

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 734**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2007 PCT/US2007/080471**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2008 WO08060780**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2007 E 07868373 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2068907**

54 Título: **Glicopéptidos y azúcares pegilados unidos a glicerol**

30 Prioridad:

04.10.2006 US 828208 P

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

21.02.2018

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsvård, DK

72 Inventor/es:

DEFREES, SHAWN y

ZENG, XIAO

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 655 734 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

Glicopéptidos y azúcares pegilados unidos a glicerol

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/828.208, presentada el 4 de octubre de 2006.

5 El documento WO 2005/072371, DeFrees *et al.*, *Glycobiology* 16: 833-843 (2006) y el documento US 7.125.843 dan a conocer péptidos modificados por medio de restos PEG, que se unen mediante uniones que contienen azúcar.

10 El documento WO 2006/082517 da a conocer la pegilación del péptido específico PPY₃₋₃₆, usando mPEG-maleimidadas lineales o ramificadas, en las que el mPEG lineal o ramificado se conjuga directamente con grupos funcionales en las cadenas laterales de aminoácidos de PPY₃₋₃₆, en particular grupo tiol de cisteínas en los residuos 10 y 11.

El documento WO 2005/051327 da a conocer eritropoyetina (EPO) glicopegilada.

El documento US 2006/0040856 da a conocer variantes del factor IX glicopegiladas.

Sumario de la invención

15 La presente invención se refiere a conjugados peptídicos del factor IX según las reivindicaciones adjuntas y a formulaciones farmacéuticas que comprenden tales conjugados según las reivindicaciones adjuntas.

20 En una realización a modo de ejemplo, se producen moléculas "glicopegiladas" de la invención mediante la formación mediada por enzima de un conjugado entre un péptido glicosilado o no glicosilado y un resto sacarilo transferible enzimáticamente que incluye un grupo de modificación, tal como un grupo de modificación polimérico tal como poli(etilenglicol), dentro de su estructura. El péptido es factor IX. El grupo de modificación polimérico se une al resto sacarilo (es decir, a través de un único grupo formado mediante la reacción de dos grupos reactivos) o a través de un resto de unión, por ejemplo, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, etc.

25 Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un resto PEG, por ejemplo, PEG y un péptido que tiene una actividad *in vivo* similar o análoga de otro modo al péptido terapéutico reconocido en la técnica. En el conjugado de la invención, el resto PEG se une covalentemente al péptido mediante un grupo de unión de glicosilo intacto. Los grupos de unión de glicosilo intactos a modo de ejemplo incluyen restos ácido siálico que se derivatizan con PEG.

El grupo de modificación polimérico puede unirse en cualquier posición de un resto glicosilo en un péptido. Además, el grupo de modificación polimérico puede unirse a un residuo glicosilo en cualquier posición en la secuencia de aminoácidos de un péptido silvestre o mutante.

30 En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un péptido que se conjuga a través de un grupo de unión de glicosilo a un grupo de modificación polimérico.

En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación polimérico se une al grupo de unión de glicosilo, generalmente a través de un heteroátomo en el núcleo de glicosilo (por ejemplo, N, O), a través de un resto de unión, L, tal como se muestra a continuación:



40 R¹ es el grupo de modificación polimérico y L se selecciona de un enlace y un grupo de unión. El índice w representa un número entero seleccionado de 1-6, preferiblemente 1-3 y más preferiblemente 1-2. Los grupos de unión a modo de ejemplo incluyen restos alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y ácido siálico. Un componente a modo de ejemplo del resto de unión es un resto acilo. Otro grupo de unión a modo de ejemplo es un residuo de aminoácido (por ejemplo, cisteína, serina, lisina, y oligopéptidos cortos, por ejemplo, Lys-Lys, Lys-Lys-Lys, Cys-Lys, Ser-Lys, etc.).

45 Cuando L es un enlace, se forma mediante la reacción de un grupo funcional reactivo en un precursor de R¹ y un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en un precursor del grupo de unión de glicosilo. Cuando L es un grupo de unión de orden distinto de cero, L puede estar en su lugar en el resto glicosilo antes de la reacción con el precursor de R¹. Alternativamente, los precursores de R¹ y L pueden incorporarse en un casete formado previamente que se une posteriormente al resto glicosilo. Tal como se expone en el presente documento, la selección y preparación de precursores con grupos funcionales reactivos apropiados está dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica. Además, se lleva a cabo el acoplamiento de los precursores mediante una química que se entiende bien en la técnica.

50 En una realización a modo de ejemplo, L es un grupo de unión que se forma a partir de un aminoácido, o péptido

pequeño (por ejemplo, 1-4 residuos de aminoácido) proporcionando un azúcar modificado en el que el resto de modificación polimérico se une a través de un resto de unión de alquilo sustituido. Los restos de unión a modo de ejemplo incluyen glicina, lisina, serina y cisteína. Los análogos de aminoácido, tal como se definen en el presente documento, también son útiles como componentes de resto de unión. El aminoácido puede modificarse con un componente adicional de un resto de unión, por ejemplo, alquilo, heteroalquilo, unido covalentemente a través de una unión acilo, por ejemplo, una amida o un uretano formados a través de un resto de amina del residuo de aminoácido.

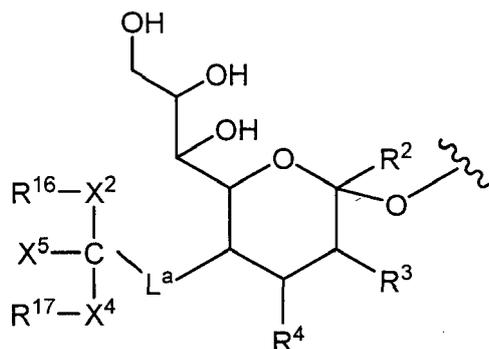
En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo tiene una estructura según las fórmulas I o Ia y R⁵ incluye el grupo de modificación polimérico. En otra realización a modo de ejemplo, R⁵ incluye tanto el grupo de modificación polimérico como un resto de unión, L, que une el grupo de modificación polimérico al núcleo de glicosilo. L puede ser una estructura lineal o ramificada. De manera similar, el grupo de modificación polimérico puede ser ramificado o lineal.

El grupo de modificación polimérico comprende dos o más unidades de repetición que pueden ser solubles en agua o esencialmente insolubles en agua. Los polímeros solubles en agua a modo de ejemplo de uso en los compuestos de la invención incluyen PEG, por ejemplo, m-PEG, PPG, por ejemplo, m-PPG, poli(ácido siálico), poliglutamato, poliaspartato, polilisina, polietilenimina, polímeros biodegradables (por ejemplo, polilactida, poliglicérido) y PEG funcionalizado, por ejemplo, PEG funcionalizado de manera terminal.

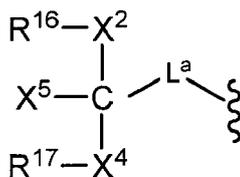
El núcleo de glicosilo de los grupos de unión de glicosilo de uso en los conjugados peptídicos se selecciona de furanosas y piranosas tanto naturales como no naturales. Los sacáridos no naturales opcionalmente incluyen un resto hidroxilo y/o de amina alquilado o acilado, por ejemplo, éteres, ésteres y sustituyentes amida en el anillo. Otros sacáridos no naturales incluyen un H, sustituyente hidroxilo, éter, éster o amida en una posición en el anillo en la que no está presente un sustituyente de este tipo en el sacárido natural. Alternativamente, al hidrato de carbono le falta un sustituyente que se encontraría en el hidrato de carbono del que se deriva su nombre, por ejemplo, desoxi-azúcares. Todavía azúcares no naturales adicionales a modo de ejemplo incluyen hidratos de carbono tanto oxidados (por ejemplo, ácidos -ónicos y -urónicos) como reducidos (alcoholes de azúcar). El resto de azúcar puede ser un mono, oligo o polisacárido.

Los azúcares naturales a modo de ejemplo de uso como componentes de grupos de unión de glicosilo en la presente invención incluyen glucosa, glucosamina, galactosa, galactosamina, fucosa, manosa, manosamina, xilanos, ribosa, N-acetil-glucosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosa, N-acetil-galactosamina y ácido siálico.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado peptídico que comprende un grupo de unión de glicosilo, en el que el grupo de unión de glicosilo se une a un residuo de aminoácido de dicho péptido, y en el que dicho grupo de unión de glicosilo comprende un grupo de unión de sialilo que tiene una fórmula que es un miembro seleccionado de:



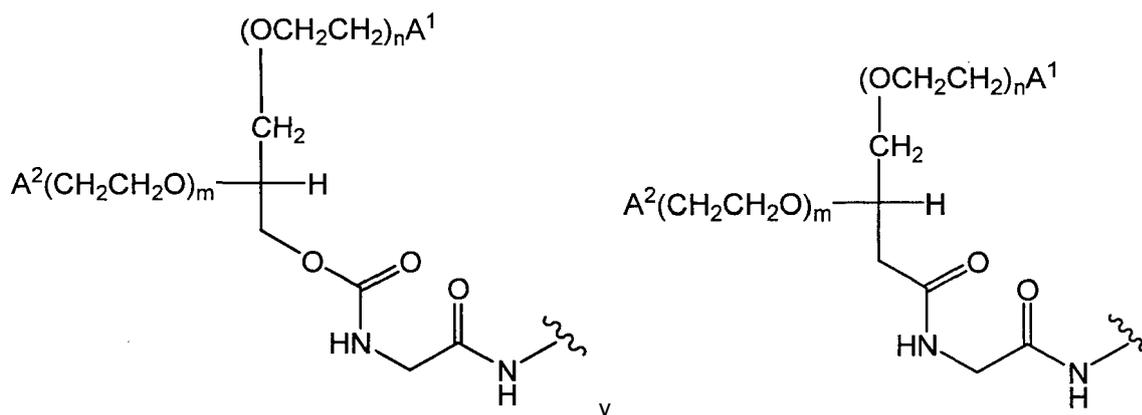
en la que



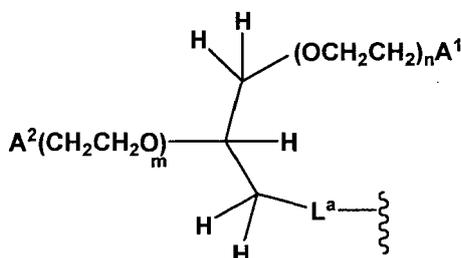
son grupos de modificación. R² es un miembro seleccionado de H, CH₂OR⁷, COOR⁷, COO⁻ y OR⁷. R⁷ es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. R³ y R⁴ son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, OR⁸ y NHC(O)R⁹. R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y sialilo. L^a es un resto de unión seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. X⁵, R¹⁶ y R¹⁷ se seleccionan independientemente de grupo no reactivo y restos poliméricos (por

ejemplo poli(óxido de alqueno), por ejemplo, PEG). Los grupos no reactivos incluyen grupos que se considera que son esencialmente no reactivos, neutros y/o estables a pH fisiológico, por ejemplo, H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y similares. Un resto polimérico a modo de ejemplo incluye las estructuras ramificadas expuestas en la fórmula IIIa y sus ejemplos, a continuación. Un experto en la técnica apreciará que el resto PEG en estas fórmulas puede reemplazarse por otros polímeros. Los polímeros a modo de ejemplo incluyen los de la familia del poli(óxido de alqueno). X² y X⁴ son fragmentos de uniones seleccionados independientemente que unen los restos poliméricos R¹⁶ y R¹⁷ a C. El índice j es un número entero seleccionado de 1 a 15.

5 En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación polimérico tiene una estructura que incluye un resto según las siguientes fórmulas:

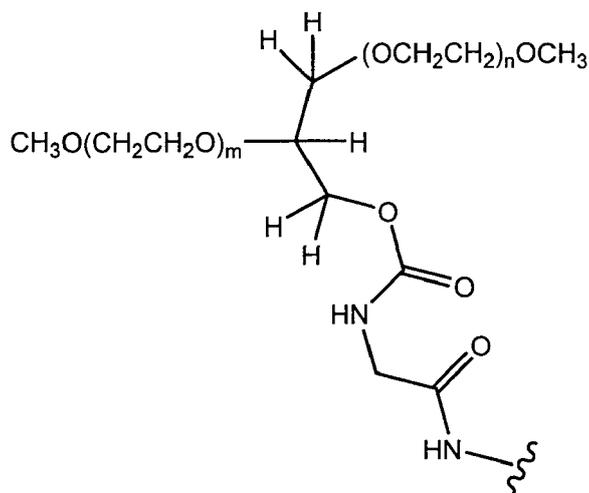


En otra realización a modo de ejemplo según la fórmula anterior, el grupo de modificación polimérico tiene una estructura según la siguiente fórmula:

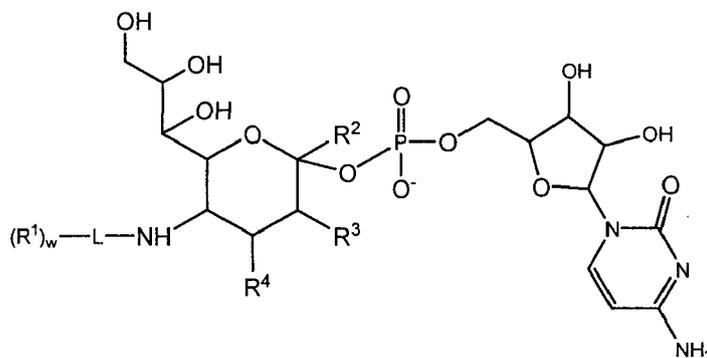


15 m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 4000, preferiblemente de desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 3000, incluso más preferiblemente de desde aproximadamente 300 hasta aproximadamente 2000 y todavía más preferiblemente de desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 1000. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 70, de aproximadamente 70 a aproximadamente 150, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250, de aproximadamente 250 a aproximadamente 375 y de aproximadamente 375 a aproximadamente 500. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 35, de aproximadamente 45 a aproximadamente 65, de aproximadamente 95 a aproximadamente 130, de aproximadamente 210 a aproximadamente 240, de aproximadamente 310 a aproximadamente 370 y de aproximadamente 420 a aproximadamente 480. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 65. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 130. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 210 hasta aproximadamente 240. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 310 hasta aproximadamente 370. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 430 hasta aproximadamente 470. A¹ y A² son cada uno -OCH₃.

Los grupos de modificación poliméricos a modo de ejemplo según esta realización incluyen el resto:



En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un azúcar modificado que tiene la siguiente fórmula:



5 en el que R^1 es el resto polimérico; L se selecciona de un enlace y un grupo de unión; R^2 es un miembro seleccionado de H, CH_2OR^7 , $COOR^7$ y OR^7 ; R^7 es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido; R^3 y R^4 son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, OR^8 y $NHC(O)R^8$; y R^8 y R^9 se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, ácido siálico y poli(ácido siálico). El índice w representa un número entero seleccionado de 1-6, preferiblemente 1-3 y más preferiblemente 1-2. Los grupos de unión a modo de ejemplo incluyen restos alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y ácido siálico. Un componente a modo de ejemplo del resto de unión es un resto acilo.

