CD8-idarrubicina
vacuna de idiotipo Anti-CD4	MAb Anti-CEA CE-25
MAb Anti-CD4 - Centocor, IDEC	MAb Anti-CEA MN 14 - Immunomedics
Pharmaceuticals, Xenova Group	conjugado MAb Anti-CEA MN14-PE40 -
MAb Anti-CD4 16H5	Immunomedics
MAb Anti-CD4 4162W94-- GlaxoSmithKline	conjugado MAb Anti-CEA T84.66-interleuquina-2
MAb Anti-CD4 B-F5 - Diaclone	MAb de oveja Anti-CEA -- KS Biomedix
MAb Anti-CD4 GK1-5	Holdings

FIG. 1C

anticuerpos monoclonales Anti-superficie celular -- Cambridge Antibody Tech. /Pharmacia
MAB bifuncional Anti-c-erbB2-anti-CD3 -- Otsuka
MAB Anti-CMV - Scotgen
MAB Anti-CTLA-4
anticuerpo catalítico Anti-EGFR - Hesed Biomed
inmunotoxina anti-EGFR - IVAX
MAB Anti-EGFR -- Abgenix
MAB Anti-EGFR 528
MAB Anti-EGFR KSB 107 - KS Biomedix
conjugado MAB Anti-EGFR -DM1 -- ImmunoGen

MAB Anti-EGFR -LA1 -
MAB de oveja Anti-EGFR - KS Biomedix
MAB Anti-FAP F19-I-131
MAB Anti-Fas IgM CH11
MAB Anti-Fas Jo2
MAB Anti-Fas RK-8

anticuerpos monoclonales Anti-Flt-1 - ImClone
péptidos anti-fúngicos - State University of New York
tripéptidos antifúngicos - BTG
proteína de fusión anticuerpo Anti-gangliósido GD2 -
interleuquina-2 - Lexigen
MAB Anti-GM2 - Kyowa
anticuerpos monoclonales Anti- receptor GM- CSF -- AMRAD
Anti-gp130 --Tosoh
anticuerpos monoclonales Anti-HCA - AltaRex/Epigen
anticuerpos Anti-hCG -- Abgenix/AVI BioPharma
anticuerpos monoclonales humanos Anti-heparanasa - Oxford Glycosciences/Medarex
anticuerpos monoclonales humanos Anti-virus de hepatitis C - XTL Biopharmaceuticals
terapia génica con anticuerpo Anti-HER-2
anticuerpo Anti-herpes - Epicyte

anticuerpo anti-VIH - Epicyte
anticuerpo catalítico anti-VIH -- Hesed Biomed
proteína de fusión anti-VIH - Idun
proteínas anti-VIH - Cangene
MAB Anti-HM1-24 -- Chugai
MAB Anti-hR3
MAB Anti-Antígeno-Carcinoma-Humano - Epicyte
MAB Anti-ICAM-1 - Boehringer Ingelheim
MAB Anti-ICAM-1 1A-29 - Pharmacia
MAB Anti-ICAM-1 HA58
MAB Anti-ICAM-1 YN1/1.7.4
MAB Anti-ICAM-3 ICM3-ICOS
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer mamario 11D10
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer mamario ACA14C5-
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer - ImClone Systems/Merck KGaA ImClone, Viventia Biotech
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer 1A7 - Titan
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer 3H1 - Titan
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer TriAb - Titan
vacuna Anti-idiotipo de *Chlamydia trachomatis*
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer colorrectal -- Novartis

vacuna Anti-idiotipo de Cáncer colorrectal -- Onyvax
vacuna Anti-idiotipo de melanoma -- IDEC Pharmaceuticals
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer de ovario ACA 125
vacuna Anti-idiotipo de Cáncer de ovario AR54 - AltaRex

vacuna Anti-idiotipo de Cáncer de ovario CA 125 - AltaRex, Biomira
anticuerpo catalítico Anti-IgE - Hesed Biomed
MAB Anti-IgE E26 - Genentech
MAB Anti-IGF-1
anti-inflamatorio - GeneMax
péptido anti-inflamatorio - BTG

FIG. 1D

péptidos anti-integrina - Burnha	MAB Anti-mu - Novartis
MAB Anti-receptor-interferón-alfa 64G12	MAB Anti-MUC-1
Pharma Pacific Management	MAB Anti-Nogo-A IN1
MAB Anti-interferón-gamma - Protein	autoanticuerpos Anti-nucleares -- Procyon
Design Labs	anticuerpos monoclonales Anti-Cáncer ovárico-
anticuerpo policlonal Anti-interferón-	-Dompe
gamma - Advanced Biotherapy	anticuerpos monoclonales Anti-p185
MAB Anti-interleuquina-10 -	MAB Anti-p43
MAB Anti-interleuquina-12 -	Vacunas antiparasitarias
Anticuerpo policlonal Anti-interleuquina-1 -beta	MAB de oveja Anti-PDGF/bFGF - KS
R&D Systems	
MAB Anti-receptor interleuquina-2 2A3	Biomedix
MAB Anti-receptor interleuquina-2 33B3-1 --	anticuerpos monoclonales Anti-properdina -
Immunotech	Abgenix/Gliatech
MAB Anti-receptor interleuquina-2 ART-18	MAB Anti-PSMA J591 - BZL Biologies
MAB Anti-receptor interleuquina-2 LO-Tact-1	terapia génica de MAB Anti-Rev -
MAB Anti-receptor interleuquina-2	anticuerpos Anti-RSV - Epicyte, Intracell
Mikbeta1	anticuerpos monoclonales Anti-RSV -
MAB Anti-receptor interleuquina-2 NDS61	Medarex/MedImmune, Applied Molecular
MAB Anti-interleuquina-4 11B11	Evolution/MedImmune
MAB Anti-interleuquina-5 -- Wallace	MAB Anti-RSV, inhalación -
Laboratories	Alkermes/MedImmune
MAB Anti-interleuquina-6 - Centocor, Diaclone,	terapia génica Anti-RT
Pharmadigm	
MAB Anti-interleuquina-8 -- Xenotech	terapia génica de ARN K-ras Antisentido
MAB Anti-JL1	MAB Anti-SF-25
MAB de oveja Anti-Klebsiella -- KS	anticuerpo Anti-esperma - Epicyte
Biomedix Holdings	conjugado Anti-Tac(Fv)-PE38
conjugado MAB Anti- receptor Laminina -	MAB Anti-TAPA/CD81 AMP1
doxorubicina liposomal	terapia génica Anti-tat
MAB Anti-LCG - Cytoclonal	MAB Anti-TCR-alpha/beta H57-597
MAB Anti-lipololisacárido - VitaResc	MAB Anti-TCR-alpha/beta R73
anticuerpos monoclonales Anti-L-	MAB Anti-tenascina BC-4-1-131
selectina - Protein Design Labs, Abgenix,	anticuerpos monoclonales humanos Anti-TGF-
Stanford University	
anticuerpos monoclonales Anti-MBL -	beta -- Cambridge Antibody Tech., Genzyme
Alexion/Brigham and Women's Hospital	MAB Anti-TGF-beta 2G7 - Genentech
anticuerpos monoclonales Anti-MHC	Antitrombina III - Genzyme Transgenics,
anticuerpo humanizado Anti-MIF - IDEC,	Aventis, Bayer, Behringwerke, CSL,
Cytokine PharmaSciences	Myriad
MAB de oveja Anti-MRSA/VRSA -- KS	MAB Anti-Thy1
Biomedix Holdings	MAB Anti-Thy1.1

FIG. 1E

MAb de oveja Anti-factor tisular/factor VIIA - KS Biomedix	ARGENT sistemas de administración génica - -- ARIAD Arresten
anticuerpos monoclonales Anti-TNF - Centocor, Chiron, Peptech, Pharacia, Serono	ART-123--AsahiKasei
MAb de oveja Anti-TNF - KS Biomedix Holdings	arilsulfatasa B - BioMarin
MAb Anti-TNFalfa - Genzyme	Arilsulfatasa B, Humana recombinante -- BioMarin
MAb Anti-TNFalfa B-C7 - Diaclone	AS1051-Ajinomoto
MAb Anti-caries dental - Planet BioTech.	ASI-BCL - Intracell
ARNasas antitumorales - NIH	ATL-101--Alizyme
MAb Anti-VCAM 2A2--Alexion	péptido natriurético atrial - Pharis
MAb Anti-VCAM 3F4-Alexion	Ácido aurintricarboxílico -alto peso molecular
MAb Anti-VCAM-1	trastornos autoinmunes - GPC Biotech/MorphoSys
MAb Anti-VEC -- ImClone	Trastornos autoinmunes y rechazo de trasplante - Bristol-Myers Squibb/Genzyme Tra
MAb Anti-VEGF -- Genentech	Trastornos autoinmunes/Cáncer - Abgenix/Chiron, /CuraGen
MAb Anti-VEGF 2C3	Autotaxina
MAb de oveja Anti-VEGF - KS Biomedix Holdings	Avicidina - NeoRx
MAb Anti-VLA-4 HP1/2 - Biogen	factor de axogénesis -1 - Boston Life Sciences
MAb Anti-VLA-4 PS/2	Axokine - Regeneron
MAb Anti-VLA-4 R1-2	vacuna de linfoma de células B- Biomira
MAb Anti-VLA-4 TA-2	terapia génica B7-1 - proteínas BABS - Chiron
MAb de oveja Anti-VRE -- KS Biomedix Holdings	BAM-002 - Novelos Therapeutics
ANUP -- TranXenoGen	Bay-16-9996-- Bayer
ANUP-1-Pharis	Bay-39-9437 -- Bayer
AOP-RANTES-Senetek	Bay-50-4798 - Bayer
Apan-CH -- Praecis Pharmaceuticals	BB-10153-British Biotech
APC-8024 - Demegen	BBT-001 - Bolder BioTech,
ApoA-1 - Milano, Pharmacia	BBT-002 - Bolder BioTech.
Apogen - Alexion	BBT-003 - Bolder BioTech.
apolipoproteína A1 - Avanir	BBT-004 - Bolder BioTech.
Apolipoproteína E -- Bio-Tech. General	BBT-005 - Bolder BioTech.
Aplagina - Biogen	BBT-006 - Bolder BioTech.
aprotinina - ProdiGene	BBT-007 - Bolder BioTech.
APT-070C--AdProTech	BCH-2763-Shire
AR177 - Aronex Pharmaceuticals	BCSF -- Millenium Biologix
AR 209 - Aronex Pharmaceuticals,	BDNF - Regeneron - Amgen
Antigenics	
AR545C	

FIG.1F

Becaplermina - Johnson & Johnson, Chiron	BST-3002 - BioStratum
Bectumomab - Immunomedics	BTI322-
terapia génica Receptor Beta-adrenérgico - University of Arkansas	butirilcolinesterasa - Shire
BI 51013 - Behringwerke AG	C 6822 - COR Therapeutics
BIBH 1 - Boehringer Ingelheim	
BIM-23190 - Beaufour-Ipsen	inhibidor de esterasa C1 - Pharming
inmunoterapia de polen de abedul - Pharmacia	adyuvante C3d - AdProTech
proteínas de fusión biespecíficas - NIH	CAB-2.1 - Millennium
MAb biespecífico 2B1 -- Chiron	calcitonina - Inhale Therapeutics Systems, Aventis, Genetronics, TranXenoGen, Unigene, Rhone Poulenc Rohrer
Bitistatina	calcitonina - oral - Nobex, Emisphere, Pharmaceutical Discovery
BIWA 4 - Boehringer Ingelheim	Péptido relacionado con gen de Calcitonina-- Asahi
sustituto de sangre - Northfield, Baxter Intl.	Kasei - Unigene
BLP-25 - Biomira	calcitonina, humana -- Suntory
BLS-0597 - Boston Life Sciences	calcitonina, nasal - Novartis, Unigene
BLyS -- Human Genome Sciences	calcitonina, Panoderm -- Elan
BLyS marcado radiactivamente - Human Genome Sciences	calcitonina, Peptitol - Shire
BM 06021 - Boehringer Mannheim	calcitonina, salmón -- Therapicon
BM-202 -- BioMarin	calina -- Biopharm
BM-301 - BioMarin	Calfobindina I
BM-301 -- BioMarin	calfobindina I - Kowa
BM-302 -- BioMarin	calreticulina - NYU
BMP 2 - Genetics Institute/Medtronic-Sofamor Danek, Genetics Institute/Colágenoesis, Genetics Institute/Yamanouch	Campath-1G
terapia génica BMP 2	Campath-1M
BMP 52 - Aventis Pasteur, Biopharm	terapia para el Cáncer - Cangene
BMP-2 -- Genetics Institute	Vacuna de Cáncer - Axlle, Aventis, Pasteur Center of Molecular Immunology, YM BioSciences, Cytos, Genzyme, Transgenics, GlobelImmune, Igeneon, ImClone, Virogenetics, InterCell, Iomai, Jenner Biotherapies, Memorial Sloan-Kettering Cáncer Center, Sydney Kimmel Cáncer Center, Novavax, Protein Sciences, Argonex, SIGA
BMS 182248 - Bristol-Myers Squibb	Vacuna de Cáncer ALVAC-CEA B7.1 - Aventis Pasteur/Therion Biologies
BMS 202448 - Bristol-Myers Squibb	Vacuna de Cáncer CEA-TRICOM -- Aventis Pasteur/Therion Biologies
factores de crecimiento óseo -- IsoTis	Terapia génica Vacuna de Cáncer - Cantab Pharmaceuticals
BPC-15-Pfizer	
péptido natriurético cerebral - Cáncer mamario -- Oxford GlycoSciences/Medarex	
Vacuna de Cáncer mamario - Therion Biologics, Oregon	
BSSL--PPL Therapeutics	
BST-2001 - BioStratum	

FIG. 1G

Vacuna de Cáncer HER-2/neu -- Corixa	vacuna CETP - Avant
Vacuna de Cáncer THERATOPE - Biomira	Cetorelix
Vacuna de Cáncer, PolyMASC -- Valentis	Cetuximab
Vacuna de Candida - Corixa, Inhibitex	CGH 400 - Novartis
Canstatina -- ILEX	CGP 42934-Novartis
CAP-18-Panorama	CGP 51901-Tanox
terapia génica Cardiovascular - Collateral Therapeutics	CGRP -- Unigene
carperitida - Suntory	CGS 27913--Novartis
Casocidina-1 - Pharis	CGS 32359 -- Novartis
CAT 152 - Cambridge Antibody Tech.	vacuna de enfermedad de Chagas - Corixa
CAT 192 - Cambridge Antibody Tech.	Quimiocinas - Immune Response
CAT 213 - Cambridge Antibody Tech.	CHH 380 - Novartis
Catalasa- Enzon	chitinasa - Genzyme, ICOS
Cat-PAD -- Circassia	vacuna de <i>Chlamydia pneumoniae</i> - Antex Biologies
CB0006-Celltech	vacuna de <i>Chlamydia trachomatis</i> - Antex Biologies
CCK(27-32)-Akzo Nobel	vacuna de <i>Chlamydia</i> - GlaxoSmithKline
CCR2-64I-NIH	vacuna de Cólera CVD 103-HgR - Swiss Serum y Vaccine Institute Berne
CD, Procept - Paligent	vacuna de Cólera CVD 112 - Swiss Serum y Vaccine Institute Berne
terapia génica CD154	vacuna de Cólera inactivada oral - SBL Vaccin
CD39 -- Immunex	Crisalina - Chrysalis BioTech.
CD39-L2 -- Hyseq	CI-782 - Hitachi Kase
CD39-L4-Hyseq	Factor neurotrófico ciliar - Fidia, Roche
toxina de fusión CD4 - Senetek	Proyecto CIM - Active Biotech
CD4 IgG - Genentech	CL 329753 -- Wyeth-Ayerst
antagonistas de receptor CD4 - Pharmacoepia/Progenies	CL22, Cobra -- ML Laboratories
CD4 soluble -- Progenies	Clenoliximab - IDEC
CD4, soluble -- Genzyme Transgenics	anticuerpos de <i>Clostridium difficile</i> -- Epicyte
ligando CD40 - Immunex	factores de coagulación - Octagene
CD4-ricina cadena A - Genentech	CMB 401 - Celltech
terapia génica CD59 - Alexion	CNTF - Sigma-Tau
terapia celular CD8 TIL therapy -- Aventis Pasteur	vacuna de abuso de Cocaína - Cantab, ImmuLogic, Scripps
CD8, soluble - Avidex	vacuna de coccidiomicosis - Arizo
CD95 ligando - Roche	colágeno -- Type I -- Pharming
CDP571-Celltech	inhibidores de formación de colágeno -- Fibrogen
CDP850-Celltech	
CDP870-Celltech	
CDS-1 - Ernest Orlando	
Cedelizumab - Ortho-McNeil	
Cetermin - Insmmed	

FIG. 1H

Colágeno/hidroxiapatita/factor de crecimiento óseo	CY 1747 - Epimmune
Aventis Pasteur, Biopharm, Orquest	CY 1748-Epimmune
colagenasa - BioSpecifics	Cyanovirin-N
Vacuna de Cáncer Colorrectal - Wistar Institute	terapia de fibrosis quística - CBR/IVAX
Componente B, Recombinante - Serono	CYT351
Inhibidores de factores de crecimiento de tejido conectivo	- citocina Traps - Regeneron
FibroGen/Taisho	
Contortostatina	citocinas - Enzon, Cytoclonal
vacuna anticonceptiva -- Zonagen	vacuna de glucoproteína de citomegalovirus
vacuna anticonceptiva hCG	Chiron, Aquila Biopharmaceuticals,
vacuna anticonceptiva reversible masculina--	Aventis Pasteur, Virogenetics
IMMUCON	vacuna viva de Citomegalovirus -- Aventis
vacuna anticonceptiva de la zona pelúcida -	Pasteur
Zonagen	terapia génica con citosina desaminasa
MAB marcado con Cobre 64 TETA-1A3 - NCI	GlaxoSmithKline
Coralina	DA-3003 - Dong-A
Corsevin M	DAB389interleucina-6 - Senetek
análogos del péptido-C-- Schwarz	DAB389interleucina -7
CPI-1500-Consenso	DAMPA - Incyte Genomics
CRF - Neurobiological Tech.	Daniplestim -- Pharmacia
pentaéptido cRGDfV -	darbepoetin alfa - Amgen
CRL1095--CytRx	DBI-3019 - Diabetogen
CRL1336-CytRx	DCC -- Genzyme
CRL1605-CytRx	DDF - Hyseq
CS-560 - Sankyo	decorin - Integra, Telios
CSF -- ZymoGenetics	defensinas -- Large Scale Biology
CSF-G - Hangzhou, Dong-A, Hanmi	DEGR-VIIa
CSF-GM - Cangene, Hunan, LG Chem	anticuerpo desinminuzado 3B6/22 AGEN
CSF-M - Zarix	anticuerpos desinmunizados contra el cáncer -
CT 1579-Merck Frosst	BiovationA/iragen
CT 1786- Merck Frosst	Dendroamida A
CT-112 ^A -BTG	vacuna del Dengue -- Bavarian Nordic, Merck
CTB-134L-Xenova	denileukin difitox -- Ligando
CTC-111-Kaketsuken	DES-1101--Desmos
CTGF - FibroGen	desirudina - Novartis
CTLA4-Ig - Bristol-Myers Squibb	desmopresina - Unigene
CTLA4-Ig terapia génica -	Desmoteplasa - Merck, Schering AG
CTP-37-AVIBioPharma	Destabilasa
	terapia génica para la diabetes - DeveloGen,
terapia natriurética de tipo C- Suntory	Pfizer
CVS 995 -Corvas Intl.	terapia para la diabetes - Crucell
CX397-NikkoKyodo	vacuna de la diabetes de tipo 1 -- Dyamid
	Therapeutics

FIG.1I

DiaCIM - YM BioSciences	vacuna EGF-P64k - Center of Molecular Immunology
oligopeptidos dialiticos - Research Corp	EL 246 - LigoCyte
Diamyd - Diamyd Therapeutics	inhibidor de elastasa - Synergen
DiaPep227- Pepgen	elcatonina - Therapicon
DiavaX - Corixa	EMD 72000 - Merck KGaA
vacuna de la difteria-tosferina-hepatitis B -- GlaxoSmithKline	Emdogain - BIORA
DIR therapy -- Solis Therapeutics -	emfilermin - AMRAD
DNase - Genentech	Emoctakin -- Novartis
Dornase alfa - Genentech	proteina de la matriz enamel -- BIORA
Dornase alfa, inhalación - Genentech	Endo III -- NYU
Doxorubicin-anti-CEA MAb conjugado - Immunomedics	endostatina - EntreMed, Pharis
DP-107-Trimeris	Enhancins -- Micrologix
drotrecogin alfa - Eli Lilly	Enlimomab - Isis Pharm.
DTctGMCSF	Enoxaparina sódica- Pharmuka
	terapia de empobrecimiento de nutrientes con anticuerpos ligados a enzimas
vacuna de la polio DTP - Aventis Pasteur	-- KS Biomedix Holdings
DU 257-KM231 anticuerpo conjugado - Kyowa	agente neutralizante derivado de Eosinófilos-
dural graft matrix - Integra	EP-51216-AstaMedica
Dutiplase-Baxter Intl.	EP-51389-AstaMedica
DWP-401 - Daewoong	familia EPH de ligandos - Regeneron
DWP-404 - Daewoong	factor de crecimiento epidérmico - Hitachi Kasei, Johnson & Johnson
DWP-408 - Daewoong	toxina de fusión con factor de crecimiento epidérmico
Ecoli 0157 vacuna de -- NIH	Senetek
E21-R-BresaGen	factor de crecimiento epidérmico -genisteina -
virus del virus de la encefalitis equina oriental	-EPI-HNE-4-Dyax
Equicetina-	EPI-KAL2 - Dyax
Equinibina 1 -	Epoetin-alfa - Amgen, Dragon
Equistatina -- Merck	Pharmaceuticals, Nanjing Huaxin
Equitamina -	Epratuzumab - Immunomedics
EC-SOD - PPL Therapeutics	vacuna del virus de Epstein-Barr
EDF - Ajinomoto	Aviron/SmithKline Beecham, Bioresearch
derivado de EDN - NIH	Eptacog alfa - Novo Nordisk
EDNA-NIH	Eptifibatida -- COR Therapeutics
Edobacomab - XOMA	erb-38-
Edrecolomab - Centocor	Erlizumab - Genentech
EF5077	
Efalizumab - Genentech	
toxina de fusión al EGF - Seragen, Ligando	

FIG.1J

eritropoyetina – Alkermes, ProLease, Dong A, Elanex, Genetics Institute, LG Chem, Protein Sciences, Serono, Snow Brand, SRC VB VECTOR, Transkaryotic Therapies	Fas TR- Human Genome Sciences
eritropoyetina Beta - Hoffman La Roche	Felvizumab - Scotgen
eritropoyetina /Epoetina alfa - Chugai	FFR-VIIa- Novo Nordisk
Vacuna de Escherichia coli - North American	FG-001-F-Gene
Vacuna, SBL Vaccin, Swiss Serum and	FG-002-F-Gene
Vacuna Institute Berne	FG-004 - F-Gene
etanercept - Immunex	FG-005 - F-Gene
examorelina - Mediolanum	FGF + fibrina - Repair
exonuclease VII	Fibrimage - Bio-Tech. General
F 105-Centocor	péptidos de unión a fibrina - ISIS Innovation
F-992 - Fornix	fibrinógeno – PPL Therapeutics, Pharming
Factor IX - Alfa Therapeutics, Wellfide Corp., CSL, enetics Institute/AHP, Pharmacia, PPL Therapeutics	factor de crecimiento se fibroblastos - Chiron, NYU, Ramot, ZymoGenetics
Factor IX terapia génica – Cell Genesys	conjugado de fibrolasa - Schering AG
Factor VII - Novo Nordisk, Bayer, Baxter Intl.	Filgrastim -- Amgen
Factor VIIa – PPL Therapeutics, ZymoGenetics	filgrastim - PDA modified - Xencor
Factor VIII - Bayer Genentech, Beaufour-Ipsen, CLB, Inex, Octagen, Pharmacia, Pharming	ligando FLT-3 - Immunex
Factor VIII - PEGilado – Bayer	FN18CRM9-
fragmentos del Factor VIII - Pharmacia	follistatina - Biotech Australia, Human Therapeutics
Factor VIII terapia génica - Targeted Genetics	follitropin alfa - Alkermes, ProLease, PowderJect, Serono, Akzo Nobel
formulación con sacarosa Factor VIII - Bayer, Genentech	Follitropin Beta - Bayer, Organon
Factor VIII-2--Bayer	FP59
Factor VIII-3 -- Bayer	FSH - Ferring
inhibidores del Factor Xa - Merck, Novo Nordisk, Mochida	FSH + LH -- Ferring
Factor XIII - ZymoGenetics	F-spondina -- CeNeS
Factores VIII y IX terapia génica - GeneticsG-CSF - Amgen, SRC VB VECTOR	sistema de administración de proteína de fusión -- UAB Research Foundation
Institute/Targeted Genetics	ftoxinas de fusión - Boston Life Sciences
Famoxin - Genset	G 5598 - Genentech
proteína Fas (delta) TM - LXR BioTech.	GA-II – Transkaryotic Therapies
	análogos de interferón gamma– SRC VB VECTOR
	lipasa gástrica - Meristem
	Gavilimomab -
	GDF-1--CeNeS
	GDF-5 - Biopharm
	GDNF-- Amgen

FIG. 1K

gelsolin -- Biogen	vacuna H5N1 del virus de la gripe A - Protein Sciences
Gemtuzumab ozogamicin - Celltech	hemoglobina -- Biopure
epoetin-alfa activada por genes- Aventis Pharma -- Transkaryotic Therapies	hemoglobina 3011, Recombinante- Baxter - Healthcare
Terapia génica para la trombastenia de Glanzmann	hemoglobina crosumarilo- Baxter Intl.
Glatiramer acetate - Yeda	hemoglobina estabilizada - Ajinomoto
glial growth factor 2 - CeNeS	hemoglobina, recombinante -- Apex
GLP-1 - Amylin, Suntory, TheraTech, Watson	Respuesta Inmunitaria -- HAF
GLP-1 peptide analogues - Zealand Pharmaceuticals	vacuna Hantavirus HB19
glucagón - Eli Lilly, ZymoGenetics	HBNF - Regeneron
péptido 1 similar a glucagon 7-36 amida - Suntory	HCC-1-Pharis
Glucocerebrosidasa - Genzyme	hCG - Milkhaus
glutamato descarboxilasa - Genzyme Transgenics	vacuna hCG - Zonagen
Glucoproteína S3 - Kureha	HE-317 - Hollis-Eden Pharmaceuticals
GM-CSF - Immunex	vacunas de proteínas de choque término del cáncer y la gripe StressGen
vacuna tumoral GM-CSF - PowderJect	vacuna de Helicobacter pylori - Acambis, AstraZeneca/CSL, Chiron, Provalis
GnRH immunotherapeutic -- Protherics	Helistat-G - GalaGen
antígeno gp75 - ImClone	Hemolink - Hemosol
gp96 - Antigenics	hepapoietin - Snow Brand
GPI0100--Galenica	heparanasa - InSight
GR 4991W93 - GlaxoSmithKline	heparinasa I - Ibex
factor estimulante de colonias de Granulocitos Dong-A	heparinasa III - Ibex
Granulocyte colony-stimulating factor conjugado	vacuna de la Hepatitis A - American Biogenetic Sciences
grass terapia de alergia -- Dynavax	vacuna de la Hepatitis A inactivada
GRF1-44-ICN	vacuna de la Hepatitis A Nothav - Chiron
Factor de crecimiento - Chiron, Atrigel, Atrix, Innogenetics, ZymoGenetics, Novo	vacuna de la Hepatitis A-hepatitis B - GlaxoSmithKline
péptidos del factor de crecimiento - Biotherapeutics	Terapia para la hepatitis B - Tripep
hormona del crecimiento - LG Chem	vacuna de la Hepatitis B - Amgen, Chiron SpA, Meiji Milk, NIS, Prodeva, PowderJect, Rhein Biotech
hormona del crecimiento, Humana recombinante -- Serono	vacuna recombinante de la Hepatitis B - Evans
GT4086-Gliatech	Vacunas, Epitec Combiotech, Genentech, MedImmune, Merck Sharp & Dohme, Rhein Biotech, Shantha Biotechnics, Vector, Yeda
GW 353430-GlaxoSmithKline	
GW-278884 -- GlaxoSmithKline	
H 11-Viventia Biotech	

FIG. 1L

Vacuna recombinante de la Hepatitis B TGP 943 Takeda	Péptidos del VIH – American Home Products
Vacuna de la Hepatitis C Bavarian Nordic, Chiron, Innogenetics Acambis,	Vacuna del VIH – Applied bioTech., Axis Genetics, Biogen, Bristol-Myers Squibb, Genentech, Korea Green Cross, NIS, Oncogen, Protein Sciences Corporation, Terumo, Tonen Corporation, Wyeth- Ayerst, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Advanced BioScience Laboratories, Bavarian Nordic, Bavarian Nordic/Statens
Vacuna de la Hepatitis D - Vacunas Chiron	- Serum Institute, GeneCure, immune
Vacuna recombinante de la Hepatitis E Genelabs/GlaxoSmithKline, Novavax	Respuesta, Progenies, Therion Biologies, United Biomedical, Chiron
Factor de crecimiento de hepatocitos - Panorama, Sosei	Vacuna VIH vCP1433 – Aventis Pasteur
Fragmentos kringle del factor de crecimiento de hepatocitos	Vacuna VIH vCP1452 – Aventis Pasteur
- EntreMed	Vacuna VIH vCP205 – Aventis Pasteur
Péptidos Her-2/Neu - Corixa	HL-9 - American BioScience
Vacuna de ADN de glucoproteína del herpes simple - Merck, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Genentech, GlaxoSmithKline, Chiron, Takeda	HM-9239 - Cytran
Vacuna del herpes simple - Cantab Pharmaceuticals, CEL-SCI, Henderson Morley	HML-103-Hemosol
Vacuna viva del herpes simple – ImClone Systems/Wyeth-Lederle, Aventis Pasteur	HML-104-Hemosol
Derivados de HGF - Dompe	HML-105-Hemosol
Vacuna hIAPP - Crucell	HML-109-Hemosol
Vacuna de la Hepatitis B Hib - Aventis Pasteur HIC1	HML-110-Hemosol
HIP-Altachem	HML-121 - Hemosol
Hirudins - Biopharma, Cangene, Dongkook.HPM 1 - Chugai	hNLP - Pharis
Japan Energy Corporation, Pharmacia Corporation, SIR International, Sanofi- Synthelabo, Sotragene, Rhein Biotech	vacuna del anquilostoma
Vacuna comestible VIH – ProdiGene	Vacunas vector huésped – Henogen
Vacuna gp120 VIH - Chiron, Ajinomoto, GlaxoSmithKline, ID Vacuna de, Progenies, VaxGen	Vacuna HPV -- MediGene
Terapia génica de vacuna gp120 VIH	HSA - Meristem
Vacuna de ADN gp160 VIH - PowderJect, Aventis Pasteur, Oncogen, Hyland	HSF - StressGen
Immuno, Protein Sciences	Veículos HSP - Weizmann, Yeda, Peptor
Vacuna gp41 VIH	HSPPC-70 - Antigenics
Vacuna HGP-30W VIH – CEL-SCI	HSPPC-96 – antígenos derivados de patógenos
Inmunoglobulina VIH - Abbott, Chiron	HSV863-Novartis
	Vacuna de ADN HTLV-I
	Vacuna HTLV-I
	Vacuna HTLV-II Access
	HU901»Tanox
	Hu23F2G--ICOS
	HuHMFGI

FIG. 1M

HumaLYM - Intracell	HuMax-IL15-Genmab
Human krebs statika - Yamanouchi	HYB190-Hybridon
Anticuerpos monoclonales humanos	HYB676-Hybridon
Abgenix/Biogen, Abgenix/ Corixa,	M25MAbA33-Celltech
Abgenix/Immunex, Abgenix/Lexicon,	Ibritumomab tiuxetan - IDEC
Abgenix/ Pfizer, Athersys/Medarex,	IBT-9401 - Ibex
Biogen/MorphoSys, -CAT/Searle,	IBT-9402 - Ibex
Centocor/Medarex, Corixa/Kirin Brewery,	IC14-ICOS
Corixa/Medarex, Eos BioTech./Medarex,	Idarrubicina anti-Ly-2.1 -
Eos/Xenex, Exelixis/Protein Design	IDEC 114--IDEC
Labs, ImmunoGen/ Raven,	IDEC 131 - IDEC
Medarex/B.Twelve,	IDEC 152-IDEC
MorphoSys/ImmunoGen, XTL	IDM 1 - IDM
Biopharmaceuticals/Dyax,	IDPS - Hollis-Eden Pharmaceuticals
Anticuerpos monoclonales humanos	Iduronato-2-sulfatasa - Transkaryotic
Medarex/Northwest Biotherapeutics,	Therapies
Medarex/Seattle Genetics	IGF/IBP-2-13--Pilaris
Neutrino-1 humana - Exelixis	IGN-101 - Igeneon
Anticuerpos contra papilomavirus humano - Epicyte	IK HIR02 - Iketon
Vacuna del papilomavirus humano - Biotech	IL-11 -Genetics Institute/AHP
Australia, IDEC, StressGen	IL-13-PE38 - NeoPharm
Vacuna del papilomavirus humano MEDI501 -	Receptor de IL-17 - Immunex
MedImmune/GlaxoSmithKline	IL-18BP--Yeda
Vacuna del papilomavirus humano MEDI	IL-1Hy1 -Hyseq
503/MEDI 504 -	IL-KI-Celltech
MedImmune/GlaxoSmithKline	Adyuvante IL-1 β --Celltech
Vacuna del papilomavirus humano TA-CIN -	IL-2 - Chiron
Cantab Pharmaceuticals	IL-2 + IL-12 - Hoffman La-Roche
Vacuna del papilomavirus humano TA-HPV -	Fusión IL-6/sIL-6R - Hadasit
Cantab Pharmaceuticals	Derivado de IL-6R -Tosoh
Vacuna del papilomavirus humano TH-GW -	Toxina de fusión IL-7-Dap 389 - Ligand
Cantab/GlaxoSmithKline	IM-862 - Cytran
Anticuerpos policlonales humanos - Biosite/Eos	IMC-1C11-ImClone
BioTech./ Medarex	
Anticuerpos antimonoclonales anti factor VIII de tipo II humano	imiglucerasa - Genzyme
- ThromboGenics	
Anticuerpos monoclonales anti-glucoproteína Ib murina humanizados	Inmunoglobulina intravenosa (humana) -
anticuerpos monoclonales - ThromboGenics	Hoffman La Roche
HumaRAD - Intracell	Factor de privilegio inmunitario - Proneuron
HuMaxEGFR-Genmab	Immunocal - Immunotec
HuMax-CD4 - Medarex	Terapia inmunogénica- Briana Bio-Tech
	5-fluorodesoxiuridin-dipalmitato-inmunoliposomal

FIG. 1N

Vacuna inmunosupresora - Aixlie	antagonistas de integrina -- Merck
inmunotoxina - Antisoma, NIH	interferón (Alfa2)—SRC VB VECTOR,
ImmuRAIT-Re-188 - Immunomedics	Viragen, Dong-A, Hoffman La-Roche,
imreg-1 - Imreg	Genentech
infertilidad - Johnson & Johnson, E-TRANS	interferón - BioMedicines, Human Genome
Vacuna del virus de la gripe -- Aventis Pasteur,	Sciences
Protein Sciences	interferón (Alfa-n3)—Interferón Sciences
Inhibina - Biotech Australia, Human	Intl.
Therapeutics	interferón (Alfa), Biphasix -- Helix
Terapia génica con proteína G inhibidora	interferón (Alfa)—Amgen, BioNative,
INKP-2001 -- InKine	Novartis, Genzyme Transgenics,
Inolimomab - Diaclone	Hayashibara, Inhale Therapeutics
insulina - Autoimmune, Altea, Biobras,	Systems, Medusa, Flamel, Dong-A,
BioSante, Bio-Tech. General, Chong Kun	GeneTrol, Nastech, Shantha,
Dang, Emisphere, Flamel, Provalis, Rhein	i Wassemann, LG Chem, Sumitomo,
Biotech, TranXenoGen	Aventis, Behring EGIS, Pepgen, Servier,
insulina (bovina) - Novartis	Rhein Biotech,
Análogo de insulina - Eli Lilly	interferón (Alfa2A)
Insulina Aspart - Novo Nordisk	interferón (Alfa2B) - Enzon, Schering-
insulina detemir - Novo Nordisk	Plough, Biogen, IDEA
insulina glargine - Aventis	interferón (Alfa-N1) - GlaxoSmithKline
insulina inhalada - Inhale Therapeutics	interferón (beta)-Rentschler, GeneTrol,
Systems, Alkermes	Meristem, Rhein Biotech, Toray, Yeda,
insulina oral -- Inovax	Daiichi, Mochida
insulina, AeroDose -- AeroGen	interferón (Beta1A) - Serono, Biogen
insulina, AERx - Aradigm	interferón (beta1A),inhale -- Biogen
insulina, BEODAS - Elan	interferón (B1b)- Chiron
insulina, Biphasix - Helix	interferón (tau)-- Pepgen
insulina, bucal - Genex	Interferón alfacon-1 -- Amgen
insulina, I2R - Flemington	Interferón alfa-2a.
insulina, intranasal - Bentley	Interferón Beta 1b -- Schering/Chiron,
insulina, oral - Nobex, Unigene	InterMune
insulina, Orasome - Endorex	Interferón Gamma - Boehringer Ingelheim,
insulina, ProMaxx - Epic	Sheffield, Rentschler, Hayashibara
insulina, Quadrant - Elan	receptor de interferón, Tipo I - Serono
insulina, recombinante - Aventis	interferón(GammalB) - Genentech
insulina, Spiros - Elan	Interferón-alfa-2b + ribavirina - Biogen,
insulina, Transfersome -- IDEA	ICN
insulina, Zymo, recombinante - Novo Nordisk	terapia génica con interferón-alfa-2b
insulinotropina - Scios	Schering-Plough
Terapia génica con insulinsina-	Terapia génica con interferón-con1