15 También se dan a conocer métodos de formación de conjugados de péptidos. Los métodos incluyen poner en contacto un péptido con un donador de azúcar modificado que porta un grupo de modificación unido covalentemente a un azúcar. El resto de azúcar modificado se transfiere desde el donador sobre un aminoácido o residuo glicosilo del péptido mediante la acción de una enzima. Las enzimas representativas incluyen, pero no se limitan a, glicosiltransferasas, por ejemplo, sialiltransferasas. El método incluye poner en contacto el péptido con: a) un donador de azúcar modificado; y b) una enzima que puede transferir un resto de azúcar modificado desde el donador de azúcar modificado sobre un aminoácido o residuo glicosilo del péptido, en condiciones apropiadas para transferir un resto de azúcar modificado desde el donador a un aminoácido o residuo glicosilo del péptido, sintetizando de ese modo dicho conjugado peptídico.

20 En un aspecto preferido, antes de la etapa a), el péptido se pone en contacto con una sialidasa, retirando de ese modo al menos una parte del ácido siálico en el péptido.

25 En otro aspecto preferido, el péptido se pone en contacto con una sialidasa, una glicosiltransferasa y un donador de azúcar modificado. En esta realización, el péptido está en contacto con la sialidasa, la glicosiltransferasa y el donador de azúcar modificado de manera esencialmente simultánea, sin importar el orden de adición de los diversos componentes. La reacción se lleva a cabo en condiciones apropiadas para la sialidasa para retirar un residuo ácido siálico del péptido; y la glicosiltransferasa para transferir un resto de azúcar modificado desde el donador de azúcar modificado a un aminoácido o residuo glicosilo del péptido.

30 En otro aspecto preferido, la desialilación y conjugación se realizan en el mismo recipiente, y el péptido desialilado preferiblemente no se purifica antes de la etapa de conjugación. En otra realización a modo de ejemplo, el método comprende además una etapa de "ocupación de sitios activos" que implica sialilación del conjugado peptídico. Esta

etapa se realiza en el mismo recipiente de reacción que contiene la sialidasa, la sialiltransferasa y el donador de azúcar modificado sin purificación previa.

5 En otro aspecto preferido, se realiza la desialilación del péptido, y se purifica el asialo-péptido. El asialo-péptido purificado se somete entonces a condiciones de reacción de conjugación. En otra realización a modo de ejemplo, el método comprende además una etapa de "ocupación de sitios activos" que implica sialilación del conjugado peptídico. Esta etapa se realiza en el mismo recipiente de reacción que contiene la sialidasa, la sialiltransferasa y el donador de azúcar modificado sin purificación previa.

10 En otro aspecto a modo de ejemplo, la etapa de ocupación de sitios activos, sialilación del conjugado peptídico, se realiza en el mismo recipiente de reacción que contiene la sialidasa, la sialiltransferasa y el donador de azúcar modificado sin purificación previa.

En un aspecto a modo de ejemplo, la puesta en contacto es durante un tiempo de menos de 20 horas, preferiblemente de menos de 16 horas, más preferiblemente de menos de 12 horas, incluso más preferiblemente de menos de 8 horas, y todavía más preferiblemente de menos de 4 horas.

15 En un aspecto adicional, también se da a conocer una mezcla de reacción de conjugado peptídico. La mezcla de reacción comprende: a) una sialidasa; b) una enzima que es un miembro seleccionado de glicosiltransferasa, exoglicosidasa y endoglicosidasa; c) un azúcar modificado; y d) un péptido.

20 En otro aspecto a modo de ejemplo, la razón de la sialidasa con respecto al péptido se selecciona de 0,1 U/l:2 mg/ml a 10 U/l:1 mg/ml, preferiblemente 0,5 U/l:2 mg/ml, más preferiblemente 1,0 U/l:2 mg/ml, incluso más preferiblemente 10 U/l:2 mg/ml, todavía más preferiblemente 0,1 U/l:1 mg/ml, más preferiblemente 0,5 U/l:1 mg/ml, incluso más preferiblemente 1,0 U/l:1 mg/ml, y todavía más preferiblemente 10 U/l:1 mg/ml.

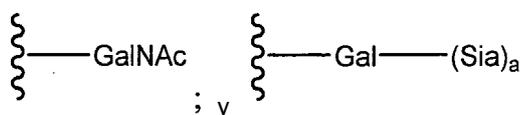
En un aspecto a modo de ejemplo, al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% de dicho conjugado peptídico incluye como máximo dos restos PEG. Los restos PEG pueden añadirse en un procedimiento en un solo recipiente, o pueden añadirse después de purificarse el asialo.

25 En otro aspecto a modo de ejemplo, al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% del conjugado peptídico incluye como máximo un resto PEG. El resto PEG puede añadirse en un procedimiento en un solo recipiente, o puede añadirse después de purificarse el asialo-péptido.

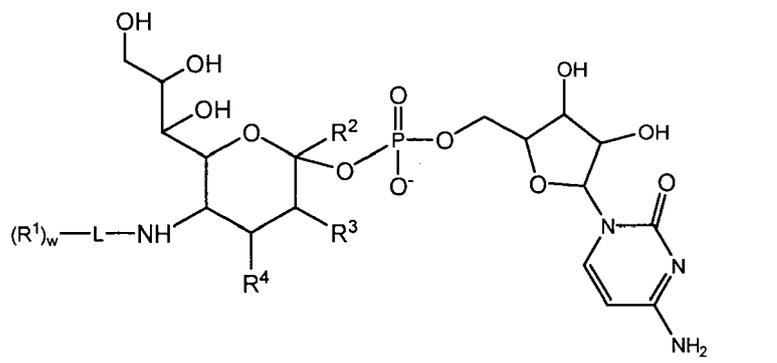
30 En un aspecto a modo de ejemplo adicional, el método comprende además "ocupar los sitios activos", o añadir ácido siálico al conjugado peptídico. En otra realización a modo de ejemplo, se añade sialidasa, seguido por un retraso de 30 min, 1 hora, 1,5 horas o 2 horas, seguido por la adición de la glicosiltransferasa, exoglicosidasa o endoglicosidasa.

En otro aspecto a modo de ejemplo, se añade sialidasa, seguido por un retraso de 30 min, 1 hora, 1,5 horas o 2 horas, seguido por la adición de la glicosiltransferasa, exoglicosidasa o endoglicosidasa. Otros objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada que sigue.

35 En otro aspecto a modo de ejemplo, el método incluye: (a) poner en contacto un péptido que comprende un grupo glicosilo seleccionado de:



en las que a es un número entero desde 0 hasta 10, con un azúcar modificado que tiene la fórmula:



y una transferasa apropiada que transfiere el grupo de unión de glicosilo sobre un miembro seleccionado de GalNAc,

Gal y Sia de dicho grupo glicosilo, en condiciones apropiadas para dicha transferencia. Un azúcar modificado a modo de ejemplo es CMP-ácido siálico modificado, a través de un resto de unión, con un polímero, por ejemplo, un resto de poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificado. Los radicales en la fórmula anterior son sustancialmente de la misma identidad que los que se encuentran en la fórmula idéntica anteriormente en el presente documento.

- 5 El péptido puede adquirirse esencialmente de cualquier fuente, sin embargo, en una realización, antes de modificarse tal como se comentó anteriormente, el péptido se expresa en un huésped adecuado. Células de mamífero (por ejemplo, BHK, CHO), bacterias (por ejemplo, *E. coli*) y de insecto (por ejemplo, Sf-9) son sistemas de expresión a modo de ejemplo que proporcionan un péptido de uso en las composiciones y los métodos expuestos en el presente documento.
- 10 Otros objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada que sigue.

Descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la preparación de CMP-ácido siálico-glicerol-PEG 40 kD.

La figura 2 ilustra las condiciones de reacción para la preparación de CMP-ácido siálico-glicerol-PEG 40 kD.

- 15 La figura 3 ilustra el procedimiento de purificación para CMP-ácido siálico-glicerol-PEG 40 kD.

La figura 4 ilustra el procedimiento de purificación que implica Q-Sepharose para CMP-ácido siálico-glicerol-PEG 40 kD.

La figura 5 es un espectro de ¹H-RMN de CMP-ácido siálico-glicerol-PEG 40 kD.

- 20 La figura 6 es una tabla que proporciona sialiltransferasas a modo de ejemplo de uso en la formación de los glicoconjugados de la invención, por ejemplo, para glicopeglar péptidos con un ácido siálico modificado.

La figura 7 es una tabla de los péptidos a los que pueden unirse uno o más grupos de unión de glicosilo. En los conjugados peptídicos de la invención, el factor IX es el péptido.

Descripción detallada de la invención y las realizaciones preferidas

Abreviaturas

- 25 PEG, poli(etilenglicol); PPG, poli(propilenglicol); Ara, arabinosilo; Fru, fructosilo; Fuc, fucosilo; Gal, galactosilo; GalNAc, N-acetilgalactosaminilo; Glc, glucosilo; GlcNAc, N-acetilglucosaminilo; Man, manosilo; ManAc, acetato de manosaminilo; Xyl, xilosilo; NeuAc, sialilo o N-acetilneuraminilo; Sia, sialilo o N-acetilneuraminilo; y derivados y análogos de los mismos.

Definiciones

- 30 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento generalmente tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta 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 los que se conocen bien y se emplean habitualmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para la síntesis
- 35 de ácidos nucleicos y péptidos. Las técnicas y los procedimientos se realizan generalmente según métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (véase generalmente, Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y), que se proporcionan en la totalidad de este documento. La nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en química analítica y de síntesis orgánica descritos a continuación son los que se conocen bien y se emplean habitualmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales, o modificaciones de las
- 40 mismas, para síntesis químicas y análisis químicos.

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

- Se considera que los oligosacáridos tienen un extremo reductor y un extremo no reductor, ya sea o no, de hecho, el sacárido en el extremo reductor un azúcar reductor. Según la nomenclatura aceptada, los oligosacáridos se
- 50 representan en el presente documento con el extremo no reductor a la izquierda y el extremo reductor a la derecha.

El término "ácido siálico" o "sialilo" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve

carbonos. El miembro más habitual de la familia del ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA). Un segundo miembro de la familia es el ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc o NeuGc), en el que se hidroxila el grupo N-acetilo de NeuAc. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano *et al.* (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). También están incluidos los 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)). Se dan a conocer la síntesis y el uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.

“Péptido” se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí a través de enlaces amida, denominado alternativamente polipéptido. Adicionalmente, también están incluidos aminoácidos no naturales, por ejemplo, β-alanina, fenilglicina y homoarginina. También pueden usarse en la presente invención aminoácidos que no están codificados por genes. Además, también pueden usarse en la invención aminoácidos que se han modificado para incluir grupos reactivos, sitios de glicosilación, polímeros, restos terapéuticos, biomoléculas y similares. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser o bien el isómero D o bien el L. El isómero L se prefiere generalmente. Además, otros peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, “péptido” se refiere a péptidos tanto glicosilados como no glicosilados. También están incluidos péptidos que están glicosilados de manera incompleta mediante un sistema que expresa el péptido. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983). Se proporciona una lista de algunos de los péptidos de la invención en la figura 7.

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

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos que se producen de manera natural y sintéticos, así como los análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos que se producen de manera natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican después, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácido se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural, es decir, un carbono α que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina-metilsulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural. Los miméticos de aminoácido se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido que se produce de manera natural.

Tal como se usa en el presente documento, el término “azúcar modificado”, o “residuo de azúcar modificado”, se refiere a un hidrato de carbono que se produce de manera natural o que no se produce de manera natural que se añade enzimáticamente sobre un aminoácido o un residuo glicosilo de un péptido en un procedimiento de la invención. El azúcar modificado se selecciona de sustratos enzimáticos incluyendo, pero sin limitarse a nucleótidos de azúcar (mono, di y trifosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo) y azúcares que ni están activados ni son nucleótidos. El “azúcar modificado” se funcionaliza covalentemente con un “grupo de modificación”. Los grupos de modificación útiles incluyen, pero no se limitan a, restos PEG, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, biomoléculas y similares. El grupo de modificación es preferiblemente un hidrato de carbono que no se produce de manera natural o no modificado. El locus de funcionalización con el grupo de modificación se selecciona de tal manera que no impida que el “azúcar modificado” se añada enzimáticamente a un péptido.

Tal como se usa en el presente documento, el término “resto polimérico” se refiere a un polímero soluble en agua o insoluble en agua. El término “soluble en agua” se refiere a restos que tienen cierto grado de solubilidad en agua detectable. Los métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua se conocen bien en la técnica. Los 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 componerse de un único aminoácido, por ejemplo, poli(lisina). Un polisacárido a modo de ejemplo es poli(ácido siálico). Un poli(éter) a modo de ejemplo es poli(etilenglicol). La poli(etilimina) es una poliamina a modo de ejemplo, y el poli(ácido acrílico) es un poli(ácido carboxílico) representativo. Polímeros solubles en agua preferidos son esencialmente no fluorescentes, o emiten una cantidad de fluorescencia tan mínima que son inapropiados para su uso como marcador fluorescente en un ensayo. Pueden usarse polímeros que son azúcares que no se producen de manera natural. Además, también se contempla el uso de un azúcar que se produce de manera natural por lo demás que se modifica mediante la unión covalente de otra entidad (por ejemplo, poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(aspartato), biomolécula, resto terapéutico, resto de diagnóstico, etc.). El término polímero soluble en agua también abarca especies tales como sacáridos (por ejemplo, dextrano, amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poli (aminoácidos), por

ejemplo, poli(ácido glutámico); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(éteres), por ejemplo, poli(etilenglicol); péptidos, proteínas, y similares. Los polímeros insolubles en agua representativos incluyen, pero no se limitan a, polifosfazinas, poli(alcoholes vinílicos), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poliacrilamidas, polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquileo), poli(tereftalatos de alquileo), poli(vinil éteres), poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), poliestireno, polivinilpirrolidona, plurónicos y polivinilfenol y copolímeros de los mismos. Además, también se contempla el uso de un azúcar que se produce de manera natural por lo demás que se modifica mediante la unión covalente de otra entidad (por ejemplo, poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(aspartato), biomolécula, resto terapéutico, resto de diagnóstico, etc.). Se describen en la solicitud ejemplos adicionales de polímeros solubles en agua e insolubles en agua.