FIG. 10

antagonistas de interleucina-1 - Dompe	IPF - Metabolex
Antagonistas de receptores de interleucina-1 - Abbott	IR-501 - Immune Response
Bioresearch, Pharmacia	ISIS 9125 -- Isis Pharmaceuticals
receptor de interleucina-1 de tipo I -- Immunex	ISURF No. 1554-Millennium
receptor de interleucina-1 de Tipo II - Immunex	ISURF No. 1866 - Iowa State Univer.
Interleucina-10 - DNAX, Schering-Plough	ITF-1697-Italfarmaco
Terapia génica con interleucina-10	IxC 162-Ixion
Interleucina-12 - Genetics Institute, Hoffman J 695 -- La-Roche	Cambridge Antibody Tech., Genetics Inst, Knoll
Interleucina-13 -- Sanofi	Jagged + FGF - Repair
Antagonistas de interleucina -13 -AMRAD	JKC-362 - Phoenix Pharmaceuticals
Interleucina-13-PE38QQR	JTP-2942 - Japan Tobacce
Interleucina-15 -- Immunex	anticuerpos monoclonales Juman - Medarex/Raven
Interleucina-16 - Research Corp	K02 - Axys Pharmaceuticals
Interleucina-18 - GlaxoSmithKline	Keliximab - IDEC
Interleucina-1-alfa - Immunex/Roche	Hemocianina de lapa californiana
Interleucina-2 --SRC VB VECTOR, Ajinomoto, Biomira	KGF - Amgen
Interleucina-3 - Cangene	KM 871-Kyowa
Interleucina-4 - Immunology Ventures, Sanofi Winthrop, Schering-Plough, Immunex/ Sanofi Winthrop, Bayer, Ono	KPI 135-Scios
Interleucina-4 + TNF-Alfa -- NIH	KPI-022-Scios
Agonista de interleucina-4 - Bayer	Kringle 5
Toxina de fusión de interleucina-4 -- Ligando	KSB 304
Receptor de interleucina-4 - Immunex, Immun	KSB-201 - KS Biomedix
Interleucina-6 Ajinomoto, Cangene, Yeda, Genetics Institute, Novartis	L 696418-Merck
Proteína de fusión de interleucina-6	L 703801-Merck
Proteína de fusión de interleucina-6 toxina de fusión de interleucina-6 - Ligand, Serono	L1 - Acorda
Interleucina-7 - IC Innovations	L-761191-Merck
Receptor de interleucina-7 - Immunex	lactoferrina - Meristem, Pharming, Agennix
Agonistas de interleucina-8 - Kyowa Hakko/Millennium/Pfizer	cardiolactoferrina - Pharming
Agonistas de interleucina-9 - Genaera	LAG-3 -- Serono
Interleucinas - Cel-Sci	LAIT-GEMMA
Yoduro 1131 tositumomab - Corixa	Citotoxina de células LAK - Arizona
ior EPOCIM - Center of Molecular Immunology	lameláras - PharmaMar/University of Malaga
lor-P3 -- Center of Molecular Immunology	Péptidos de laminina A - NIH
IP-10--NIH	lanotepiasa - Genetics Institute
	laronidasa - BioMarin
	Vacuna de la fiebre de Lassa
	LCAT-NIH
	LDP 01 - Millennium

FIG. 1P

LDP 02 - Millennium	Vacuna de la enfermedad de Lyme - Aquila
Superóxido dismutasa lecitinizada –	Biopharmaceuticals, Aventis, Pasteur,
Seikagaku	Symbicom, GlaxoSmithKline, Hyland
Adyvante LeIF -- Corixa	Immuno, MedImmune
Vacuna de la leishmaniasis - Corixa	Vacuna del virus linfocítico de la coriomeningitis
lenercept - Hoffman La-Roche	Vacuna de linfoma - Biomira, Genitope
Lenograstim - Aventis, Chugai	LYP18
lepirudina - Aventis	Plasminógeno de lisina recombinante
leptina - Amgen, IC Innovations	Terapia génica de enfermedad de almacenamiento lisosomal
Terapia génica con leptina - Chiron Corporation	Avigen
Leptina, 2ª generación - Amgen	Lisostafina - Nutrition 21
leridistim - Pharmacia	M 23 - Gruenenthal
leuprolida, ProMaxx - Epic	Anticuerpos monoclonales M1 - Acorda
leuprorelin, oral - Unigene	Therapeutics
LeuTech - Papatina	MA16N7C2-CorvasIntl.
LEX 032 - SuperGen	Vacuna de la malaria - GlaxoSmithKline,
LiDEPT - Novartis	AdProTech, Antigenics, Apovia, Aventis
lipasa - Altus Biologies	Pasteur, Axis Genetics, Behringwerke,
Vacuna lipido A - EntreMed	CDCP, Chiron Vaccines, Genzyme
Tecnología de anclaje unida a lípidos Tech. - ICRT,	Transgenics, Hawaii, MedImmune, NIH,
ID	NYU, Oxxon, Roche/Saramane, Biotech
Biomedical	Australia, Rx Tech
Tecnología liposoma-CD4 – Sheffield	Vacuna de la malaria CDC/NIIMALVAC-1
Vacuna de Listeria monocitogenes	Vacuna de la malaria, multicomponente
LMB1	mammaglobina - Corixa
LMB7	mammastatina - Biotherapeutics
LMB 9 - Battelle Memorial Institute, NIH	Lecitina de unión a manano - NatlImmu
LM-CD45 - Cantab Pharmaceuticals	manano-MUC1 - Psiron
lovastatina - Merck	MAP 30
LSA-3	Marinovir - Phytera
receptor LT-β -- Biogen	MARstem -- Maret
Vacuna del cáncer de pulmón - Corixa	MB-015 - Mochida
lusupultida - Scios	MBP - ImmuLogic
L-Vax-AVAX	MCI-028 - Mitsubishi-Tokyo
LY355455-Eli Lilly	MCIF - Human Genome Sciences
LY366405-Eli Lilly	MDC - Advanced BioScience - Akzo
LY-355101-Eli Lilly	MDX11-Medarex
Vacuna de ADN de la enfermedad de Lyme - Vical/Aventis Nobel, ICOS	MDX210-Medarex
Pasteur	MDX 22-Medarex
	MDX22

FIG. 1Q

MDX240-Medarex	Terapia génica de metionina liasa
MDX33	AntiCáncer
MDX 44 - Medarex	Met-RANTES - Genexa Biomedical,
MDX447-Medarex	Serono
MDX H210-Medarex	Metreleptina
MDX RA - Houston BioTech., Medarex	MGDF-Kirin
ME-104-Pharmexa	MGV -- Progenies
Vacuna del sarampión	micrina - Endocrine
Mecasemin – Cephalon/Chiron, Chiron	microplasma - ThromboGenics
MEDI488 - MedImmune	MIF - Genetics Institute
MEDI500	Factor inhibidor de migración - NIH
MEDI 507 - BioTransplant	Mim CD4.1 - Xycte Therapies
Hormona concentradora de melanina –	mirostipen - Human Genome Sciences
Neurocrine Biosciences	MK 852 -Merck
melanocortinas - OMRF	Mobenakin - NIS
Anticuerpos monoclonales de melanoma - Viragen	molgramostim - Genetics Institute, Novartis
Vacuna del melanoma – GlaxoSmithKline,	anticuerpos monoclonales - Abgenix/Celltech,
Akzo Nobel, Avant, Aventis Pasteur,	Immusol/ Medarex, Viragen/ Roslin
Bavarian Nordic, Biovector, CancerVax,	Institute, Cambridge Antibody Tech./Elan
Genzyme Molecular Oncology, Humbolt,	MAB 108-
ImClone Systems, Memorial, NYU, Oxxon	MAB 10D5 -
MAB 10D5 -	MAB 14.18-interleucina-2 inmunocitocina-
Vacuna del melanoma de Magevac - Therion	Lexigen
Potenciadores de la memoria - Scios	MAB14G2a-
Vacuna meningocócica B - Chiron	MAB15A10-
Vacuna meningocócica – CAMR	- MAB 170 - Biomira
Conjugado de vacuna meningocócica grupo B	MAB177LuCC49-
- North American Vaccine	MAB 17F9
Vacuna meningocócica grupo B recombinante	MAB1D7
- BioChem Vaccines,	MAB 1F7 - Immune Network
Microscience	conjugado MAB 1H10-doxorubicina
Conjugado Y del grupo de vacuna meningocócica	MAB26-2F
- North American Vaccine	MAB2A11
conjugado de vacuna meningocócica grupos A, B y	MAB 2E1--RW Johnson
C	MAB2F5
- North American Vaccine	MAB 31.1 - International BiImmune
Mepolizumab - GlaxoSmithKline	Systems
Metastatina - EntreMed, Takeda	MAB 32 - Cambridge Antibody Tech.,
Met-CkB7 – Human Genome Sciences	Peptech
met-encefalina - TNI	MAB 323A3 - Centocor
METH-1 - Human Genome Sciences	MAB 3C5
metioninasa - AntiCáncer	

FIG. 1R

MAb 3F12	MAb C242-conjugado con PE
MAb 3F8	MAb c30-6
MAb 42/6	MAb CA208-conjugado con citorhodin-S-
MAb 425--Merck KGaA	Hoechst Japan
MAb 447-52D -- Merck Sharp & Dohme	MAb CC49 -- Enzon
conjugado MAb 45-2D9-- hematoporfirina	MAbch14.18-
	MAb CH14.18-GM-CSF proteína de fusión --
MAb4B4	Lexigen
conjugado MAb 4E3-CPA - BCM Oncologia	j MAb chCE7
conjugado MAb 4E3-daunorubicina	MAbCI-137-AMRAD
MAb 50-6	conjugado MAb - cisplatino
MAb 50-61A - Institut Pasteur	MAb CLB-CD19
MAb 5A8 - Biogen	MAb CLB-CD19V
conjugado MAb 791T/36-metotrexato	MAb CLL-1 - Peregrine
MAb7c11.e8	conjugado MAb - CLL-1-GM-CSF
conjugado MAb 7E11 C5-selenocistamina	conjugado MAb - CLL-1-IL-2 - Peregrine
MAb 93KA9 - Novartis	conjugado MAb - CLN IgG -- doxorubicina
conjugado MAb A5B7-cisplatino	Conjugados MAb - Tanox
Biodynamics Research, Pharmacia	MAb D612
MAbA5B7-I-131	MAb Dal B02
MAbA7	MABDC101-ImClone
MAB717-Exocell	MAB EA1 -
conjugado MAb A7-zinostatina	MAB EC708 -- Biovation
MABABX-RB2 -Abgenix	MAB EP-5C7 - Protein Design Labs
MABACAU	MAB ERIC-1 - ICRT
MAB AFP-I-131 - Immunomedics	Terapia génica MAB F105
MABAPI	MAB FC 2.15
MABAZI	MAB G250 -- Centocor
conjugado MAB B3-LysPE40	MAB GA6
MAB B4 - United Biomedical	MAB GA733
conjugado MAB B43 - Genisteína	MAB Gliomab-H - Viventia Biotech
MAB B43.13-Tc-99m - Biomira	MAB conjugado con HB2-saporina
conjugado MAB B43-PAP	MABHD37-
conjugado MAB B4G7-gelonina	conjugado MAB-cadena rica en HD37
conjugado MAB BCM 43-daunorubicina	MABHNC20-Acambis
BCM Oncologia	conjugado MAB - huN901-DM -
MAB BIS-1	ImmunoGen
MAB BMS 181170 - Bristol-Myers Squibb	MAB 1-131 CC49-Corixa
MAB BR55-2	MAB IC025
MAB BW494	MAB conjugado con ICR12-CPG2
conjugado MAB C 242-DM1 - ImmunoGen	MAB ICR-62

FIG.1S

conjugado MAb IRac-ricina A	MAb R-24
MAbK1	MAb R-24 α humana GD3 - Celltech
conjugado MAb KS1-4-metotrexato	conjugado MAb cadena A rica en RFB4
MAb L6 – Bristol-Myers Squibb, Oncogen	conjugado MAb cadena A rica en RFT5
MAb LiC016-88	MAb SC1
MAb LL2-I-131 - Immunomedics	MAbSM-3-ICRT
MAb LL2-Y-90	MAb SMART 1D10 - Protein Design Labs
MAbLS2D617--Hybritech	MAb SMART ABL 364 - Novartis
conjugado MAb LYM-1-gelonina	MAb SN6f
MAbLYM-1-1-131	conjugado MAb cadena A rica en SN6f-
	desglucosilado
MAb LYM-1-Y-90	
MAb LYM-2 - Peregrine	MAb SN6j
MAbM195	conjugado MAb cadena A rica en SN7
conjugado MAb M195-bismuto 213 –	conjugado MAb T101-Y-90 – Hybritech
Protein Design Labs	MAb T-88 - Chiron
conjugado MAb M195-gelonina	MAb TB94 – Cáncer ImmunoBiology
MAb M195-1-131	MAbTEC 11
MAbM195-Y-90	MAbTES-23-Chugai
MAbMA33H1-Sanofi	MAbTM31-Avant
MAbMADH	MAb TNT-1 – Cambridge Antibody Tech.,
MAb MGB2	Peregrine
MAb MINT5	MAbTNT-3
MAb MK2-23	MAb TNT-3 - IL2 proteína de fusión -
conjugado MAb MOC31 - ETA(252-613)	MAbTP3-At-211
MAbMOC-31-In-111	conjugado MAb TP3-PAP
conjugado MAb MOC-31-PE	MAbUJ13A-ICRT
MAbMR6-	MAb UN3
MAb MRK-16 - Aventis Pasteur	conjugado MAb ZME-018-gelonina
MAbMS11G6	MAb-BC2 - GlaxoSmithKline
MAb MX-DTPA BrE-3	conjugado MAb- DM1 – ImmunoGen
MAb MY9	conjugado MAb- ricina cadena A - XOMA
MAbNd2--Tosoh	conjugados MAb-temoporfin
MAb NG-1 - Hygeia	Monopharm C – Viventia Biotech
MAb NM01 - Nissin Food	monteplase -- Eisai
MAb OC125	Hidrato de montirelina - Gruenenthal
conjugado MAb OC 125-CMA	moroctocog alfa - Genetics Institute
MAb OKI-1 -- Ortho-McNeil	Moroctocog-alfa - Pharmacia
MAb OX52 – Bioproducts for Science	MP 4
MAb PMA5	MP-121-Biopharm
MAb PR1	MP-52 - Biopharm
MAbprost30	MRA-Chugai

FIG. 1T

MS 28168 - Mitsui Chemicals, Nihon Schering	Vacuna neuroprotectora -- universidad de Auckland
Toxina de fusión MSH - Ligand	Quimeras neurotróficas - Regeneron
MSI-99 -- Genaera	Factor neurotrófico - NsGene, CereMedix
MT 201 - Micromet	NeuroVax - Immune Response
Vacuna Muc-1 - Corixa	neurturina - Genentech
Tolerancia a mucosa -- Aberdeen	Endopeptidasa neutra - Genentech
Sustrato inhibidor muleriano	Potenciadores de NGF - NeuroSearch
muplestim - Genetics Institute, Novartis,	Vacuna NHL -- Large Scale Biology
DSM Anti-Infectives	NIP45 - Boston Life Sciences
MAb murino - KS Biomedix	NKI-B20
Somatropina mutante - JCR Pharmaceutical	NM 01 - Nissin Food
MV 833 -- Toagosei	NMI-139-NitroMed
Vacuna de Mycoplasma pulmonis	NMMP - Genetics Institute
Mycoprex - XOMA	NN-2211-NovoNordisk
mieloperoxidasa -- Henogen	Noggin - Regeneron
miostatina - Genetics Institute	Nonacog alfa
Nacolumab tafenatox - Pharmacia	Norelin - Biostar
nagrestipen - British Biotech	Vacuna del virus Norwalk
NAP-5 - Corvas Intl.	NRLLMO-NeoRx
NAPc2 - Corvas Intl.	NRLLMOPE-NeoRx
nartograstim -- Kyowa	NT-3 - Regeneron
Natalizumab - Protein Design Labs	NT-4/5 - Genentech
Nateplasa - NIH, Nihon Schering	NU 3056
Nateplasa - Schering AG	NU 3076
NBI-3001 - Neurocrine Biosci.	NX 1838 -Gilead Sciences
NBI-5788 - Neurocrine Biosci.	NYSEO-1/CAG-3 antigen-NIH
NBI-6024 - Neurocrine Biosci.	NYVAC-7 -- Aventis Pasteur
Inhibidores Nef - BRI	NZ-1002-Novazyme
Vacuna de Neisseria gonorrhea - Antex	Terapia contra la obesidad -- Nobex
Biologies	OC10426 -Ontogen
Conjugado de neomicina B-arginina	OC 144093 -- Ontogen
Nerelimomab - Chiron	OCIF - Sankyo
Factor de crecimiento nervioso - Amgen - Chiron,	Oct-43 - Otsuka
Genentech	OK PSA - liposomal
Terapia génica de factor de crecimiento nervioso	OKT3-gamma-1 -ala-ala
nesiritida citrato - Scios	OM991
neurregulina-2 - CeNeS	OM992
neurocan - NYU	Omalizumab -- Genentech
Sistema de administración neuronal - CAMR	oncoimmunina-L - NIH
	Oncolisina B -- ImmunoGen

FIG. 1U

Oncolisina CD6 - ImmunoGen	PAM 4 - Merck
Oncolisina M - ImmunoGen	pamiteplasa - Yamanouchi
Oncolisina S -- ImmunoGen	pancreatina, Minitabs -- Eurand
Oncofago -- Antigenics	Pangen -- Fournier
Oncostatina M - Bristol-Myers Squibb	Pantarina - Selective Genetics
OncoVax-CL -- Jenner Biotherapies	Vacuna del virus paragripal - Pharmacia,
OncoVax-P -- Jenner Biotherapies	Pierre Fabre
onercept - Yeda	paraoxanasa - Esperion
Vacuna de la onicomycosis - Boehringer	Hormona paratiroidea - Abiogen, Korea
Ingelheim	Green Cross
opebecan - XOMA	Hormona paratiroidea (1-34) -
opioides -- Arizona	Chugai/Suntory
Oprelvekin - Genetics Institute	Terapia génica para la enfermedad de Parkinson -- Cel
Org-33408b-Akzo Nobel	Genesys/ Ceregene
Orolip DP -- EpiCept	Vacuna del parvovirus - MedImmune
Orizacistatina	PCP-Scan - Immunomedics
Péptidos OSA - GenSci Regeneration	Cóctel PDGF - Theratechnologies
Caderina GF - osteoblastos - Pharis	Terapia de alergia al cacahuete - Dynavax
Osteocalcin-terapia génica timidina quinasa - osteocalcina PEG anti-ICAM MAb - Boehringer	Ingelheim
Proteína osteogénica - Curis	PEG asparaginasa - Enzon
osteopontina - OraPharma	PEG glucocerebrosidasa
Péptidos de osteoporosis - Integra, Telios	Hirudina PEG - Knoll
osteoprotegerina - Amgen, SnowBrand	PEG interferón-alfa-2a - Roche
Vacunas de la otitis media - Antex Biologies	PEG interferón-alfa-2b + ribavirina -
Cáncer de ovario - University of Alabama	Biogen, Enzon, ICN Pharmaceuticals,
Proteína de fusión OX40-IgG - Cantab, Xenova	Schering-Plough
P 246 -- Diatide	PEGMAbA5B7-
P 30 - Alfacell	Pegacaristim - Amgen - Kirin Brewery -
p1025-- Active Biotech	ZymoGenetics
P-113 ^A -Demegen	Pegaldesleucina - Research Corp
Péptido P-16 - Transition Therapeutics	pegaspargasa -- Enzon
p43 - Ramot	pegfilgrastim - Amgen
Péptido P-50 -- Transition Therapeutics	PEG-interferón Alfa - Viragen
Vacuna p53 + RAS - NIH, NCI	PEG-interferón Alfa 2A - Hoffman La-
Análogo PACAP(1-27)	Roche
Vacunas pediátricas - Chiron	PEG-interferón Alfa 2B - Schering-
Pafase -- ICOS	Plough
ADN plasmidico PAGE-4-IDEC	PEG-r-hirudin - Abbott
PAI-2 - Biotech Australia, Human	PEG-uricasa - Mountain View
Therapeutics	Pegvisomant - Genentech
Palivizumab - MedImmune	

FIG. 1V

Proteínas PEGiladas, PolyMASC - Valentis	Pharmaprojects No. 5947 – StressGen
Leptina humana nativa recombinante PEGilada	n Pharmaprojects No. 5961 –
- Roche	Theratechnologies
Pemtumomab	Pharmaprojects No. 5962 – NIH
Penetratina - Cyclacel	Pharmaprojects No. 5966 – NIH
Pepscan - Antisoma	Pharmaprojects No. 5994 – Pharming
Péptido G - Peptech, ICRT	Pharmaprojects No. 5995 – Pharming
Vacuna peptídica - NIH, NCI	Pharmaprojects No. 6023 – IMMUCON
Pexelizumab	Pharmaprojects No. 6063 – Cytoclonal
pexiganan acetato - Genaera	Pharmaprojects No. 6073 – SIDDICO
Pharmaprojects No. 3179 – NYU	Pharmaprojects No. 6115 – Genzyme
Pharmaprojects No. 3390 – Ernest Orlando	Pharmaprojects No. 6227 – NIH
Pharmaprojects No. 3417 – Sumitomo	Pharmaprojects No. 6230 – NIH
Pharmaprojects No. 3777 – Acambis	Pharmaprojects No. 6236 – NIH
Pharmaprojects No. 4209 – XOMA	Pharmaprojects No. 6243 – NIH
Pharmaprojects No. 4349 – Baxter. Intl.	Pharmaprojects No. 6244 – NIH
Pharmaprojects No. 4651	Pharmaprojects No. 6281 – Senetek
Pharmaprojects No. 4915 – Avanir	Pharmaprojects No. 6365 – NIH
Pharmaprojects No. 5156 – Rhizogenics	Pharmaprojects No. 6368 – NIH
Pharmaprojects No. 5200 – Pfizer	Pharmaprojects No. 6373 – NIH
Pharmaprojects No. 5215 – Origene	Pharmaprojects No. 6408 – Pan Pacific
Pharmaprojects No. 5216 – Origene	Pharmaprojects No. 6410 – Athersys
Pharmaprojects No. 5218 – Origene	Pharmaprojects No. 6421 – Oxford
Pharmaprojects No. 5267 – ML	GlycoSciences
Laboratories	Pharmaprojects No. 6522 – Maxygen
Pharmaprojects No. 5373 – MorphoSys	Pharmaprojects No. 6523 – Pharis
Pharmaprojects No. 5493 – Metabolex	Pharmaprojects No. 6538 – Maxygen
Pharmaprojects No. 5707 – Genentech	Pharmaprojects No. 6554 – APALEXO
Pharmaprojects No. 5728 – Autogen	Pharmaprojects No. 6560 – Ardana
Pharmaprojects No. 5733 – BioMarin	Pharmaprojects No. 6562 – Bayer
Pharmaprojects No. 5757 – NIH	Pharmaprojects No. 6569 – Eos
Pharmaprojects No. 5765 – Gryphon	Phenoxazine
Pharmaprojects No. 5830 – AntiCáncer	Phenylase - Ibex
Pharmaprojects No. 5839 – Dyax	Factor derivado de epitelio pigmentoso - inhibidor-
Pharmaprojects No. 5849 – Johnson &	1 activador de plasminógeno, recombinante –
Johnson	DuPont Pharmaceuticals
Pharmaprojects No. 5860 – Mitsubishi-	
Tokyo	
Pharmaprojects No. 5869 – Oxford	
GlycoSciences	
Pharmaprojects No. 5883 – Asahi Brewer	

FIG. 1W

Activadores de plasminógeno - Abbott Laboratories, American Home Products, Boehringer Mannheim, Chiron Corporation, DuPont Pharmaceuticals, Eli Lilly, Shionogi, Genentech, Genetics Institute, GlaxoSmithKline, Hemisphere Biopharma, Merck & Co, Novartis, Pharmacia Corporation, Wakamoto, Yeda	Antígeno específico de próstata - EntreMed
Péptidos relacionados con plasminógeno - Bio-Tech. General/MGH	Proteína A - RepliGen
Factor 4 plaquetario - RepliGen	Adhesivos de proteína - Enzon
Factor de crecimiento derivado de plaquetas - Amgen - ZymoGenetics	Proteína C - Baxter Intl., PPL Therapeutics, ZymoGenetics
plusonemin- Hayashibara	Activador de proteína C - Gilead Sciences
PMD-2850 -- Protherics	Antagonistas de proteína quinasa R - NIH
Vacuna neumocócica - Antex Biologies, Aventis Pasteur	protirelin - Takeda
Vacuna neumocócica intranasal - BioChem Vaccines/Biovector	protocadherina 2 - Caprion
PR1A3	Pro-uroquinasa - Abbott, Bristol-Myers
PR-39	Squibb, Dainippon, Tosoh - Welfide
pralmorelin - Kaken	Ligando-1 de glucoproteína P-selectina - Genetics Institute
Pretarget-Lymphoma - NeoRx	Infecciones por pseudomonas - InterMune
Priliximab - Centocor	Vacuna de pseudomonas - Cytovax
PR0140 - Progenies	PSGL-Ig -- American Home Products
PRO 2000 - Procept	PSP-94 -- Procyon
PRO 367 - Progenies	PTH1-34--Nobex
PRO 542 -- Progenies	Quilimmune-M - Antigenics
pro-Apo A-I - Esperion	R101933
prolactina - Genzyme	R125224 -Sankyo
Prosaptida TX14(A) - Bio-Tech. General	RA therapy - Cardion
Anticuerpos del cáncer de próstata - Immunex, UroCor	Vacuna recombinante de la rabia -- Aventis Pasteur, BioChem Vaccines, Kaketsuken Pharmaceuticals
Terapia con anticuerpos del cáncer de próstata - Genentech/UroGenesys, Genotherapeutics	RadioTheraCIM - YM BioSciences
Inmunoterapéutica del cáncer de próstata - The PSMA Development Company	Ramot project No. 1315 - Ramot
Vacuna del cáncer de próstata -- Aventis Pasteur	Ramot project No. K-734A - Ramot
Zonagen, Corixa, Dendreon, Jenner	Ramot project No. K-734B - Ramot
Biotherapies, Therion Biologies	RANK - Immunex
	ranpirnasa - Alfacell
	MAb ranpirnasa-anti-CD22 - Alfacell
	Inhibidor de RANTES -Milan
	Sistemas de administración de fármacos RAPID - ARIAD
	rasburicasa -- Sanofi
	rBPI-21, tópica --XOMA
	RC 529 - Corixa
	rCFTR - Genzyme Transgenics
	RD 62198
	rDnasa -- Genentech
	RDP-58 -- SangStat

FIG. 1X

RecepTox-Fce - Keryx	Terapia génica con ribozimas -- Genset
RecepTox-GnRH - Keryx, MTR	Vacuna recombinante Rickettsial
Technologies	RIGScan CR - Neoprobe
RecepTox-MBP - Keryx, MTR	RIP-3-Rigel
Technologies	RK-0202-RxKinetix
recFSH - Akzo Nobel, Organon	Péptido RLT - Esperion
REGA3G12	rM/NEI - IVAX
Regavirumab - Teijin	rmCRP -- Immtech
relaxina - Connetics, Corp	RN-1001 - Renovo
Vacuna del cáncer renal - MacroPharm	RN-3 -- Renovo
repifemina - Human Genome Sciences	Conjugado de RNAsa - Immunomedics
Vacuna PFP-2 del virus sincital respiratorio -	-RO 631908-Roche
Wyeth-Lederle	Vacuna de Rotavirus - Merck
Vacuna del virus sincital respiratorio	RP 431 - DuPont Pharmaceuticals
GlaxoSmithKiine, Pharmacia, Pierre Fabre	RP-128 - Resolution
Vacuna inactivada del virus sincital respiratorio	Terapia génica RPE65 -
	RPR 110173 - Aventis Pasteur
Vacuna del virus paragripal-virus sincital respiratorio	RPR 115135 -Aventis Pasteur
- Aventis Pasteur,	RPR 116258A - Aventis Pasteur
Pharmacia	rPSGL-Ig - American Home Products
Retepase - Boehringer Mannheim,	Tensioactivo r-SPC - Byk Gulden
Hoffman La-Roche	rV-HER-2/neu - Therion Biologies
Retropep - Retroscreen	SA1042-Sankyo
RFB4(dsFv)PE38	sacrosidasa - Orphan Medical
RFI641 - American Home Products	Sant7
RFTS - UAB Research Foundation	Sargramostim - Immunex
RG 12986-Aventis Pasteur	saruplasa - Gruenenthal
RG 83852 - Aventis Pasteur	Satumomab - Cytogen
RG-1059-RepliGen	SB 1 - COR Therapeutics
rGCR-NIH	SB 207448 - GlaxoSmithKiine
rGLP-1 -- Restoragen	SB 208651 - GlaxoSmithKiine
rGRF - Restoragen	SB 240683 - GlaxoSmithKiine
rh Insulin - Eli Lilly	SB 249415-GlaxoSmithKiine
péptidos RHAMM diana - Cangene	SB 249417-GlaxoSmithKiine
rHbU-Baxter Intl.	SB 6 - COR Therapeutics
rhCCIO - Claragen	SB RA 31012-
rhCG - Serono	SC 56929 - Pharmacia
Terapia génica para artritis reumatoide	Proteínas de unión a SCA - Curis, Enzon
Vacuna para artritis reumatoide - Veterans	scFv(14E1)-ETA Berlex Laboratories,
Affairs Medical Center	Schering AG
rhLH- Serono	ScFv(FRP5)-ETA-

FIG. 1Y

ScFv6C6-PE40-	somatomedin-1 - GroPep, Mitsubishi-
SCH 55700-Celltech	Tokyo, NIH
Vacuna de la esquistosomiasis - Glaxo	Proteína transportadora somatomedina-1 - Insmed
Wellcome/Medeva, Brazil	somatostatina - Ferring
SCPF -- Advanced Tissue Sciences	Somatotropina/
complejo scuPA-suPAR - Hadasit	Homona del crecimiento humano - Bio-Tech.
SD-9427 - Pharmacia	General, Eli Lilly
SDF-1--Ono	somatropina - Bio-Tech. General, Alkermes,
SDZ 215918--Novartis	ProLeasa, Aventis Behring, Biovector,
SDZ 280125-Novartis	Cangene, Dong-A, Eli Lilly, Emisphere,
SDZ 89104--Novartis	Enact, Genentech, Genzyme Transgenics,
SDZ ABL 364-Novartis	Grandis/InfiMed, CSL, InfiMed, MacroMed,
SDZ MMA 383-Novartis	Novartis, Novo Nordisk, Pharmacia
Inhibidores de serina proteasa - Pharis	Serono, TranXenoGen
sermorelin acetato - Serono	Derivado de somatropin - Schering AG
SERP-1-Viron	somatropina, AIR-Eli Lilly
sertenef - Dainippon	Somatropina, inhaled - Eli Lilly/Alkermes
Albúmina de suero, recombinante humana -	somatropina, Kabi - Pharmacia
Aventis Behring	somatropina, Orasome - Novo Nordisk
Factor derivado de suero - Hadasit	Sonermina - Dainippon Pharmaceutical
Sevirumab - Novartis	SP(V5.2)C-Supertek
SGN 14 - Seattle Genetics	SPf66
SGN 15-Seattle Genetics	esfingomielinasa - Genzyme
SGN 17/19 - Seattle Genetics	SR 29001-Sanofi
SGN 30 - Seattle Genetics	SR 41476-Sanofi
SGN-10 - Seattle Genetics	SR-29001 - Sanofi
SGN-11-Seattle Genetics	SS1(dsFV)-PE38--NeoPharm
SH 306 - DuPont Pharmaceuticals	β 2 microglobulina - Avidex
Shanvac-B - Shantha	proteínas de fusión β 2-microglobulina - NIH
Vacuna de Shigella flexneri - Avant, Acambis, péptidos β amiloideos -- CeNeS	
Novavax	β -defensina - Pharis
Vacuna de Shigella sonnei -	Infecciones por Staphylococcus aureus -
sICAM-1 - Boehringer Ingelheim	Inhibitex/ZLB
Silteplase - Genzyme	Conjugado de vacuna de Staphylococcus aureus
Vacuna SIV - Endocon, Institut Pasteur	Nabi
SK 896 - Sanwa Kagaku Kenkyusho	Terapia para Staphylococcus -- Tripep
SK-827 - Sanwa Kagaku Kenkyusho	Estafiloquinasa - Biovation, Prothera,
Skeletex - CellFactors	Thrombogenetics
SKF 106160 - GlaxoSmithKline	Vacuna A estreptocócica -- M6
S-nitroso-AR545C-	Pharmaceuticals, North American Vaccine
SNTP-Active Biotech	Vacuna B estreptocócica -- Microscience

FIG. 1Z

Vacuna recombinante B estreptocócica -	TFPI - EntreMed
Vacunas Biochem	tgD-IL-2--Takeda
Vacuna de Streptococcus piogenes	TGF-Alfa - ZymoGenetics
STRL-33 -- NIH	TGF-β-Kolon
Subalin-SRC VB VECTOR	TGF-β2 -- Insmed
SUIS -- United Biomedical	TGF-β3--OSI
SUIS-LHRH - United Biomedical	terapia génica Talasémica - Crucell
SUN-E3001 - Suntory	TheraCIM-h-R3 - Center of Molecular
Anticuerpos monoclonales de super alta afinidad -	- Immunology, YM BioSciences
YM BioSciences	Theradigm-HBV - Epimmune
Superóxido dismutasa - Chiron, Enzon,	Theradigm-HPV -- Epimmune
Ube Industries, Bio-Tech, Yeda	Theradigm-malaria - Epimmune
Superóxido dismutasa-2 - OXIS	Theradigm-melanoma - Epimmune
suppresina - UAB Research Foundation	TheraFab - Antisoma
SY-161-P5 -ThromboGenics	ThGRF 1-29 - Theratechnologies
SY-162-ThromboGenics	ThGRF 1-44 -- Theratechnologies
Vacuna del lupus eritematoso sistémico -	trombomodulina - Iowa, Novocastra
MedClone/VivoRx	Trombopoietina - Dragon Pharmaceuticals,
Vacuna peptídica de receptores de linfocitos T	Genentech
Liposomas T4N5 - AGI Dermatics	trombopoyetina, Pliva -- Recepton
TACI, soluble - ZymoGenetics	Trombospondina 2 -
Apoptosis dirigida - Antisoma	trombostatina -- Thromgen
tasonemina - Boehringer Ingelheim	timalfasina -- SciClone
TASP	timocartina - Gedeon Richter
TASP-V	timosin Alfal - NIH
Análogos peptídicos Tat - NIH	Hormona estimuladora de tiroides - Genzyme
TBPI-Yeda	tICAM-1 - Bayer
TBPII	Péptido anticoagulante Tick - Merck
TBV25H - NIH	TIF-Xoma
Tc 99m ior ceal - Center of Molecular	Tifacogin - Chiron, NIS, Pharmacia
Immunology	Factor tisular -- Genentech
Tc 99m P 748 - Diatide	Inhibidor de la ruta del factor tisular
Tc 99m votumumab - Intracell	TJN-135--Tsumura
Tc-99m rh-Anexina V - Theseus Imaging	TM27-Avant
teceleuquina - Biogen	TM29-Avant
tenecteplasa - Genentech	TMC-151 -Tanabe Seiyaku
Teriparatida - Armour Pharmaceuticals,	Factor de necrosis tumoral TNF - Asahi Kasei
Asahi Kasei, Eli Lilly	TNF Alfa - CytImmune
terlipresina - Ferring	Anticuerpo TNF -- Johnson & Johnson
testisina-AMRAD	Proteína de unión a TNF - Amgen
Tetrafibricina - Roche	Producto de degradación de TNF - Oncotech

FIG. 1AA

Receptor del TNF - Immunex	TXU-PAP
Receptor 1 del TNF, soluble - Amgen	TY-10721-TOAEiyo
Factor alfa de necrosis tumoral TNF - Asahi	Vacuna de la diabetes de tipo I - Research Corp
Kasei, Genetech, Mochida	Vacuna tifoidea CVD 908
Inhibidor del TNF-alfa - Tripep	U 143677 - Pharmacia
Terapia génica TNFR:Fc - Targeted Genetics	U 81749 - Pharmacia
TNF-SAM2	UA1248--Arizona
Tolerimab- Innogenetics	UGIF--Sheffield
Vacuna del Toxoplasma gondii -	UIC2
GlaxoSmithKline	UK 101
TP 9201 -- Telios	UK-279276 - Corvas Intl.
TP10--Avant	urodilatina - Pharis
TP20--Avant	urofilitrofina - Serono
tPA - Centocor	uteroferrina- Pepgen
trafermin - Scios	V20-GLYCODesign
TRAIL/Apo2L - Immunex	Vacunas para terapia génica de receptores de vasopresina V2
Proteínas de unión a transferrina - CAMR	vaccines - Active Biotech
Factor beta-1 de crecimiento transformante -	Vacuna de glucoproteína de la Varicela zoster -
Genentech	Research Corporation Technologies
Proteínas de transporte - Genesis	Vacuna viva del virus de la Varicela zoster - Cantab
TRH - Ferring	Pharmaceuticals
Triabin - Schering AG	Factor de crecimiento endotelial vascular -
Triconal	Genentech, University of California
Triflavina	Factor de crecimiento endotelial vascular - R&D
troponina I - Boston Life Sciences	Systems
TRP-2 ^A -NIH	Agentes de direccionamiento vascular - Peregrine
Inhibidor de tripsina - Mochida	Agentes de potenciación de la permeabilización de los vasos -
Terapia génica TSP-1 -	Peregrine
TT-232	vasostatina - NIH
TTS-CD2-Active Biotech	VCL - Bio-Tech. General
Vacuna de la tuberculosis - Aventis Pasteur,	VEGF - Genentech, Scios
Genesis	Inhibidor VEGF - Chugai
Superantígenos dirigidos a tumores - Active	VEGF-2 - Human Genome Sciences
Biotech - Pharmacia	VEGF-Trap -- Regeneron
Vacunas tumorales - PhotoCure	viscumin, recombinante - Madaus
Conjugados de anticuerpo profarmacológico activado	Vitaxina
por tumor	Vitraxa - ISTA Pharmaceuticals
conjugados - Millennium/ImmunoGen	Vacuna del virus del Nilo oriental - Bavarian Nordic
tumstatina - ILEX	WP652
Tuvirumab - Novartis	Vacuna WT1 -- Corixa
TV-4710-Teva	WX-293-WilexBioTech.
Receptor TWEAK - Immunex	