La estructura principal de polímero del polímero soluble en agua es poli(etilenglicol) (es decir PEG). Sin embargo, debe entenderse que otros polímeros relacionados también son adecuados para su uso en la práctica de esta invención y que el uso del término PEG o poli(etilenglicol) pretende ser incluyente y no excluyente a este respecto. El término PEG incluye poli(etilenglicol) en cualquiera de sus formas, incluyendo alcoxi-PEG, PEG difuncional, PEG de múltiples brazos, PEG en horquilla, PEG ramificado, PEG colgante (es decir PEG o polímeros relacionados que tienen uno o más grupos funcionales colgantes de la estructura principal de polímero), o PEG con uniones degradables en el mismo.

El polímero puede ser lineal o ramificado. Los polímeros ramificados se conocen generalmente en la técnica. Normalmente, un polímero ramificado tiene un resto de núcleo de rama central y una pluralidad de cadenas de polímero lineales o ramificadas unidas al núcleo de rama central. PEG se usa habitualmente en formas ramificadas que pueden prepararse mediante adición de óxido de etileno a diversos polioles, tales como glicerol, pentaeritritol y sorbitol. El resto de rama central también puede derivarse de varios aminoácidos, tales como lisina. El poli(etilenglicol) ramificado puede representarse de forma general como $R(-PEG-OH)_m$ en la que R representa el resto de núcleo, concretamente glicerol, y m representa el número de brazos. También pueden usarse moléculas de PEG de múltiples brazos, tales como las descritas en la patente estadounidense n.º 5.932.462, como la estructura principal de polímero. En una realización a modo de ejemplo, el propio polímero ramificado se une a un resto de ramificación (por ejemplo, cisteína, serina, lisina, y oligómeros de lisina).

El "área bajo la curva" o "AUC", tal como se usa en el presente documento en el contexto de la administración de un fármaco peptídico a un paciente, se define como el área total bajo la curva que describe la concentración de fármaco en la circulación sistémica del paciente en función del tiempo de cero a infinito.

El término "semivida" o " $t_{1/2}$ ", tal como se usa en el presente documento en el contexto de la administración de un fármaco peptídico 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 con el fármaco peptídico dependiendo de múltiples mecanismos de aclaramiento, redistribución y otros mecanismos bien conocidos en la técnica. Habitualmente, se definen semividas alfa y beta de tal manera que la fase alfa se asocia con redistribución, y la fase beta se asocia con aclaramiento. Sin embargo, con fármacos proteicos que están confinados, en su mayor parte, en el torrente sanguíneo, puede haber al menos dos semividas de aclaramiento. Para algunos péptidos glicosilados, el rápido aclaramiento de fase beta puede estar mediado por receptores en macrófagos, o células endoteliales que reconocen galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa o fucosa terminal. Puede producirse un aclaramiento de fase beta más lento mediante filtración glomerular renal para moléculas con un radio efectivo < 2 nm (aproximadamente 68 kD) y/o captación y metabolismo específicos o no específicos en tejidos. La glicopegilación puede ocupar sitios activos de azúcares terminales (por ejemplo, galactosa o N-acetilgalactosamina) y bloquear de ese modo un rápido aclaramiento de fase alfa por receptores que reconocen estos azúcares. También puede conferir un mayor radio efectivo y disminuir de ese modo el volumen de distribución y la captación en tejido, prolongando de ese modo la fase beta tardía. Por tanto, el impacto preciso de la glicopegilación sobre las semividas de fase alfa y fase beta puede variar dependiendo del tamaño, el estado de glicosilación, y otros parámetros, tal como se conoce bien en la técnica. Se encuentra una explicación adicional de "semivida" en Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin y RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Ámsterdam, págs. 101 - 120).

El término "glicoconjugación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la conjugación mediada enzimáticamente de una especie de azúcar modificado con un aminoácido o residuo glicosilo de un polipéptido, por ejemplo, un péptido de G-CSF de la presente invención. Un subgénero de "glicoconjugación" es la "glicopegilación", en la que el grupo de modificación del azúcar modificado es poli(etilenglicol) y derivado de alquilo (por ejemplo, m-PEG) o derivado reactivo (por ejemplo, H_2N -PEG, $HOOC$ -PEG) del mismo.

Los términos "a gran escala" y "a escala industrial" se usan de manera intercambiable y se refieren a un ciclo de reacción que produce al menos aproximadamente 250 mg, preferiblemente al menos aproximadamente 500 mg, y más preferiblemente al menos aproximadamente 1 gramo de glicoconjugado al completarse un único ciclo de

reacción.

El término, “grupo de unión de glicosilo”, tal como se usa en el presente documento se refiere a un residuo glicosilo al que se une covalentemente un grupo de modificación (por ejemplo, resto PEG, resto terapéutico, biomolécula); el grupo de unión de glicosilo une el grupo de modificación a la parte restante del conjugado. En los métodos de la invención, el “grupo de unión de glicosilo” llega a unirse covalentemente a un péptido glicosilado o no glicosilado, uniéndose de ese modo el agente a un aminoácido y/o residuo glicosilo en el péptido. Un “grupo de unión de glicosilo” se deriva generalmente de un “azúcar modificado” mediante la unión enzimática del “azúcar modificado” a un aminoácido y/o residuo glicosilo del péptido. El grupo de unión de glicosilo puede ser una estructura derivada de un sacárido que se degrada durante la formación del casete grupo de modificación-azúcar modificado (por ejemplo, oxidación → formación de base de Schiff → reducción), o el grupo de unión de glicosilo puede estar intacto. Un “grupo de unión de glicosilo intacto” se refiere a un grupo de unión que se deriva de un resto glicosilo en el que el monómero de sacárido que une el grupo de modificación y a la parte restante del conjugado no se degrada, por ejemplo, oxida, por ejemplo, mediante metaperyodato de sodio. “Grupos de unión de glicosilo intactos” de la invención pueden derivarse de un oligosacárido que se produce de manera natural mediante adición de unidad(es) de glicosilo o la retirada de una o más unidades de glicosilo de una estructura de sacárido original.

El término, “grupo de modificación no glicosídico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a grupos de modificación que no incluyen un azúcar que se produce de manera natural unido directamente al grupo de unión de glicosilo.

El término “resto de direccionamiento”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a especies que se localizarán selectivamente en un tejido o región del cuerpo particular. La localización está mediada por el reconocimiento específico de determinantes moleculares, el tamaño molecular del agente de direccionamiento o conjugado, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas y similares. Otros mecanismos de direccionamiento de un agente a un tejido o una región particular los conocen los expertos en la técnica. Los restos de direccionamiento a modo de ejemplo incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, transferrina, glicoproteína HS, factores de coagulación, proteínas séricas, β -glicoproteína, GCSF, GM-CSF, M-CSF, EPO y similares.

Tal como se usa en el presente documento, “resto terapéutico” significa cualquier agente útil para terapia incluyendo, pero sin limitarse a, antibióticos, agentes antiinflamatorios, fármacos antitumorales, citotoxinas y agentes radiactivos. “Resto terapéutico” incluye profármacos de agentes bioactivos, constructos en los que más de un resto terapéutico se une a un portador, por ejemplo, agentes multivalentes. Resto terapéutico también incluye proteínas y constructos que incluyen proteínas. Las proteínas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GMCSF), interferón (por ejemplo, interferón- α , β , γ), interleucina (por ejemplo, interleucina II), proteínas séricas (por ejemplo, factores VII, VIIa, VIII, IX y X), gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona estimulantes del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH) y proteínas de fusión de anticuerpos (por ejemplo, proteína de fusión de receptor de factor de necrosis tumoral ((TNFR)/ dominio Fc)).

Tal como se usa en el presente documento, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material, que cuando se combina con el conjugado conserva la actividad de los conjugados y no es reactiva con los sistemas inmunitarios del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los portadores farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Otros portadores también pueden incluir disoluciones estériles, comprimidos incluyendo comprimidos recubiertos y cápsulas. Normalmente, tales portadores contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, determinados tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales del mismo, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Tales portadores también pueden incluir aditivos de sabor y color u otros componentes. Se formulan composiciones que comprenden tales portadores mediante métodos convencionales bien conocidos.

Tal como se usa en el presente documento, “administrar”, significa administración oral, administración como supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal o subcutánea, o el implante de un dispositivo de liberación lenta por ejemplo, una minibomba osmótica, al sujeto. Administración es mediante cualquier vía incluyendo parenteral y transmucosa (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraarteriolar, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Además, cuando la inyección es para tratar un tumor, por ejemplo, inducir apoptosis, la administración puede ser directamente al tumor y/o en los tejidos que rodean el tumor. Otros modos de administración incluyen, pero no se limitan a, el uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

El término “que mejora” o “mejorar” se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento de una patología o un estado, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión o disminución de los síntomas o una mejora en el bienestar físico o mental de un paciente. La mejora de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico y/o una evaluación psiquiátrica.

El término “terapia” se refiere a “tratar” o el “tratamiento” de una enfermedad o un estado incluyendo prevenir que se

produzca la enfermedad o el estado en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que no ha experimentado aún ni presenta síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), inhibir la enfermedad (ralentizando o deteniendo su desarrollo), proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo tratamiento paliativo) y aliviar la enfermedad (provocando la regresión de la enfermedad).

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

10 El término “aislado” se refiere a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes, que se usan para producir el material. Para conjugados peptídicos de la invención, el término “aislado” se refiere a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que acompañan normalmente al material en la mezcla usada para preparar el conjugado peptídico. “Aislado” y “puro” se usan de manera intercambiable. Normalmente, los conjugados peptídicos aislados de la invención tienen un nivel de pureza expresado preferiblemente como un intervalo. El límite inferior del intervalo de pureza para los conjugados peptídicos es de aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70% o aproximadamente el 80% y el límite superior del intervalo de pureza es de aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% o más de aproximadamente el 90%.

15 Cuando los conjugados peptídicos son puros en más de aproximadamente el 90%, sus purezas también se expresan preferiblemente como un intervalo. El límite inferior del intervalo de pureza es de aproximadamente el 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 96% o aproximadamente el 98%. El límite superior del intervalo de pureza es de aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 100% de pureza.

20 Se determina la pureza mediante cualquier método de análisis reconocido en la técnica (por ejemplo, intensidad de bandas en un gel teñido con plata, electroforesis en gel de poli(acrilamida), HPLC, o un medio similar).

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

30 “Homogeneidad”, se refiere a la consistencia estructural a través de una población de restos aceptores con los que se conjugan los azúcares modificados. Por tanto, en un conjugado peptídico de la invención en el que cada resto de azúcar modificado se conjuga con un sitio aceptor que tiene la misma estructura que el sitio aceptor con el que se conjuga cada segundo azúcar modificado, se dice que el conjugado peptídico es homogéneo en aproximadamente el 100%. La homogeneidad se expresa normalmente como un intervalo. El límite inferior del intervalo de homogeneidad para los conjugados peptídicos es de aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70% o aproximadamente el 80% y el límite superior del intervalo de pureza es de aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% o más de aproximadamente el 90%.

35 Cuando los conjugados peptídicos son homogéneos en más de o igual a aproximadamente el 90%, su homogeneidad también se expresa preferiblemente como un intervalo. El límite inferior del intervalo de homogeneidad es de aproximadamente el 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 96% o aproximadamente el 98%. El límite superior del intervalo de pureza es de aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 100% de homogeneidad. La pureza de los conjugados peptídicos se determina normalmente mediante uno o más métodos que conocen los expertos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM), espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF), electroforesis capilar, y similares.

40 “Glicoforma sustancialmente uniforme” o un “patrón de glicosilación sustancialmente uniforme”, cuando se hace referencia a una especie de glicopéptido, se refiere al porcentaje de restos aceptores que se glicosilan por la glicosiltransferasa de interés (por ejemplo, fucosiltransferasa). Por ejemplo, en el caso de una α 1,2-fucosiltransferasa, existe un patrón de glicosilación sustancialmente uniforme si sustancialmente la totalidad (tal como se define a continuación) de Gal β 1,4-GlcNAc-R y análogos sialilados de los mismos se fucosilan en un conjugado peptídico de la invención. En las estructuras fucosiladas expuestas en el presente documento, la unión Fuc-GlcNAc es generalmente α 1,6 o α 1,3, prefiriéndose generalmente α 1,6. Un experto en la técnica entenderá que el material de partida puede contener restos aceptores glicosilados (por ejemplo, restos Gal β 1,4-GlcNAc-R fucosilados). Por tanto, el porcentaje de glicosilación calculado incluirá los restos aceptores que se glicosilan mediante los métodos de la invención, así como aquellos restos aceptores ya glicosilados en el material de partida.

45 El término “sustancialmente” en las definiciones anteriores de “sustancialmente uniforme” significa generalmente que al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, o más

preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de los restos aceptores para una glicosiltransferasa particular están glicosilados.

5 Cuando se especifican grupos sustituyentes mediante sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos, que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{O}-$ también pretende mencionar $-\text{OCH}_2-$.

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

20 El término "alquileo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, tal como se ejemplifica, pero no se limita, mediante $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, e incluye además aquellos grupos descritos a continuación como "heteroalquileo". Normalmente, un grupo alquilo (o alquileo) tendrá desde 1 hasta 24 átomos de carbono, prefiriéndose aquellos grupos que tienen 10 átomos de carbono o menos en la presente invención. Un "alquilo inferior" o "alquileo inferior" es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, generalmente que tiene ocho átomos de carbono o menos.

25 Los términos "alcoxilo", "alquilamino" y "alquilitio" (o tioalcoxilo) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos a la parte restante de la molécula mediante un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

30 El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se establezca de otro modo, un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, o cíclico, estable, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número establecido de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y de azufre pueden oxidarse opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede cuaternizarse opcionalmente. El/los heteroátomo(s) O, N y S y Si pueden situarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo se une a la parte restante de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)}_2\text{-CH}_3$, $-\text{CH=CHO-CH}_3$, $-\text{Si(CH}_3\text{)}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH=N-OCH}_3$ y $-\text{CH=CH-N(CH}_3\text{)-CH}_3$. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{-NH-OCH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{-O-Si(CH}_3\text{)}_3$. De manera similar, el término "heteroalquileo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, tal como se ejemplifica, pero no se limita mediante $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2-$. Para grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos terminales de cadena (por ejemplo, alquileoóxido, alquileoóxido, alquilenamino, alquilendiamino, y similares). Todavía adicionalmente, para grupos de unión de alquileo y heteroalquileo, no se implica ninguna orientación del grupo de unión mediante el sentido en que se escribe la fórmula del grupo de unión. Por ejemplo, la fórmula $-\text{C(O)}_2\text{R}'$ representa tanto $-\text{C(O)}_2\text{R}'$ como $-\text{R}'\text{C(O)}_2-$.

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

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

55 El término "arilo" significa, a menos que se establezca de otro modo, un sustituyente poliinsaturado, aromático que puede ser un único anillo o múltiples anillos (preferiblemente desde 1 hasta 3 anillos), que se condensan conjuntamente o se unen covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen desde uno hasta cuatro heteroátomos seleccionados de N, O y S, en los que los átomos de nitrógeno y de azufre se oxidan opcionalmente, y el/los átomo(s) de nitrógeno se cuaternizan opcionalmente. Un grupo heteroarilo puede

unirse a la parte restante de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitativos de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalino, 5-quinoxalino, 3-quinolilo, tetrazolilo, benzo[b]furanilo, benzo[b]tienilo, 2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-ilo, benzo[1,3]dioxol-5-ilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo de arilo y heteroarilo se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación.

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

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

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos denominados a menudo alquilenilo, alqueno, heteroalquilenilo, heteroalqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno y heterocicloalqueno) se denominan genéricamente "sustituyentes de grupo alquilo", y pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de, pero sin limitarse a: $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R'')=NR'''$, $-NR-C(NR'R'')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$ en un número que oscila entre cero y $(2m'+1)$, donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. R' , R'' , R''' y R'''' se refieren cada uno de manera preferiblemente independiente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxilo o tioalcoxilo o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son cada uno de los grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' se unen al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 ó 7-miembros. Por ejemplo, $-NR'R''$ pretende incluir, pero sin limitarse a, 1-pirrolidino y 4-morfolino. A partir del comentario anterior de sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acilo (por ejemplo, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$, y similares).

De manera similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se denominan genéricamente "sustituyentes de grupo arilo". Los sustituyentes se seleccionan de, por ejemplo: $halógeno$, $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R'')=NR'''$, $-NR-C(NR'R'')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, fluoroalcoxilo (C_1-C_4) y fluoroalquilo (C_1-C_4), en un número que oscila entre cero y el número total de valencias libres en el sistema de anillos aromáticos; y en los que R' , R'' , R''' y R'''' preferiblemente se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R , por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como lo son cada uno de los grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. En los esquemas que siguen, el símbolo X representa " R " tal como se describió anteriormente.

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente por un sustituyente de fórmula $-T-C(O)-(CRR')_u-U-$, en la que T y U son independientemente $-NR-$, $-O-$, $-CRR'-$ o un enlace sencillo, y u es un número entero de desde 0 hasta 3. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente por un sustituyente de fórmula $-A-(CH_2)_r-B-$, en la que A y B son independientemente $-CRR'-$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'-$ o un enlace sencillo, y r es un número entero de desde 1 hasta 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede reemplazarse opcionalmente por un doble enlace. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente por un sustituyente de fórmula $-(CRR')_z-X-(CR''R''')_d-$, en la que z y d son independientemente números enteros de desde 0 hasta 3, y X es $-O-$, $-NR'-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$ o $-S(O)_2NR'-$. Los sustituyentes R , R' , R'' y R''' preferiblemente se seleccionan independientemente de hidrógeno o alquilo (C_1-C_6) sustituido o no sustituido.

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

Tal como se usa en el presente documento, péptido del factor VII se refiere a péptidos tanto del factor VII como del

factor VIIa. Los términos se refieren generalmente a variantes y mutantes de estos péptidos, incluyendo mutantes de adición, delección, sustitución y proteína de fusión. Cuando se usan tanto el factor VII como el factor VIIa, el uso pretende ser ilustrativo de dos especies del género "péptido del factor VII".

5 La invención pretende incluir sales de los compuestos de la invención que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares que se encuentran en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, pueden obtenerse sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, o bien pura o bien en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de base incluyen sal de sodio, potasio, litio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, o bien puro o bien en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También están incluidas sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como los ácidos glucurónico o galactunórico y similares (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Science* 66: 1-19 (1977)). Determinados compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de o bien base o bien ácido.

25 Las formas neutras de los compuestos se regeneran preferiblemente poniendo en contacto la sal con una base o un ácido y aislando los compuestos originales de la manera convencional. La forma original del compuesto difiere de las diversas formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares.

"Contraión de sal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a iones cargados positivamente que se asocian con un compuesto de la invención cuando uno de sus restos está cargado negativamente (por ejemplo, COO⁻). Los ejemplos de contraiones de sal incluyen H⁺, H₃O⁺, amonio, potasio, calcio, litio, magnesio y sodio.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "CMP-SA-PEG" es una molécula de citidina monofosfato que se conjuga con un ácido siálico que comprende un resto polietilenglicol. Si no se especifica una longitud de la cadena de polietilenglicol, entonces es posible cualquier longitud de cadena de PEG (por ejemplo 1 kD, 2 kD, 5 kD, 10 kD, 20 kD, 30 kD, 40 kD). Un CMP-SA-PEG a modo de ejemplo es el compuesto 5 en el esquema 1.

1. Introducción

35 Para mejorar la eficacia de péptidos recombinantes usados para fines terapéuticos, la presente invención proporciona conjugados de péptidos glicosilados y no glicosilados con un grupo de modificación. Los grupos de modificación pueden seleccionarse de grupos de modificación poliméricos tales como, por ejemplo, PEG (m-PEG), PPG (m-PPG), etc., restos terapéuticos, restos de diagnóstico, restos de direccionamiento y similares. La modificación de los péptidos, por ejemplo, con un grupo de modificación polimérico soluble en agua puede mejorar la estabilidad y el tiempo de retención de los péptidos recombinantes en la circulación de un paciente, y/o reducir la antigenicidad de péptidos recombinantes.

Los conjugados peptídicos de la invención pueden formarse mediante la unión enzimática de un azúcar modificado al péptido glicosilado o no glicosilado. Un sitio de glicosilación y/o un grupo glicosilo modificado proporcionan un locus para conjugar un azúcar modificado que porta un grupo de modificación con el péptido, por ejemplo, mediante glicoconjugación.

45 Los métodos de la invención también hacen que sea posible ensamblar conjugados peptídicos y conjugados glicopeptídicos que tienen un patrón de derivatización sustancialmente homogéneo. Las enzimas usadas en la invención son generalmente selectivas para un residuo de aminoácido particular, combinación de residuos de aminoácido, residuos glicosilo particulares, o combinación de residuos glicosilo del péptido. Los métodos también son prácticos para la producción a gran escala de conjugados peptídicos. Por tanto, los métodos de la invención proporcionan un medio práctico para la preparación a gran escala de conjugados peptídicos que tienen patrones de derivatización uniformes preseleccionados. Los métodos son particularmente muy adecuados para la modificación de péptidos terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a, glicopéptidos que se glicosilan de manera incompleta durante la producción en células en cultivo celular (por ejemplo, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, células fúngicas, células de levadura o células procariontas) o plantas o animales transgénicos.

55 La presente invención también proporciona conjugados de péptidos glicosilados y no glicosilados con semivida terapéutica aumentada debido a, por ejemplo, tasa de aclaramiento reducida o tasa de captación reducida por el sistema inmunitario o reticuloendotelial (SRE). Además, los métodos de la invención proporcionan un medio para enmascarar determinantes antigénicos en péptidos, reduciendo o eliminando por tanto la respuesta inmunitaria de

un huésped frente al péptido. La unión selectiva de agentes de direccionamiento también puede usarse para direccionar un péptido a un tejido particular o receptor de superficie celular que es específico para el agente de direccionamiento particular.

5 La determinación de condiciones óptimas para la preparación de conjugados peptídicos con polímeros solubles en agua, por ejemplo, implica la optimización de numerosos parámetros, que dependen de la identidad del péptido y del polímero soluble en agua. Por ejemplo, cuando el polímero es poli(etilenglicol), por ejemplo, un poli(etilenglicol) ramificado, preferiblemente se establece un equilibrio entre la cantidad de polímero utilizada en la reacción y la viscosidad de la mezcla de reacción que puede atribuirse a la presencia del polímero: si el polímero está demasiado concentrado, la mezcla de reacción se vuelve viscosa, ralentizando la velocidad de transferencia másica y reacción.

10 Además, aunque resulta evidente intuitivamente añadir un exceso de enzima, los presentes inventores han reconocido que, cuando la enzima está presente en un exceso demasiado grande, la enzima en exceso se convierte en un contaminante cuya retirada requiere etapas de purificación y material extra y aumenta innecesariamente los costes del producto final.

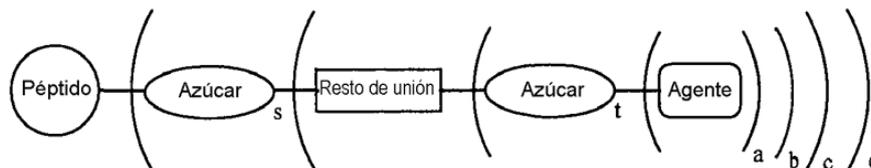
15 Además, generalmente se desea producir un péptido con un nivel controlado de modificación. En algunos casos, se desea añadir un azúcar modificado preferentemente. En otros casos, se desea añadir dos azúcares modificados preferentemente. Por tanto, las condiciones de reacción se controlan preferiblemente para influir en el grado de conjugación de los grupos de modificación con el péptido.

20 La presente invención proporciona condiciones en las que se maximiza el rendimiento de un péptido, que tiene el nivel deseado de conjugación. Las condiciones en las realizaciones a modo de ejemplo de las invenciones también reconocen el gasto de los diversos reactivos y los materiales y el tiempo necesarios para purificar el producto: las condiciones de reacción expuestas en el presente documento se optimizan para proporcionar rendimientos excelentes del producto deseado, mientras que se minimiza el derroche de reactivos costosos.

II. Las composiciones de material/conjugados peptídicos

25 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado entre un azúcar modificado y un péptido. La presente invención también proporciona un conjugado entre un grupo de modificación y un péptido. Un conjugado peptídico puede tener una de varias formas. En una realización a modo de ejemplo, un conjugado peptídico puede comprender un péptido y un grupo de modificación unido a un aminoácido del péptido a través de un grupo de unión de glicosilo. En otra realización a modo de ejemplo, un conjugado peptídico puede comprender un péptido y un grupo de modificación unido a un glicosilo reside del péptido a través de un grupo de unión de glicosilo. En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico puede comprender un péptido y un grupo de modificación que se une tanto a un hidrato de carbono glicopeptídico como directamente a un residuo de aminoácido de la estructura principal del péptido. En aún otra realización a modo de ejemplo, un conjugado peptídico puede comprender un péptido y un grupo de modificación unido directamente a un residuo de aminoácido del péptido. En esta realización, el conjugado peptídico puede no comprender un grupo glicosilo. En cualquiera de estas realizaciones, el péptido puede estar glicosilado o no.

Los conjugados de la invención corresponderán normalmente a la estructura general:

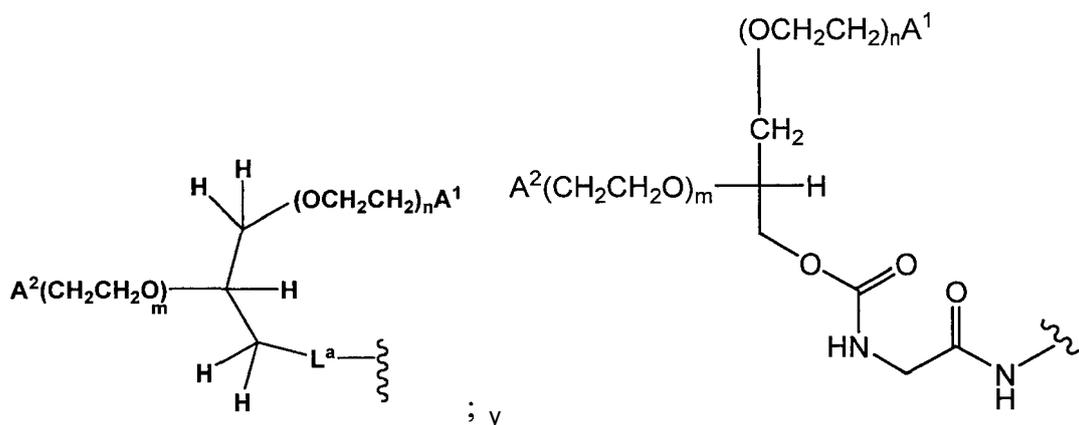


40 en la que los símbolos a, b, c, d y s representan un número entero positivo, distinto de cero; y t es o bien 0 o bien un número entero positivo. El "agente", o grupo de modificación, puede ser un agente terapéutico, un agente bioactivo, un marcador detectable, un grupo de modificación polimérico tal como un polímero soluble en agua (por ejemplo, PEG, m-PEG, PPG y m-PPG) o similar. El "agente", o grupo de modificación, puede ser un péptido, por ejemplo, enzima, anticuerpo, antígeno, etc. El resto de unión puede ser cualquiera de una amplia serie de grupos de unión, anteriormente citados. Alternativamente, el resto de unión puede ser un enlace sencillo o un "resto de unión de orden cero".

45 *II. A. Péptido*

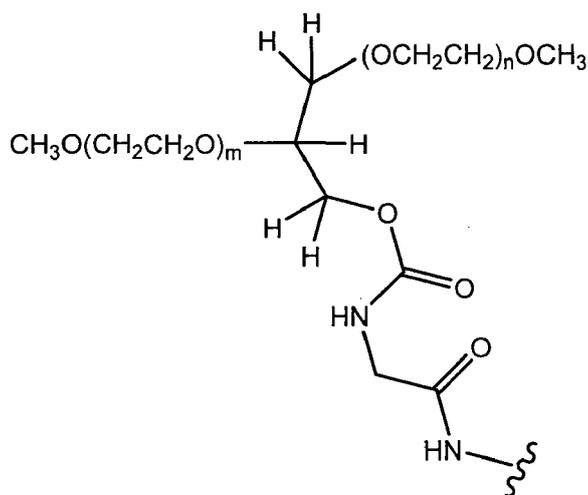
El péptido en el conjugado peptídico es el factor IX.

En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación polimérico tiene una estructura que incluye un resto según las siguientes fórmulas:



En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5000, preferiblemente de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 4000, más preferiblemente de desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 3000, incluso más preferiblemente de desde aproximadamente 300 hasta aproximadamente 2000 y todavía más preferiblemente de desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 1000. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 70, de aproximadamente 70 a aproximadamente 150, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250, de aproximadamente 250 a aproximadamente 375 y de aproximadamente 375 a aproximadamente 500. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 35, de aproximadamente 45 a aproximadamente 65, de aproximadamente 95 a aproximadamente 130, de aproximadamente 210 a aproximadamente 240, de aproximadamente 310 a aproximadamente 370 y de aproximadamente 420 a aproximadamente 480. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 65. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 130. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 210 hasta aproximadamente 240. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 310 hasta aproximadamente 370. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 430 hasta aproximadamente 470. En una realización a modo de ejemplo, A¹ y A² son cada uno miembros seleccionados de -OH y -OCH₃.