FIG.1BB

WX-360-WilexBioTech.	YM 207 - Yamanouchi
WX-UK 1-WilexBioTech.	YM 337 - Protein Design Labs
XMP-500--XOMA	biotina marcada con Itrio-90
XomaZyme-791 - XOMA	anti-CEA MAb T84.66 - marcado con Itrio-90
XTL 001 - XTL Biopharmaceuticals	ZD0490-AstraZeneca
XTL 002 - XTL Biopharmaceuticals	ziconotida - Elan
sistema de administración de levaduras -	ZK 157138 - Berlex Laboratories
GlobelImmune	
vacuna de Yersinia pestis	Zolimomab aritox
YIGSR-Stealth -- Johnson & Johnson	Zorcell -- Immune Response
Yisum Project No. D-0460 - Yisum	Péptidos ZRXL - Novartis

FIG.1CC

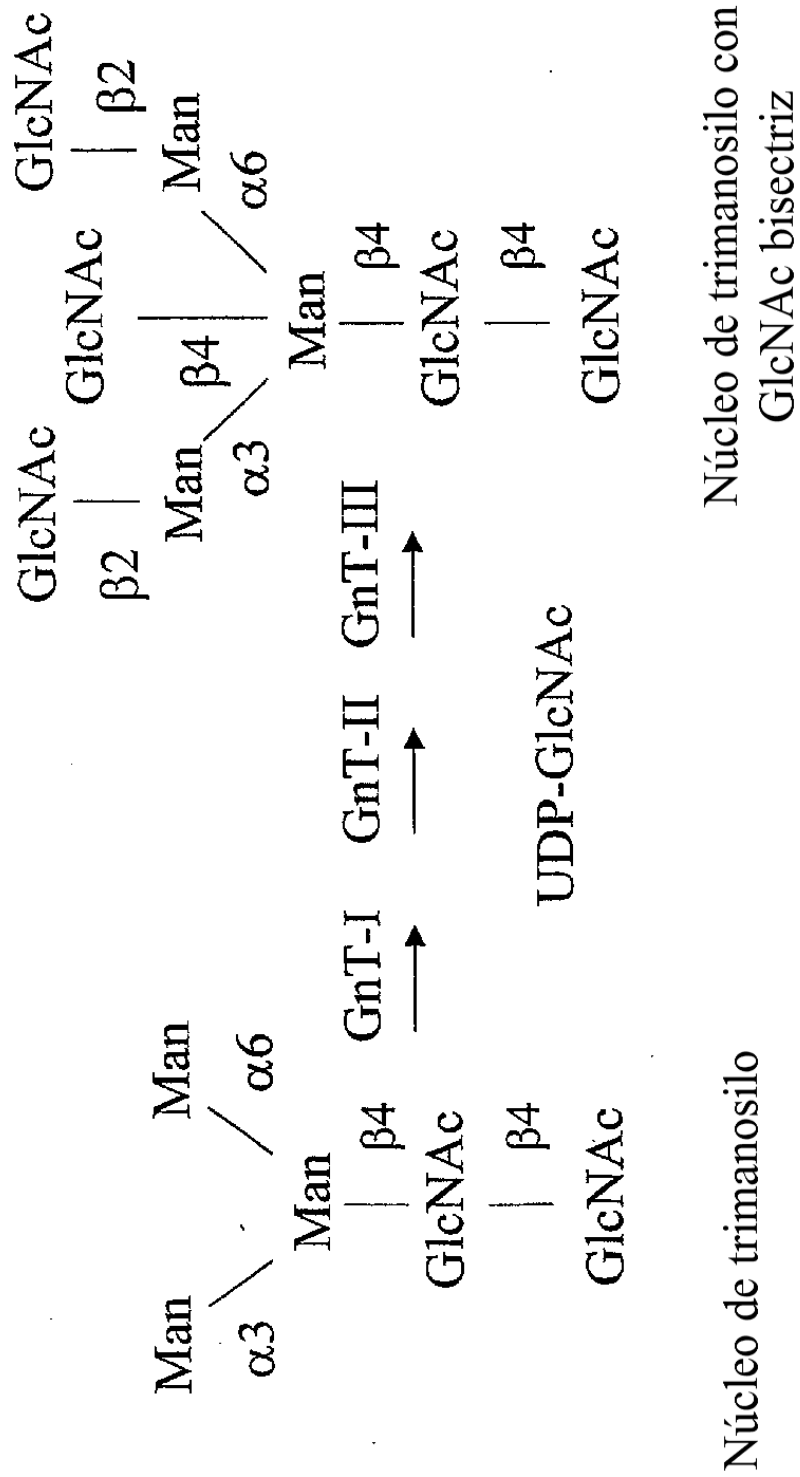
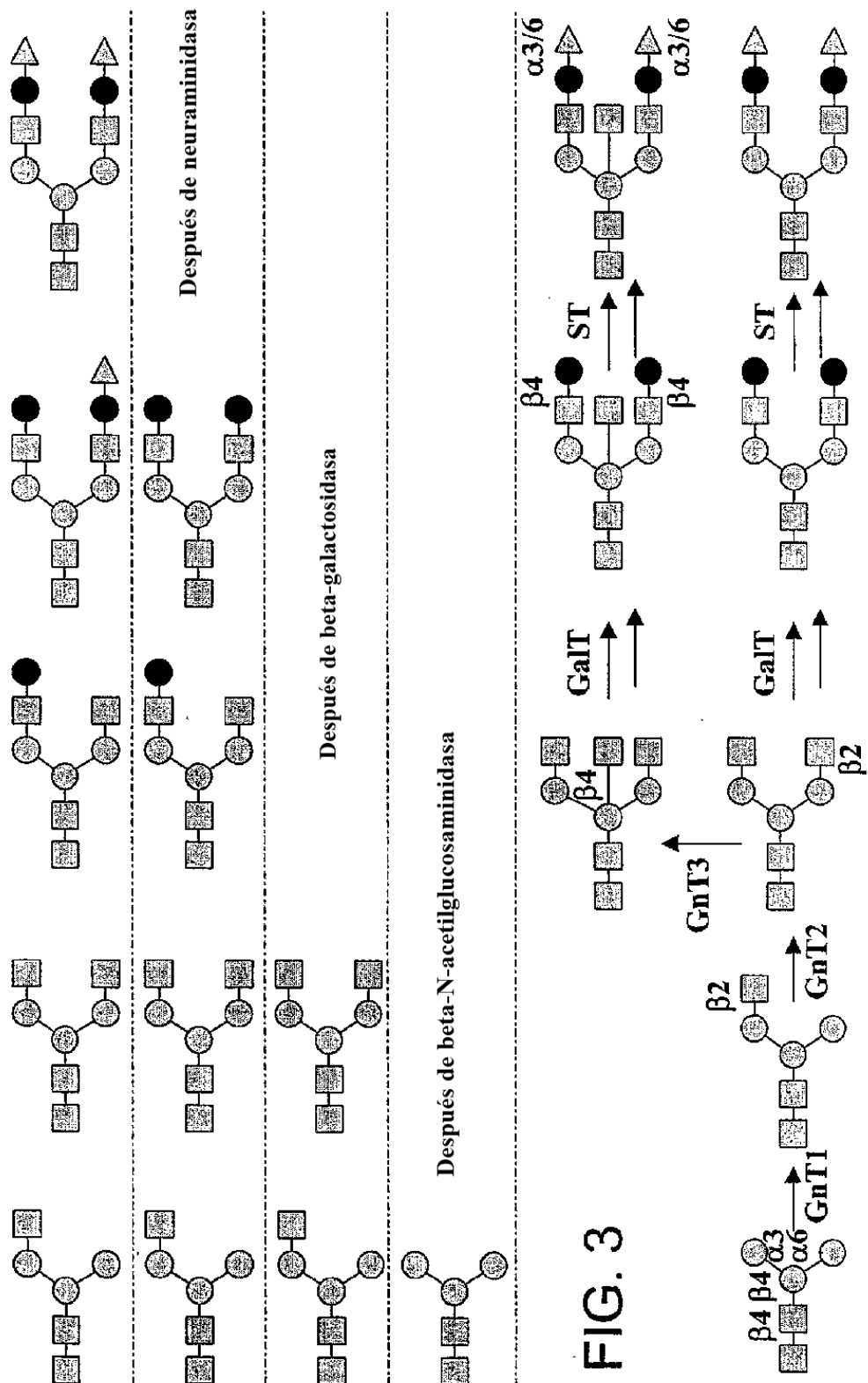


FIG. 2



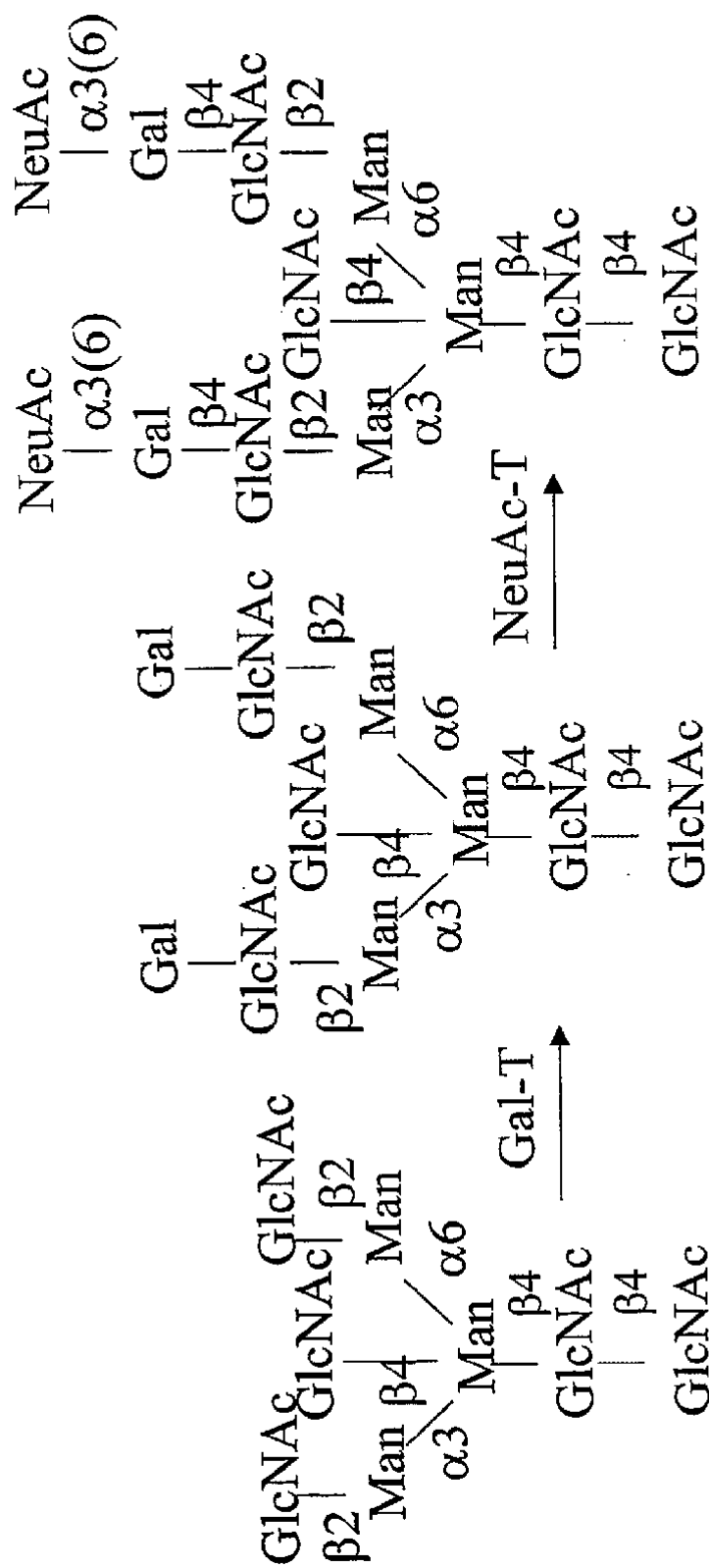


FIG. 4

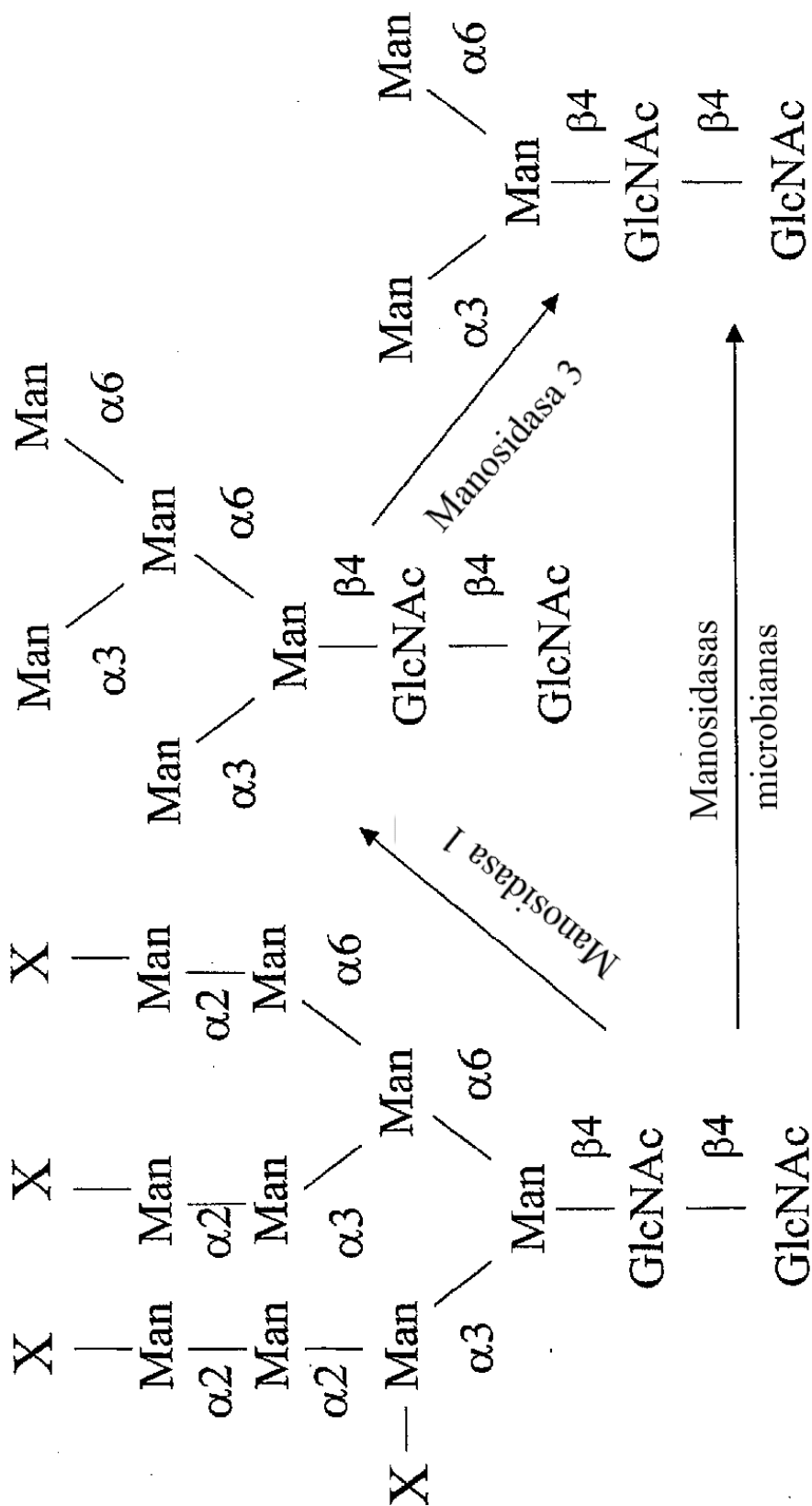


FIG. 5

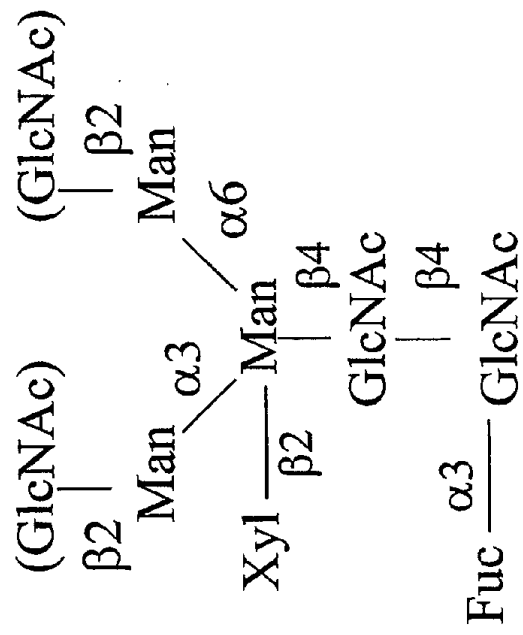


FIG. 6

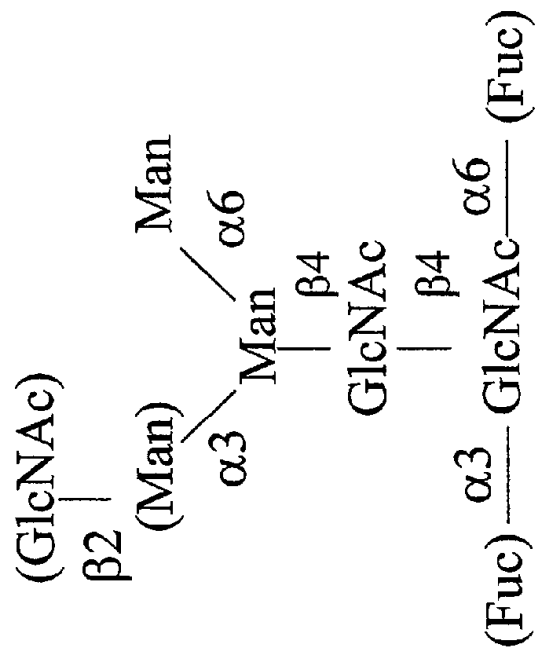
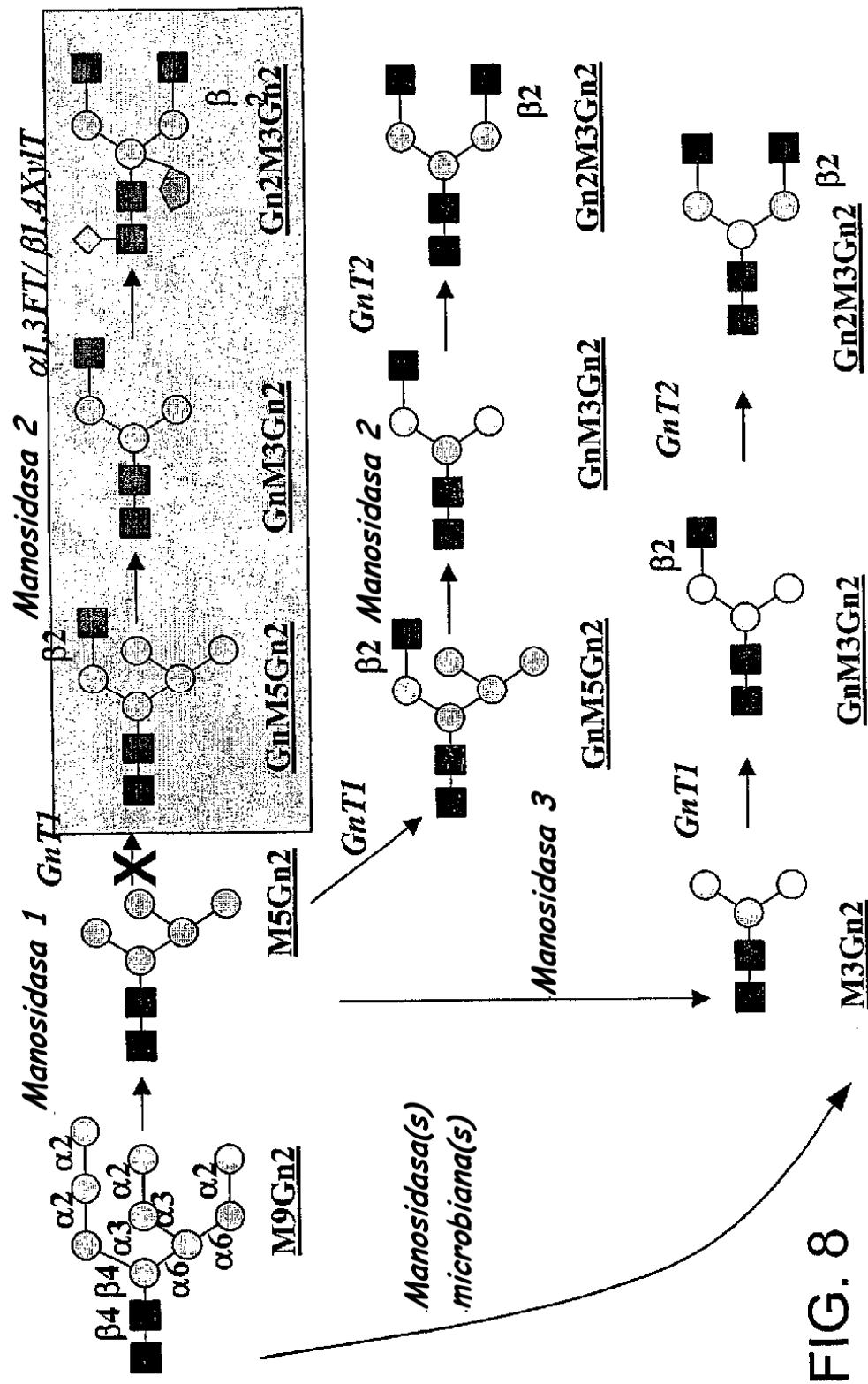


FIG. 7



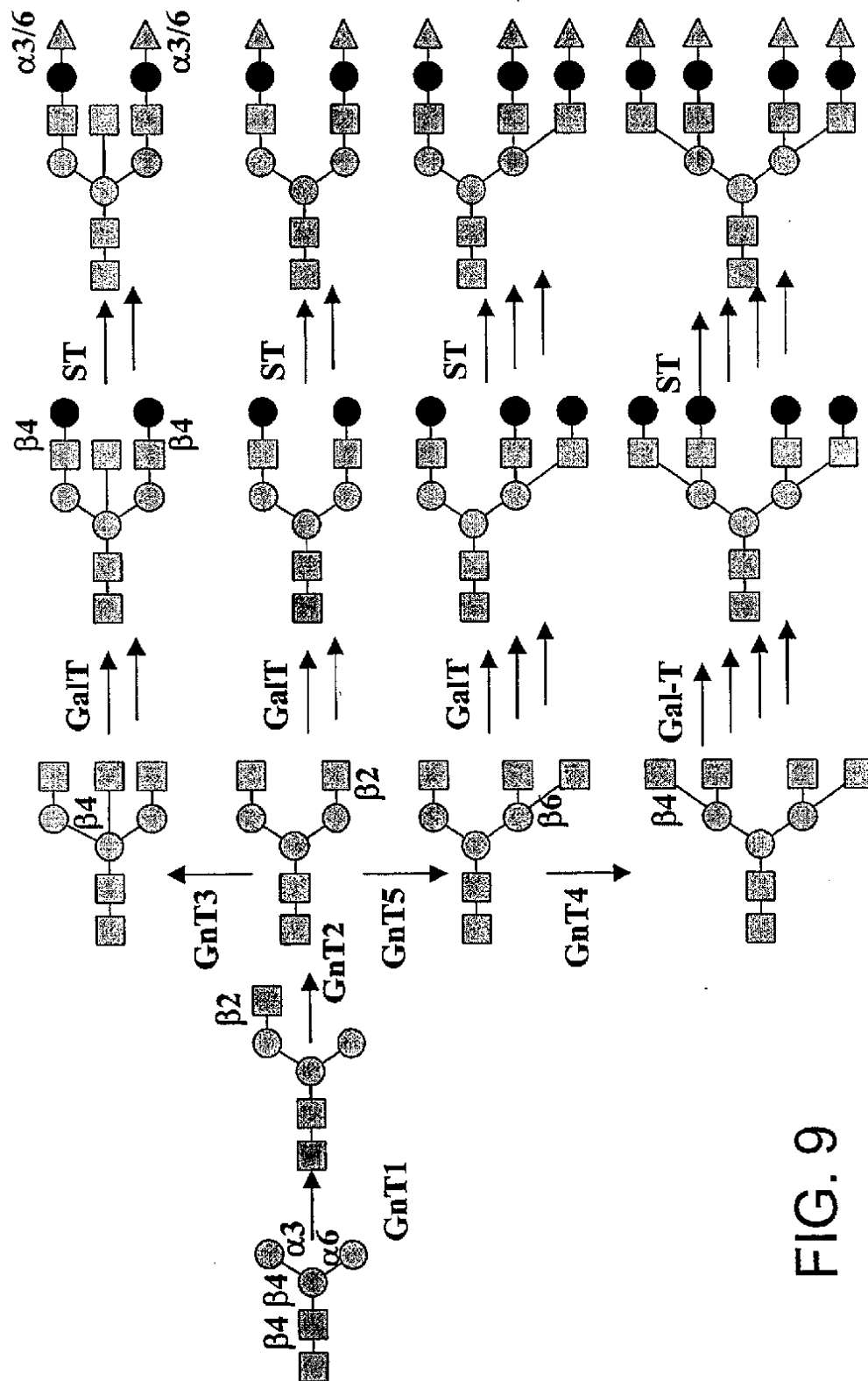


FIG. 9

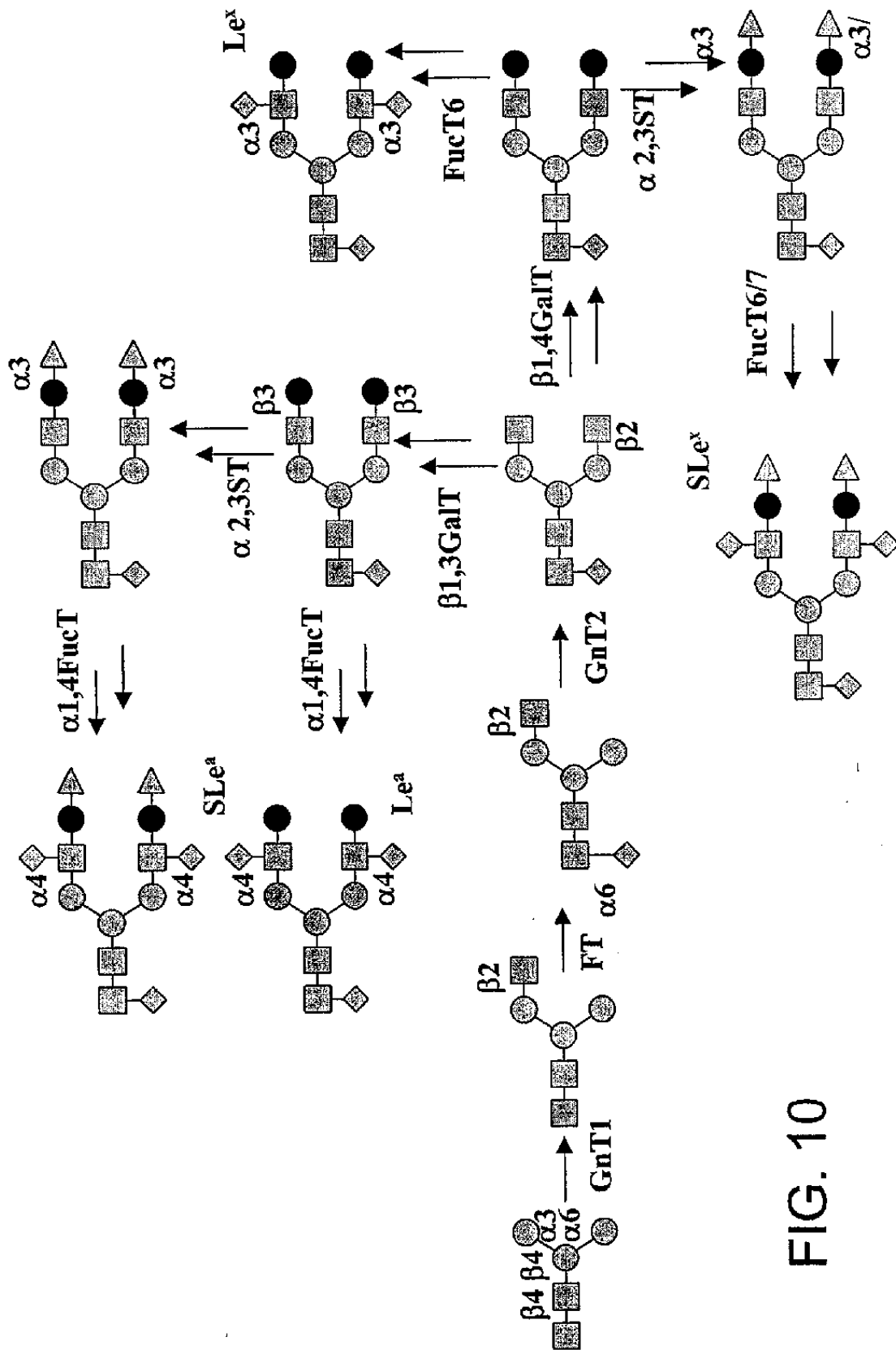


FIG. 10

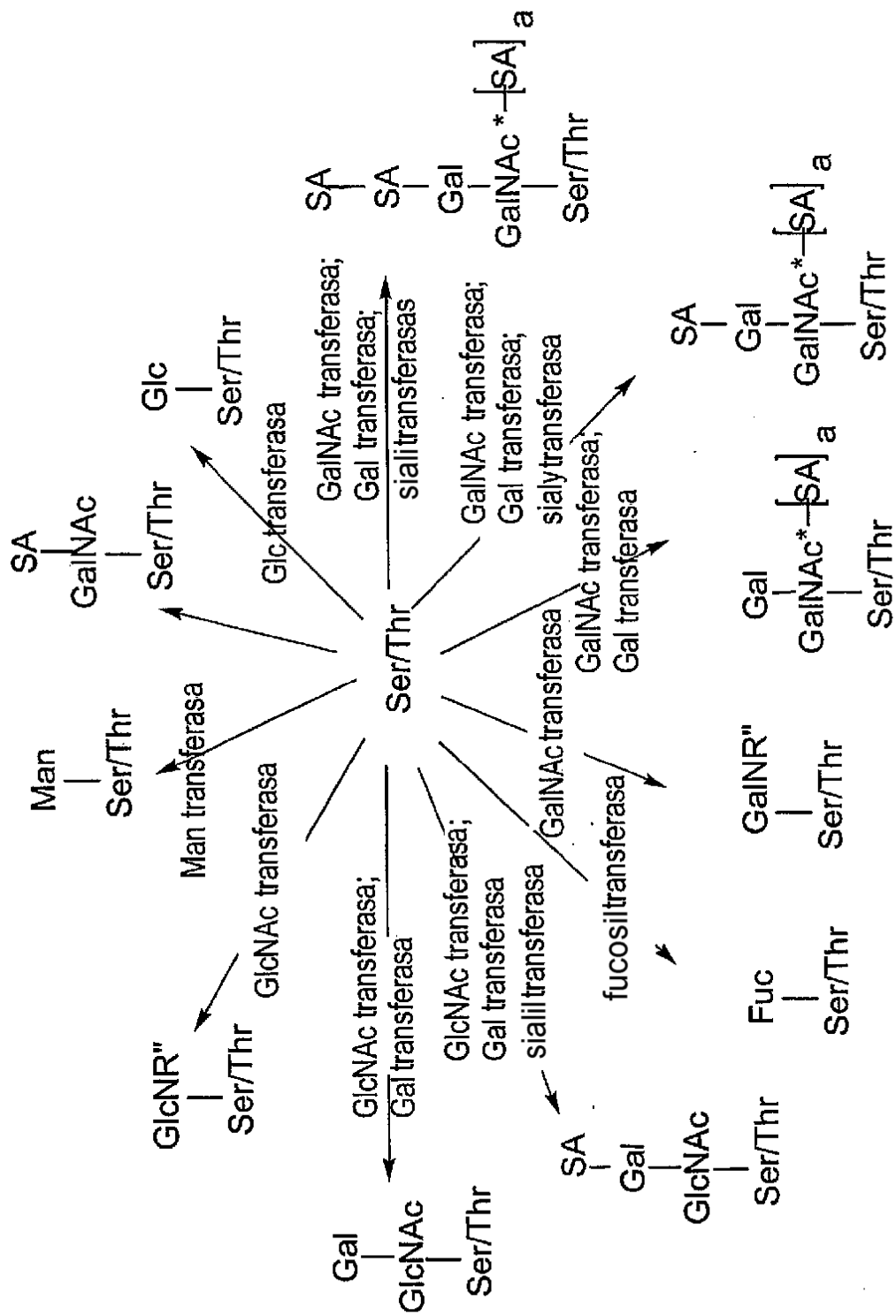
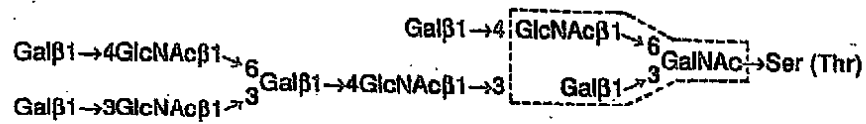
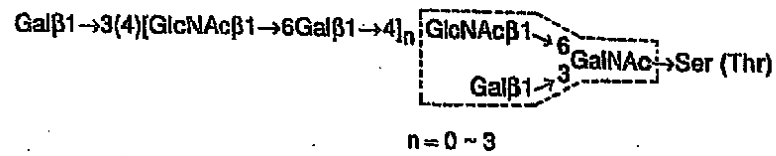
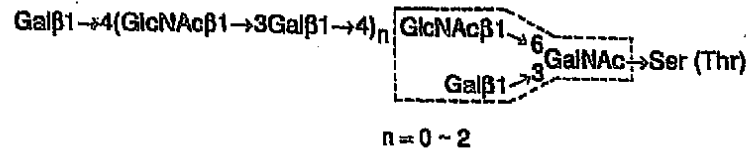


FIG. 11

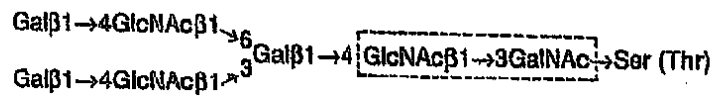
Núcleo 1



Núcleo 2



Núcleo 3



Núcleo 4

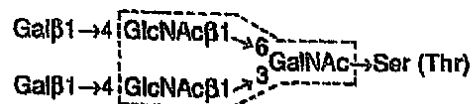
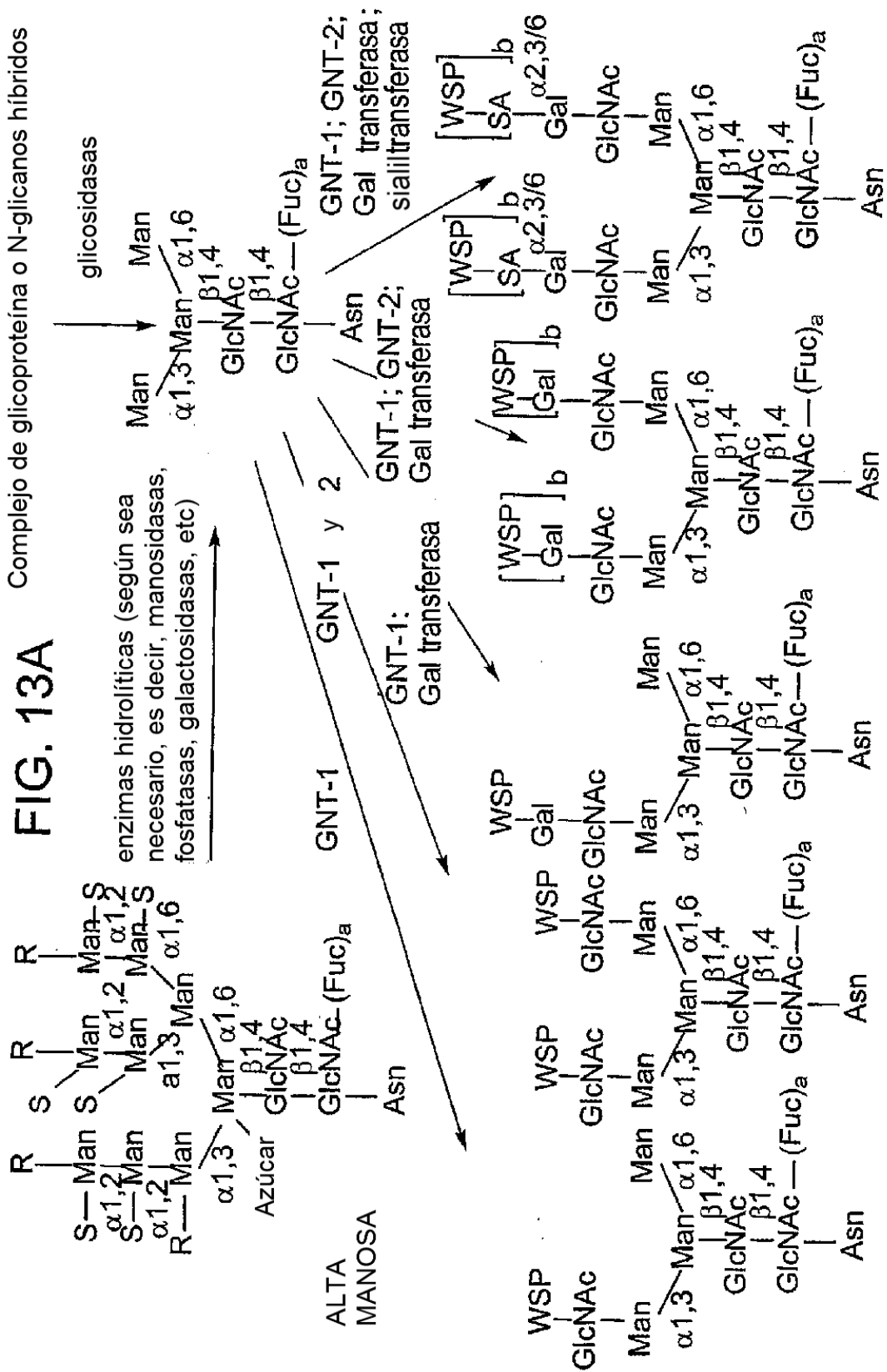
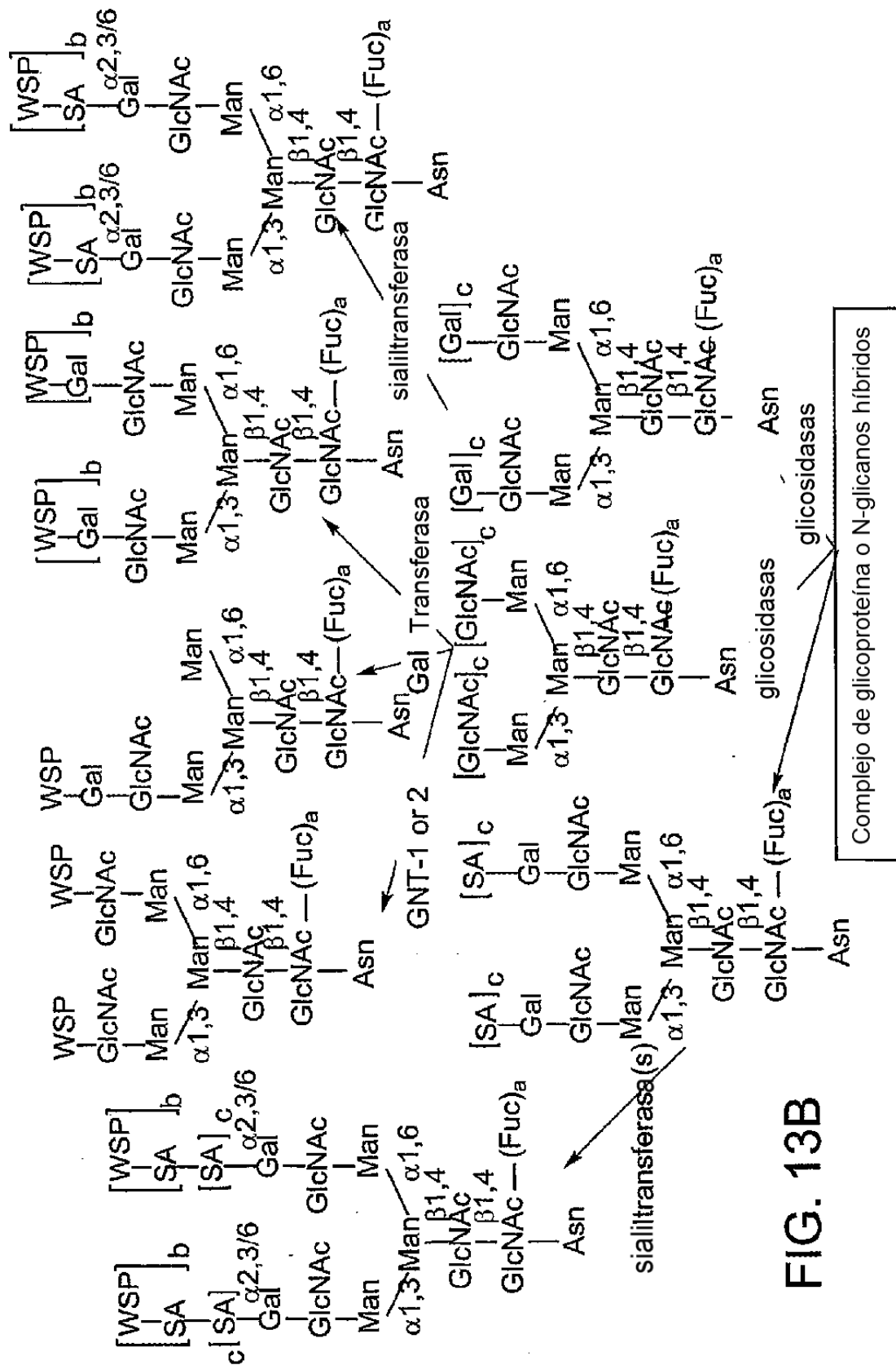


FIG. 12

FIG. 13A
Complejo de glicoproteína o N-glicanos híbridos





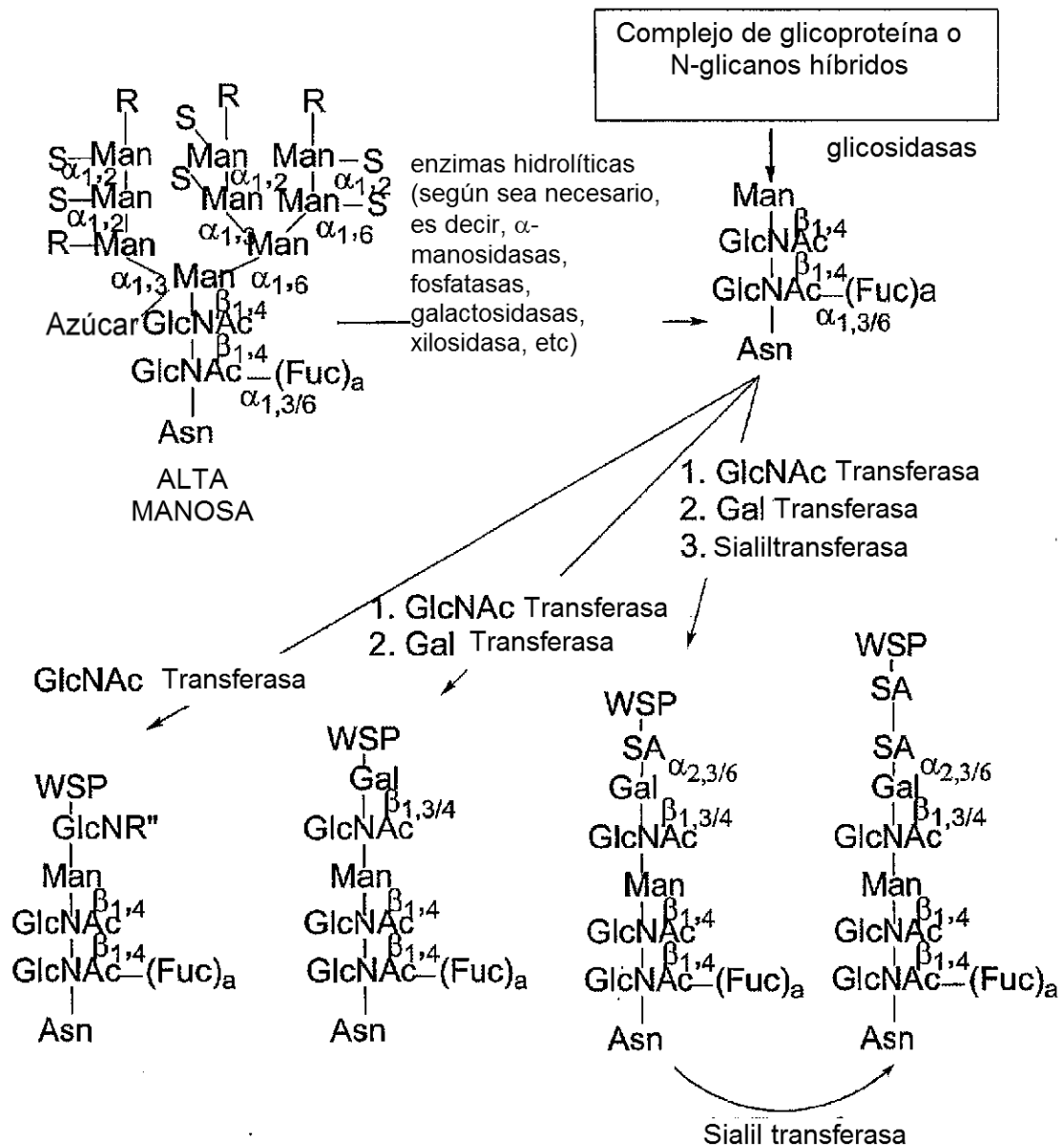


FIG. 14

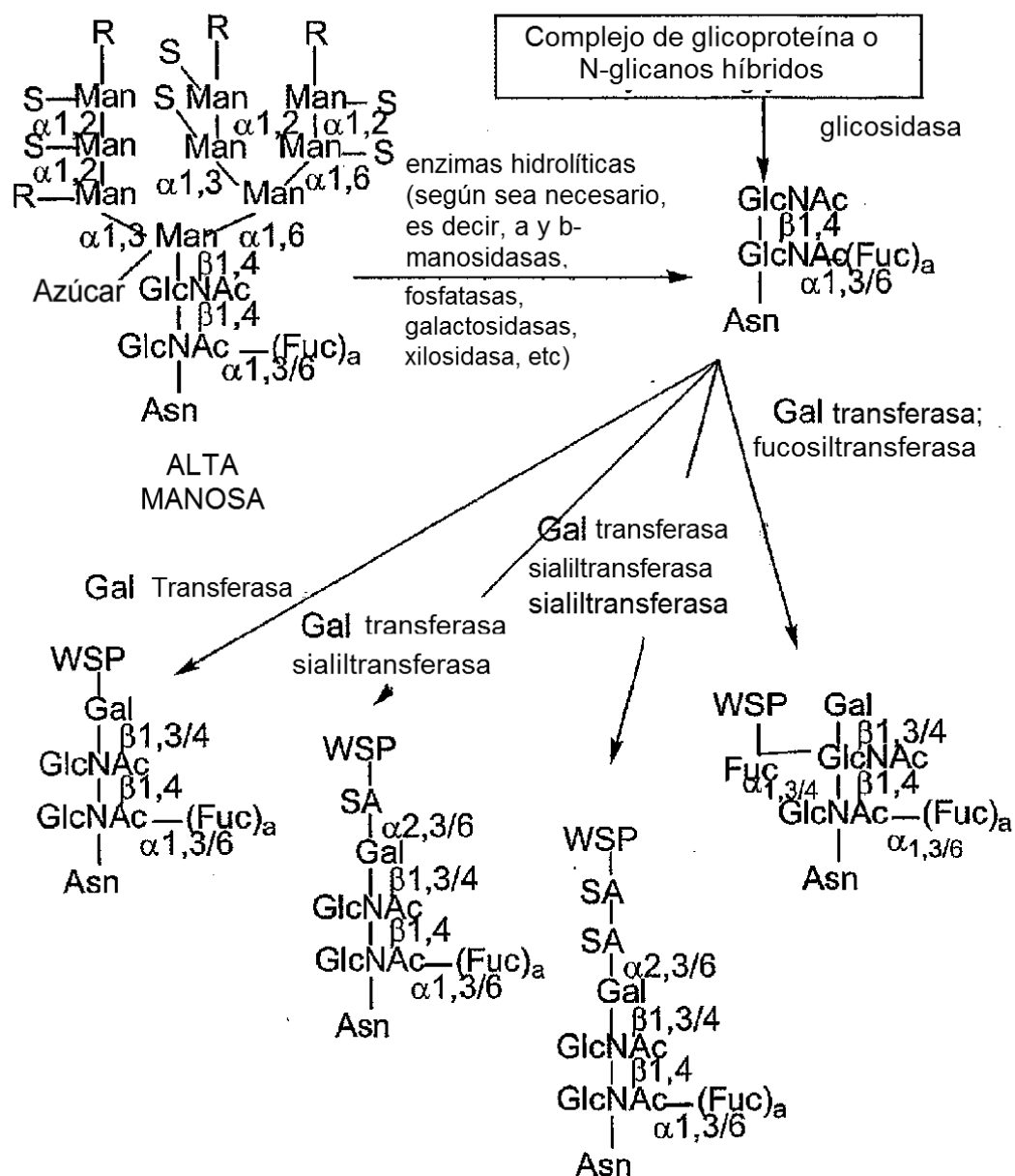


FIG. 15

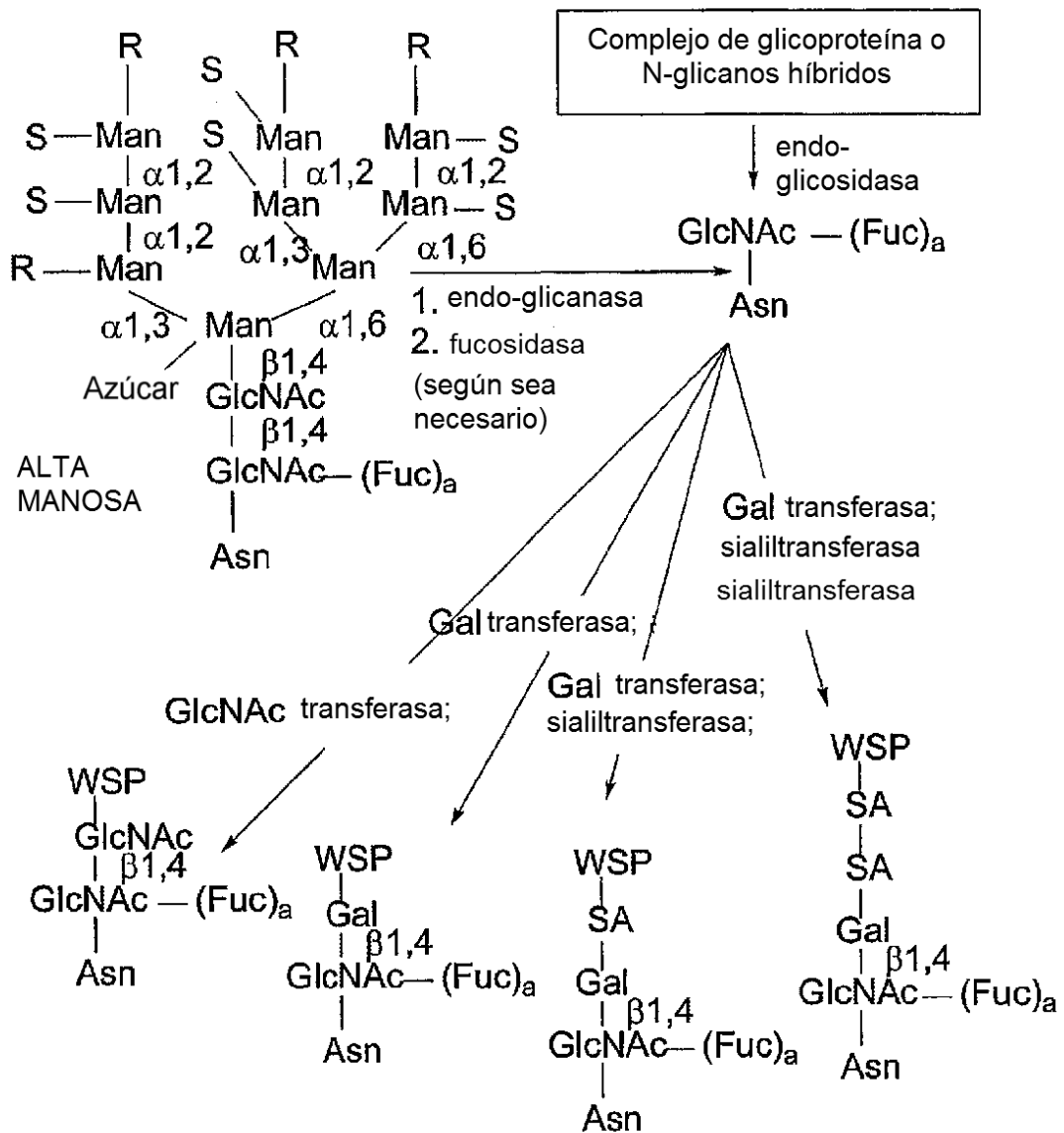


FIG. 16

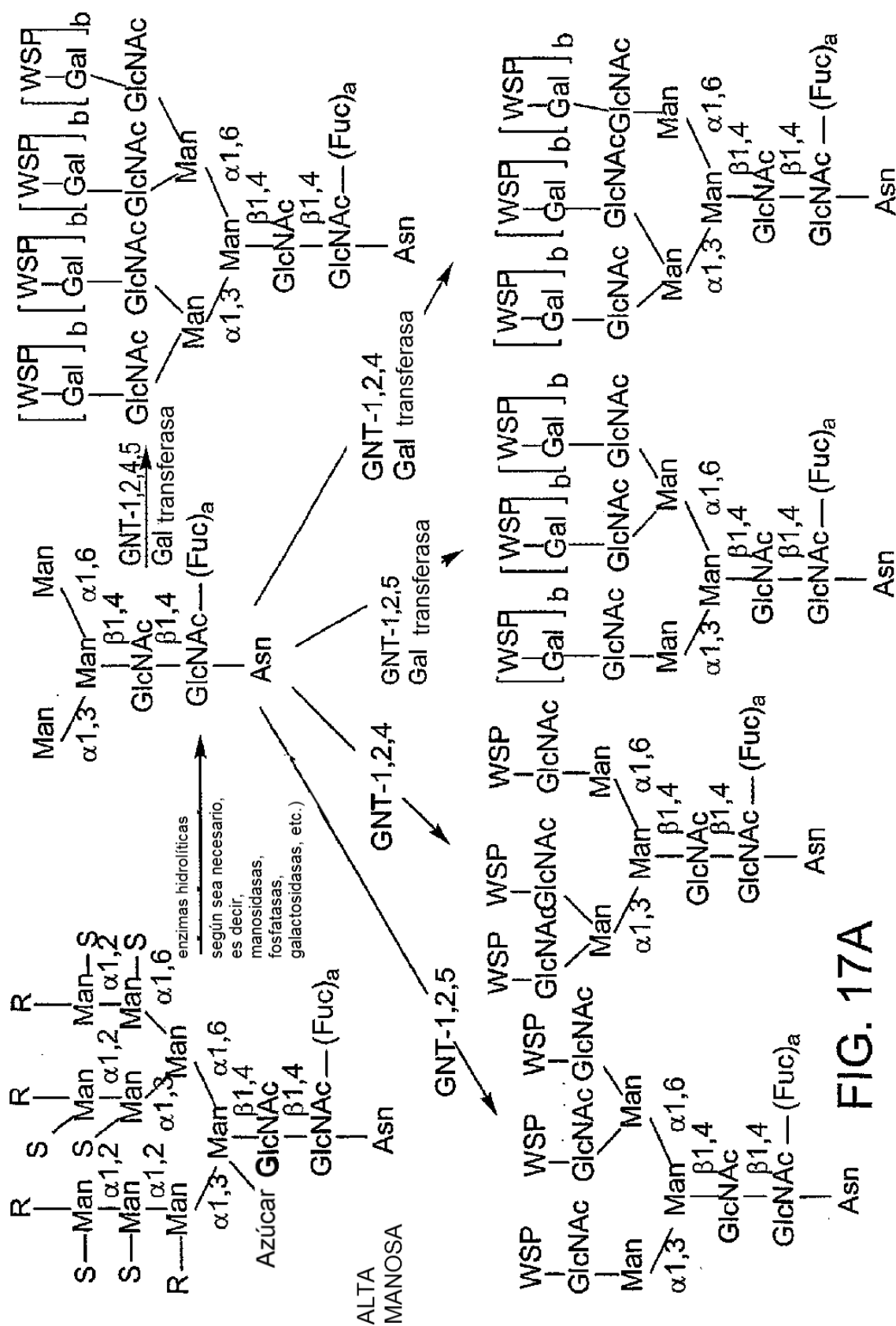


FIG. 17A

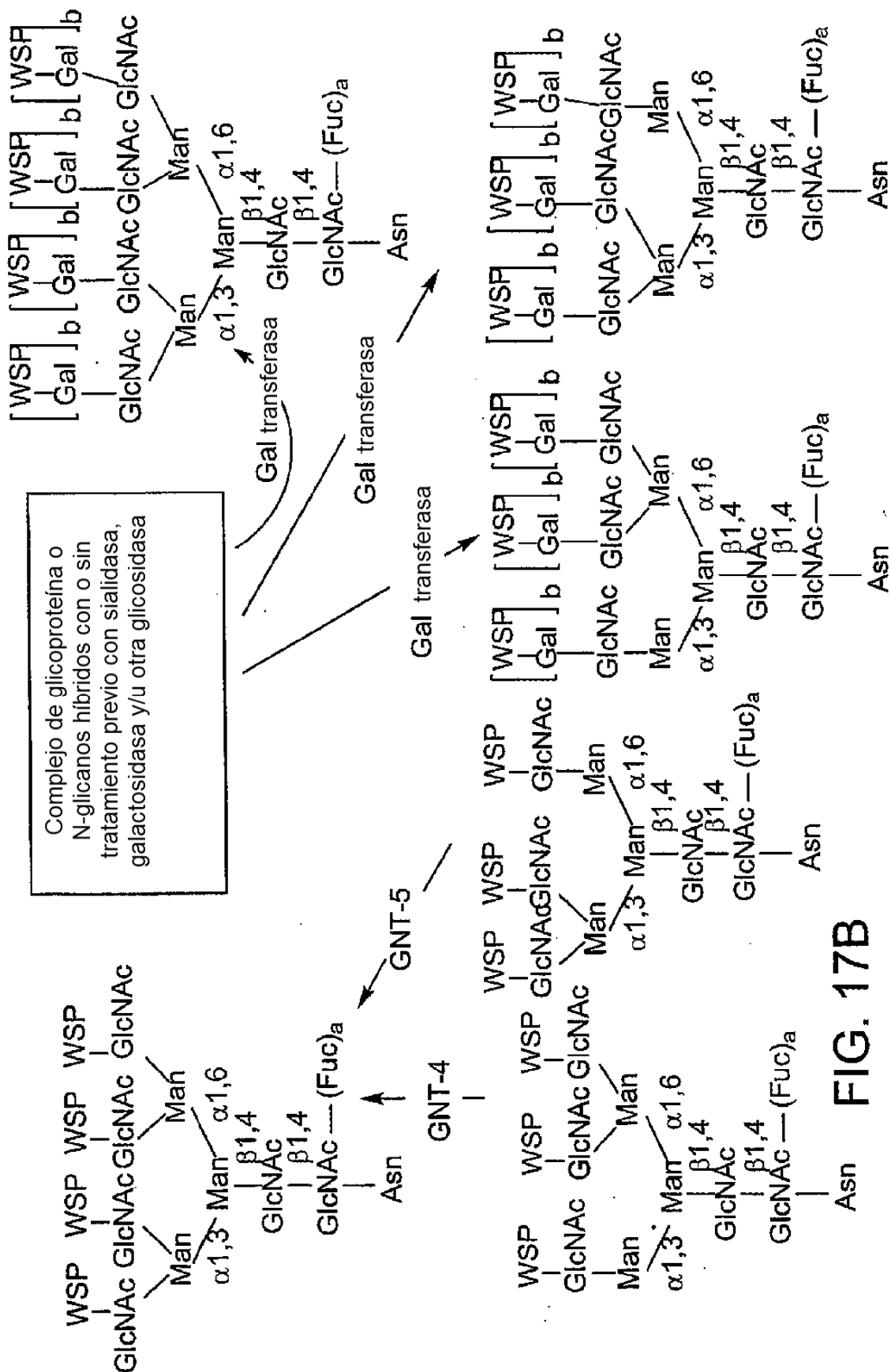
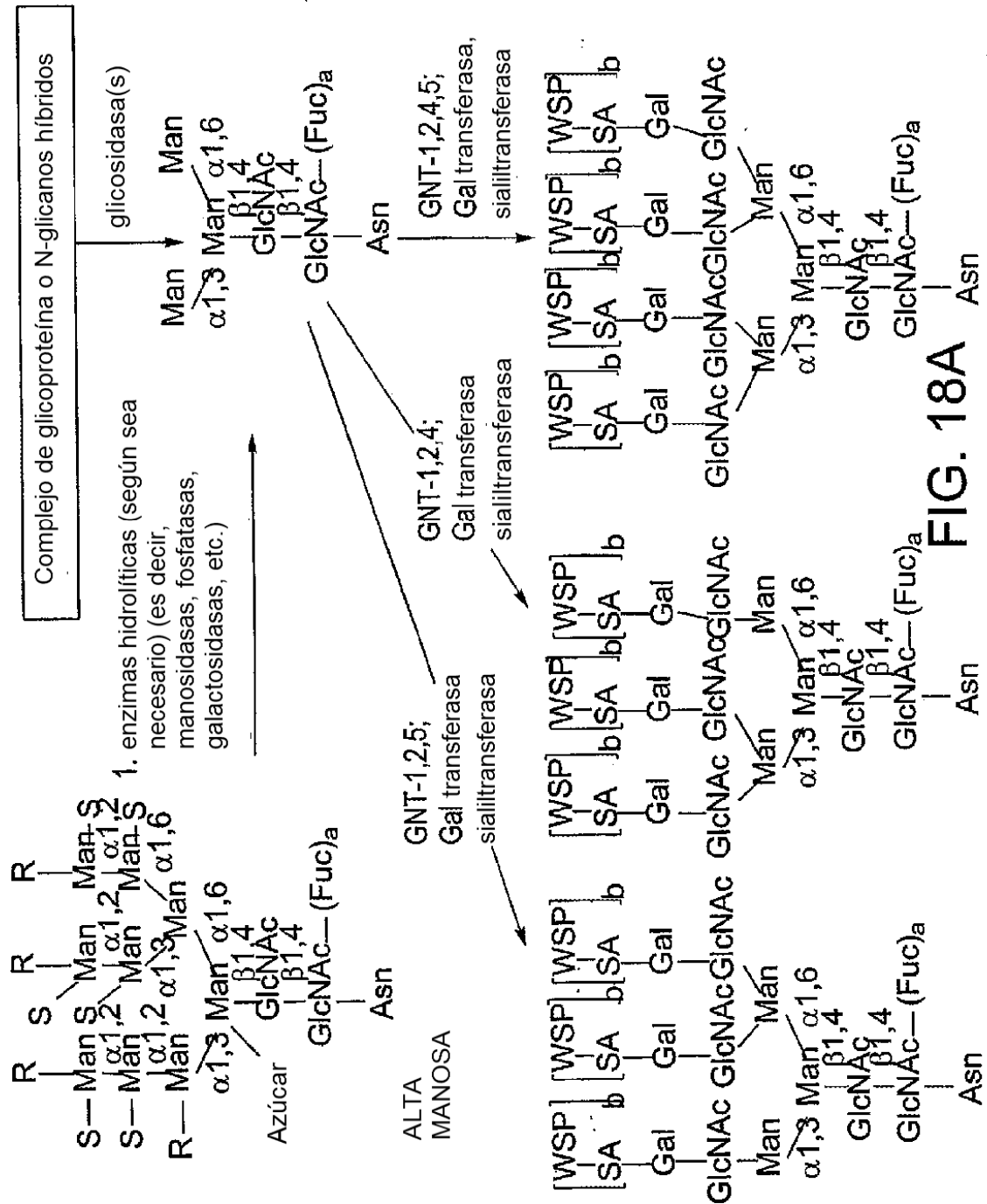


FIG. 17B



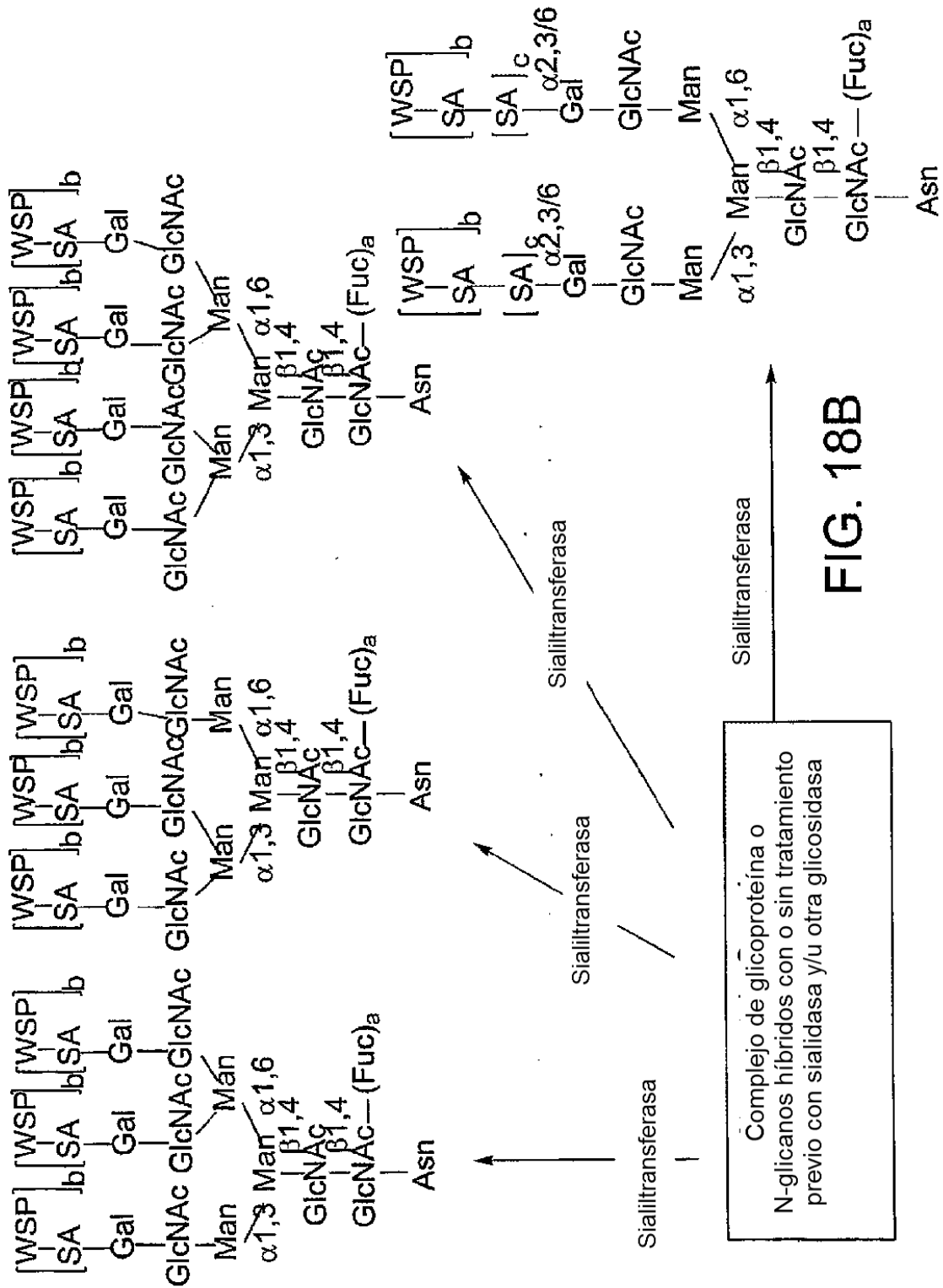


FIG. 18B

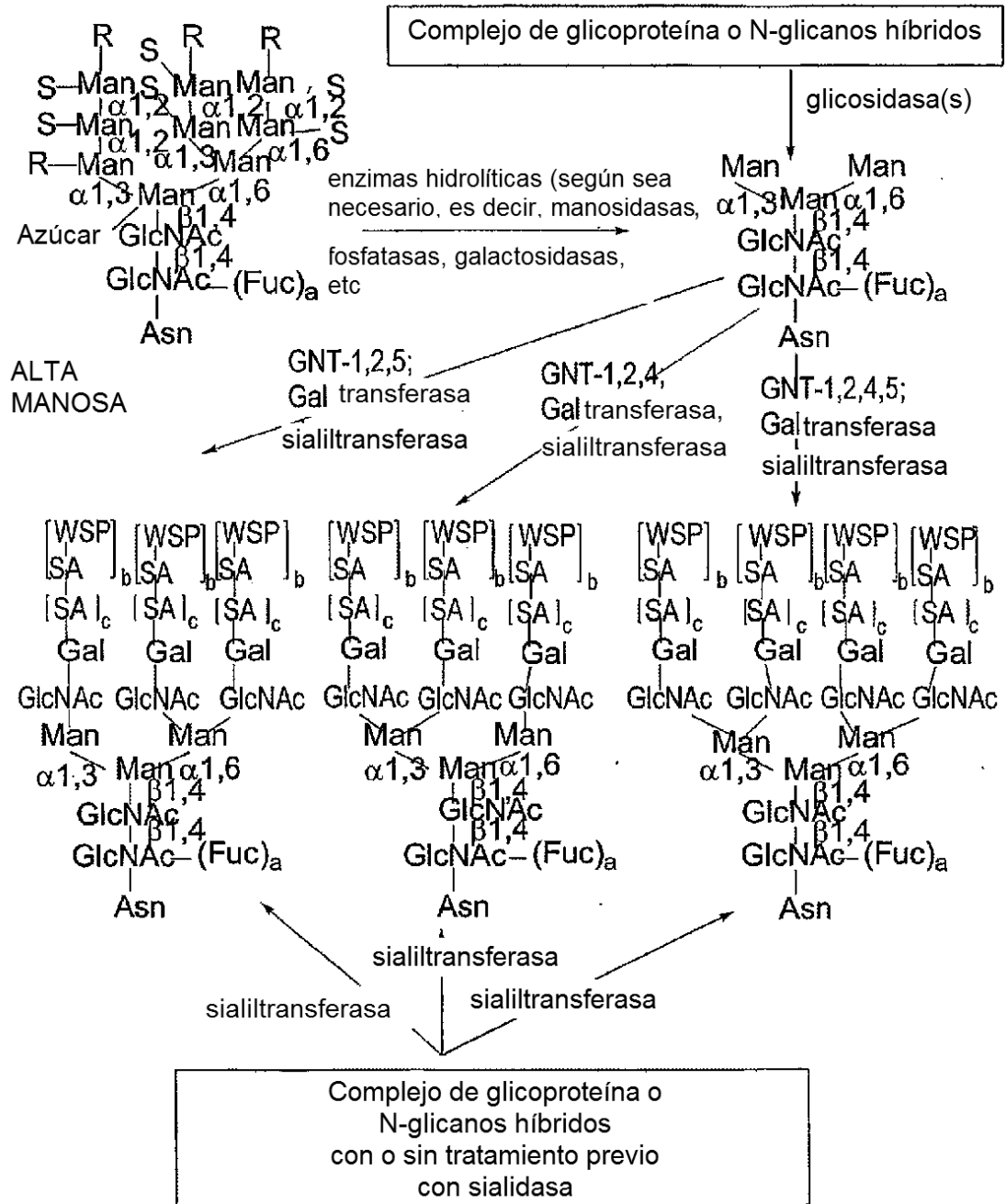
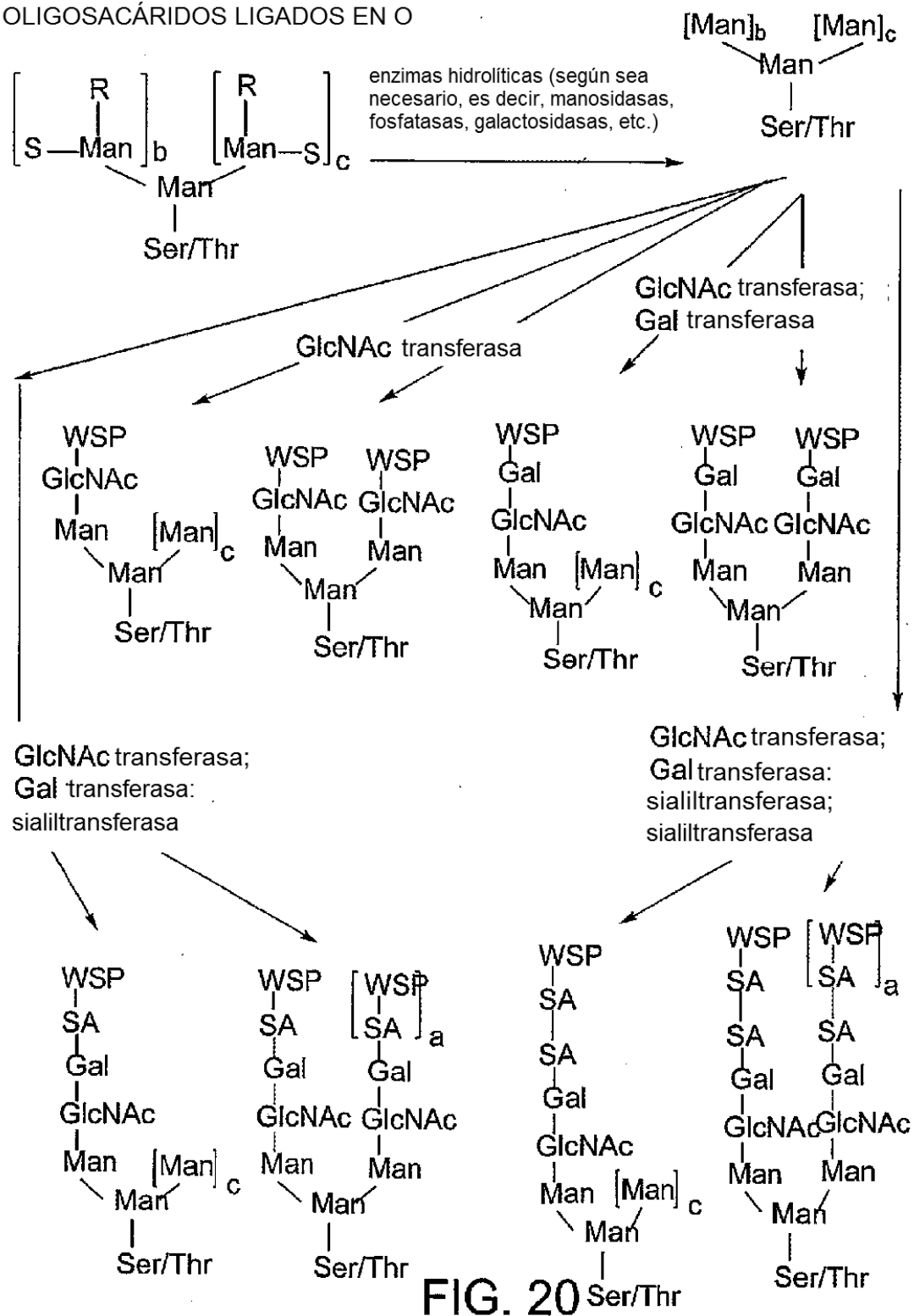
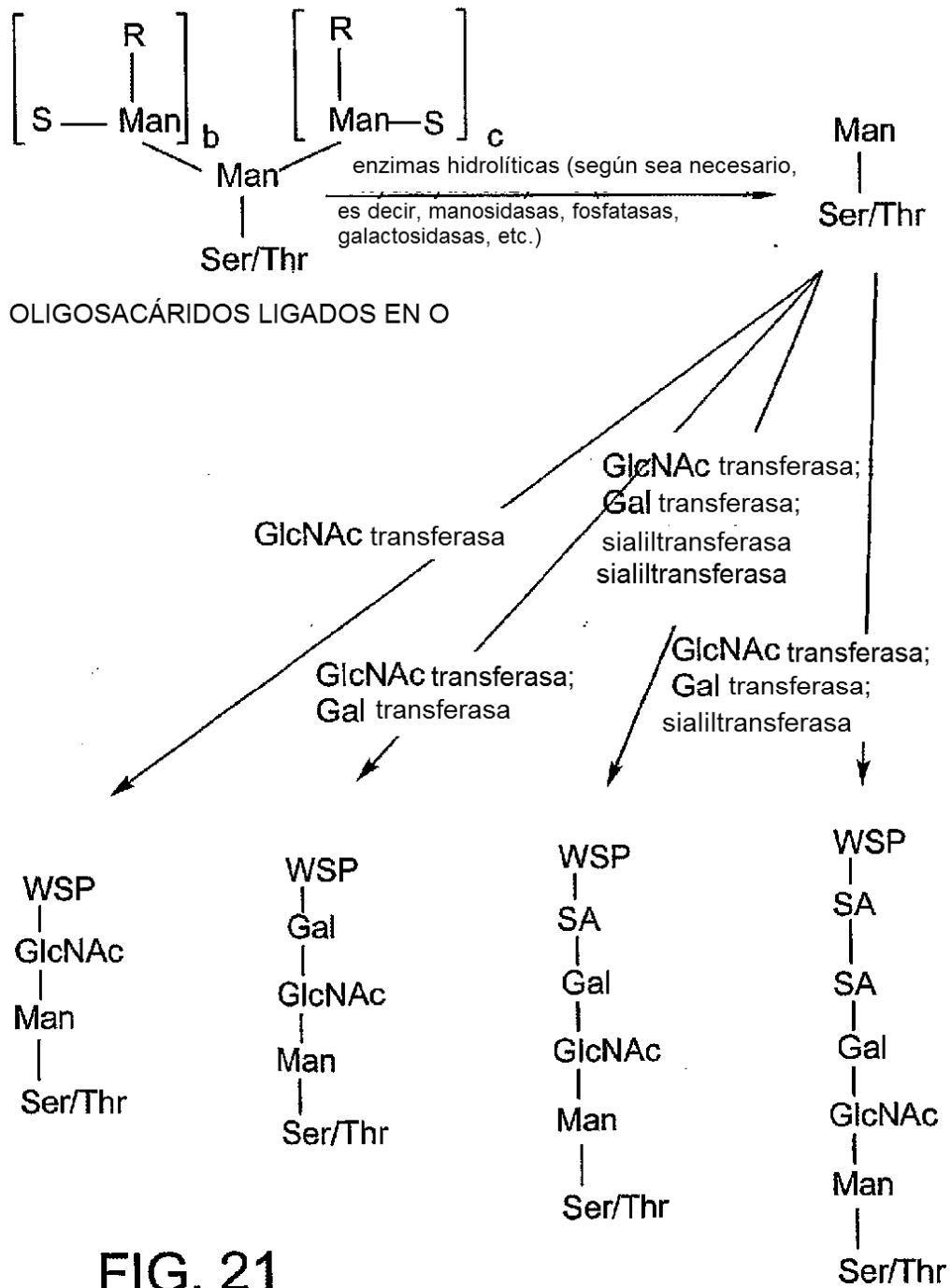