Los grupos de modificación poliméricos a modo de ejemplo según esta realización incluyen el resto:



En una realización a modo de ejemplo, en la que el grupo de modificación es un polímero ramificado soluble en agua, tal como aquellos mostrados anteriormente, se prefiere generalmente que la concentración de sialidasa sea de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 U/l de mezcla de reacción. Más preferiblemente la cantidad de sialidasa es de aproximadamente 2 U/l.

En otra realización a modo de ejemplo, se ponen en contacto de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 gramos

de sustrato peptídico con las cantidades de sialidasa expuestas anteriormente.

El azúcar modificado está presente en la mezcla de reacción en una cantidad de desde aproximadamente 1 gramo hasta aproximadamente 6 gramos, preferiblemente desde aproximadamente 3 gramos hasta aproximadamente 4 gramos. Se prefiere generalmente mantener la concentración de un azúcar modificado que tiene un resto de modificación de polímero ramificado soluble en agua, por ejemplo, el resto mostrado anteriormente, a menos de aproximadamente 0,5 mM.

En determinadas realizaciones, el grupo de modificación es un poli(óxido de alquileo) ramificado, por ejemplo, poli(etilenglicol), que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 20 kD hasta aproximadamente 60 kD, más preferiblemente, de desde aproximadamente 30 kD hasta aproximadamente 50 kD, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 40 kD. En otras realizaciones, el grupo de modificación es un poli(óxido de alquileo) ramificado, por ejemplo, poli(etilenglicol), que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 80 kD, preferiblemente al menos aproximadamente 100 kD, más preferiblemente al menos aproximadamente 120 kD, al menos aproximadamente 140 kD o al menos aproximadamente 160 kD. En aún otra realización, el poli(óxido de alquileo) ramificado, por ejemplo, poli(etilenglicol) es al menos de aproximadamente 200 kD, tal como desde al menos aproximadamente 80 kD hasta al menos aproximadamente 200 kD, incluyendo al menos aproximadamente 160 kD y al menos aproximadamente 180 kD. Tal como apreciarán los expertos, el peso molecular de los polímeros es a menudo polidisperso, por tanto, la expresión "aproximadamente" en el contexto del peso molecular abarca preferiblemente un intervalo de valores alrededor del número establecido. Por ejemplo, un grupo de modificación preferido que tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kD es uno que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 35 kD hasta aproximadamente 45 kD. Los expertos apreciarán que la base de estructuras de PEG ramificadas expuestas anteriormente es simplemente por claridad de ilustración, el PEG puede reemplazarse sustancialmente por cualquier resto polimérico, incluyendo, sin limitación aquellas especies expuestas en la definición de "resto polimérico" que se encuentra en el presente documento.

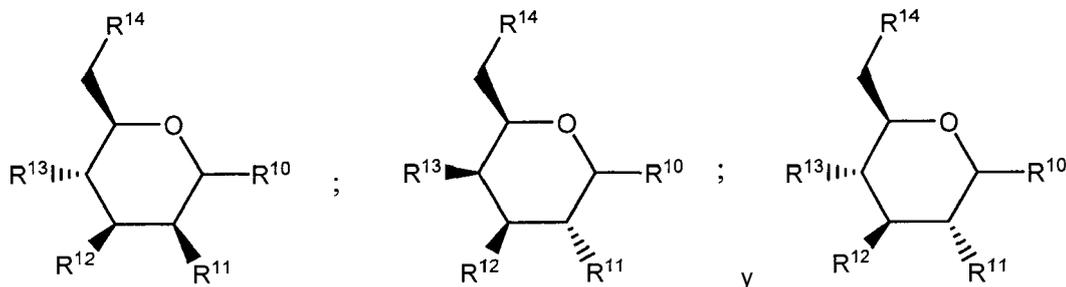
Con respecto a la concentración de la glicosiltransferasa, en una realización preferida actualmente, usando el grupo de modificación expuesto anteriormente, la razón de glicosiltransferasa con respecto a péptido es de aproximadamente 40 µg/ml de transferasa con respecto a aproximadamente 200 µM de péptido.

II. B. Azúcar modificado

En una realización a modo de ejemplo, los péptidos de la invención, concretamente el factor IX enumerado en la figura 7, se hacen reaccionar con un azúcar modificado, formándose por tanto un conjugado peptídico. Un azúcar modificado comprende un "resto donador de azúcar" así como un "resto de transferencia de azúcar". El resto donador de azúcar es cualquier parte del azúcar modificado que se unirá al péptido, o bien a través de un resto glicosilo o bien un resto de aminoácido, como conjugado de la invención. El resto donador de azúcar incluye aquellos átomos que se alteran químicamente durante su conversión del azúcar modificado al grupo de unión de glicosilo del conjugado peptídico. El resto de transferencia de azúcar es cualquier parte del azúcar modificado que no se unirá al péptido como conjugado de la invención. Por ejemplo, un azúcar modificado de la invención es el nucleótido de azúcar pegilado, PEG-ácido siálico-CMP. Para PEG-ácido siálico-CMP, el resto donador de azúcar, o resto donador de PEG-sialilo, comprende PEG-ácido siálico mientras que el resto de transferencia de azúcar, o resto de transferencia de sialilo, comprende CMP.

En azúcares modificados de uso en la invención, el resto sacarilo es preferiblemente un sacárido, un desoxi-sacárido, un amino-sacárido o un N-acil-sacárido. El término "sacárido" y sus equivalentes, "sacarilo", "azúcar", y "glicosilo" se refieren a monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros. El resto de azúcar también se funcionaliza con un grupo de modificación. El grupo de modificación se conjuga con el resto sacarilo, normalmente, a través de conjugación con una resto de amina, sulfhidrilo o hidroxilo, por ejemplo, hidroxilo primario, en el azúcar. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación se une a través de un resto de amina en el azúcar, por ejemplo, a través de una amida, un uretano o una urea que se forma a través de la reacción de la amina con un derivado reactivo del grupo de modificación.

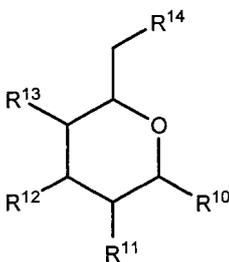
Cualquier resto sacarilo puede utilizarse como el resto donador de azúcar del azúcar modificado. El resto sacarilo puede ser un azúcar conocido, tal como manosa, galactosa o glucosa, o una especie que tiene la estereoquímica de un azúcar conocido. Las fórmulas generales de estos azúcares modificados son:



Otros restos sacarilo que son útiles en la formación de las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a fucosa y ácido siálico, así como aminoazúcares tales como glucosamina, galactosamina, manosamina, el análogo de 5-amina del ácido siálico y similares. El resto sacarilo puede ser una estructura que se encuentra en la naturaleza o puede modificarse para proporcionar un sitio para conjugar el grupo de modificación. Por ejemplo, en una realización, el azúcar modificado proporciona un derivado de ácido siálico en el que el resto 9-hidroxilo se reemplaza por una amina. La amina se derivatiza fácilmente con un análogo activado de un grupo de modificación seleccionado.

Se describen ejemplos de azúcares modificados de uso en la invención en la solicitud de patente PCT n.º PCT/US05/002522.

En una realización a modo de ejemplo adicional, la invención utiliza azúcares modificados en los que la posición 6-hidroxilo se convierte en el resto de amina correspondiente, que porta un casete de resto de unión-grupo de modificación tal como los expuestos anteriormente. Los grupos glicosilo a modo de ejemplo que pueden usarse como el núcleo de estos azúcares modificados incluyen Glu, Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc, Fuc, Xyl, Man, y similares. Un azúcar modificado representativo según esta realización tiene la fórmula:

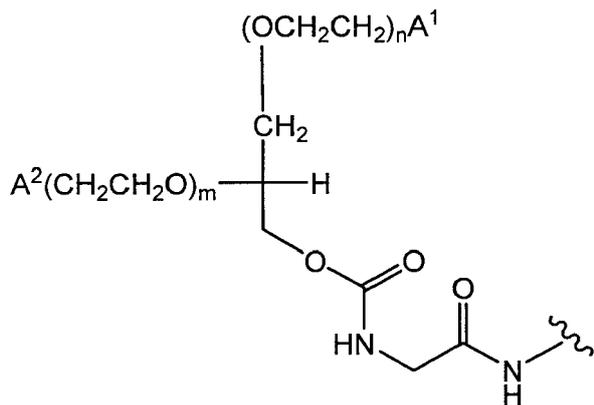


en la que R¹¹-R¹⁴ son miembros seleccionados independientemente de H, OH, C(O)CH₃, NH y NHC(O)CH₃. R¹⁰ es una unión a otro residuo glicosilo (-O-glicosilo) o a un aminoácido del péptido del factor VII/factor VIIa (-NH-(factor VII/factor VIIa)). R¹⁴ es OR¹, NHR¹ o NH-L-R¹. R¹ y NH-L-R¹ son tal como se describieron anteriormente.

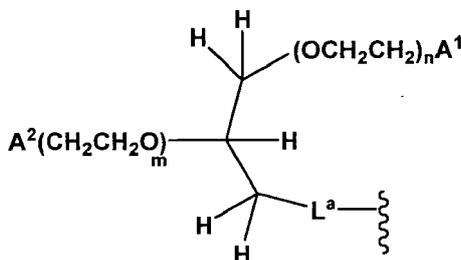
II. C. Grupos de unión de glicosilo

En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un conjugado peptídico formado entre un azúcar modificado de la invención y un péptido. El péptido en el conjugado peptídico es el factor IX.

En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación polimérico incluye un resto que tiene una estructura según las siguientes fórmulas:

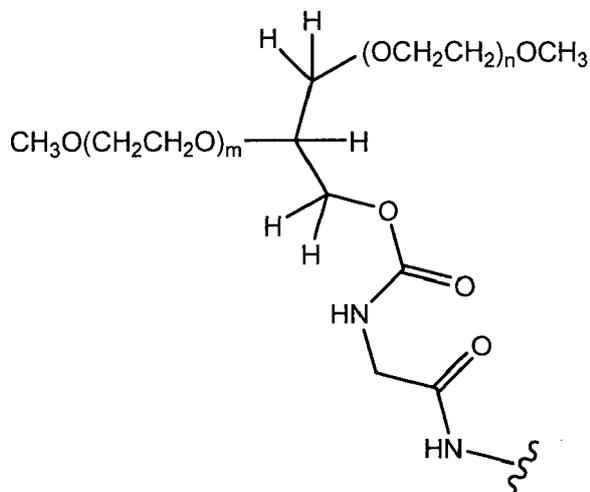


En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación en el azúcar modificado incluye el resto:



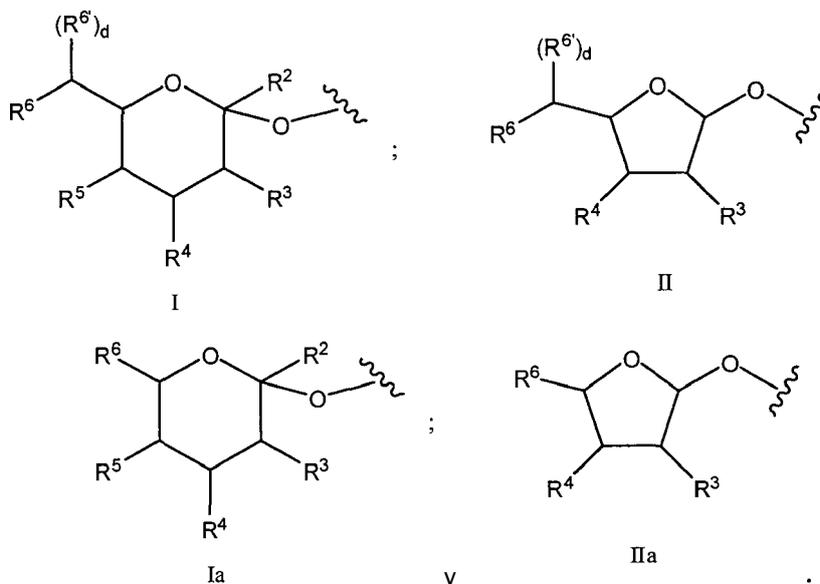
A¹ y A² son cada uno -OCH₃.

Los grupos de modificación poliméricos a modo de ejemplo según esta realización incluyen el resto:



Debido a la versatilidad de los métodos disponibles para añadir y/o modificar residuos glicosilo en un péptido, los grupos de unión de glicosilo pueden tener sustancialmente cualquier estructura. En el comentario que sigue, la invención se ilustra mediante referencia al uso de derivados seleccionados de furanosa y piranosa. Los expertos en la técnica reconocerán que el centro de atención del comentario es para mayor claridad de ilustración y que las estructuras y composiciones expuestas pueden aplicarse generalmente a través del género de grupos de unión de glicosilo y azúcares modificados. El grupo de unión de glicosilo puede comprender virtualmente cualquier mono u oligosacárido. Los grupos de unión de glicosilo pueden unirse a un aminoácido o bien a través de la cadena lateral o bien a través de la estructura principal del péptido. Alternativamente, los grupos de unión de glicosilo puede unirse al péptido a través de un resto sacarilo. Este resto sacarilo puede ser una parte de una estructura de glicano unida en O o unida en N en el péptido.

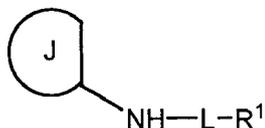
También se da a conocer un conjugado peptídico que comprende un grupo de unión de glicosilo intacto que tiene una fórmula que se selecciona de:



En las fórmulas I e Ia, R² es H, CH₂OR⁷, COOR⁷ u OR⁷, en los que R⁷ representa H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido. Cuando COOR⁷ es un ácido carboxílico o carboxilato, ambas formas están representadas por la designación de la estructura sencilla COO⁻ o COOH. En las fórmulas I, Ia, II o IIa, los símbolos R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁶ representan independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido, OR⁸, NHC(O)R⁹. El índice d es 0 ó 1. R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, ácido siálico o poli(ácido siálico). Al menos uno de R³, R⁴, R⁵, R⁶ o R⁶ incluye un grupo de modificación. Este grupo de modificación puede ser un resto de modificación polimérico por ejemplo, PEG, unido a través de un enlace o un grupo de unión. En una realización a modo de ejemplo, R⁶ y R⁶, junto con el carbono al

que están unidos son componentes de la cadena lateral de piruvilo del ácido siálico. En una realización a modo de ejemplo adicional, la cadena lateral de piruvilo se funcionaliza con el grupo de modificación polimérico. En otra realización a modo de ejemplo, R^6 y R^6 , junto con el carbono al que están unidos son componentes de la cadena lateral de ácido siálico y el grupo de modificación polimérico es un componente de R^5 .