FIG. 19

OLIGOSACÁRIDOS LIGADOS EN O





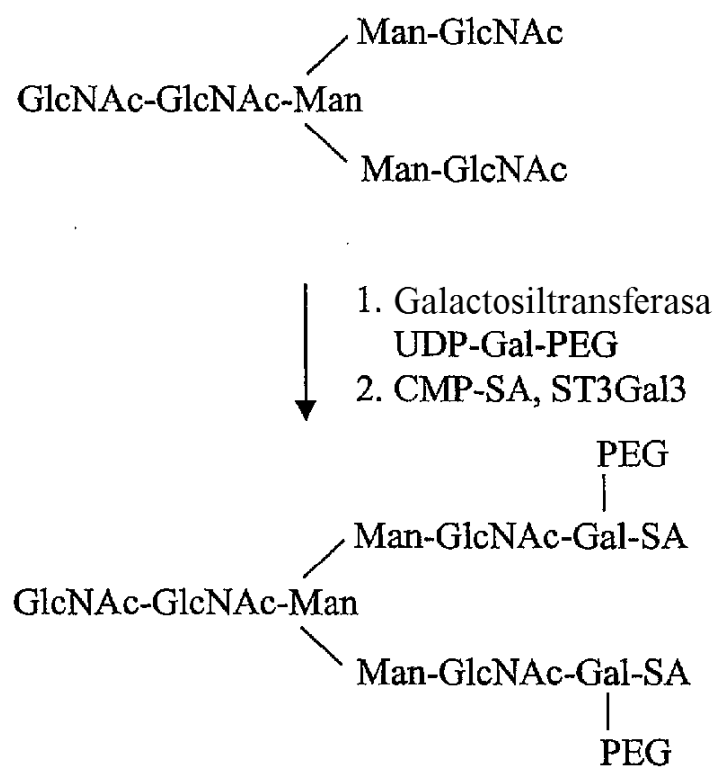


FIG. 22A

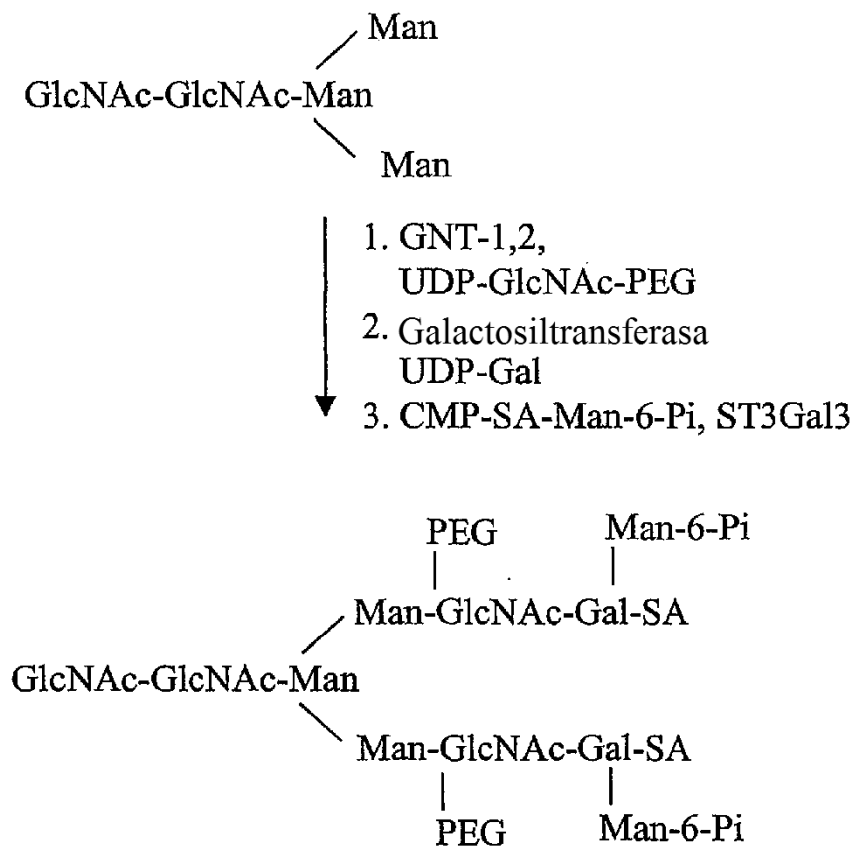


FIG. 22B

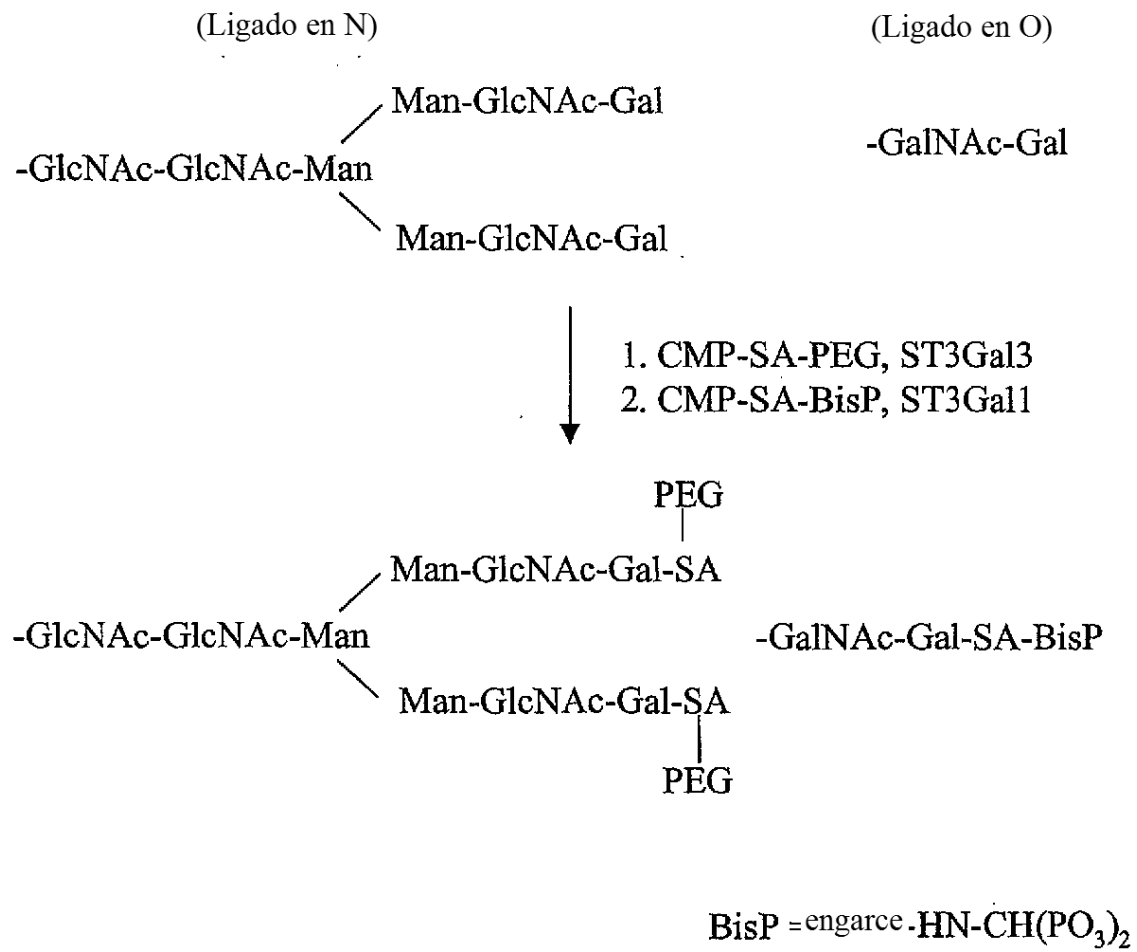


FIG. 22C

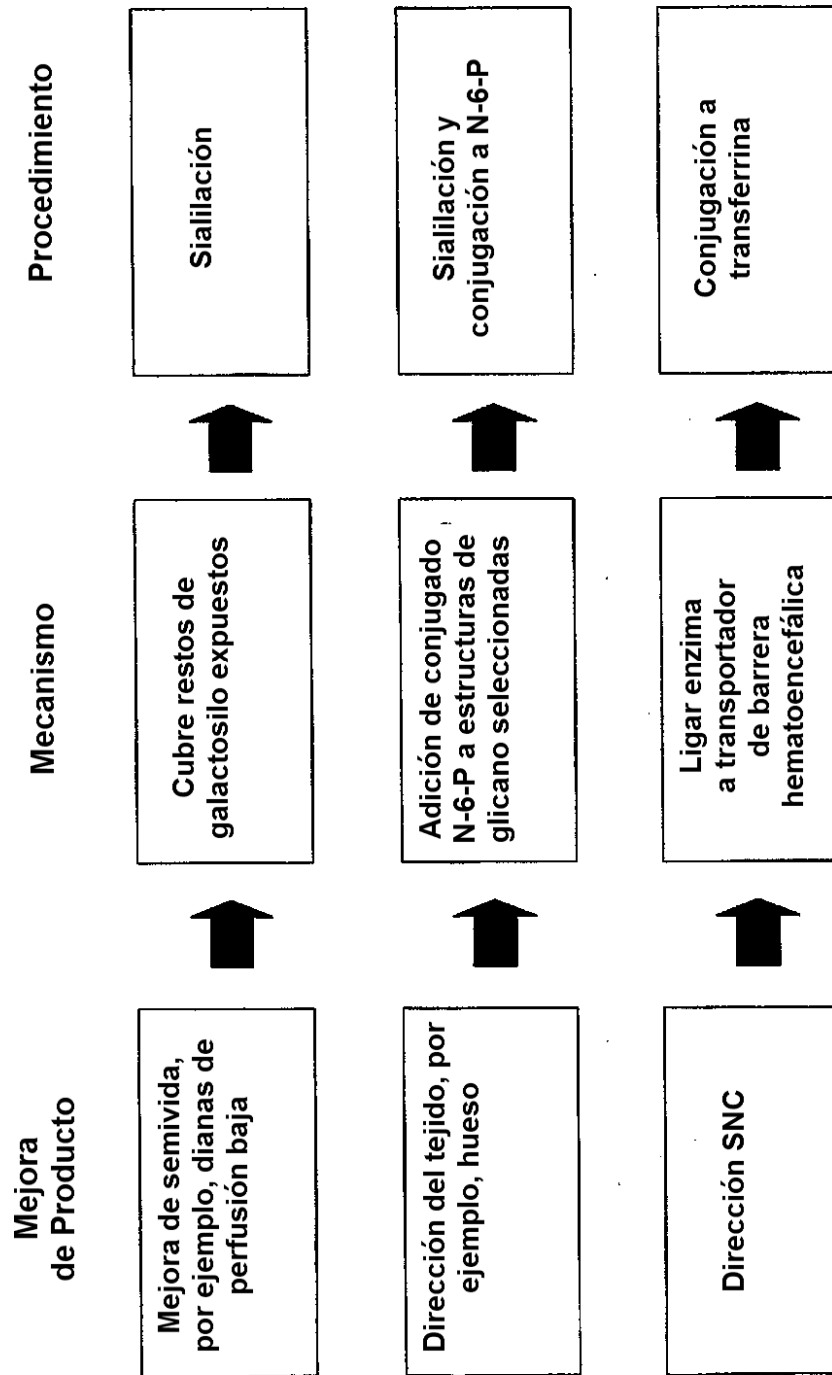


FIG. 23

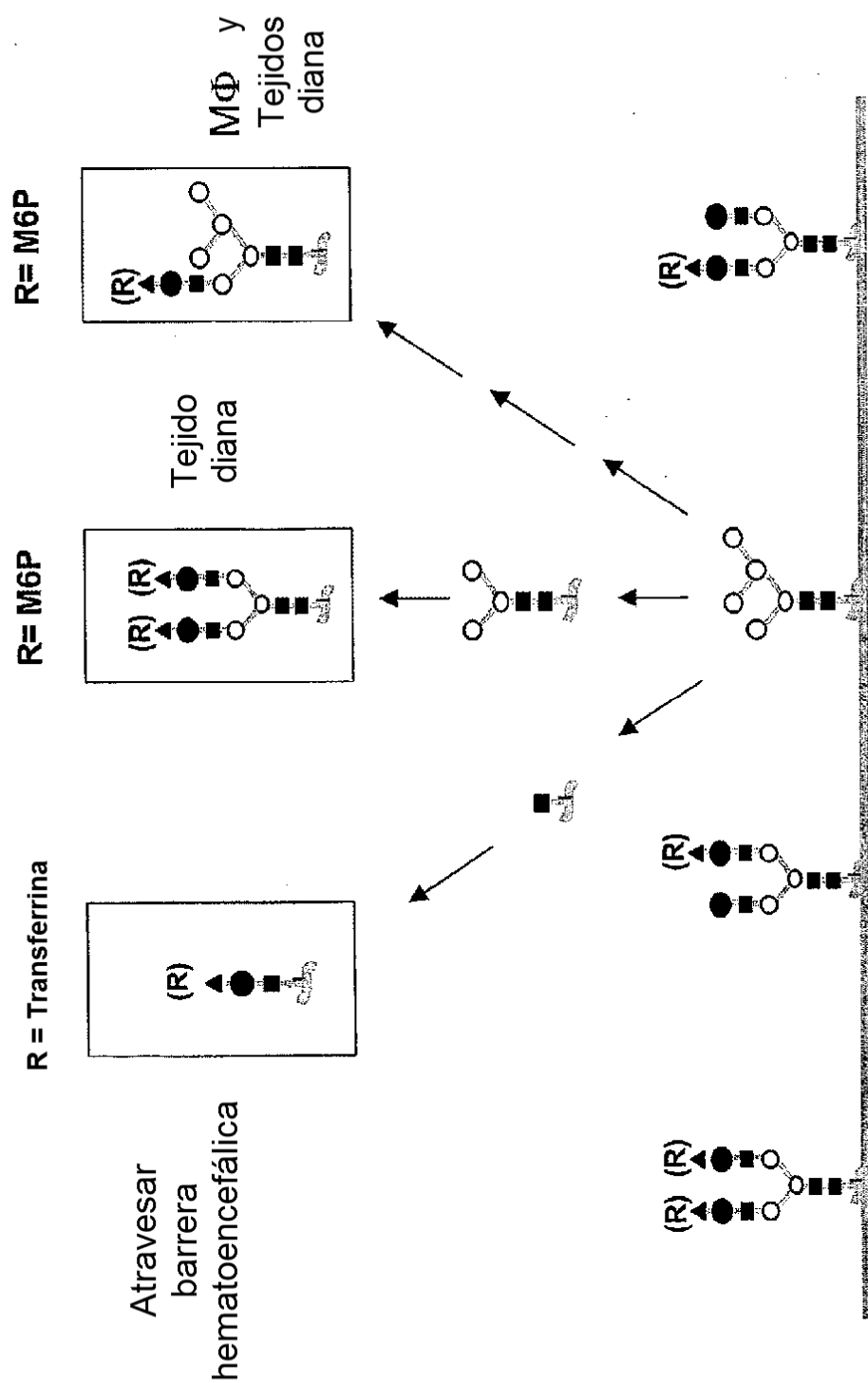


FIG. 24

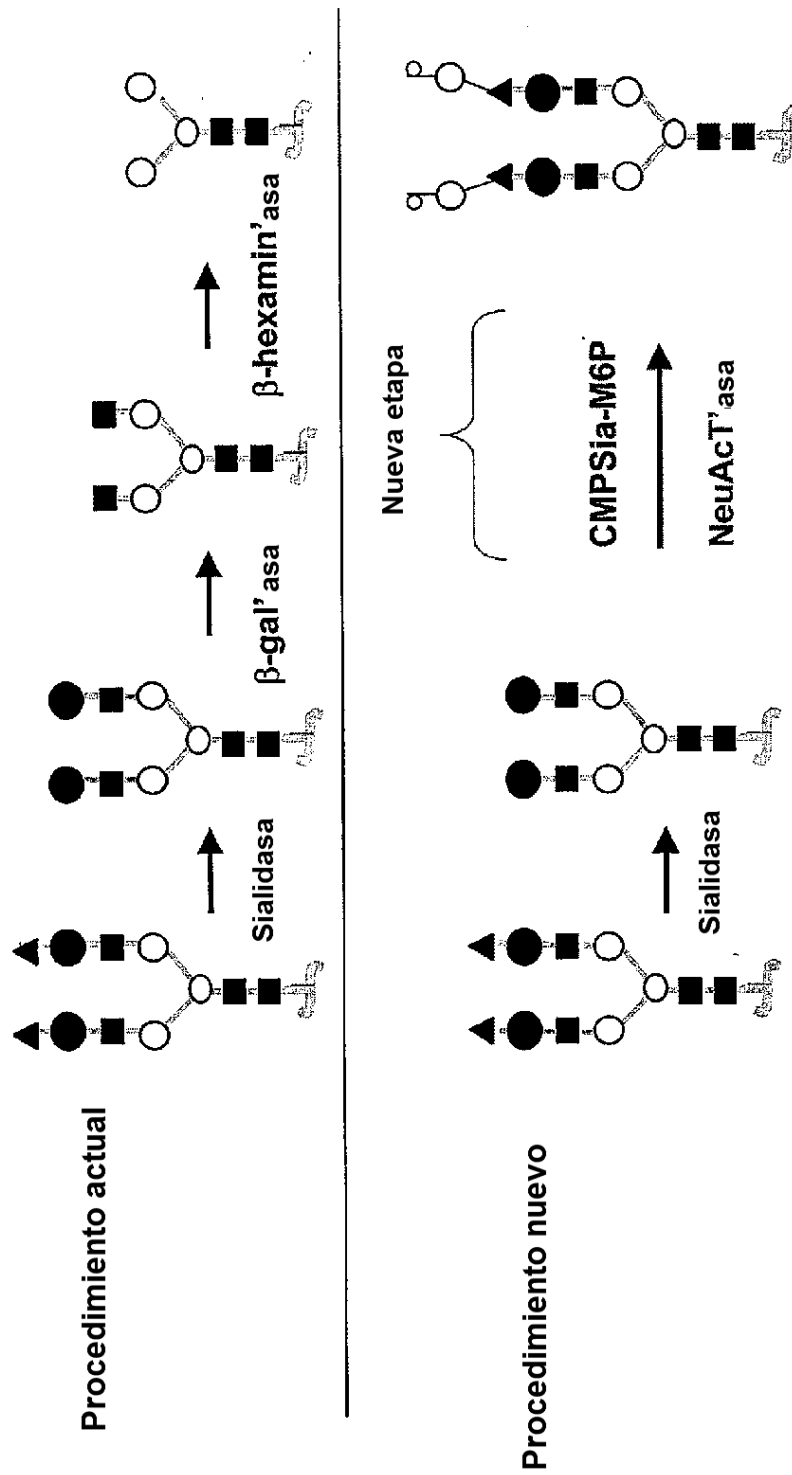


FIG. 25

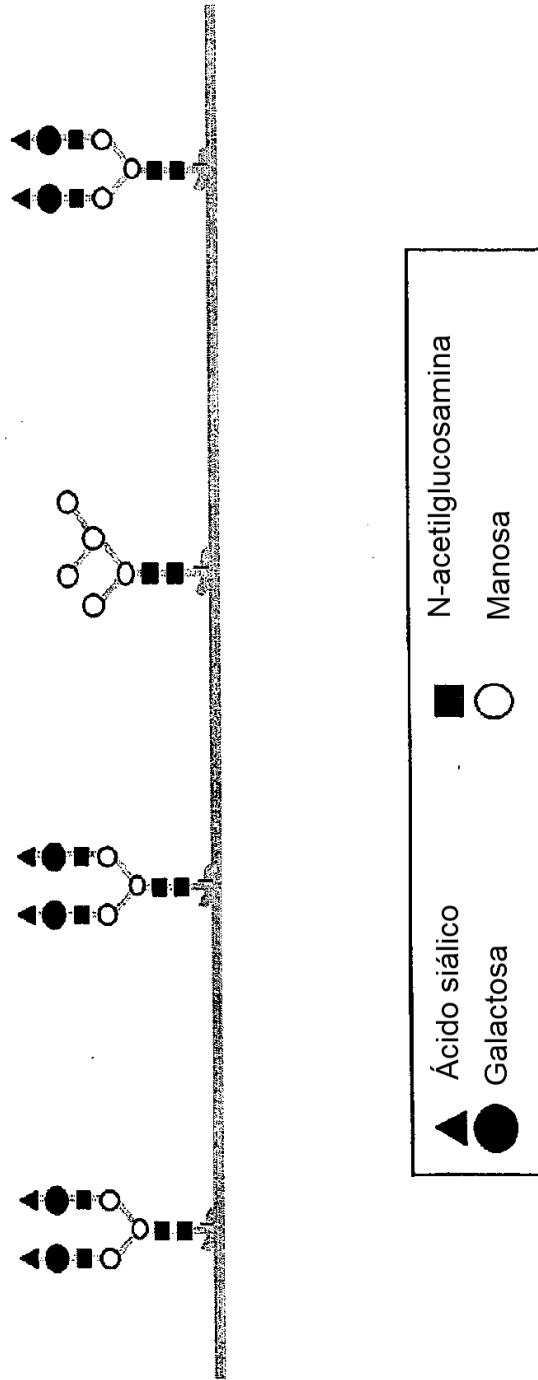
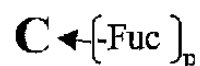
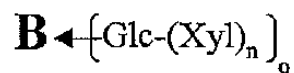
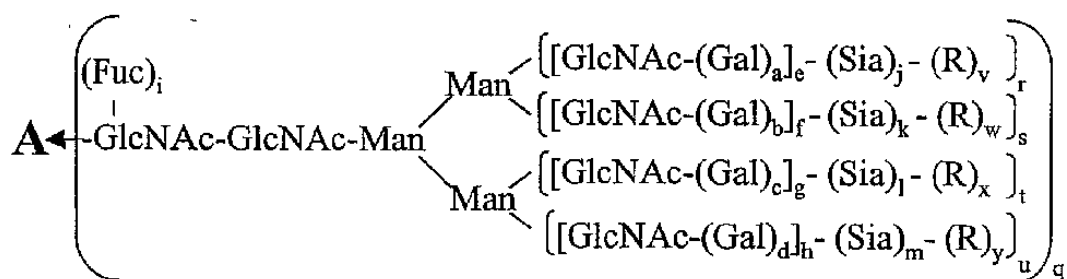
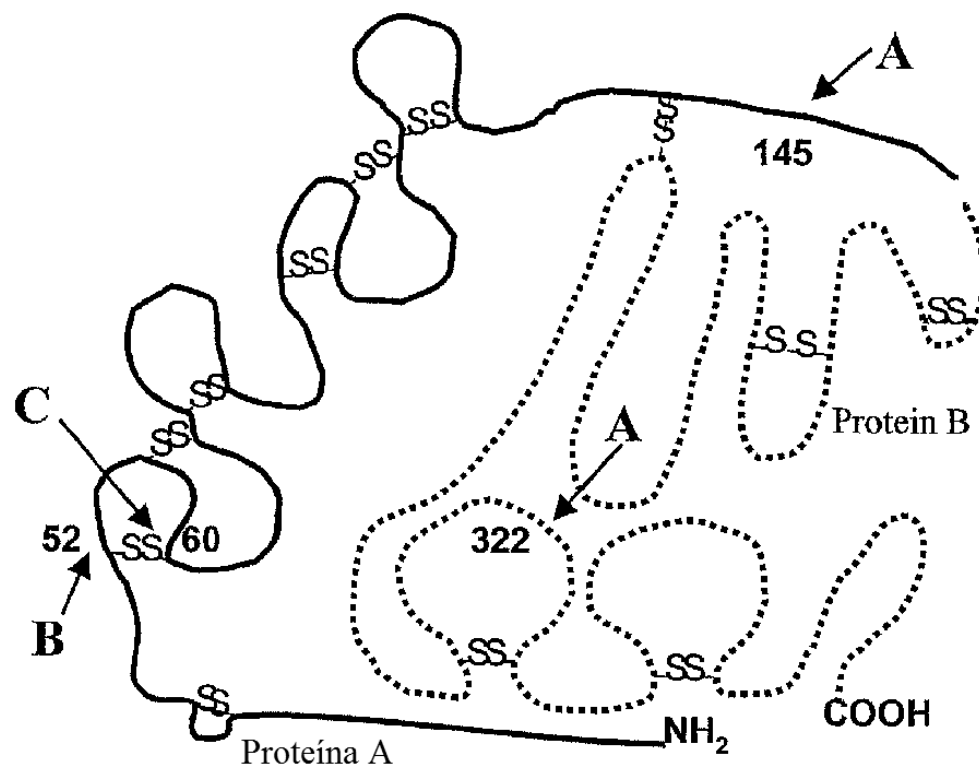


FIG. 26



a-d, i, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

o, p (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h, n (seleccionado independientemente) = 0 a 6;

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20;

v-y = 0;

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa, Sia-Lewis X, Sia-Lewis A..

FIG. 30A

Factor VII o VIIa expresado en BHK

a-d, e, i, g, q, j, l, o, p (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, v-y = 0; n = 0-4.



1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG (16 mole eq),
ST3Gal3

a-d, e, g, i, q, j, l, o, p (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, w, y = 0; n = 0-4;
v, x, (seleccionado independientemente) = 1;
when j, l (respectivamente, seleccionado independientemente) es 1;
R = PEG.

FIG. 30B

Factor VII o VIIa expresado en células CHO, BHK, 293, Vero

a-d, e, i, g, q, j, l, o, p (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, v-y = 0; n = 0-4.



1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG (1.2 mole eq),
ST3Gal3
3. CMP-SA (8 mol eq), ST3Gal3

a-d, e, g, i, q, j, l, o, p (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
r, t = 1; f, h, k, m, s, u, w, y = 0; n = 0-4;
v or x, (seleccionado independientemente) = 1;
when j or l, (respectivamente, seleccionado independientemente) es 1;
R = PEG.

FIG. 30C

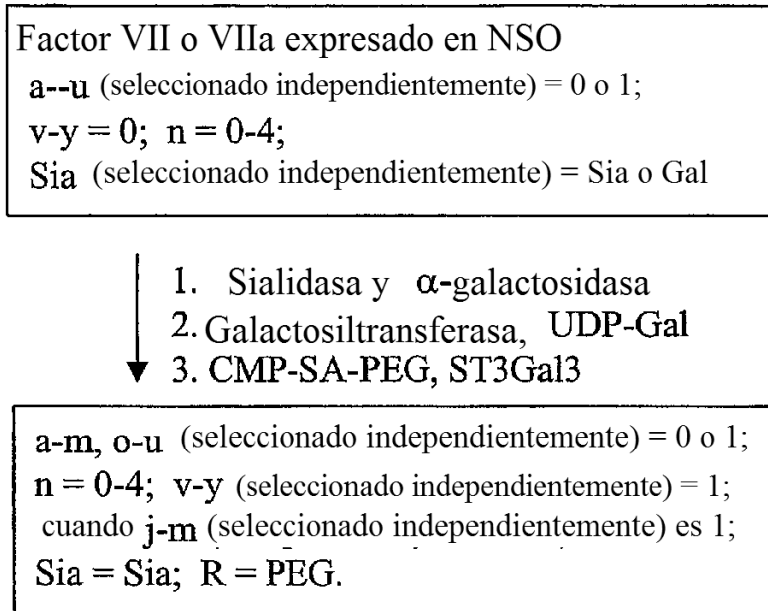
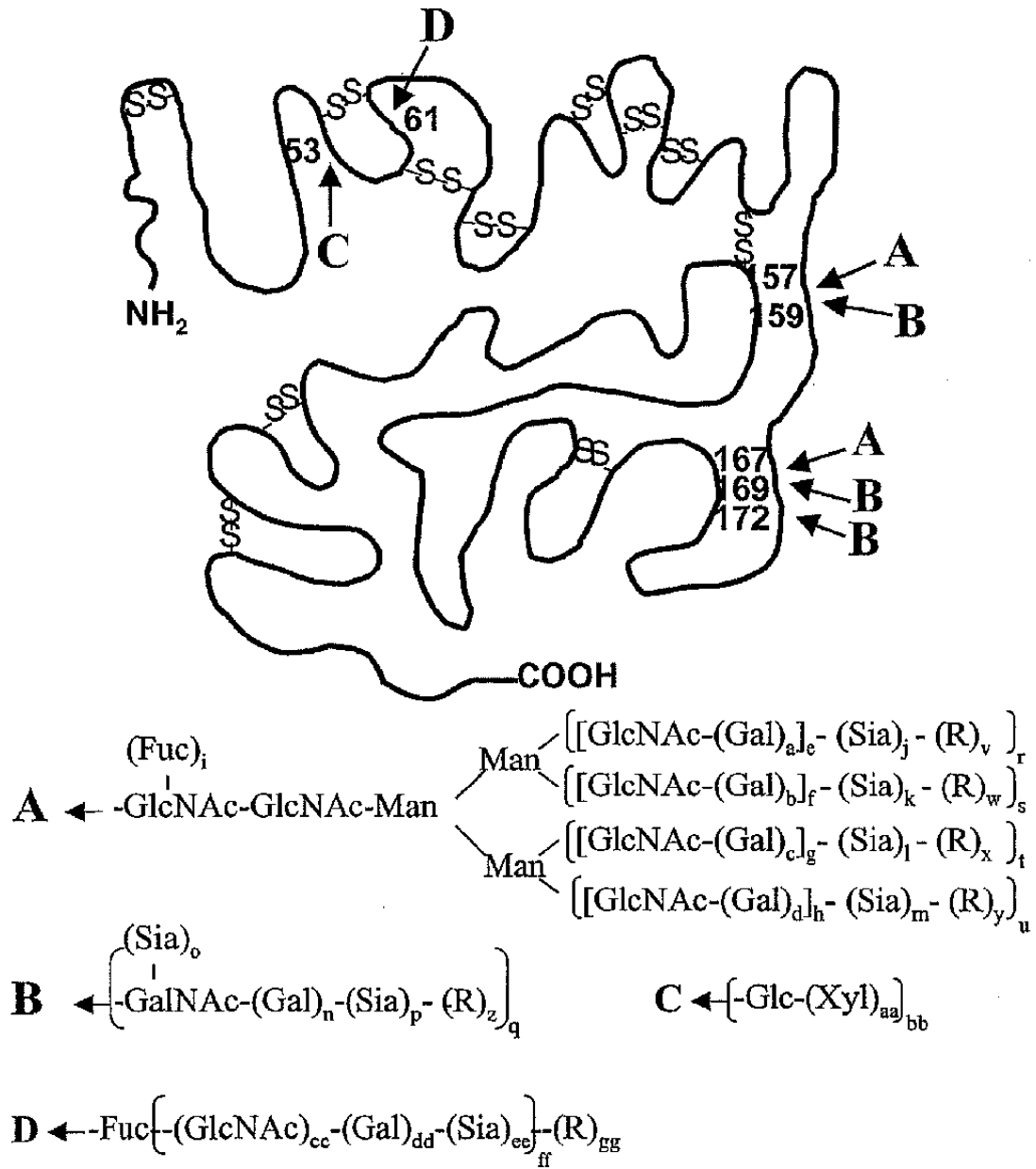


FIG. 30D



a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 bb, cc, dd, ee, ff, gg (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 e-h, aa (seleccionado independientemente) = 0 a 6;
 j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20;
 v-z = 0; R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa

FIG. 31A

Factor X expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j-m, i, n, o, p, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
v-z, gg = 0.



1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-d, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, n, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
o, p, z = 0;
j-m, ee, v-y, gg (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 31B

Factor IX expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, n, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j-m, i, o, p, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
v-z, gg = 0.



1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3
3. ST3Gal1, CMP-SA

a-d, n, p, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
j-m, ee, v-y, gg (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
o, z = 0; R = PEG.

FIG. 31C

Factor IX expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, n, q, bb, cc, dd, ff = 1; e-h, aa = 1 to 4; ee, j-m, i,
o, p, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1; v-z, gg = 0.

1. sialidasa
2. Galactosiltransferasa, UDP-Gal
3. CMP-SA, ST3Gal3
4. CMP-SA-PEG, ST3Gal1

a-d, n, q = 1; e-h = 1 to 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, r-u (seleccionado independientemente)
= 0 o 1; R = PEG;
o, v-y, gg = 0;
j-m, p, ee (seleccionado independientemente) = 0 o 1; pero cuando
p = 1, z = 1.

FIG. 31D

Factor IX expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, q = 1; e-h = 1 to 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j-m, i, n, o, p, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
v-z, gg = 0.

- CMP-SA-PEG, ST3Gal3

a-d, q = 1; e-h = 1 to 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, n, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1; R = PEG
o, p, z = 0; j-m, ee, v-y, gg (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;

FIG. 31E

Factor IX expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, j-m, i, n, o, p, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
v-z, gg = 0.