- 5 En una realización a modo de ejemplo, la invención utiliza un grupo de unión de glicosilo que tiene la fórmula:



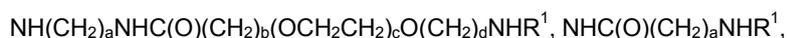
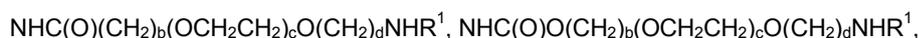
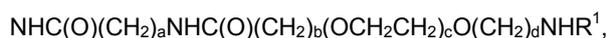
10 en la que J es un resto glicosilo, L es un enlace o un resto de unión y R^1 es un grupo de modificación, por ejemplo, un grupo de modificación polimérico. Enlaces a modo de ejemplo son aquellos que se forman entre un resto NH_2 en el resto glicosilo y un grupo de reactividad complementaria en el grupo de modificación. Por ejemplo, cuando R^1 incluye un resto ácido carboxílico, este resto puede activarse y acoplarse con el resto NH_2 en el residuo glicosilo proporcionando un enlace que tiene la estructura NHC(O)R^1 . J es preferiblemente un resto glicosilo que está "intacto", que no se ha degradado mediante la exposición a condiciones que escinden la estructura de piranosa o furanosa, por ejemplo condiciones oxidativas, por ejemplo, peryodato de sodio.

15 Los restos de unión a modo de ejemplo incluyen restos alquilo y heteroalquilo. Los restos de unión incluyen grupos de unión, por ejemplo grupos de unión basados en acilo, por ejemplo, -C(O)NH- , -OC(O)NH- , y similares. Los grupos de unión son enlaces formados entre componentes de las especies de la invención, por ejemplo, entre el resto glicosilo y el resto de unión (L), o entre el resto de unión y el grupo de modificación (R^1). Otros grupos de unión a modo de ejemplo son éteres, tioéteres y aminas. Por ejemplo, en una realización, el resto de unión es un residuo de aminoácido, tal como un residuo de glicina. El resto ácido carboxílico de la glicina se convierte en la amida correspondiente mediante reacción con una amina en el residuo glicosilo, y la amina de la glicina se convierte en la amida o el uretano correspondiente mediante reacción con un ácido carboxílico o carbonato activado del grupo de modificación.

Una especie a modo de ejemplo de NH-L-R^1 tiene la fórmula:

25 $\text{-NH}\{C(O)(CH_2)_aNH\}_s\{C(O)(CH_2)_b(OCH_2CH_2)_cO(CH_2)_dNH\}_tR^1$, en la que los índices s y t son independientemente 0 ó 1. Los índices a, b y d son independientemente números enteros de desde 0 hasta 20, y c es un número entero de desde 1 hasta 2500. Otros restos de unión similares se basan en especies en las que un resto -NH se reemplaza por otro grupo, por ejemplo, -S , -O o -CH_2 . Tal como apreciarán los expertos uno o más de los restos entre corchetes correspondientes a los índices s y t pueden reemplazarse por un resto alquilo o heteroalquilo sustituido o no sustituido.

30 Más particularmente, la invención utiliza compuestos en los que NH-L-R^1 es:

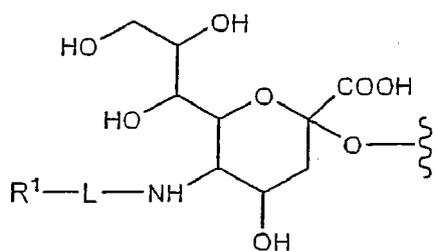


35 $\text{NH(CH}_2)_a\text{NHR}^1$ y NHR^1 . En estas fórmulas, los índices a, b y d se seleccionan independientemente de los números enteros de desde 0 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 5. El índice c es un número entero de desde 1 hasta aproximadamente 2500.

En una realización a modo de ejemplo, c se selecciona de tal manera que el resto PEG es de aproximadamente 1 kD, 5 kD, 10, kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 35 kD, 40 kD o 45 kD.

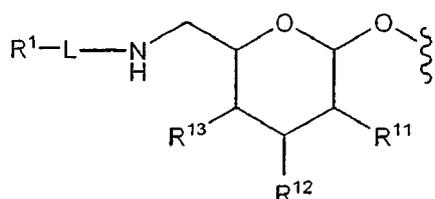
40 Con fines de conveniencia, los grupos de unión de glicosilo en la parte restante de esta sección se basarán en un resto sialilo. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que podría usarse otro resto glicosilo, tal como manosilo, galactosilo, glucosilo o fucosilo, el lugar del resto sialilo.

45 En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un grupo de unión de glicosilo intacto, en el que el resto o restos glicosilo que forman el grupo de unión no se degradan mediante procedimientos químicos (por ejemplo, metaperyodato de sodio) o enzimáticos (por ejemplo, oxidasa). Los conjugados seleccionados de la invención incluyen un grupo de modificación que se une al resto de amina de un amino-sacárido, por ejemplo, manosamina, glucosamina, galactosamina, ácido siálico etc. Los casetes de grupo de modificación-grupo de unión de glicosilo intacto a modo de ejemplo según este motivo se basan en una estructura de ácido siálico, tales como aquellos que tienen las formulas:



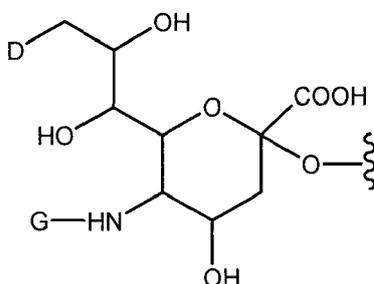
En las fórmulas anteriores, R^1 y L son tal como se describieron anteriormente. A continuación se proporcionan detalles adicionales sobre la estructura de grupos R^1 a modo de ejemplo.

- 5 En todavía una realización a modo de ejemplo adicional, el conjugado se forma entre un péptido y un azúcar modificado en el que el grupo de modificación se une a través de un resto de unión en la posición de carbono 6 del azúcar modificado. Por tanto, grupos de unión de glicosilo ilustrativos según esta realización tienen la fórmula:



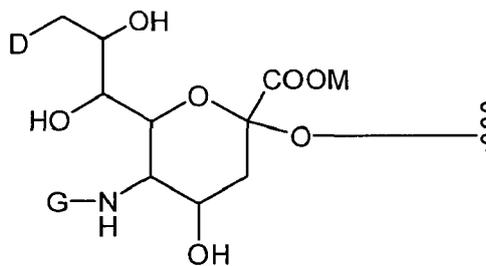
- 10 en la que los radicales son tal como se comentaron anteriormente. Los grupos de unión de glicosilo incluyen, sin limitación, glucosa, glucosamina, N-acetil-glucosamina, galactosa, galactosamina, N-acetilgalactosamina, manosa, manosamina, N-acetil-manosamina, y similares.

En una realización, la presente invención proporciona un conjugado peptídico que comprende el siguiente grupo de unión de glicosilo:



- 15 en el que D es $-OH$; G es un miembro seleccionado de R^1-L- y $-C(O)-$ alquilo (C_1-C_6); R^1 es un resto que comprende un residuo de poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificado; y L es un resto de unión, por ejemplo, un enlace ("orden cero"), alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. En realizaciones a modo de ejemplo, cuando D es OH , G es R^1-L- , y cuando G es $-C(O)-$ alquilo (C_1-C_6), D es $R^1-L-NH-$.

En una realización, la presente invención proporciona un conjugado peptídico que comprende el siguiente grupo de unión de glicosilo:



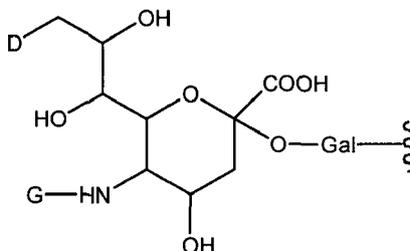
- 20 D es $-OH$; G es un miembro seleccionado de R^1-L- y $-C(O)-$ alquilo (C_1-C_6)- R^1 ; R^1 es un resto que comprende un miembro seleccionado de un residuo de poli(etilenglicol) de cadena lineal y un residuo de poli(etilenglicol) ramificado; y

- 25 M es un miembro seleccionado de H , un contraión de sal y una única carga negativa; L es un resto de unión que es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. En

una realización a modo de ejemplo, cuando D es OH, G es R1-L-. En otra realización a modo de ejemplo, cuando G es -C(O)-alquilo (C1-C6), D es R1-L-NH-.

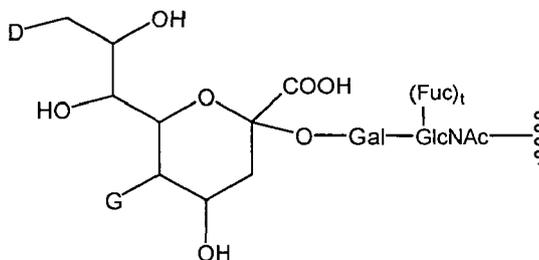
En cualquiera de los compuestos de la invención, un grupo COOH puede ser alternativamente COOM, en el que M es un miembro seleccionado de H, una carga negativa y un contraión de sal.

- 5 La invención proporciona un conjugado peptídico que incluye un grupo de unión de glicosilo que tiene la fórmula:



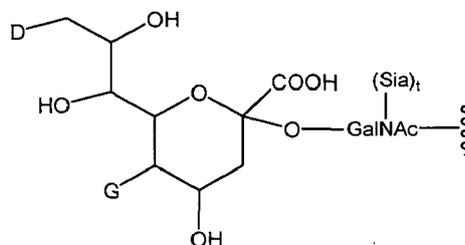
en la que D y G son tal como se describieron anteriormente.

En otras realizaciones, el grupo de unión de glicosilo tiene la fórmula:



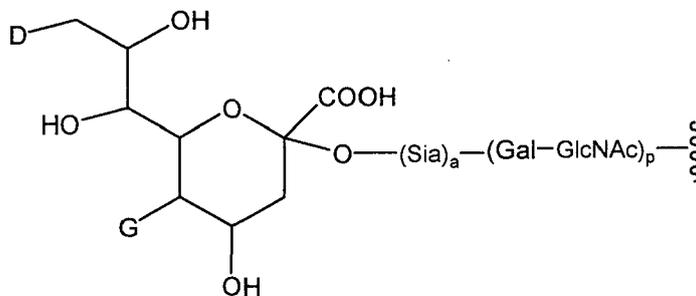
- 10 en la que D y G son tal como se describieron anteriormente y el índice t es 0 ó 1.

En todavía una realización a modo de ejemplo adicional, el grupo de unión de glicosilo tiene la fórmula:



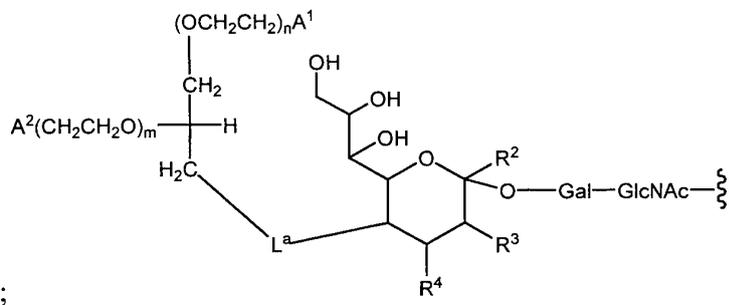
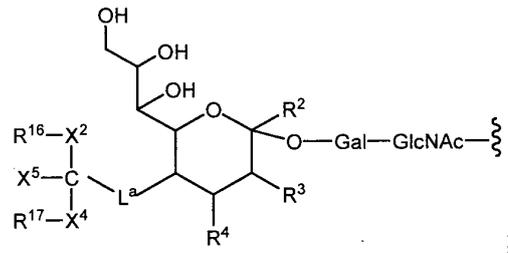
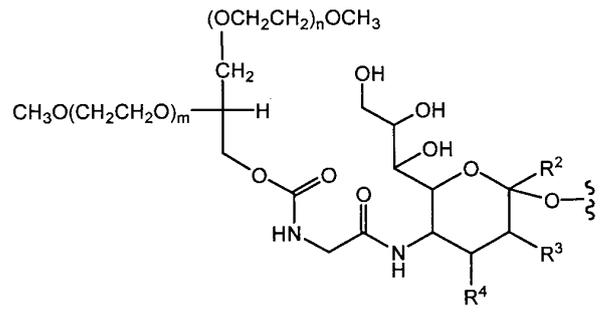
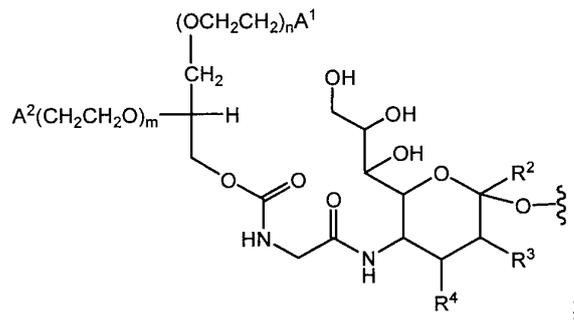
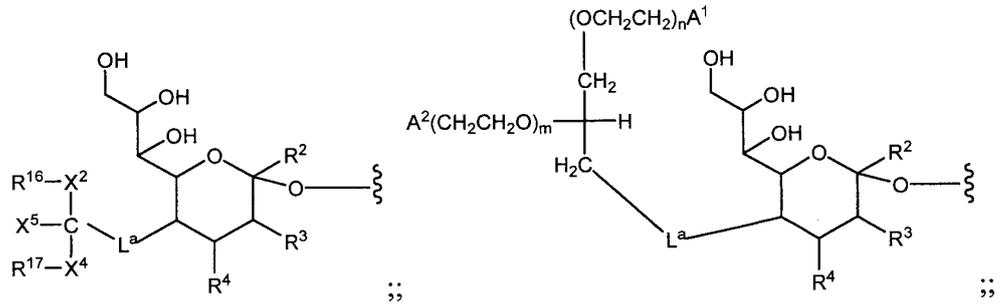
en la que D y G son tal como se describieron anteriormente y el índice t es 0 ó 1.

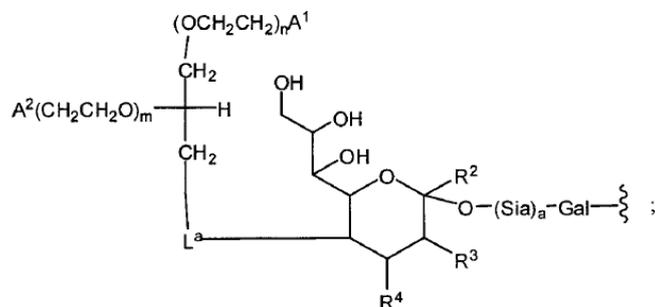
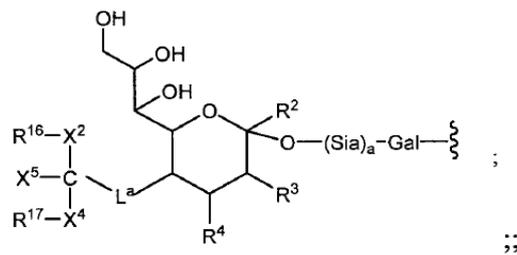
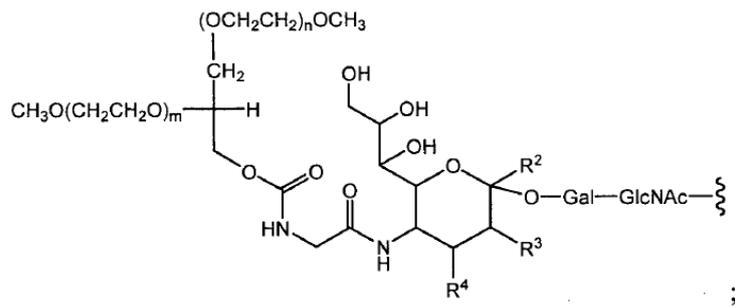
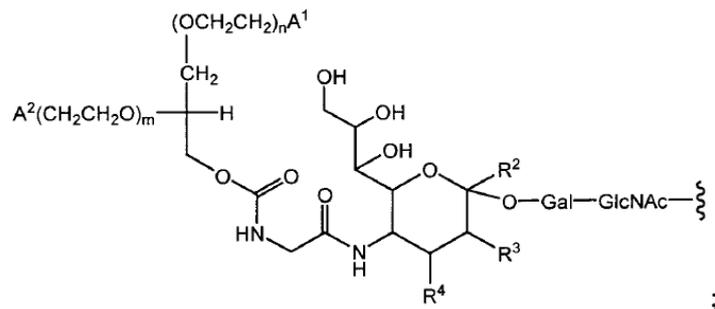
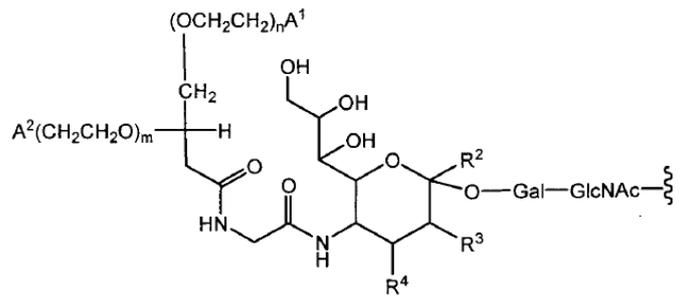
En aún otra realización, el grupo de unión de glicosilo tiene la fórmula:

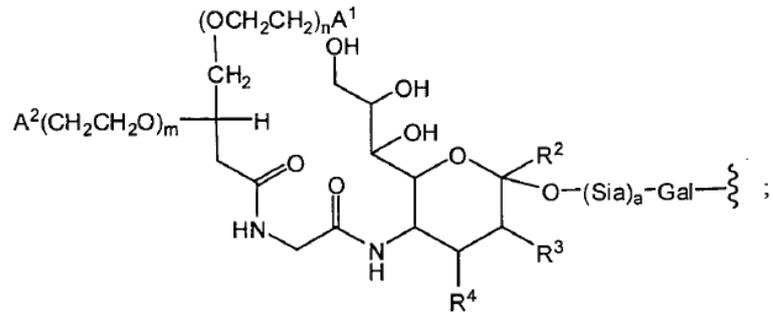


- 15 en la que D y G son tal como se describieron anteriormente y el índice p representa un número entero de desde 1 hasta 10; y a es o bien 0 o bien 1.

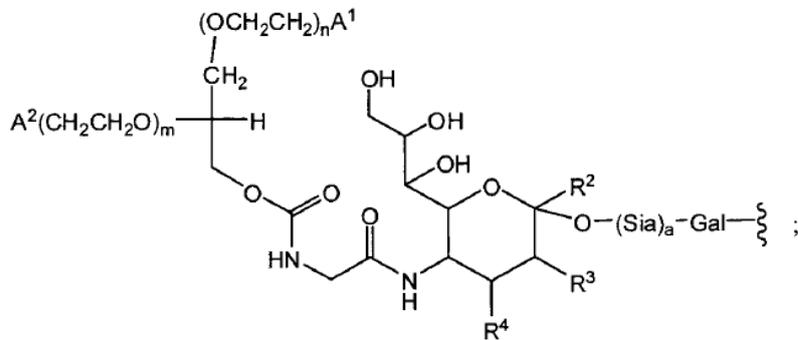
En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende un resto glicosilo seleccionado de las fórmulas:



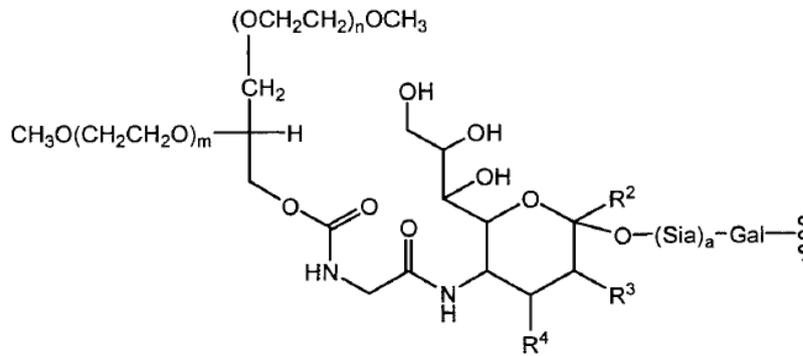




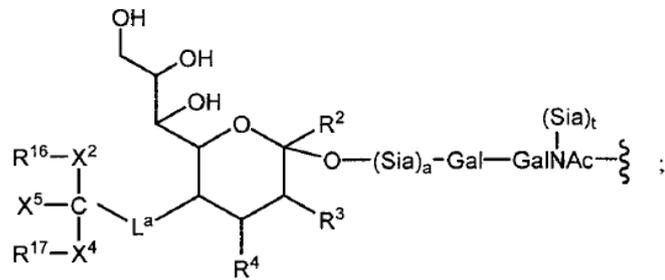
;



;

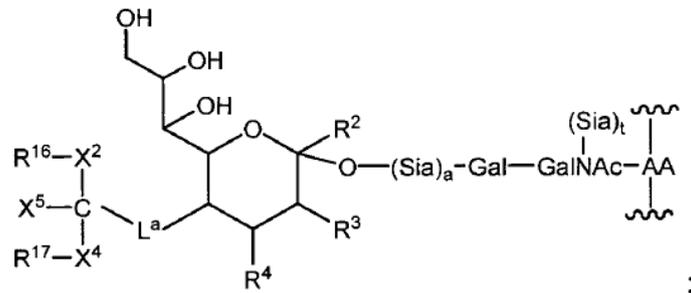
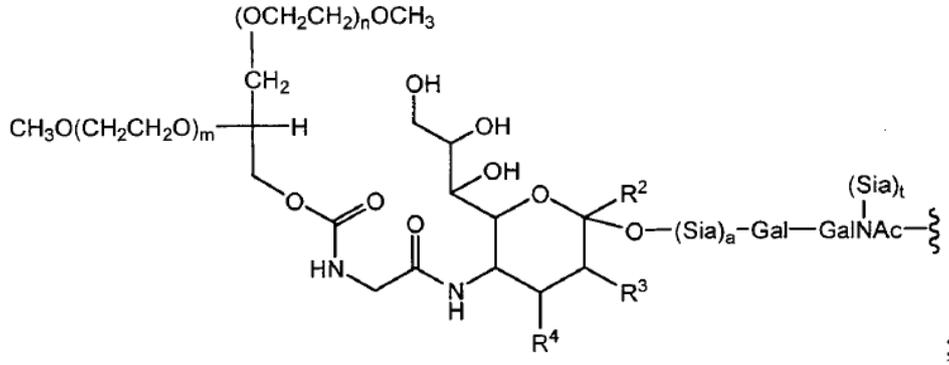
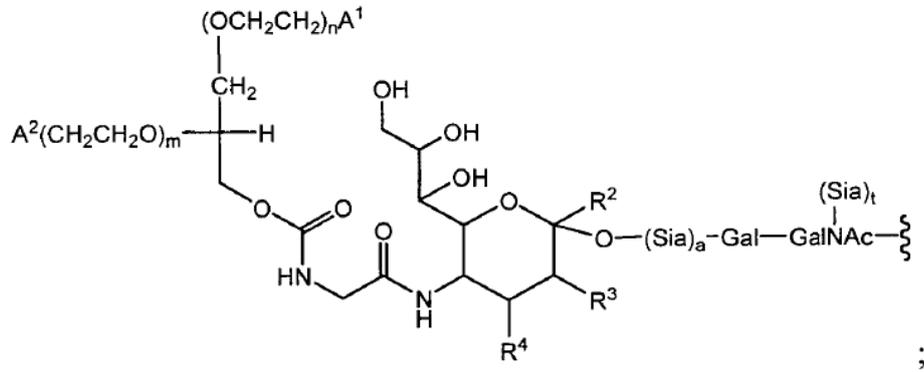
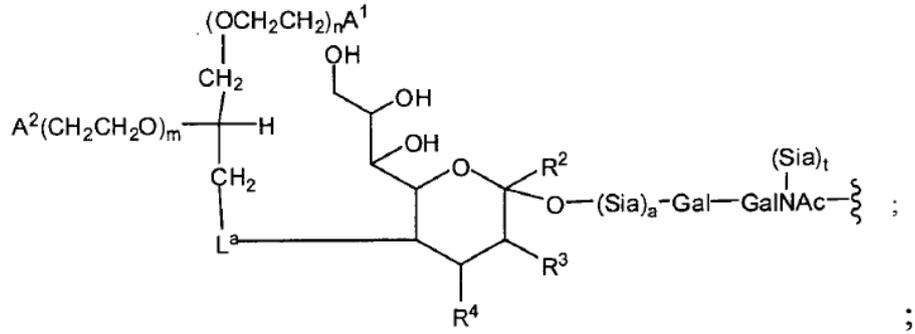


;