- ↓ 1. CMP-SA-levulinato, ST3Gal3,
tampón, sal
2. H₄N₂-PEG

a-d, q = 1; e-h = 1 a 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, n, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
o, p, z = 0; R = PEG;
j-m, ee, v-y, gg (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

FIG. 31F

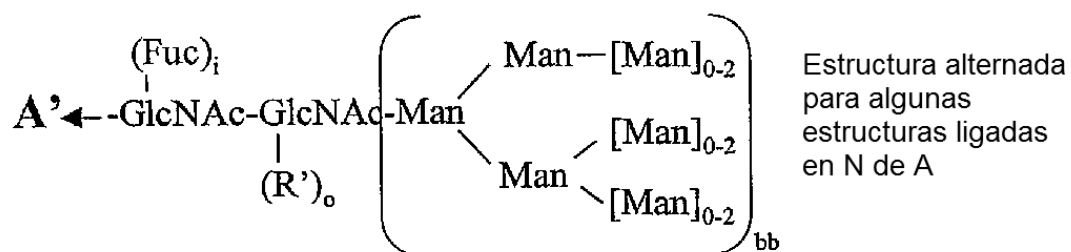
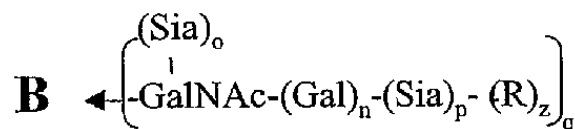
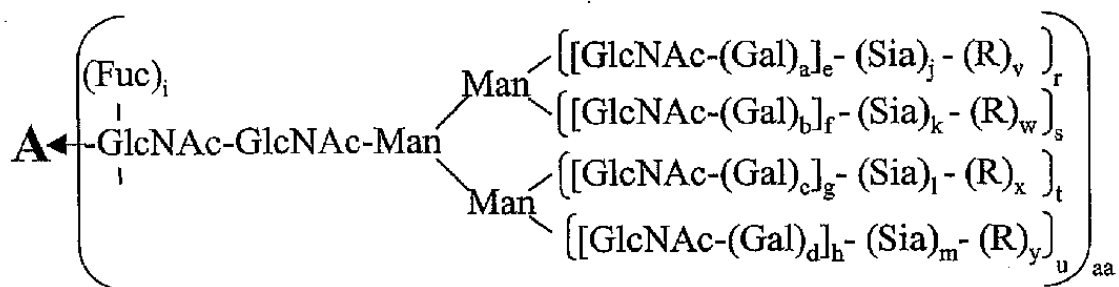
Factor IX expresado en células CHO, BHK, 293, Vero
a-d, n, q, bb, cc, dd, ff = 1;
e-h, aa = 1 a 4;
ee, j-m, i, o, p, r-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
v-z, gg = 0.

- ↓ 1. CMP-SA-PEG, α2,8-ST

a-d, q = 1; e-h = 1 to 4;
aa, bb, cc, dd, ee, ff, i, n, r-u (seleccionado
independientemente) = 0 o 1;
o, p, z = 0; R = PEG;
j-m, ee (seleccionado independientemente) = 0 a 2;
v-y, gg (seleccionado independientemente) = 0 o 1; cuando j-m
(seleccionado independientemente) es 2.

FIG. 31G

2 péptidos
sitios ligados en N **A** y **A'**
Sitios ligados en O - **B**



a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
aa, bb (seleccionado independientemente) = 0 o 1.
e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.
j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20.
v-z = 0; R = polímero, glicoconjugado.

FIG. 40A

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293, Vero,
MDCK, HEKC

e-h = 1 a 4;

aa, bb, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

v-z = 0.

- ↓
1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

e-h = 1 a 4;

aa, bb, a-d, i, n, q-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

o, p, z = 0; j-m, v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

R = PEG.

FIG. 40B

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S, Vero,
MDCK, 293S, HEKC

e-h = 1 a 4;

aa, bb, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

v-z = 0.

- ↓
1. Sialidasa
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal3
3. ST3Gal1, CMP-SA

e-h = 1 a 4;

aa, bb, a-d, i, n, p-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

o, z = 0; j-m, v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

R = PEG.

FIG. 40C

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293s,
Vero, MDCK, HEKC
e-h = 1 a 4;
aa, bb, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
v-z = 0.



1. CMP-SA-PEG, ST3Gal3

e-h = 1 to 4;
aa, bb, a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
z = 0; j-m, v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 40D

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S,
Vero, MDCK, HEKC
e-h = 1 a 4;
aa, bb, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
v-z = 0.



1. CMP-SA-PEG, ST3Gal1

e-h = 1 to 4;
aa, bb, a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
z = 0; j-m, v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
R = PEG.

FIG. 40E

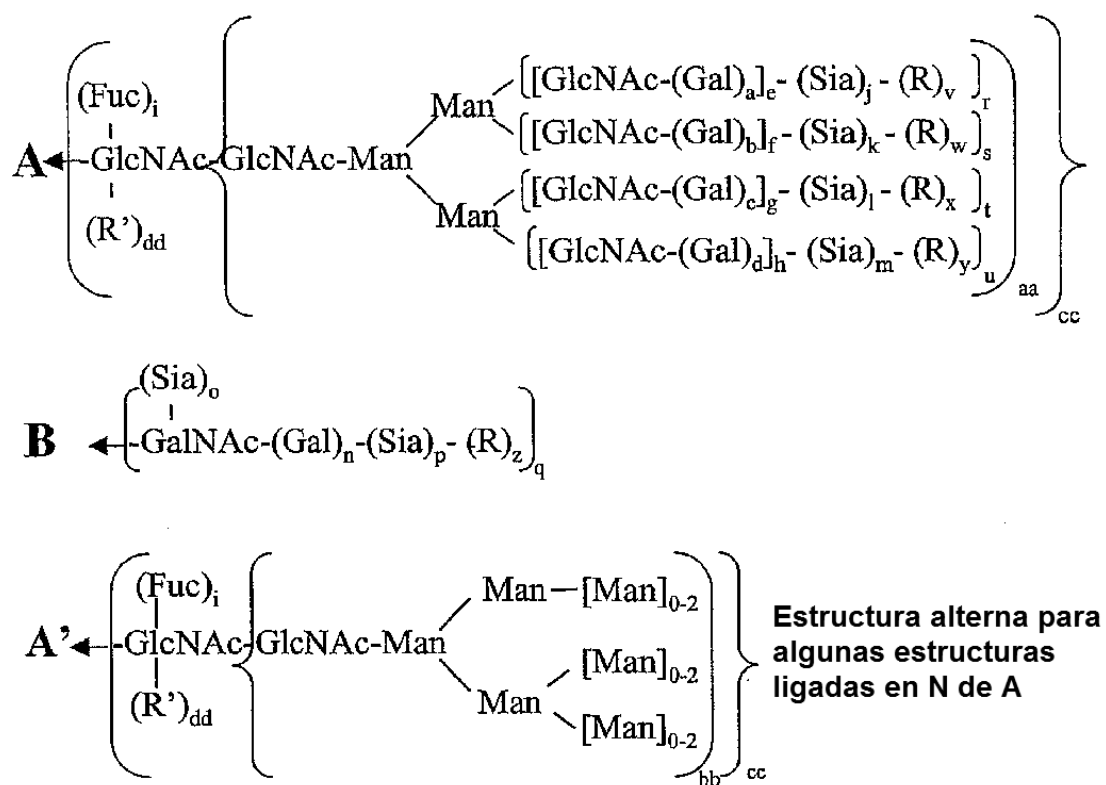
Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S,
Vero, MDCK, HEKC
e-h = 1 a 4;
aa, bb, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
v-z = 0.

↓ 1. CMP-SA-PEG, α 2,8-ST

e-h = 1 a 4;
aa, bb, a-d, i, n-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
z = 0; j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 2;
v-y (seleccionado independientemente) = 1;
cuando j-m (seleccionado independientemente) es 2;
R = PEG.

FIG. 40F

2 péptidos

Sitios ligados en N **A** o **A'**Sitios ligados en O **B**

a-d, i, n-u, (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

aa, bb, cc, dd (seleccionado independientemente) = 0 o 1.

e-h (seleccionado independientemente) = 0 a 6.

j-m (seleccionado independientemente) = 0 a 20.

v-z = 0;

R = grupo modificador, manosa, oligo-manosa.

R' = H, residuo de glicosilo, grupo modificador glicoconjugado.

FIG. 40G

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S, Vero, MDCK, HEKC

e-h = 1 a 4;

aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

dd, v-z = 0.

↓ 1. CMP-SA-levulinato, ST3Gal3,
2. H₄N₂-PEG

e-h = 1 a 4;

aa, bb, cc, a-d, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

dd, z = 0; j-m, v-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

R = PEG.

FIG. 40H

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S, Vero, MDCK, HEKC

e-h = 1 a 4;

aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

dd, v-z = 0.

↓ 1. endo-H
2. galactosiltransferasa, UDP-Gal-PEG

e-h = 1 a 4;

aa, bb, dd, a-d, i, j-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;

cc, v-z = 0; R' = -Gal-PEG.

FIG. 40I

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S, Vero, MDCK, HEKC
 e-h = 1 a 4;
 aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 dd, v-z = 0.

- ↓ 1. ST3Gal3, CMP-SA
 2. endo-H
 3. galactosiltransferasa, UDP-Gal-PEG

e-h = 1 a 4;
 aa, bb, dd, a-d, i, j-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 cc, v-z = 0; R' = -Gal-PEG.

FIG. 40J

Factor VIII expresado en células CHO, BHK, 293S, Vero, MDCK, HEKC
 e-h = 1 a 4;
 aa, bb, cc, a-d, j-m, i, n-u (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 dd, v-z = 0.

- ↓ 1. manosidasas
 2. GNT 1 & 2, UDP-GlcNAc
 3. galactosiltransferasa, UDP-Gal-PEG

e-h = 1 a 4;
 aa, a-d, i, j-y (seleccionado independientemente) = 0 o 1;
 bb, cc, dd, z = 0; R = PEG.

FIG. 40K

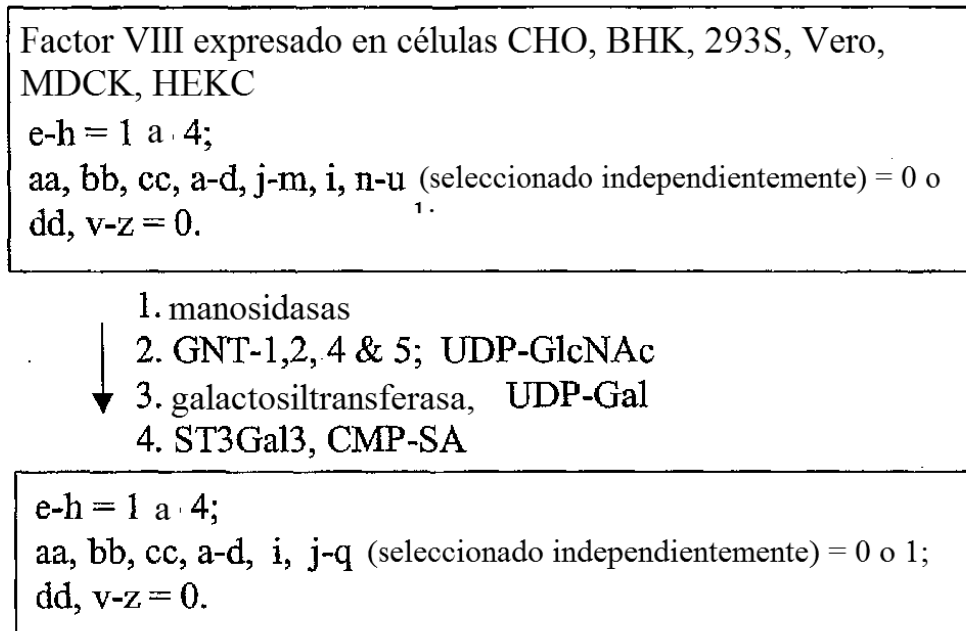


FIG. 40L

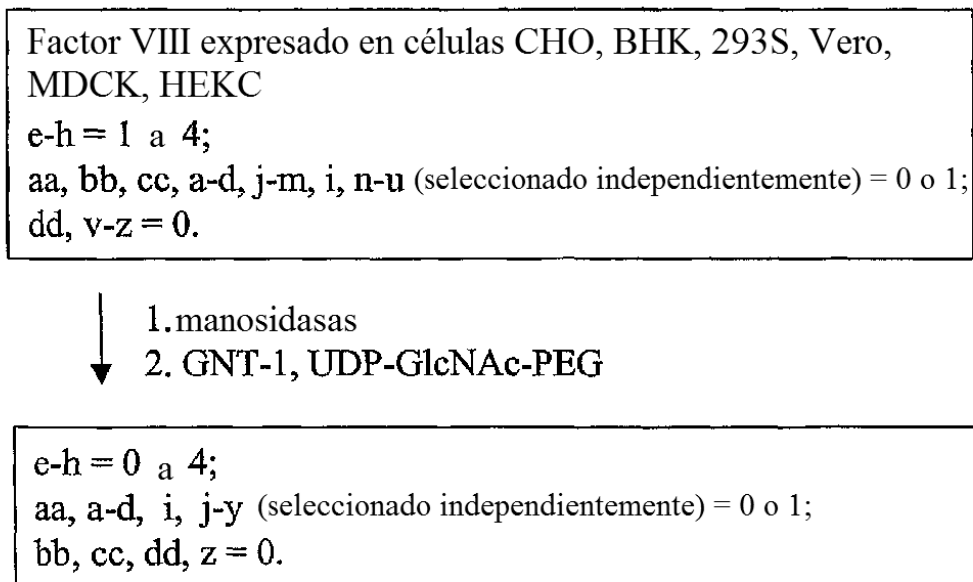


FIG. 40M

FIG. 55A

ATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCAG
 GGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGT
 CCTGCACCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGC
 CGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGA
 GGAGGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTC
 TGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCCTCAAGTCCATGCCA
 GAATGGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATCTGCTTCT
 GCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAACGTGTGAGACGCACAAGGATGAC
 CAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAG
 TGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACT
 CTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTGTCACACCCACAGTTGAATATCCA
 TGTGGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCA
 AGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGGAGTGTCCA
 TGGCAGGTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGGGGGGAC
 CCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCCACTGTTTCGACAA
 AATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGAC
 CTCAGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGG
 TCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACCAACCAACGACATC
 GCGCTGCTCCGCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGACCATGTGGTG
 CCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTC
 GTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGG
 CGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTGCTCAACGTGCCCCGGCTGATGA
 CCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAAT
 ATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGA
 CTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGG
 GCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCA
 ACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCCAGTACATCGA
 GTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCCAGGAGTCCTCC
 TCGAGCCCCATTTCCC

FIG. 55B

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln Gly Cys
 Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg
 Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys
 Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg
 Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys
 Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
 Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val
 Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg
 Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro
 Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys
 Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln
 Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
 Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile
 Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg
 Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp
 Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu
 Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser
 Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu
 Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg
 Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp
 Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg
 Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly
 His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met
 Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro

FIG. 56A

ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAAGCCTCATCAC
 CATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTT
 GATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAA
 TTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAAT
 GTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAACCACGAGAAGTTTTTGAA
 AACACTGAAAAGACAACCTGAATTTTGGAAGCAGTATGTTGATGGAGA
 TCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATG
 ACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGA
 ACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAG
 CAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACT
 GAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGT
 GCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCAC
 CCGTGCTGAGGCTGTTTTTCCTGATGTGGACTATGTAAATCCTACTGA
 AGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAGGCACCCAATCATTTA
 ATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAA
 TTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGA
 GGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTGTGCTGCCCACTGTGTT
 GAAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTTCGCAGGTGAACATAATATTGA
 GGAGACAGAACATAACAGAGCAAAAAGCGAAATGTGATTTCGAGCAATT
 ATTCCTCACCACAACCTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGA
 CATTGCCCTTCTGGAACTGGACGAACCTTAGTGCTAAACAGCTACG
 TTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCA
 AATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGCAAGAGTCTTCCACAAA
 GGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGAC
 CGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTACCATCTATAACAACAT
 GTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAG
 ATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTA
 ACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATA
 TGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAA
 AAACAAAGCTCACTTAATGAAAGATGGATTTC AAGGTTAATTCATT
 GGAATTGAAAATTAACAG

FIG. 56B

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Ser Leu Ile Thr Ile Cys Leu
 Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala
 Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe
 Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu
 Pro Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr
 Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys
 Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn
 Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys
 Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu
 Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser
 Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr
 Val Asn Pro Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Gly Thr Gln Ser
 Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val
 Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr
 Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn
 Val Ile Arg Ala Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn
 His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr
 Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly
 Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln
 Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe
 Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu
 Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr
 Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr

FIG. 65A-1

ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCT
 GCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAAGTGTCA
 TGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCTGTGGACGCAAG
 ATTTCTCCTAGAGTGCCAAAATCTTTTCCATTCAACACCTCAGTCGT
 GTACAAAAAGACTCTGTTTGTAGAATTACGGATCACCTTTTCAACAT
 CGCTAAGCCAAGGCCACCCTGGATGGGTCTGCTAGGTCCTACCATCC
 AGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATGGCT
 TCCCATCCTGTCAGTCTTCATGCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCT
 TCTGAGGGAGCTGAATATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAG
 AAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAGCCATACATATGTCTGGCAG
 GTCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTAC
 CTAATCATATCTTTCTCATGTGGACCTGGTAAAAGACTTGAATTCAGG
 CCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGTAGAGAAGGGAGTCTGGCCAAGG
 AAAAGACACAGACCTTGCACAAATTTATACTACTTTTTGCTGTATTTG
 ATGAAGGGAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCA
 GGATAGGGATGCTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAATGCACACAG
 TCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAGGTCTGATTGGATGCCACA
 GGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCACTCCTGAA
 GTGCACTCAATATTCCTCGAAGGTCACACATTTCTTGAGGAACCAT
 CGCCAGGCGTCCTTGGAATCTCGCCAATAACTTTCCTTACTGCTCAA
 ACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGTCATATCTCTT
 CCCACCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGT
 CCAGAGGAACCCCAACTACGAATGAAAAATAATGAAGAAGCGGAAG
 ACTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATGGATGTGGTCAGGTTTG
 ATGATGACAACTCTCCTTCCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGA
 AGCATCCTAAAACCTTGGGTACATTACATTGCTGCTGAAGAGGAGGAC
 TGGGACTATGCTCCCTTAGTCCTCGCCCCGATGACAGAAGTTATAAA
 AGTCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGGAAGTACAA
 AAAAGTCCGATTTATGGCATAACAGATGAAACCTTTAAGACTCGTG
 AAGCTATTCAGCATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGG
 AAGTTGGAGACACACTGTTGATTATATTTAAGAATCAAGCAAGCAGA
 CCATATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGTAT
 TCAAGGAGATTACCAAAAGGTGTAAAACATTTGAAGGATTTTCCAAT
 TCTGCCAGGAGAAATATTCAAATATAAATGGACAGTGACTGTAGAAG
 ATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGCTATTACTCTA
 GTTTCGTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTGGCCCTC
 TCCTCATCTGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAGAGGAAACCAGATA
 ATGTCAGACAAGAGGAATGTCATCCTGTTTTCTGTATTTGATGAGAAC
 CGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAACGCTTCTCCCAATCCA
 GCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCAT
 GCACAGCATCAATGGCTATGTTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGTTTG
 TTTGCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGA
 CTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGATATACCTTCAAACACAAAAT

FIG. 65A-2

GGTCTATGAAGACACACTCACCTATTCCCATTCTCAGGAGAAACTGT
CTTCATGTCGATGGAAAACCCAGGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACA
ACTCAGACTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAGGTTTCT
AGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTATTACGAGGACAGTTATGAAGA
TATTTTCAGCATACTTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAA
GCTTCTCCCAGAATTCAAGACACCGTAGCACTAGGC AAAAGCAATTT
AATGCCACCACAATTCCAGAAAATGACATAGAGAAGACTGACCCTTG
GTTTGCACACAGAACACCTATGCCTAAAATACAAAATGTCTCCTCTA
GTGATTTGTTGATGCTCTTGCGACAGAGTCCTACTCCACATGGGCTAT
CCTTATCTGATCTCCAAGAAGCCAAATATGAGACTTTTTCTGATGATC
CATCACCTGGAGCAATAGACAGTAATAACAGCCTGTCTGAAATGACA
CACTTCAGGCCACAGCTCCATCACAGTGGGGACATGGTATTTACCCC
TGAGTCAGGCCTCCAATTAAGATTAAATGAGAACTGGGGACA ACTG
CAGCAACAGAGTTGAAGAACTTGATTTCAAAGTTTCTAGTACATCA
AATAATCTGATTTCAACAATTCCATCAGACAATTTGGCAGCAGGTACT
GATAATACAAGTTCCTTAGGACCCCCAAGTATGCCAGTTCATTATGAT
AGTCAATTAGATACCACTCTATTTGGCAAAAAGTCATCTCCCTTACT
GAGTCTGGTGGACCTCTGAGCTTGAGTGAAGAAAATAATGATTCAA
GTTGTTAGAATCAGGTTTAATGAATAGCCAAGAAAGTTCATGGGGAA
AAAATGTATCGTCAACAGAGAGTGGTAGGTTATTTAAAGGGGAAAAGA
GCTCATGGACCTGCTTTGTTGACTAAAGATAATGCCTTATTCAAAGTT
AGCATCTCTTTGTTAAAGACAAACAAA ACTTCCAATAATTCAGCAACT
AATAGAAAGACTCACATTGATGGCCCATCATTATTAATTGAGAATAG
TCCATCAGTCTGGCAAAAATATATTAGAAAGTGACACTGAGTTTAAAA
AAGTGACACCTTTGATTCATGACAGAATGCTTATGGACAAAAATGCT
ACAGCTTTGAGGCTAAATCATATGTCAAATAAAACTACTTCATCAAA
AAACATGGAAATGGTCCAACAGAAAAAAGAGGGCCCCATTCCACCA
GATGCACAAAATCCAGATATGTCGTTCTTTAAGATGCTATTCTTGCCA
GAATCAGCAAGGTGGATACAAAGGACTCATGGAAAGA ACTCTCTGAA
CTCTGGGCAAGGCCCCAGTCCAAAGCAATTAGTATCCTTAGGACCAG
AAAAATCTGTGGAAGGTCAGAATTTCTTGTCTGAGAAAAACAAAGTG
GTAGTAGGAAAGGGTGAATTTACAAAGGACGTAGGACTCAAAGAGA
TGGTTTTTCCAAGCAGCAGAAACCTATTTCTTACTAACTTGGATAATT
TACATGAAAATAATACACACAATCAAGAAAAAATAATTCAGGAAGA
AATAGAAAAGAAGGAAACATTAATCCAAGAGAATGTAGTTTTGCCTC
AGATACATACAGTGACTGGCACTAAGAATTTTCATGAAGAACCTTTTC
TACTGAGCACTAGGCAAAATGTAGAAGGTTTCATATGACGGGGCATA
TGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATTAAATGATTCAACAAATAG
AACAAAGAAACACACAGCTCATTTCTCAAAAAAAGGGGAGGAAGAA
AACTTGGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAGCAAATTGTAGAGAAATAT
GCATGCACCACAAGGAATATCTCCTAATACAAGCCAGCAGAATTTTG
TCACGCAACGTAGTAAGAGAGCTTTGAAACAATTCAGACTCCCACTA

FIG. 65A-3

GAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAATTGTGGATGACACCTCAAC
 CCAGTGGTCCAAAAACATGAAACATTTGACCCCGAGCACCTCACAC
 AGATAGACTACAATGAGAAGGAGAAAGGGGCCATTACTCAGTCTCCC
 TTATCAGATTGCCTTACGAGGAGTCATAGCATCCCTCAAGCAAATAGA
 TCTCCATTACCCATTGCAAAGGTATCATCATTTCCATCTATTAGACCTA
 TATATCTGACCAGGGTCCTATTCCAAGACAACCTCTTCTCATCTTCCAG
 CAGCATCTTATAGAAAGAAAGATTCTGGGGTCCAAGAAAGCAGTCAT
 TTCTTACAAGGAGCCAAAAAAATAACCTTTCTTTAGCCATTCTAACC
 TTGGAGATGACTGGTGATCAAAGAGAGGTTGGCTCCCTGGGGACAAG
 TGCCACAAATTCAGTCACATACAAGAAAGTTGAGAACACTGTTCTCCC
 GAAACCAGACTTGCCCAAAACATCTGGCAAAGTTGAATTGCTTCCAA
 AAGTTCACATTTATCAGAAGGACCTATTCCTACGGAACTAGCAATG
 GGTCTCCTGGCCATCTGGATCTCGTGGAAGGGAGCCTTCTTCAGGGAA
 CAGAGGGAGCGATTAAAGTGGAATGAAGCAAACAGACCTGGAAAAGT
 TCCCTTTCTGAGAGTAGCAACAGAAAGCTCTGCAAAGACTCCCTCCAA
 GCTATTGGATCCTCTTGCTTGGGATAACCACTATGGTACTCAGATACC
 AAAAGAAGAGTGGAATCCCAAGAGAAGTCACCAGAAAAAACAGCT
 TTTAAGAAAAAGGATACCATTTTGTCCCTGAACGCTTGTGAAAGCAAT
 CATGCAATAGCAGCAATAAATGAGGGACAAAATAAGCCCGAAATAG
 AAGTCACCTGGGCAAAGCAAGGTAGGACTGAAAGGCTGTGCTCTCAA
 AACCCACCAGTCTTGAAACGCCATCAACGGGAAATAACTCGTACTAC
 TCTTCAGTCAGATCAAGAGGAAATTGACTATGATGATACCATATCAGT
 TGAAATGAAGAAGGAAGATTTTGACATTTATGATGAGGATGAAAATC
 AGAGCCCCCGCAGCTTTCAAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTG
 CAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATGAGTAGCTCCCCACATGTT
 CTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGT
 TGTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGT
 GGAGAACTAAATGAACATTTGGGACTCCTGGGGCCATATATAAGAGC
 AGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACCTTTCAGAAATCAGGCCTCTC
 GTCCCTATTCCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATGAGGAAGATCAGAG
 GCAAGGAGCAGAACCTAGAAAAAACTTTGTCAAGCCTAATGAAACCA
 AAACCTTACTTTTGGAAAGTGCAACATCATATGGCACCCACTAAAGAT
 GAGTTTGACTGCAAAGCCTGGGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTGGAA
 AAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTGGACCCCTTCTGGTCTGCCACACT
 AACACACTGAACCCTGCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATT
 TGCTCTGTTTTTACCATCTTTGATGAGACCAAAAGCTGGTACTTCACT
 GAAAATATGGAAAGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGA
 AGATCCCCTTTTAAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTA
 CATAATGGATACACTACCTGGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGA
 TTCGATGGTATCTGCTCAGCATGGGCAGCAATGAAAACATCCATTCT
 ATTCATTTCAGTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAAAAAGAGGAGTA
 TAAAATGGCACTGTACAATCTCTATCCAGGTGTTTTTGAGACAGTGGA

FIG. 65A-4

AATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGCGGGTGGAATGCCTTATTGG
 CGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTTCTGGTGTACAGCAA
 TAAGTGTGAGACTCCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTT
 TCAGATTACAGCTTCAGGACAATATGGACAGTGGGCCCCAAAGCTGG
 CCAGACTTCATTATTCCGGATCAATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAG
 CCTTTTTCTTGGATCAAGGTGGATCTGTTGGCACCAATGATTATTCAC
 GGCATCAAGACCCAGGGTGCCCGTCAGAAGTCTCCAGCCTCTACAT
 CTCTCAGTTTATCATCATGTATAGTCTTGATGGGAAGAAGTGGCAGA
 CTTATCGAGGAAATTCCTACTGGAACCTTAATGGTCTTCTTTGGCAATG
 TGGATTCACTCTGGGATAAAACACAATATTTTTTAACCCTCCAATTATTG
 CTCGATACATCCGTTTGCACCCAACCTCATTATAGCATTTCGCAGCACTC
 TTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATTAAATAGTTGCAGCATGCCAT
 TGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTTCA
 TCCTACTTTACCAATATGTTTGCCACCTGGTCTCCTTCAAAAGCTCGA
 CTTACCTCCAAGGGAGGAGTAATGCCTGGAGACCTCAGGTGAATAA
 TCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCA
 CAGGAGTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTAT
 GTGAAGGAGTTCCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGAC
 TCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAGGTTTTTCAGGGAAATCAAGA
 CTCCTTCACACCTGTGGTGAACCTCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCG
 CTACCTTCGAATTCACCCCCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAG
 GATGGAGGTTCTGGGCTGCGAGGCACAGGACCTCTACTGAGGGTGGC
 CACTGCAGCACCTGCCACTGCCGTCACCTCTCCCTCCTCAGCTCCAGG
 GCAGTGTCCCTCCCTGGCTTGCCCTTCTACCTTTGTGCTAAATCCTAGC
 AGACACTGCCTTGAAGCCTCCTGAATTAACCTATCATCAGTCCTGCATT
 TCTTTGGTGGGGGGGCCAGGAGGGTGCATCCAATTTAACTTAACTCTTA
 CCTATTTTCTGCAGCTGCTCCCAGATTACTCCTTCCTTCCAATATAACT
 AGGCAAAAAGAAGTGAGGAGAAACCTGCATGAAAGCATTCTTCCCTG
 AAAAGTTAGGCCTCTCAGAGTCACCACTTCCTCTGTTGTAGAAAAACT
 ATGTGATGAAACTTTGAAAAAGATATTTATGATGTTAACATTTTCAGGT
 TAAGCCTCATACGTTTAAAAATAAACTCTCAGTTGTTTATTATCCTGA
 TCAAGCATGGAACAAAGCATGTTTCAGGATCAGATCAATACAATCTT
 GGAGTCAAAAGGCAAATCATTTGGACAATCTGCAAAATGGAGAGAA
 TACAATAACTACTACAGTAAAGTCTGTTTCTGCTTCCTTACACATAGA
 TATAATTATGTTATTTAGTCATTATGAGGGGCACATTCTTATCTCCAA
 AACTAGCATTCTTAAACTGAGAATTATAGATGGGGTTCAAGAATCCC
 TAAGTCCCCTGAAATTATATAAGGCATTCTGTATAAATGCAAATGTGC
 ATTTTTCTGACGAGTGTCCATAGATATAAAGCCATTTGGTCTTAATTCT
 GACCAATAAAAAAATAAGTCAGGAGGATGCAATTGTTGAAAGCTTTG
 AAATAAAATAACAATGTCTTCTTGAAATTTGTGATGGCCAAGAAAGA
 AAATGATGA

FIG. 65B-1

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe Cys Phe Ser
Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr Met Gln Ser
Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe
Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His
Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile
Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro
Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr
Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly
Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro
Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn
Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys
Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser
Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg
Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu
Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro
Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln
Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp
Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu
Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn
Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val
Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys
Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr
Ala Pro Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro
Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg
Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile
Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg
Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser
Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn
Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg
Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln
Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys
His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val
Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe
Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr
Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn
Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Arg Ser Thr Arg Gln
Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp

FIG. 65B-2

Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu
 Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu
 Ala Lys Tyr Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
 Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly Thr Thr
 Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu
 Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu
 Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly
 Lys Lys Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn
 Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp Gly
 Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys Arg Ala His Gly
 Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu
 Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp
 Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser
 Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser
 Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala
 Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg
 Trp Ile Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro
 Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe Leu
 Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly
 Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp
 Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile
 Glu Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr
 Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg Gln
 Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg
 Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys
 Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val
 Glu Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe
 Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu Glu
 Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn
 Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu
 Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile
 Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser Ile
 Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro
 Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu
 Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr
 Gly Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr
 Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr Ser
 Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro
 Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu

FIG. 65B-3

Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys
 Val Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu
 Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu Glu
 Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile
 Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly
 Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg
 Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg
 Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
 Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg
 Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp
 Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val
 Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro
 Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg
 Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro
 Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu
 Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr
 Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu
 Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
 Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
 Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr
 Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro
 Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly
 Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys
 Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr
 Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu
 His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr
 Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln
 Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala
 Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile
 Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
 Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly
 Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
 Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr
 His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn
 Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr
 Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu
 His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
 Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln
 Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser
 Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
 Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu
 Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His

FIG.65B-4

Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu
Ala Gln Asp Leu Tyr

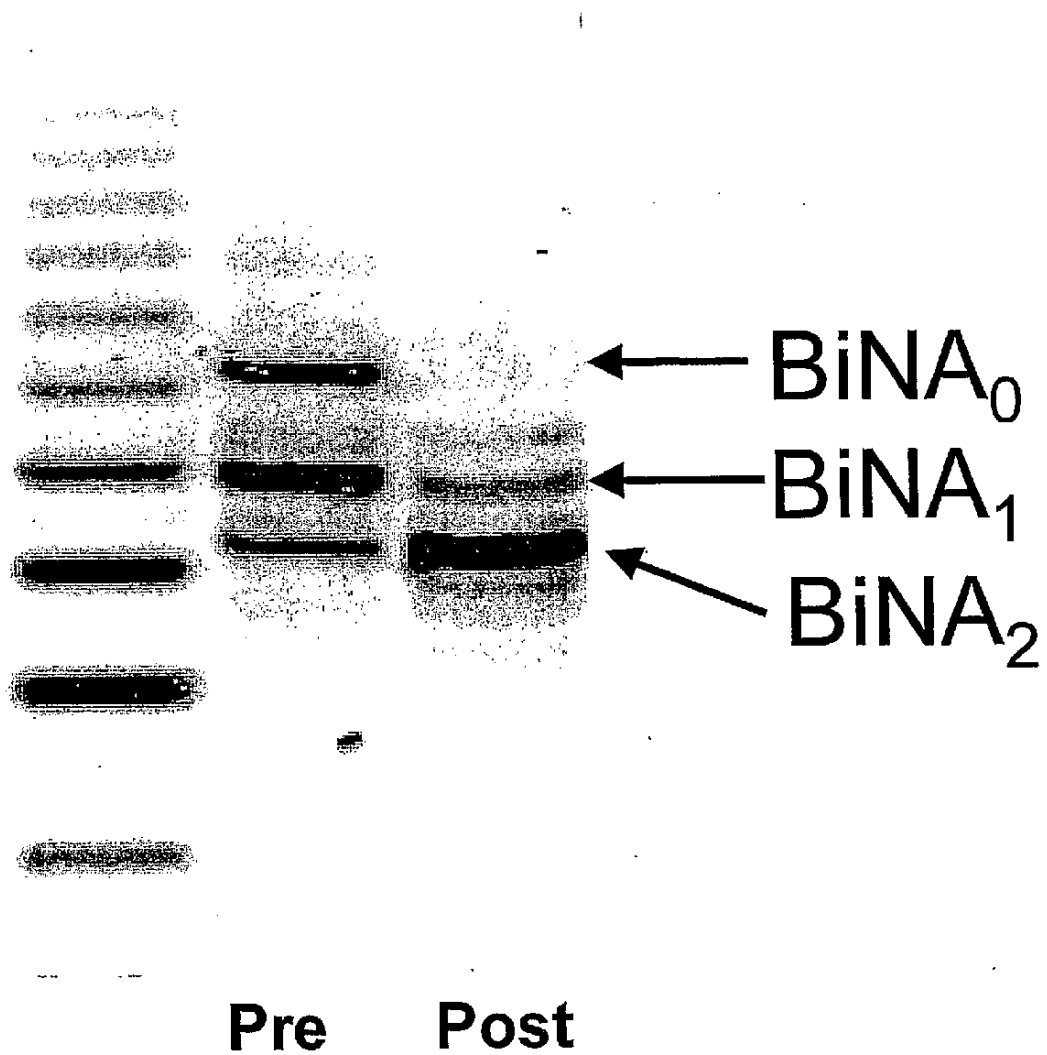


FIG. 86

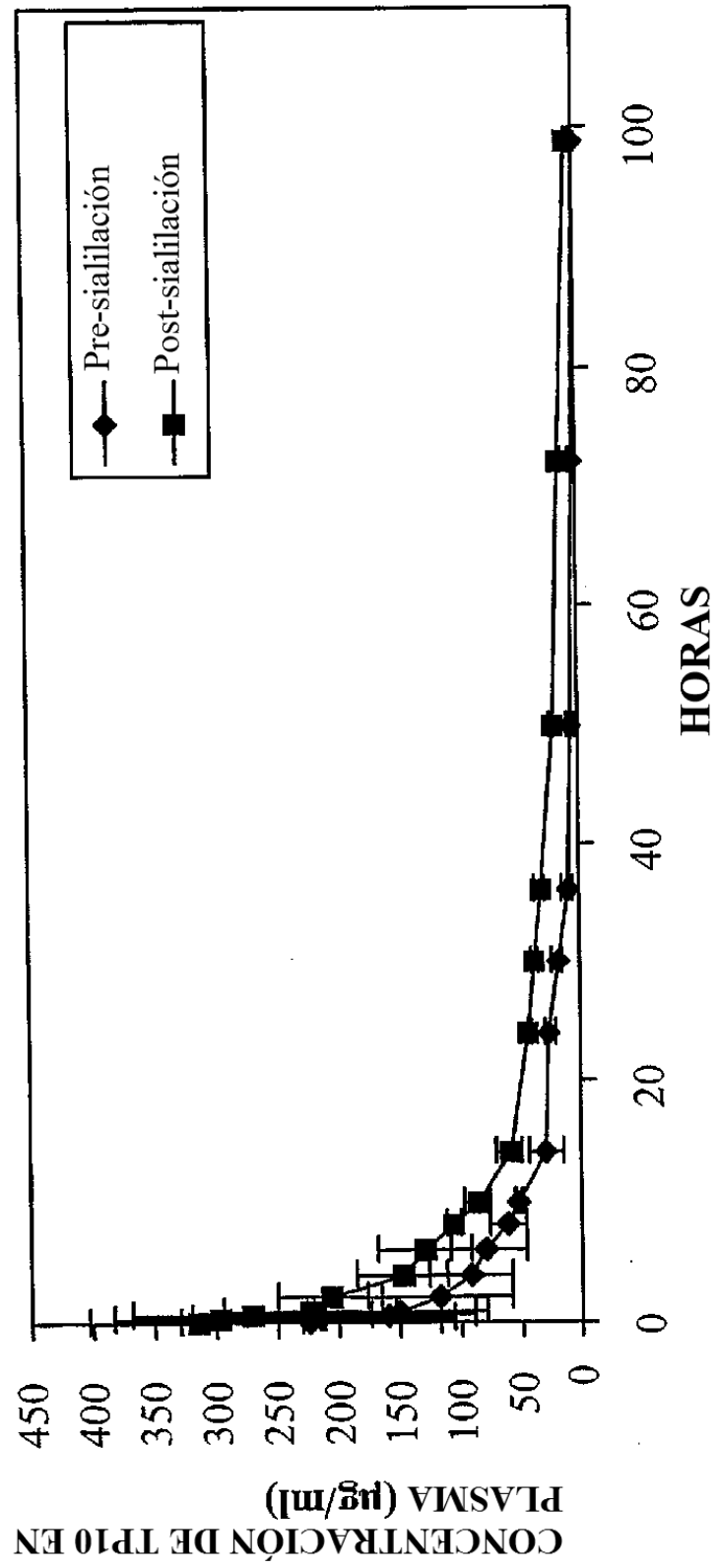


FIG. 87

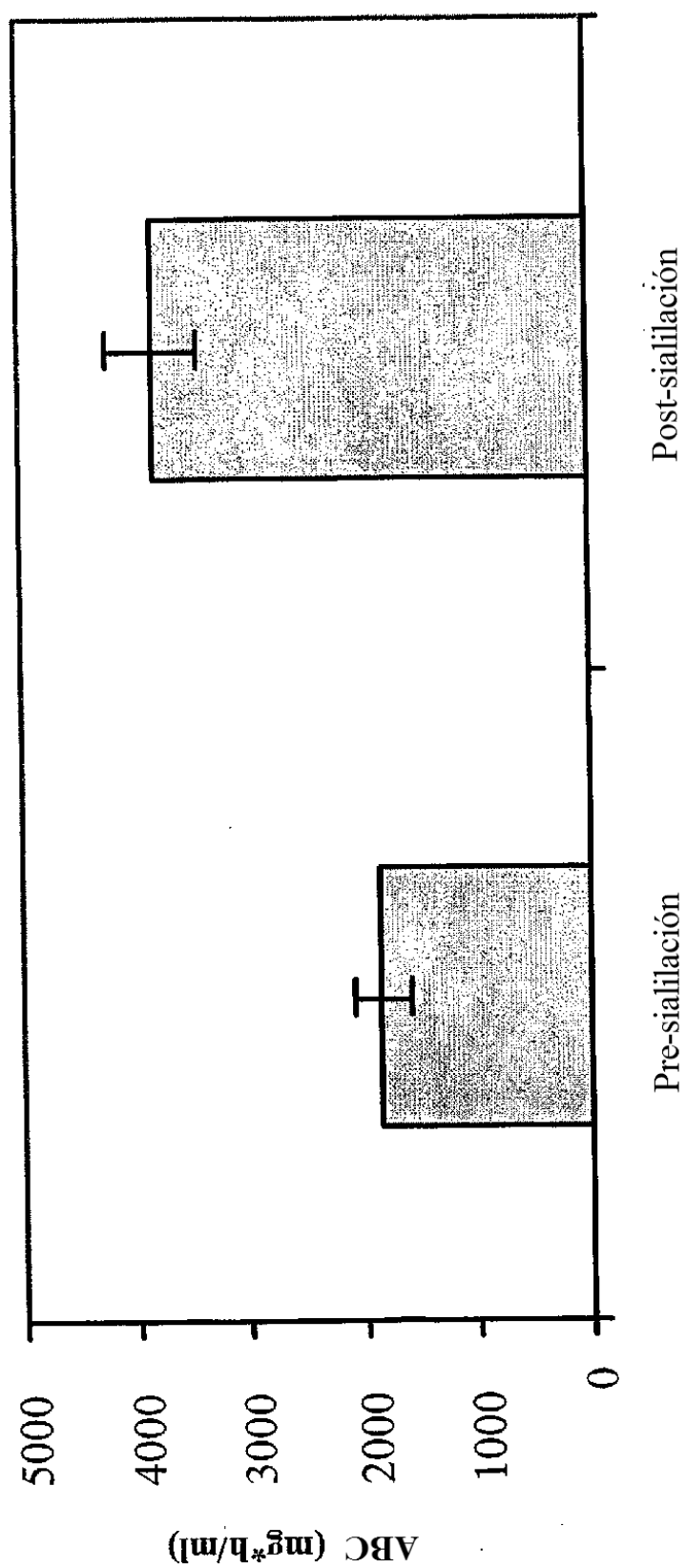
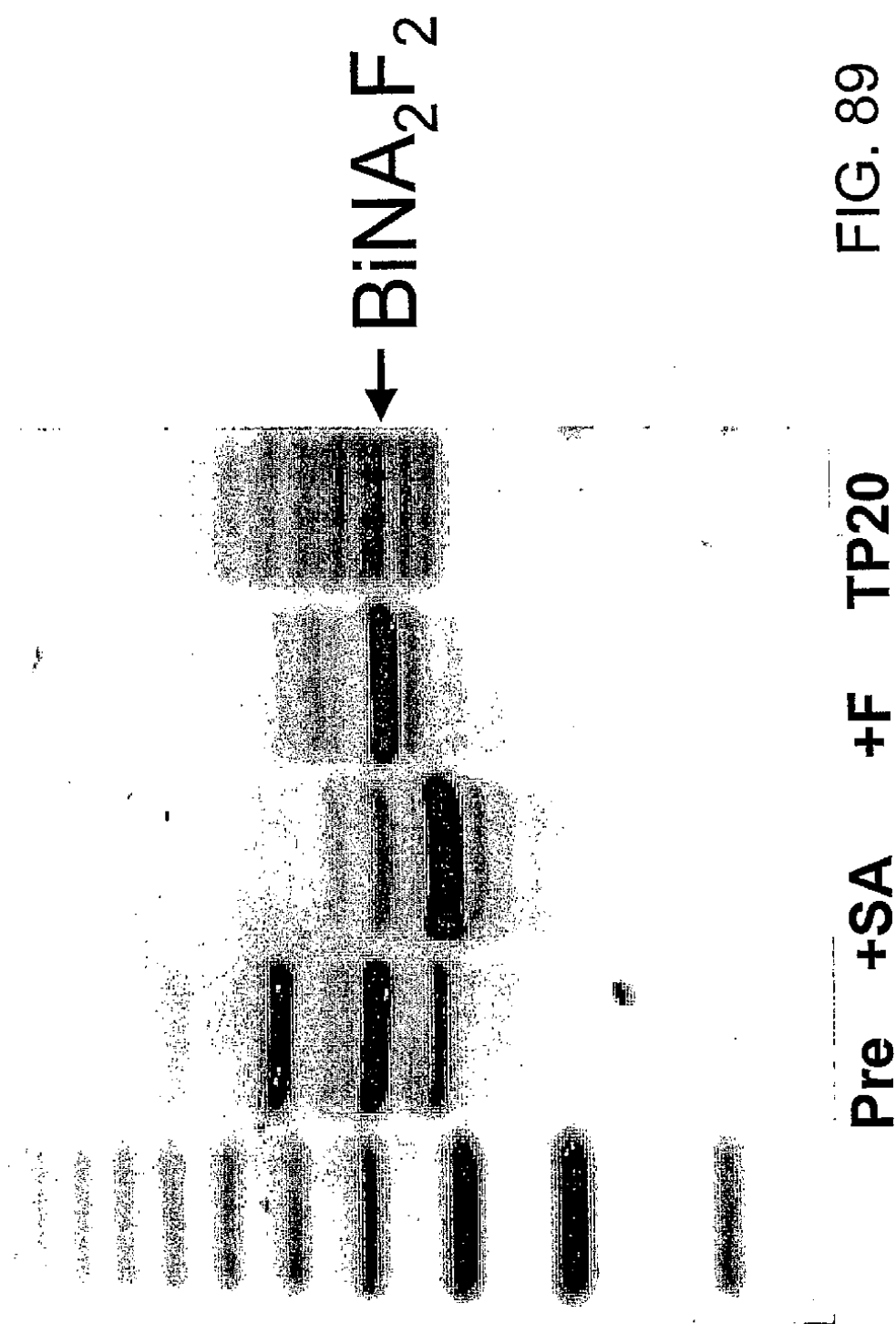


FIG. 88



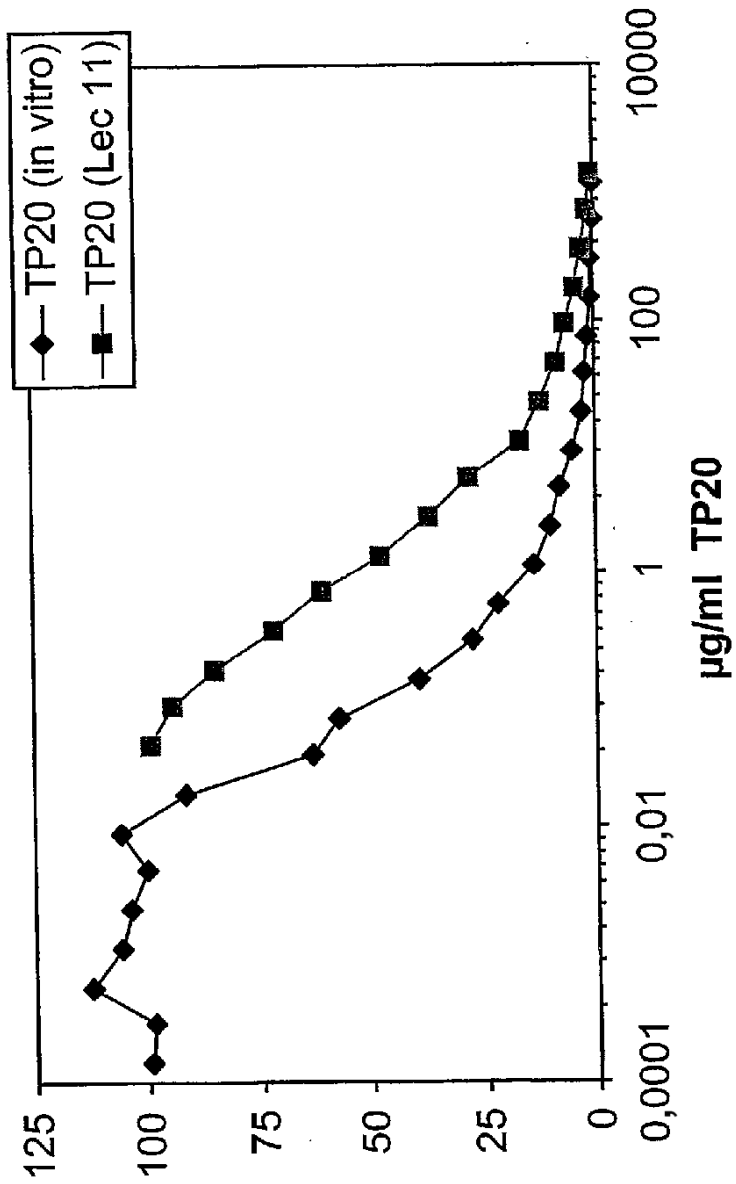


FIG. 90

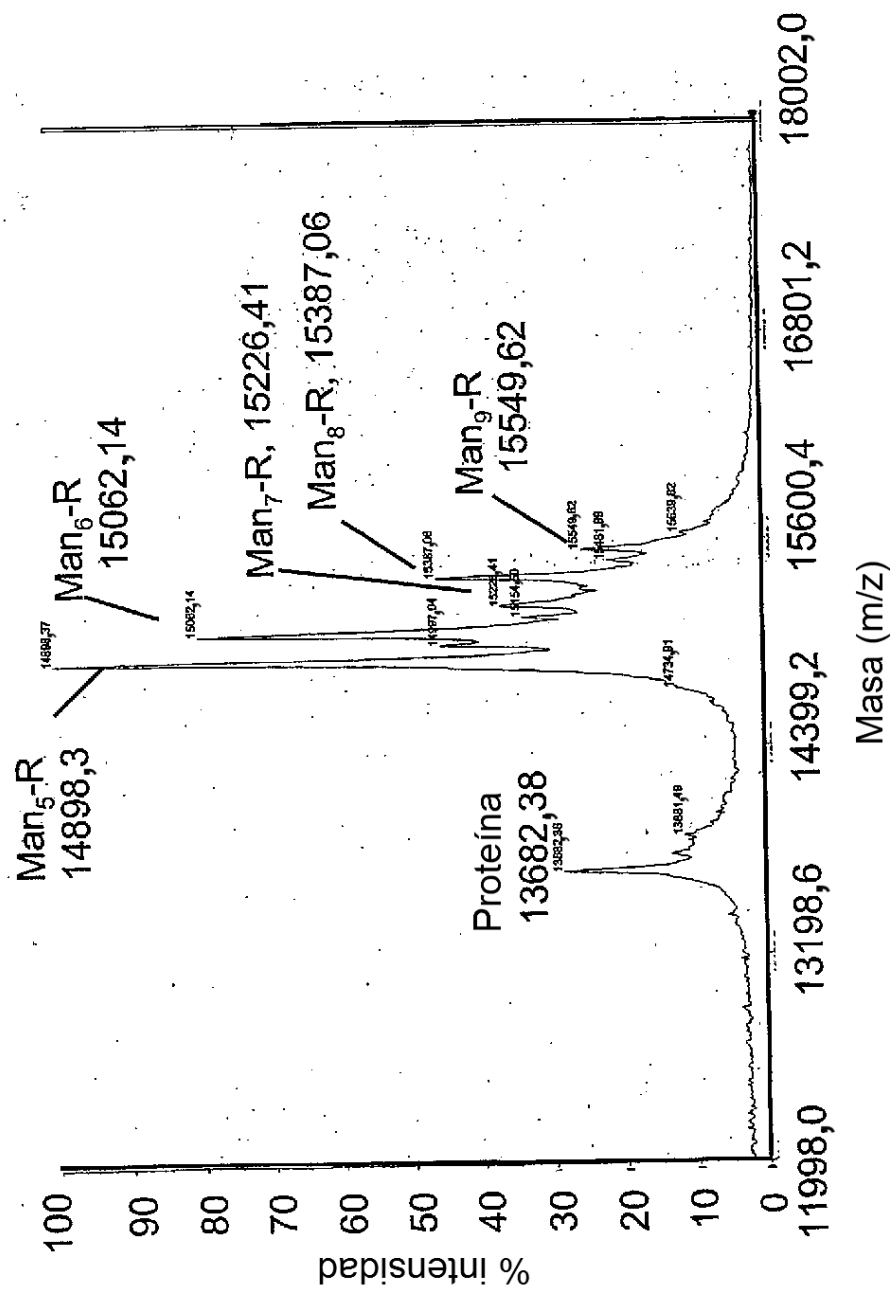


FIG. 92A

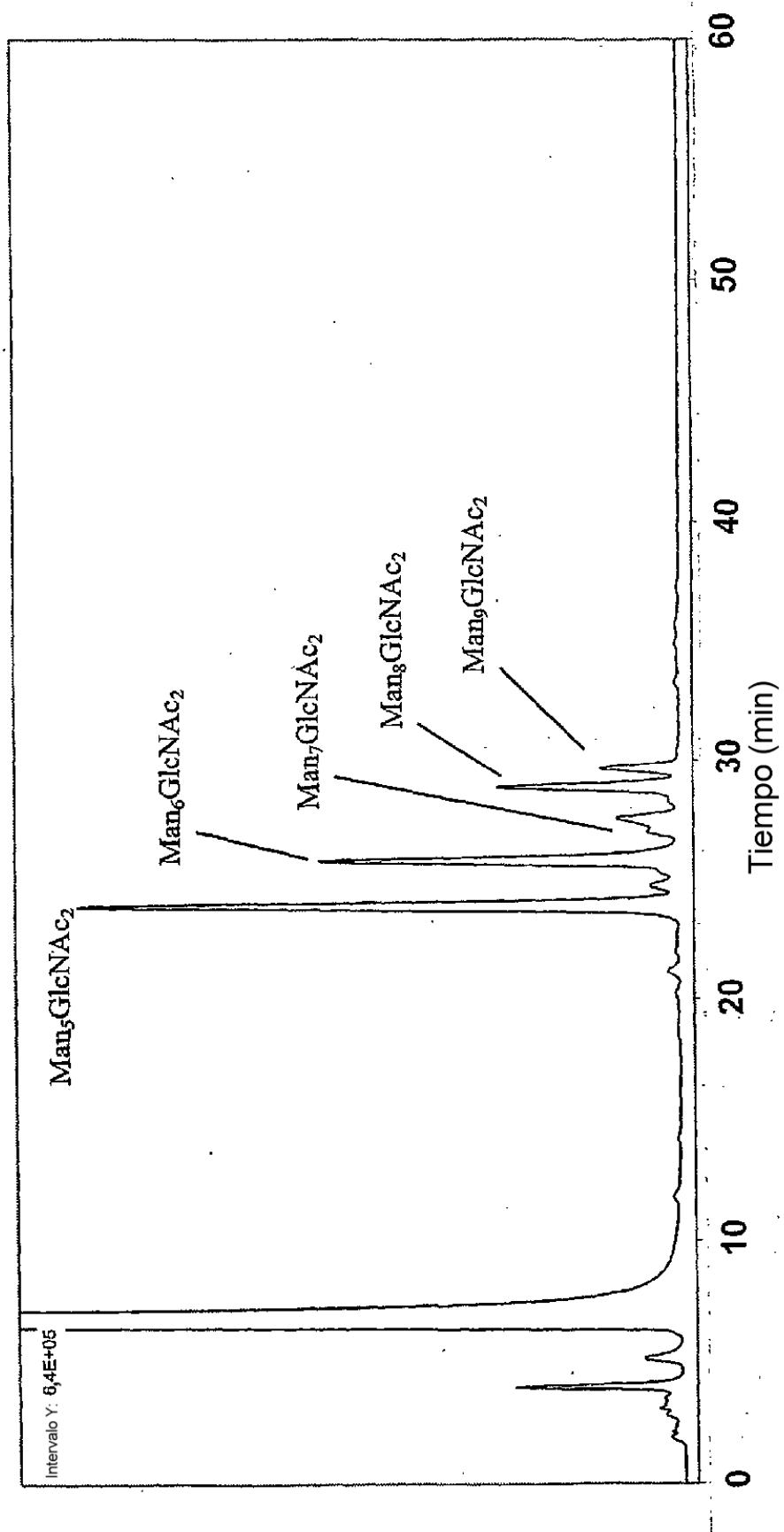


FIG. 92B

N-glicanos híbridos
bisectriz

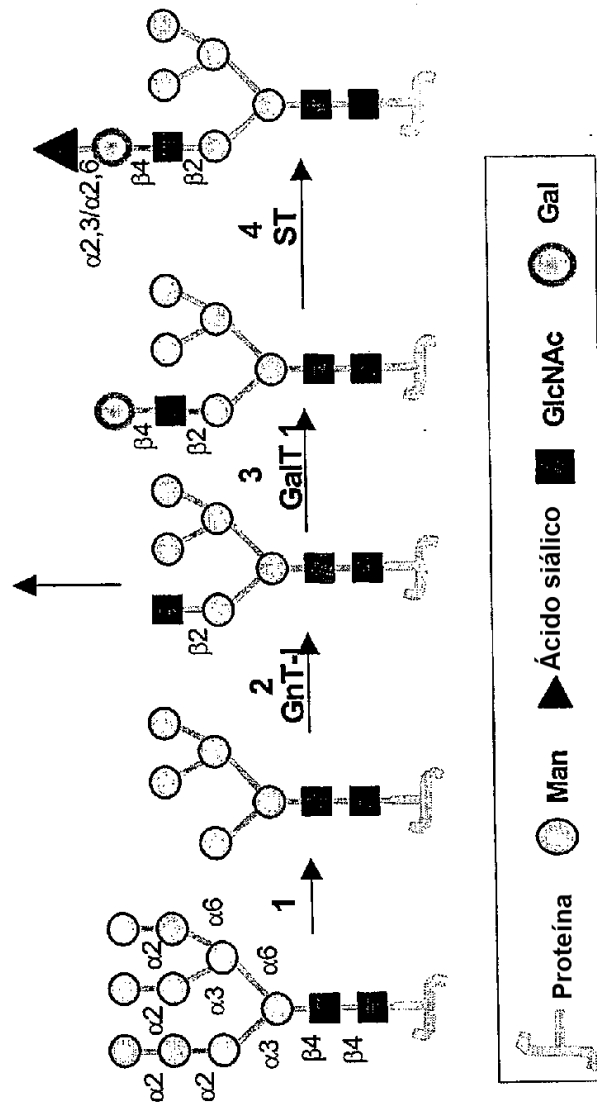


FIG. 93

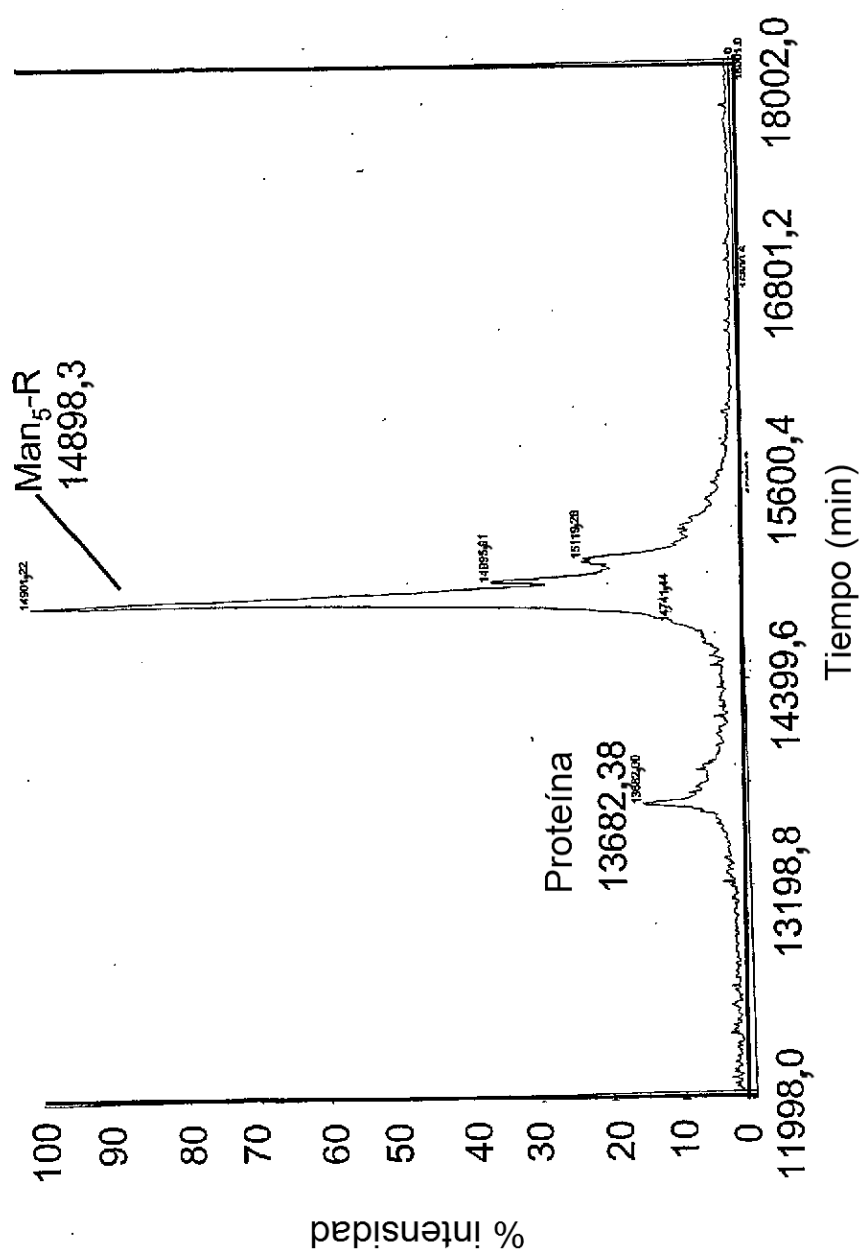


FIG. 94A

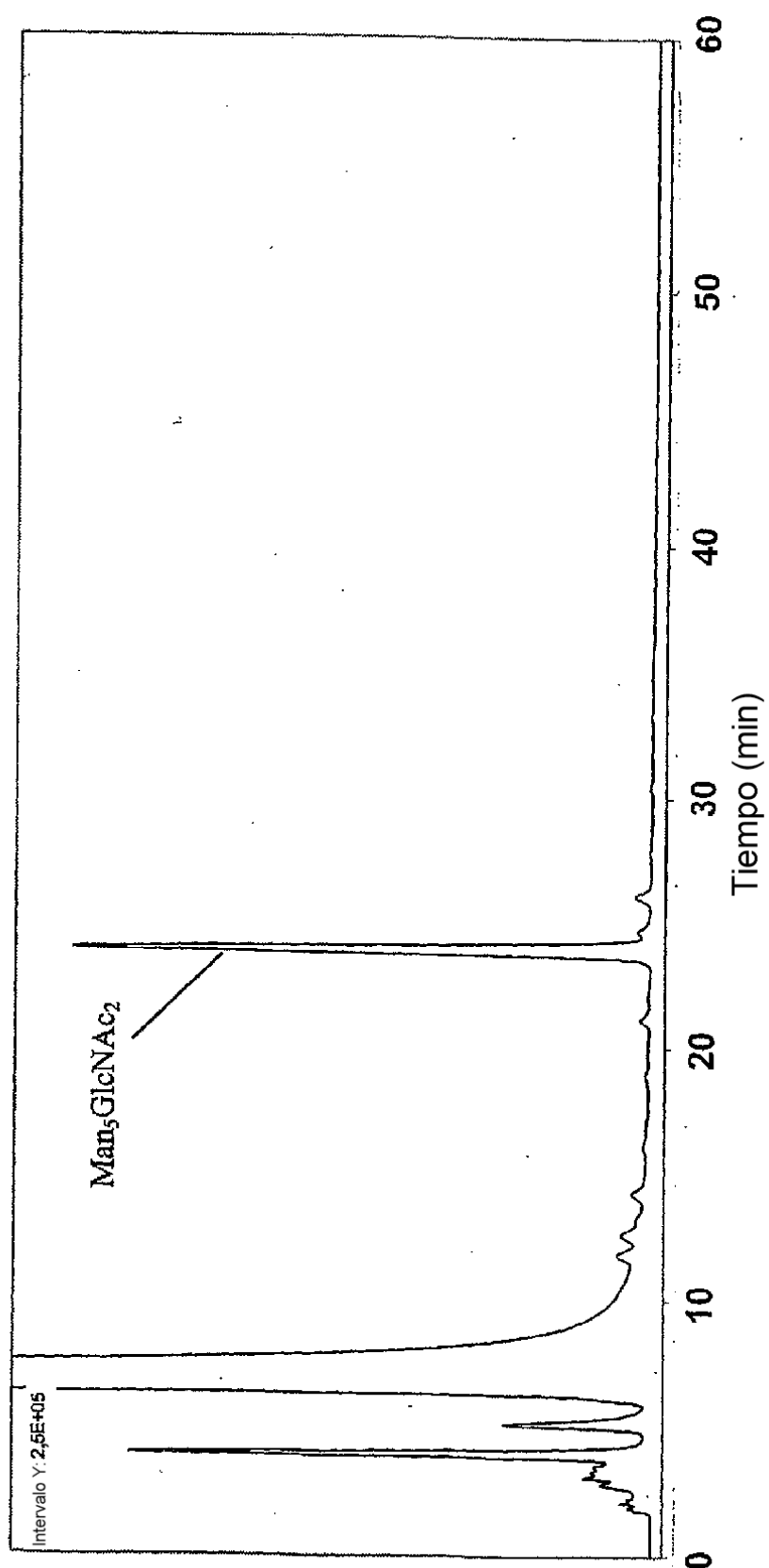


FIG. 94B

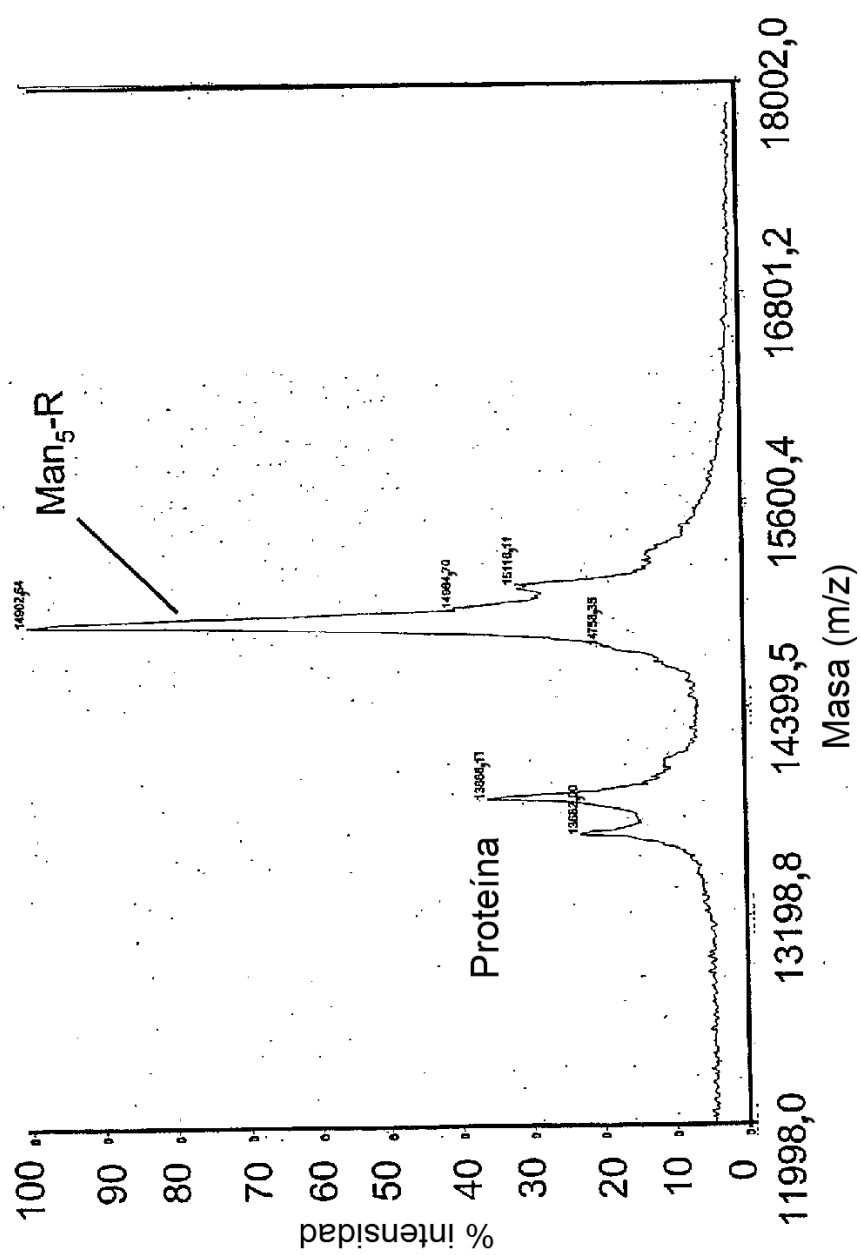


FIG. 95

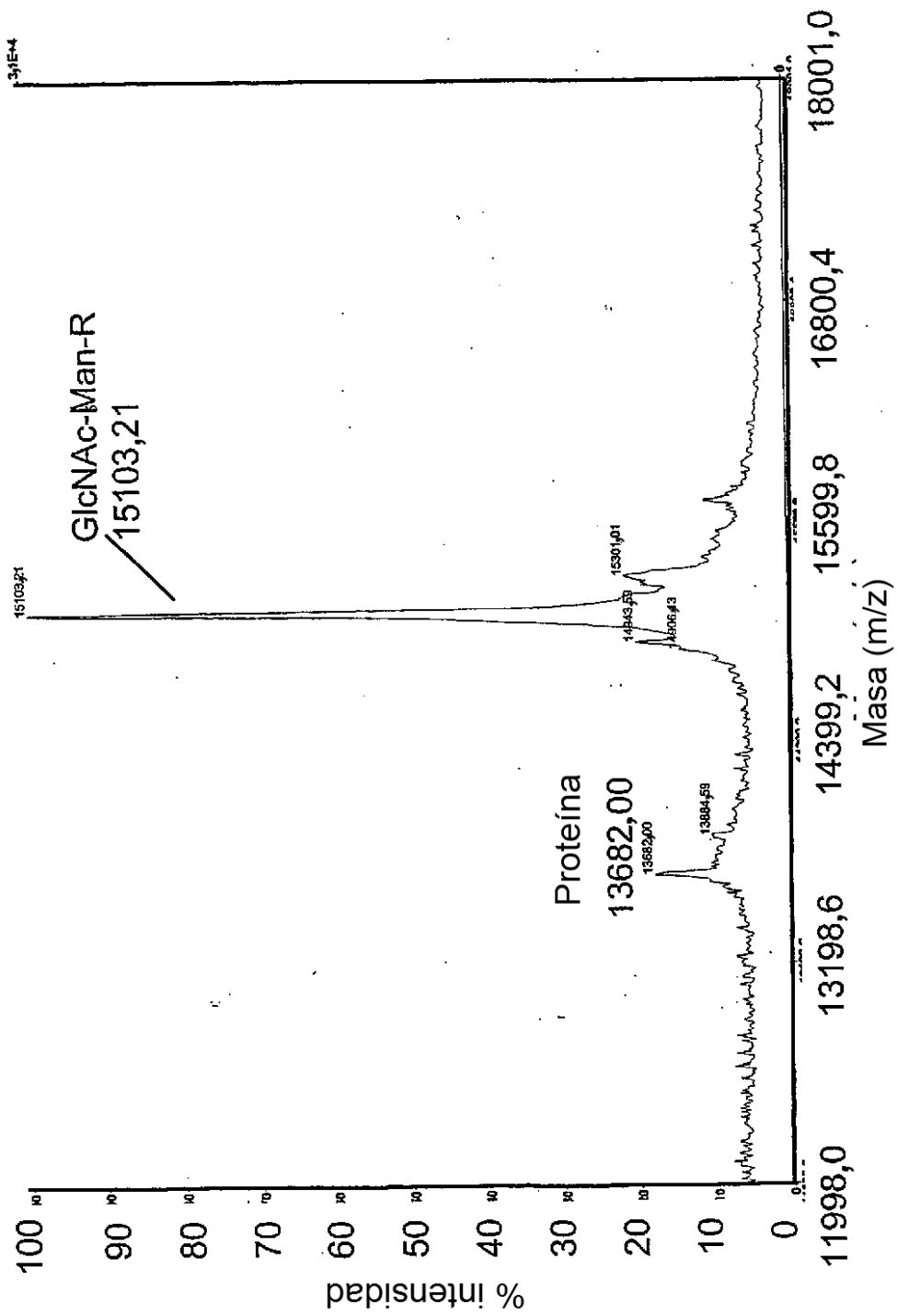


FIG. 96

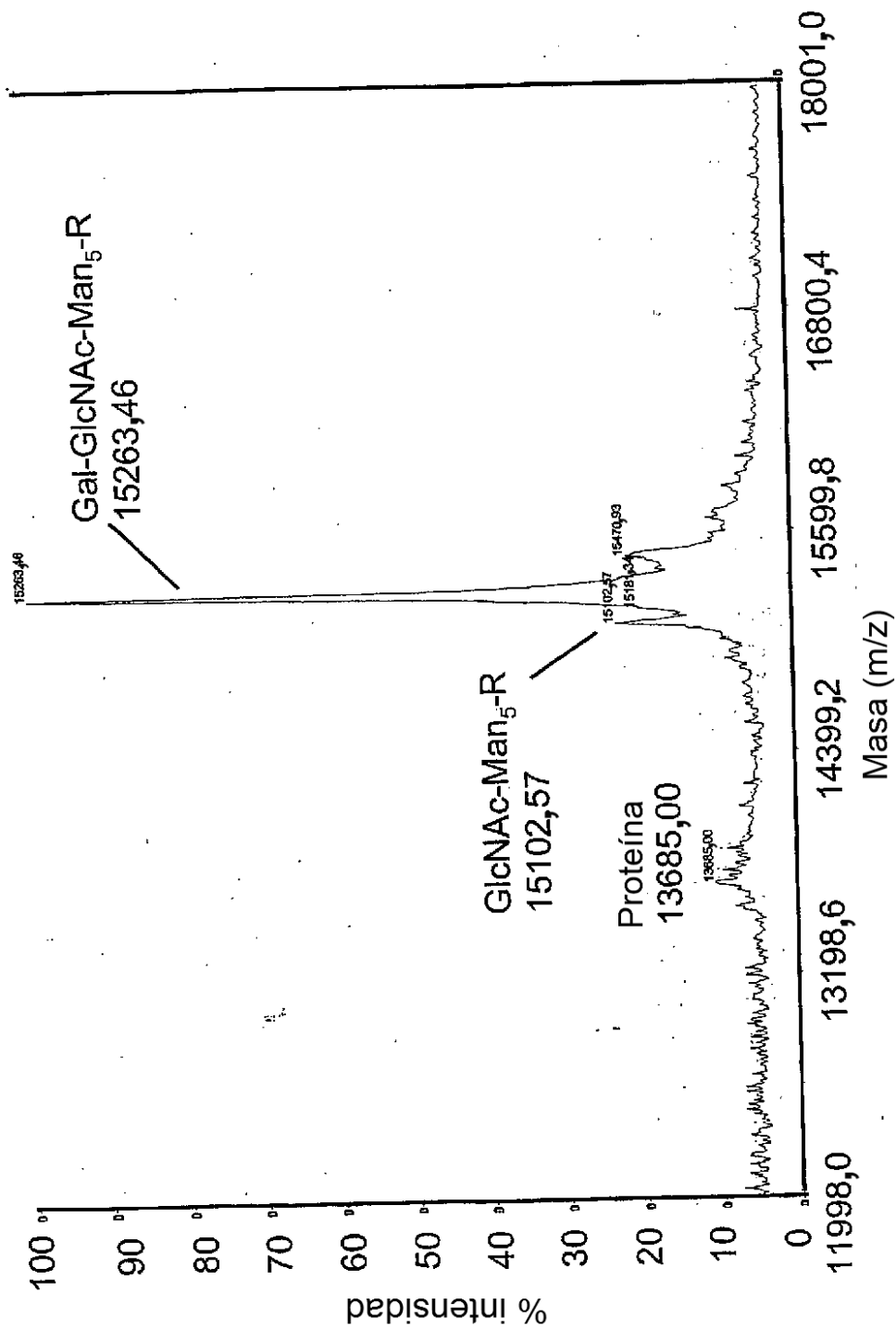


FIG. 97

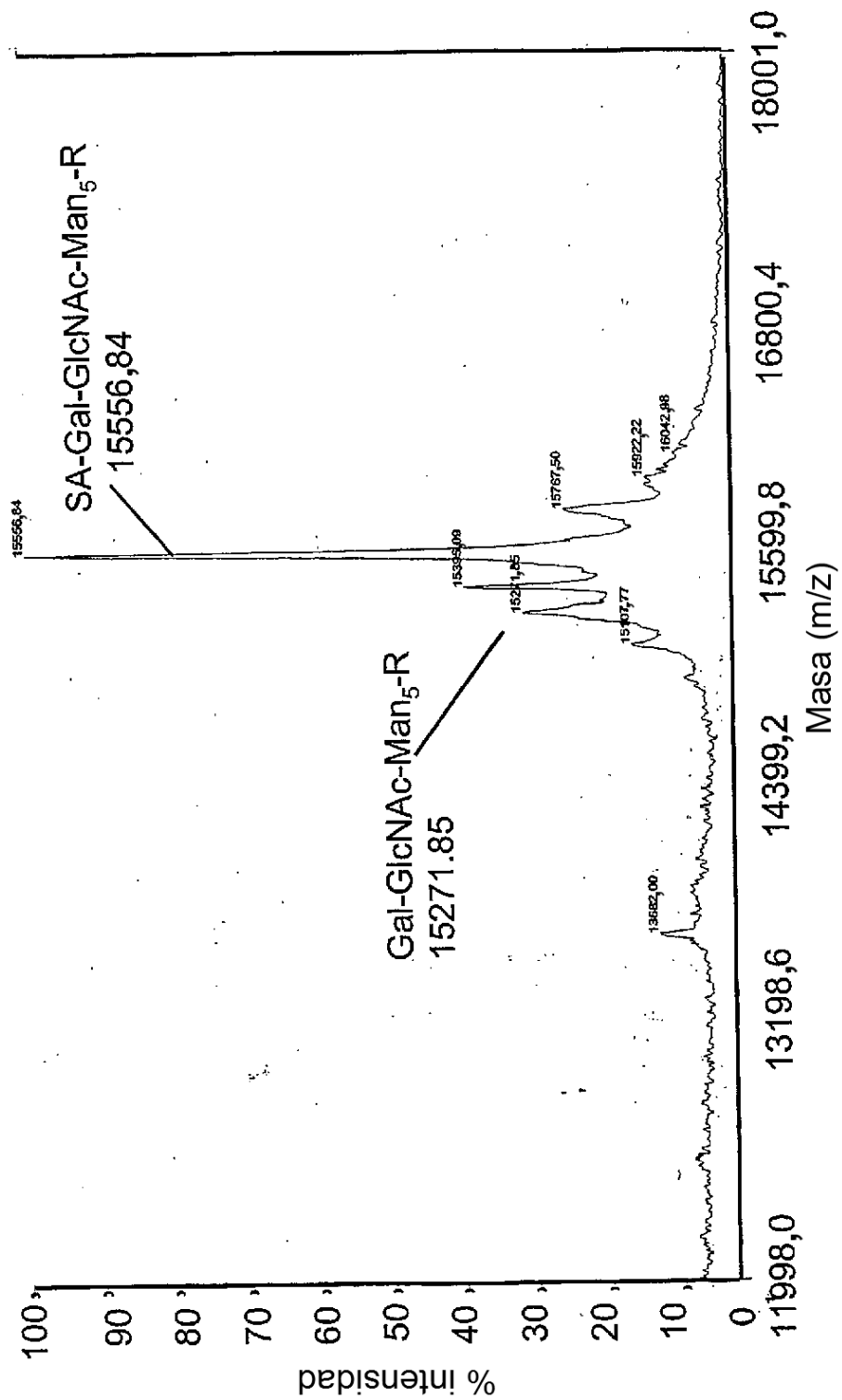


FIG. 98

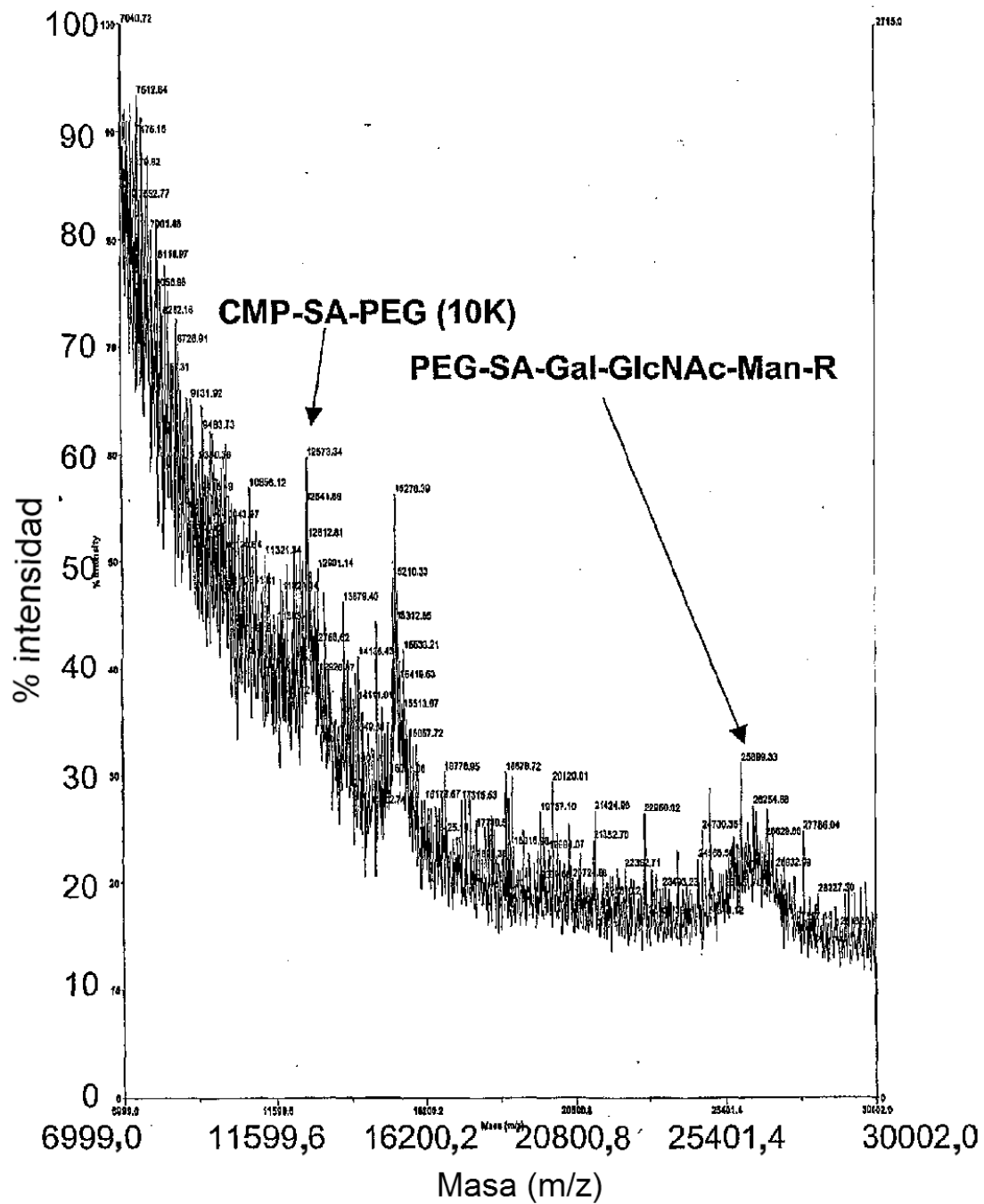


FIG. 99A

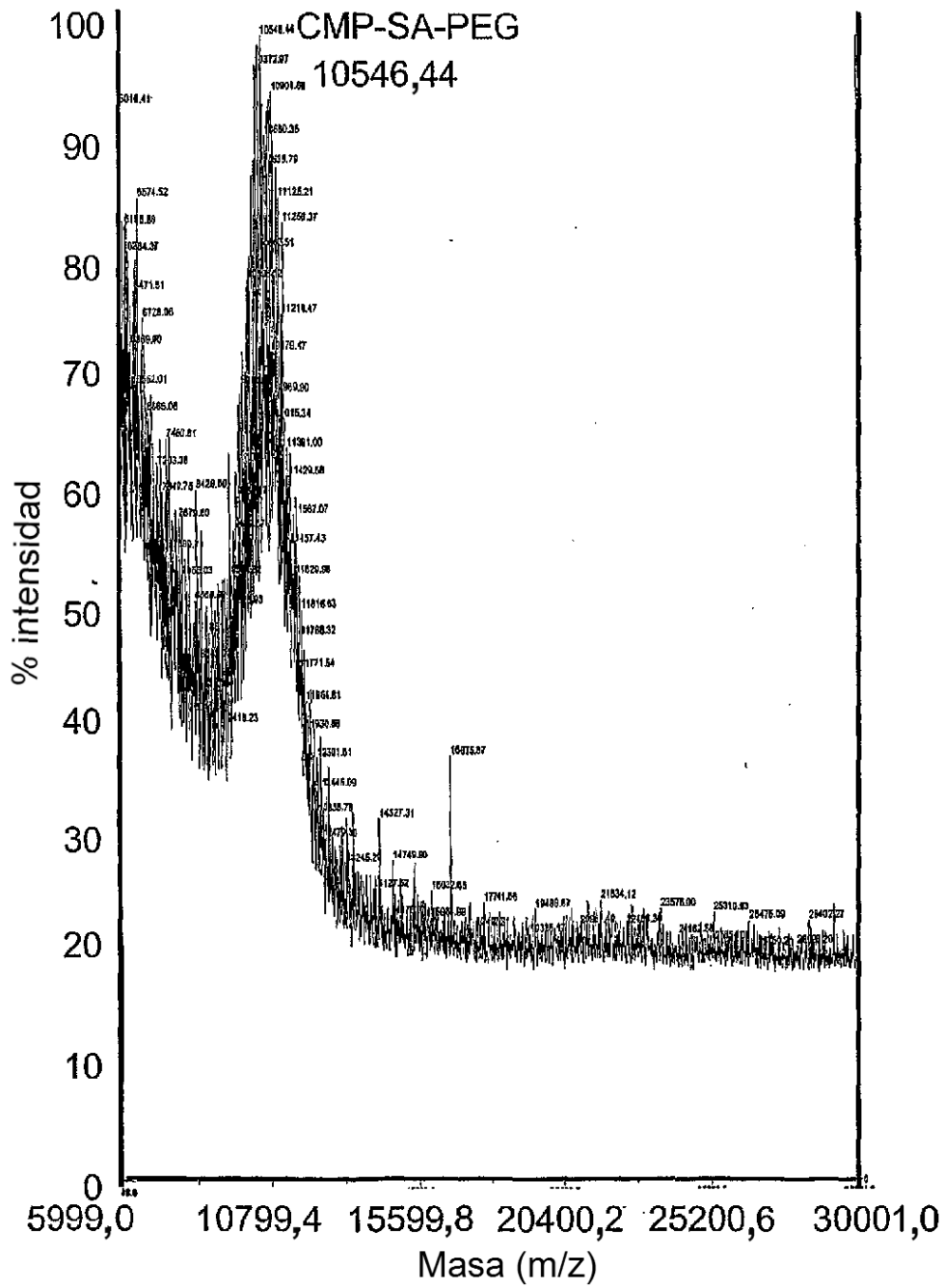
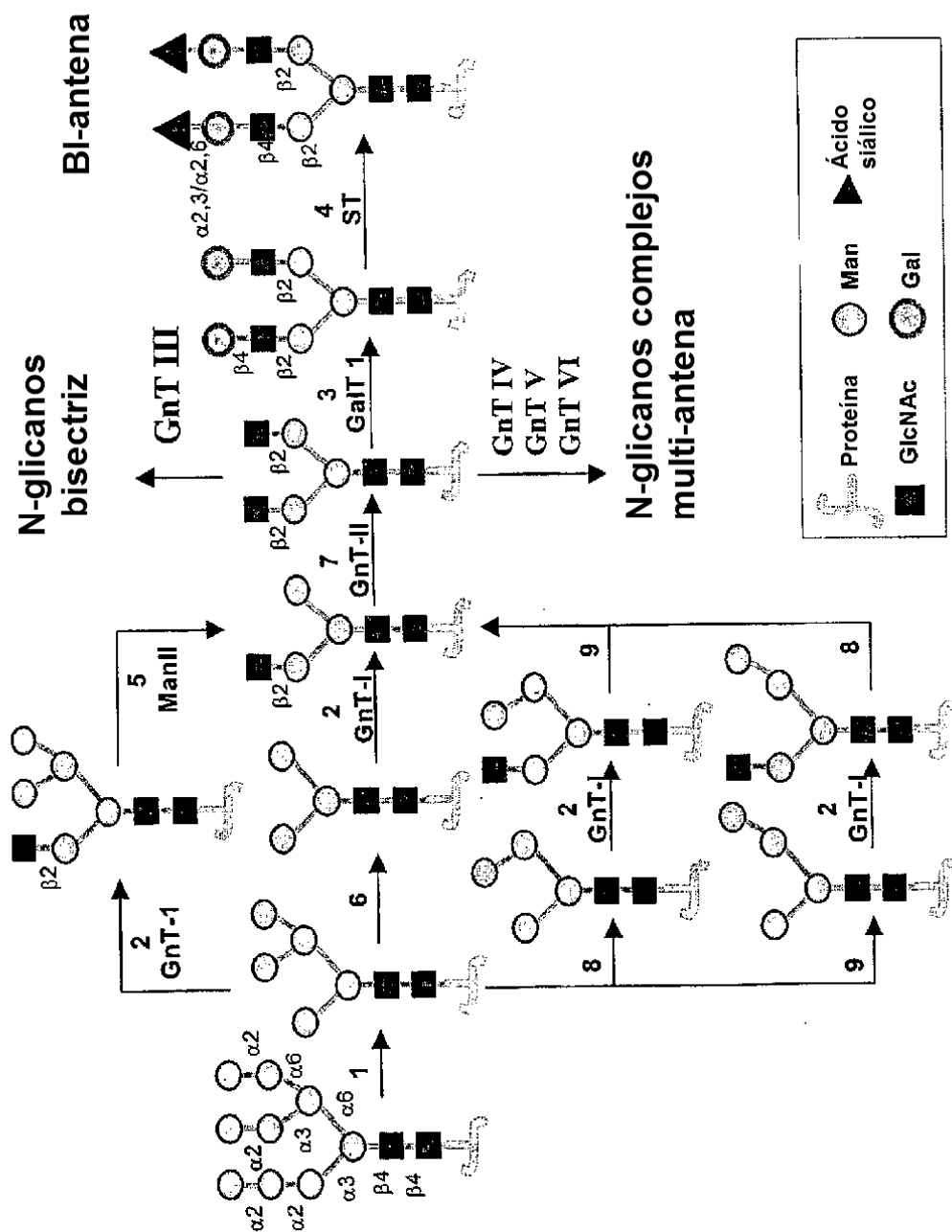


FIG. 99B



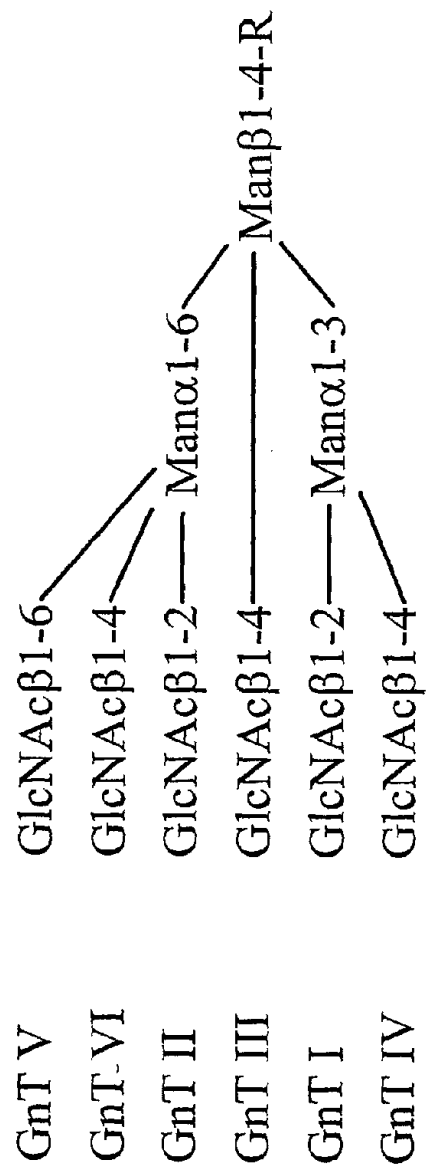


FIG. 101

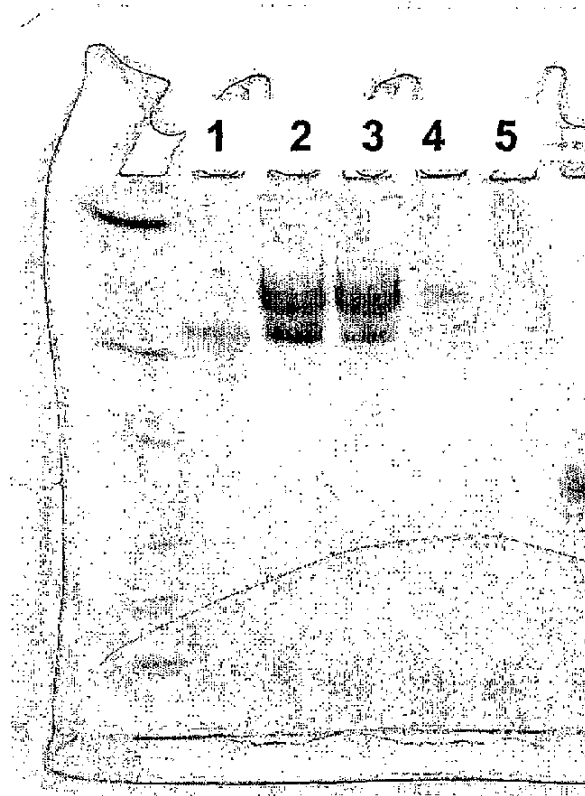
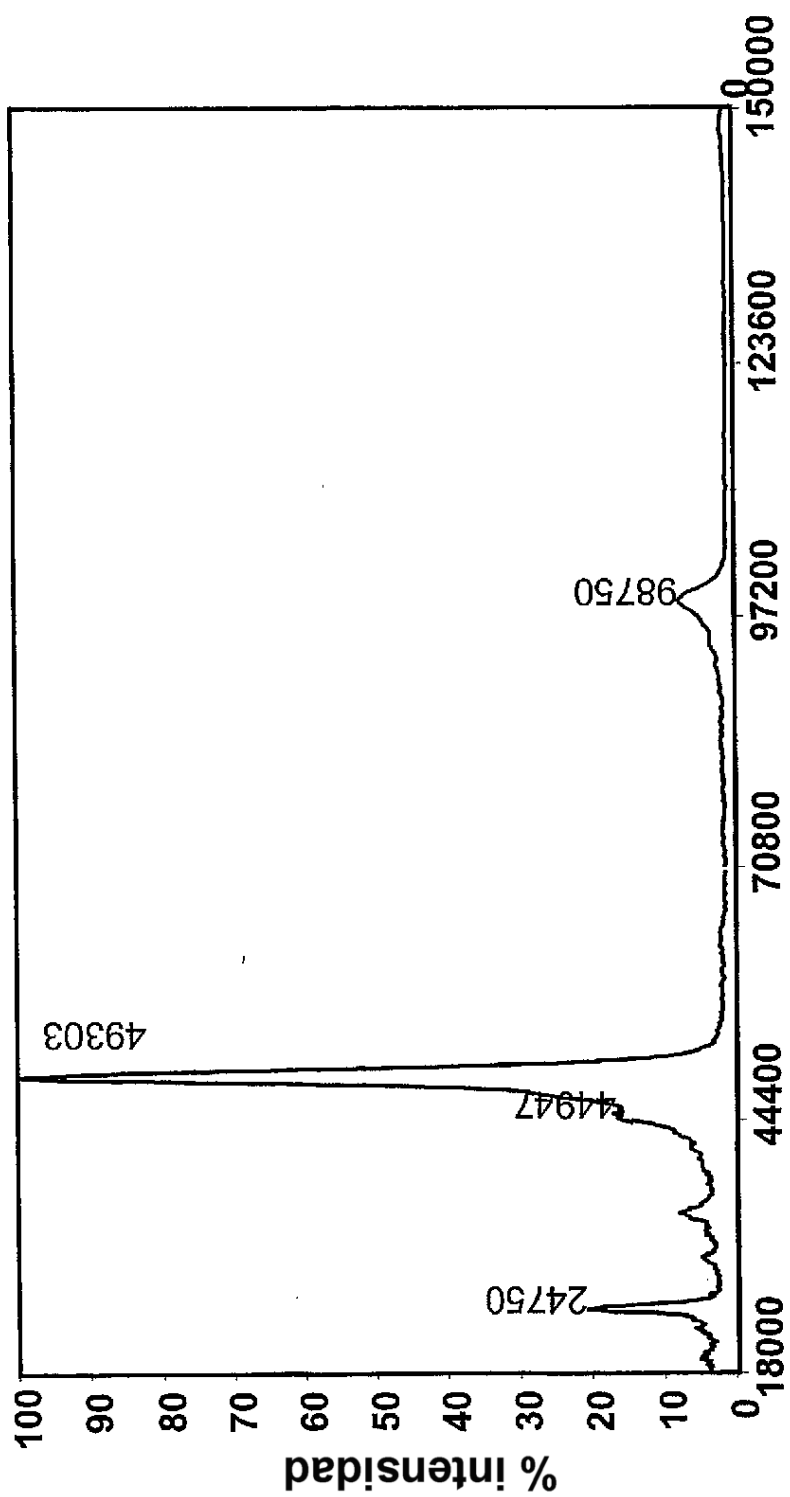


FIG. 116



Masa (m/z)
FIG. 117

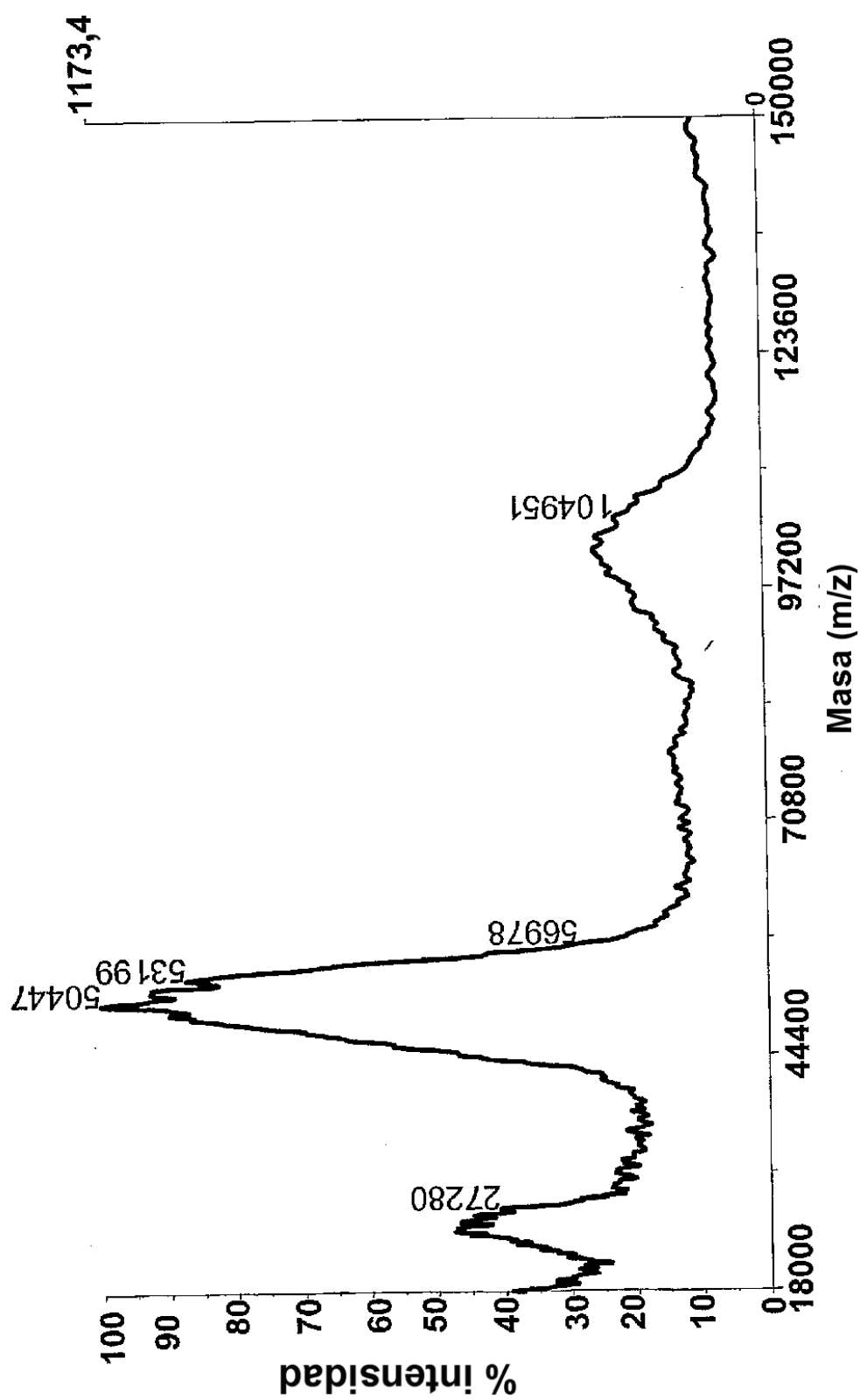


FIG. 118

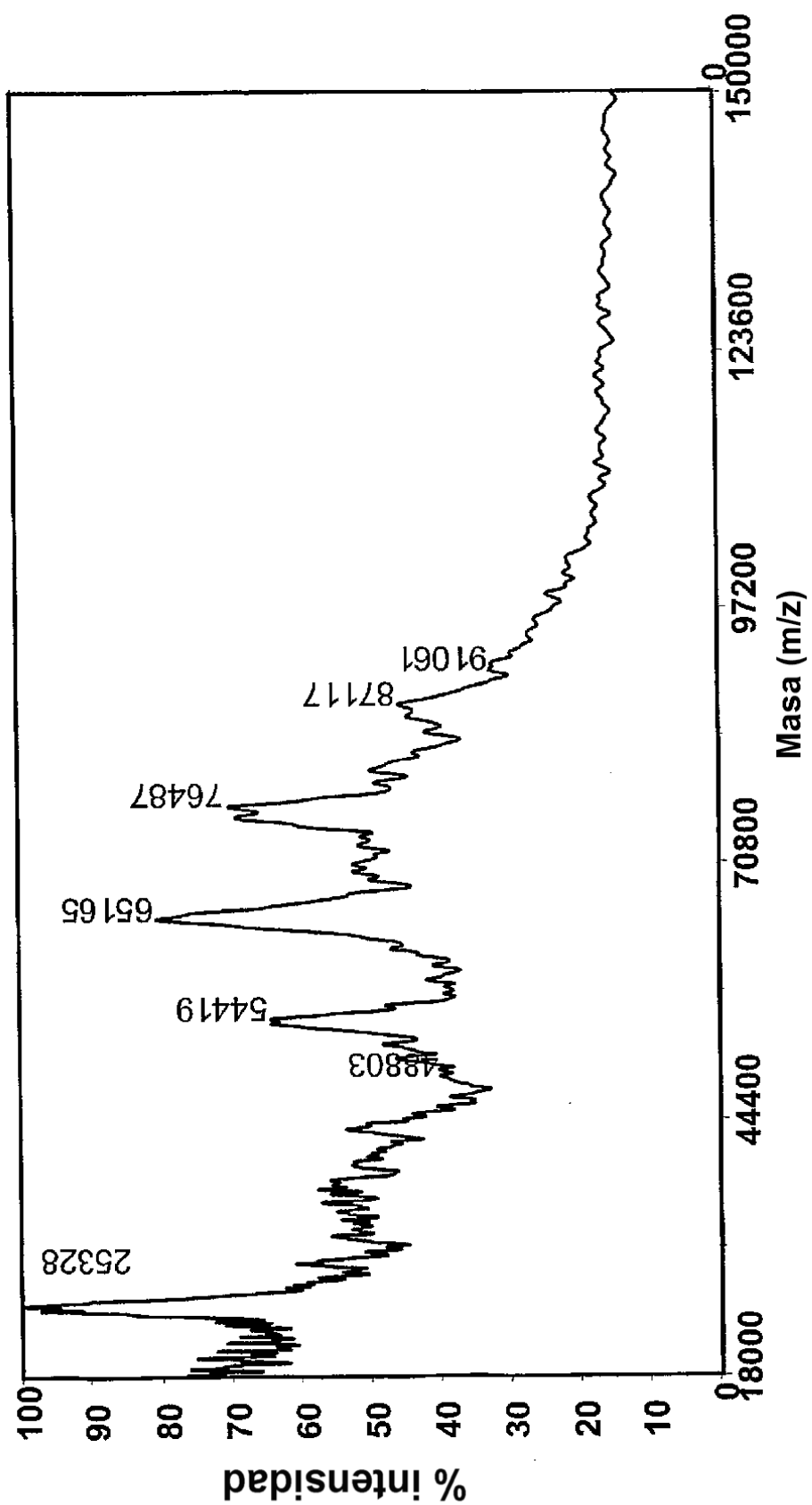


FIG. 119

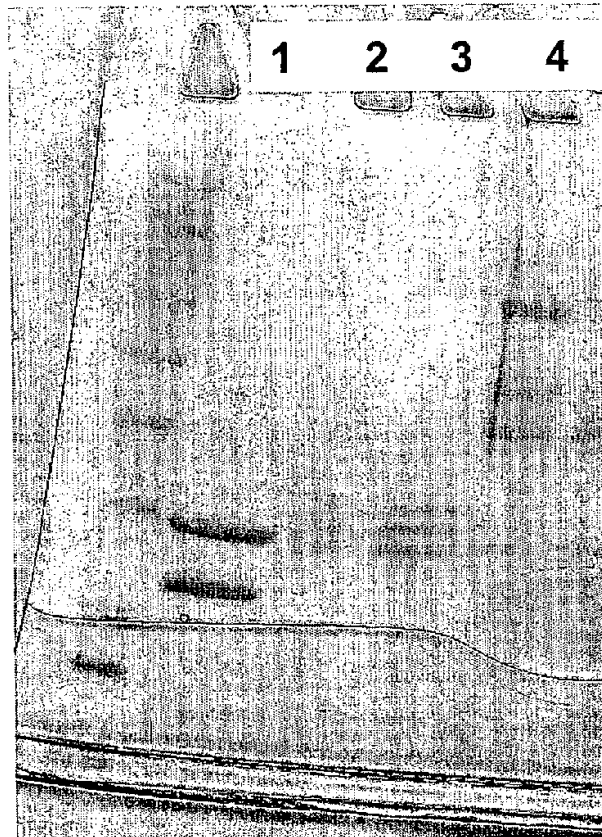


FIG. 120



FIG. 121



FIG. 122

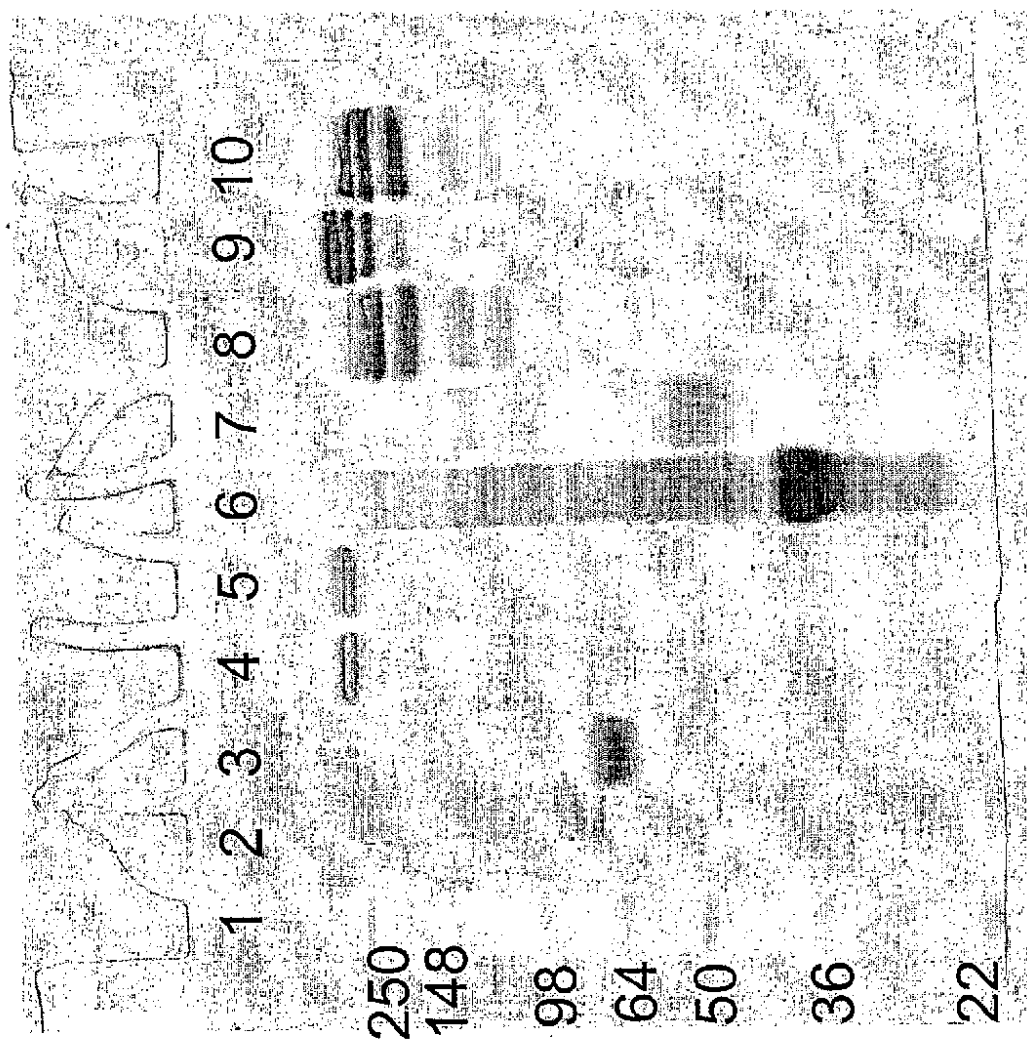


FIG. 123

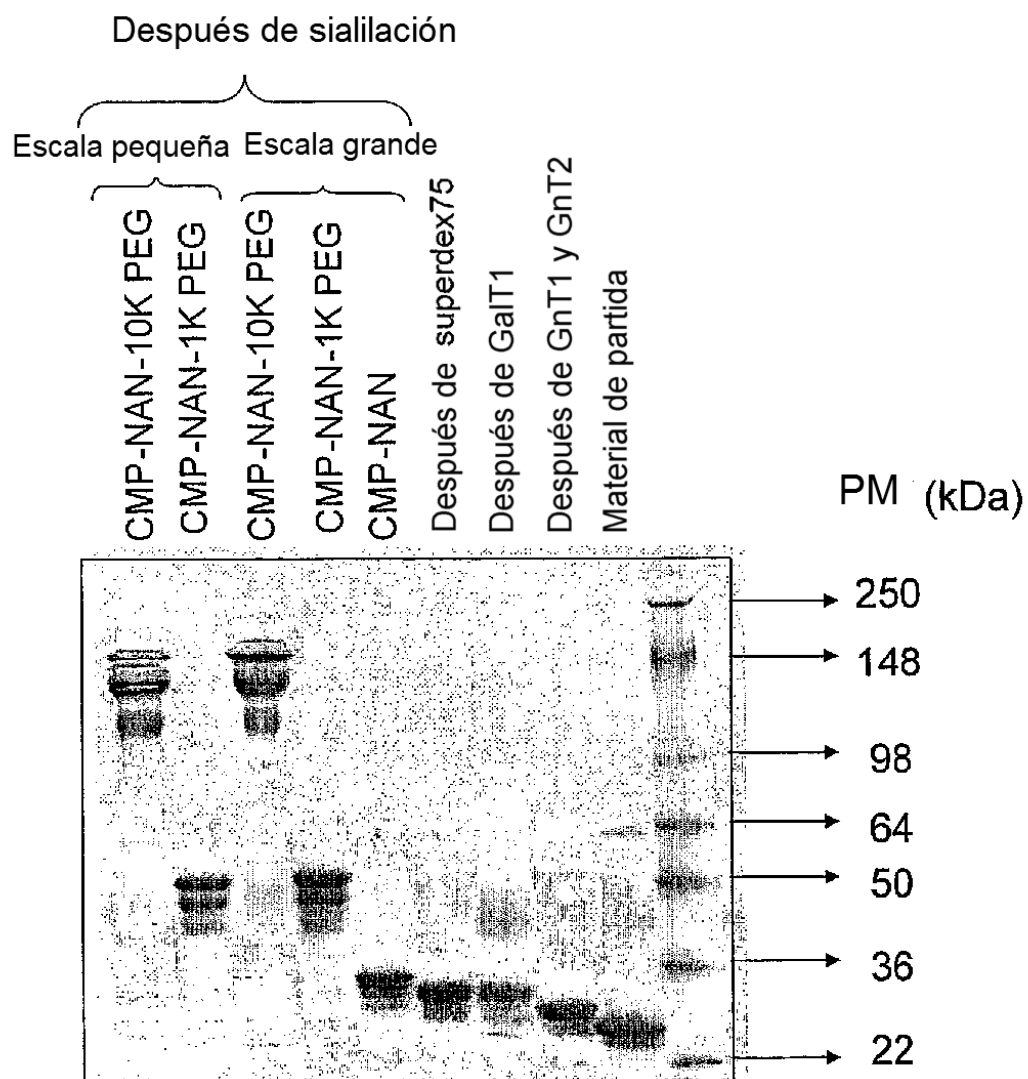


FIG. 125