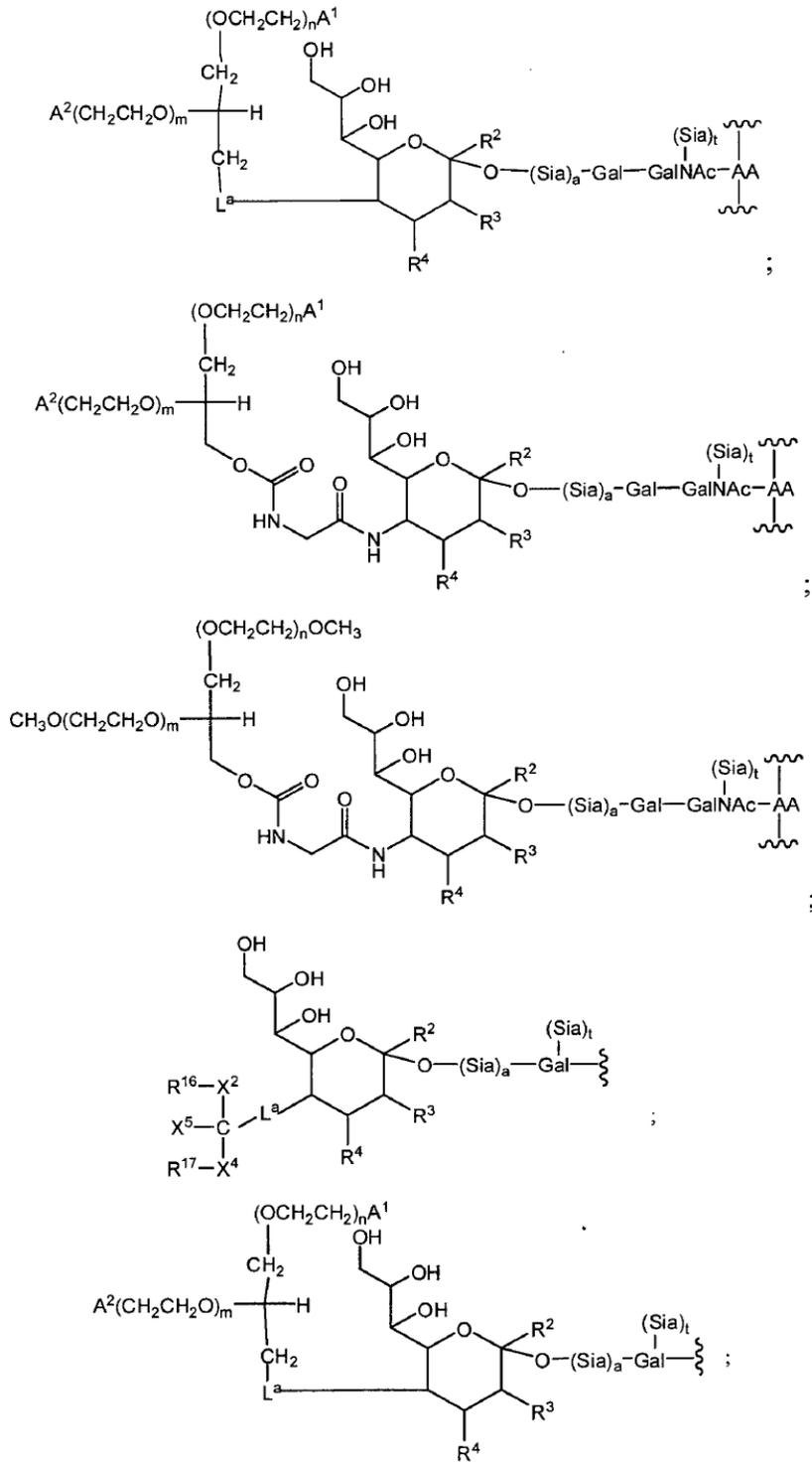


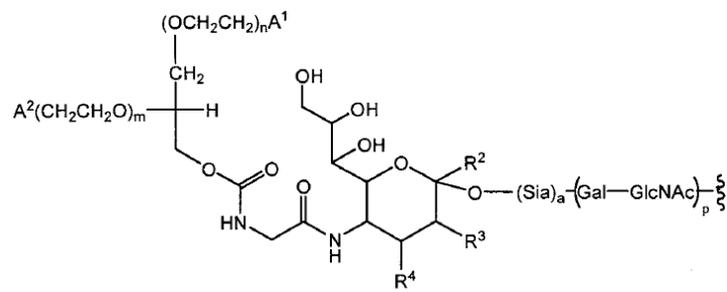
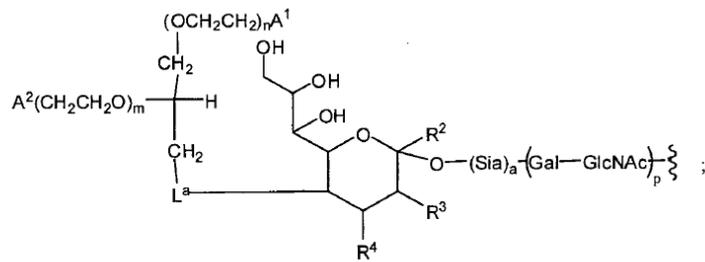
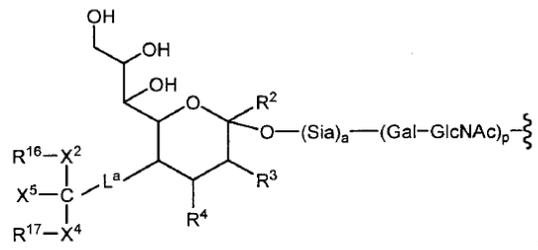
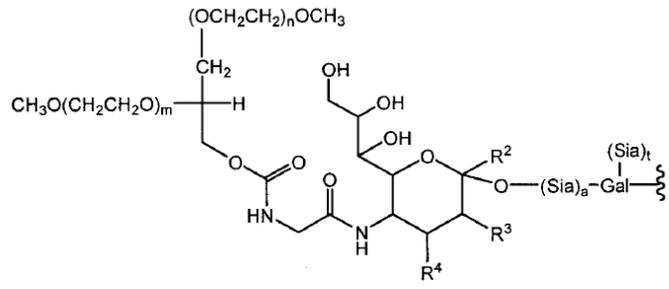
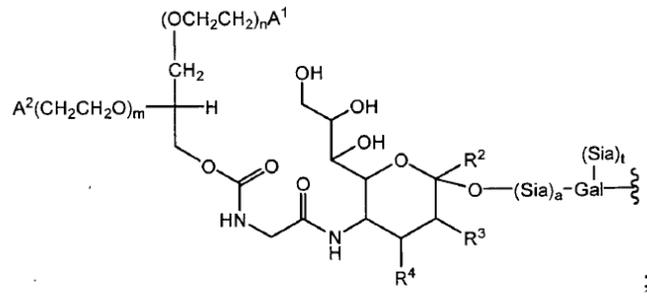
;

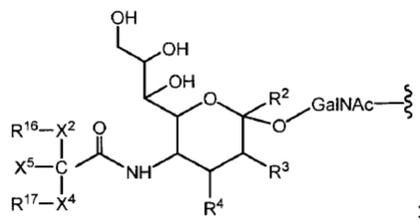
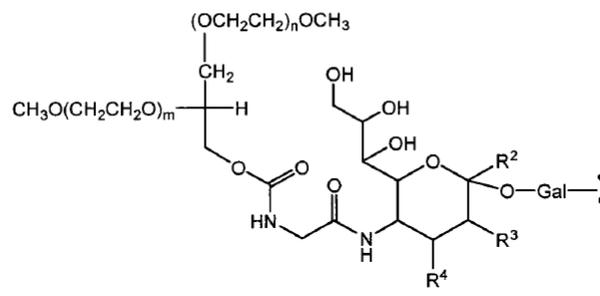
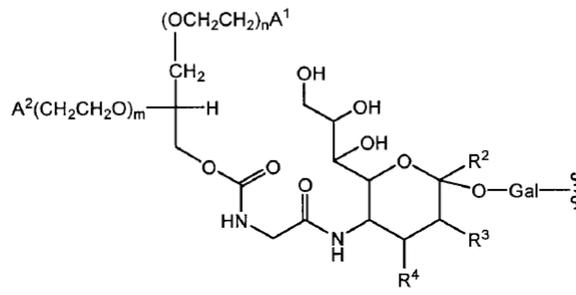
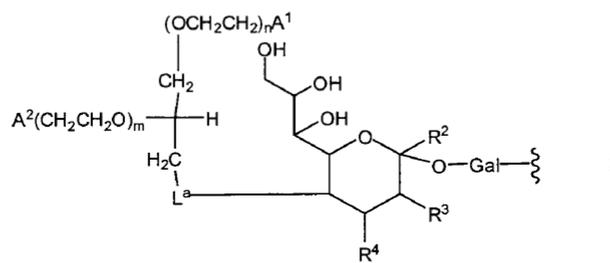
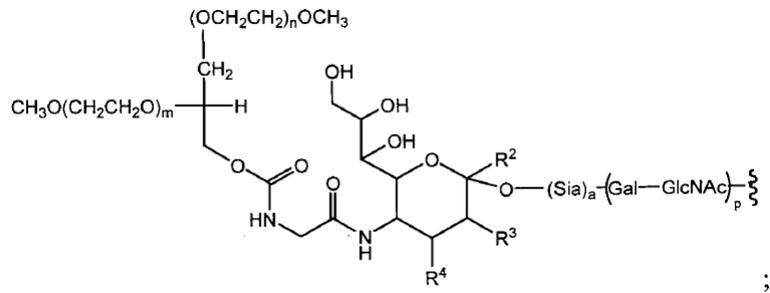
;

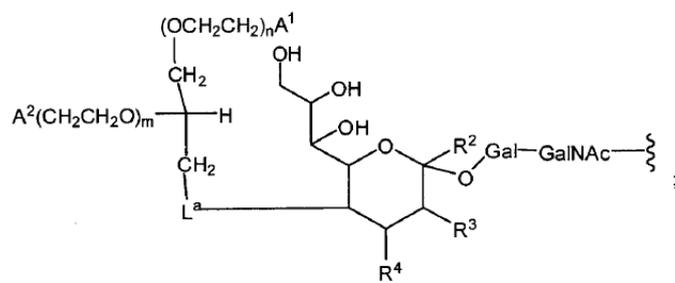
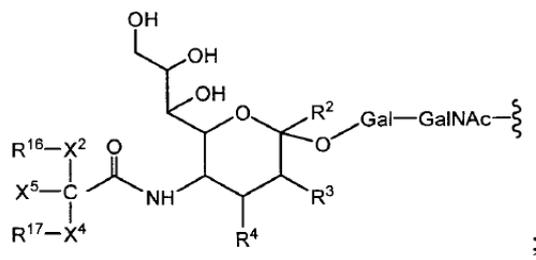
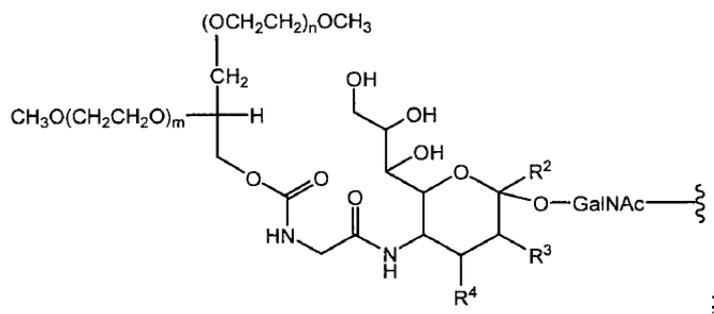
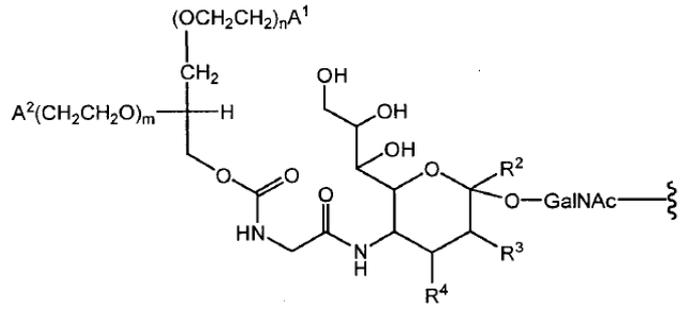
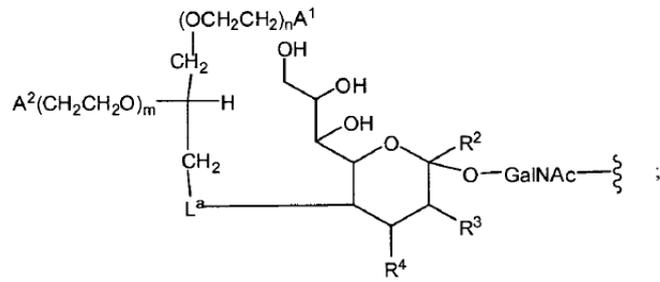


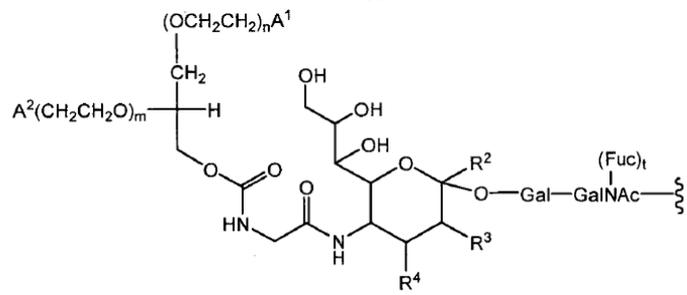
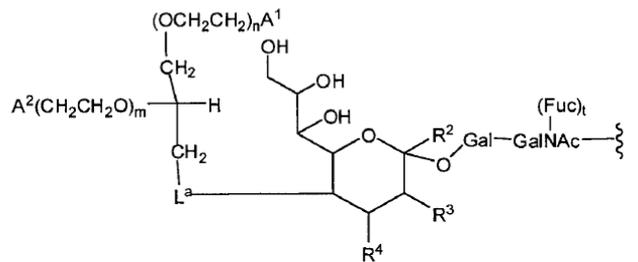
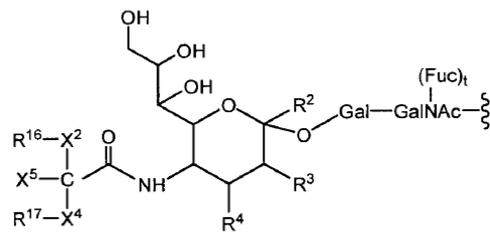
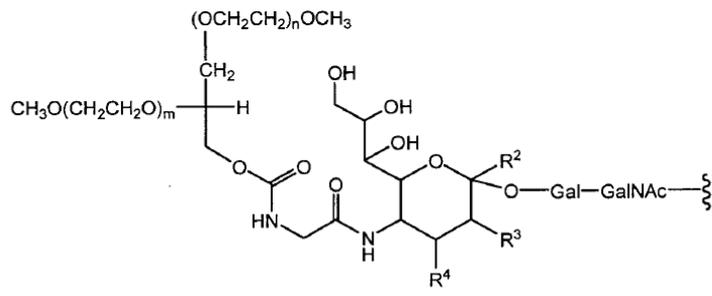
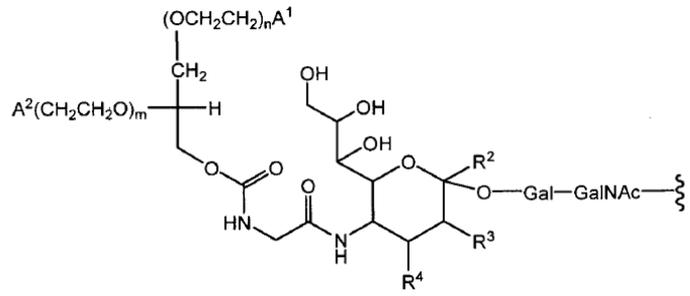
;

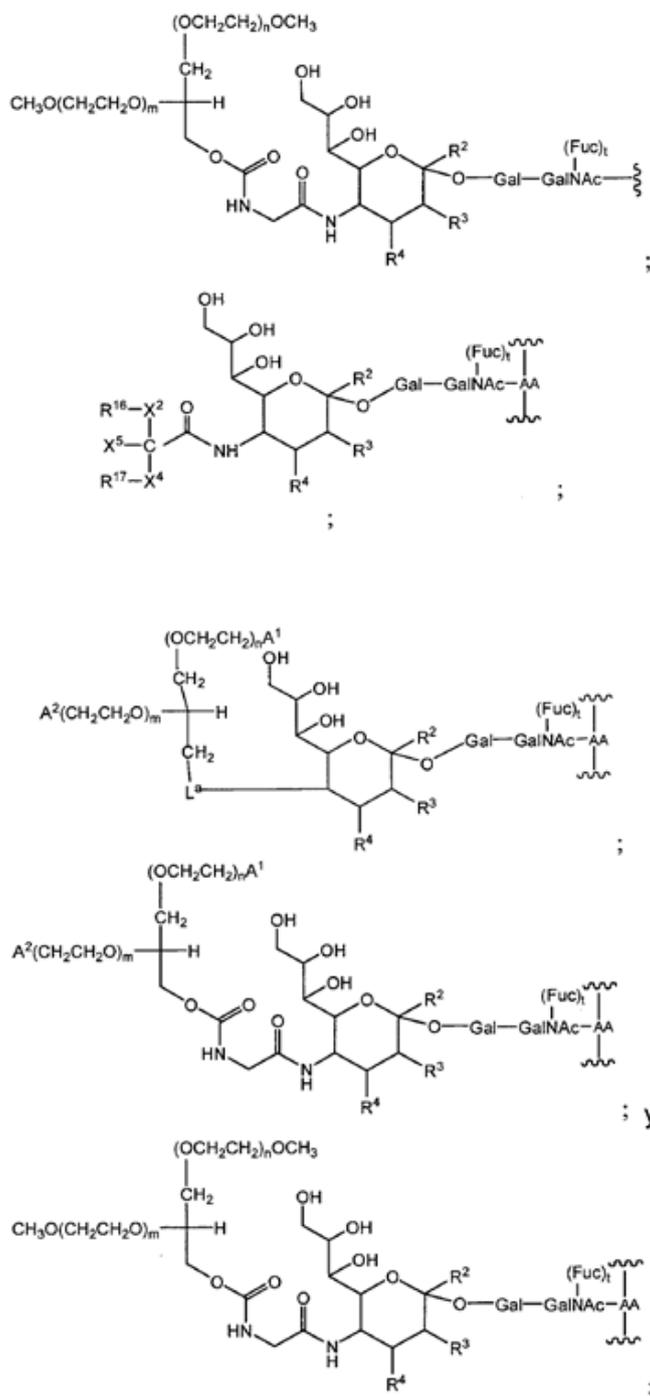












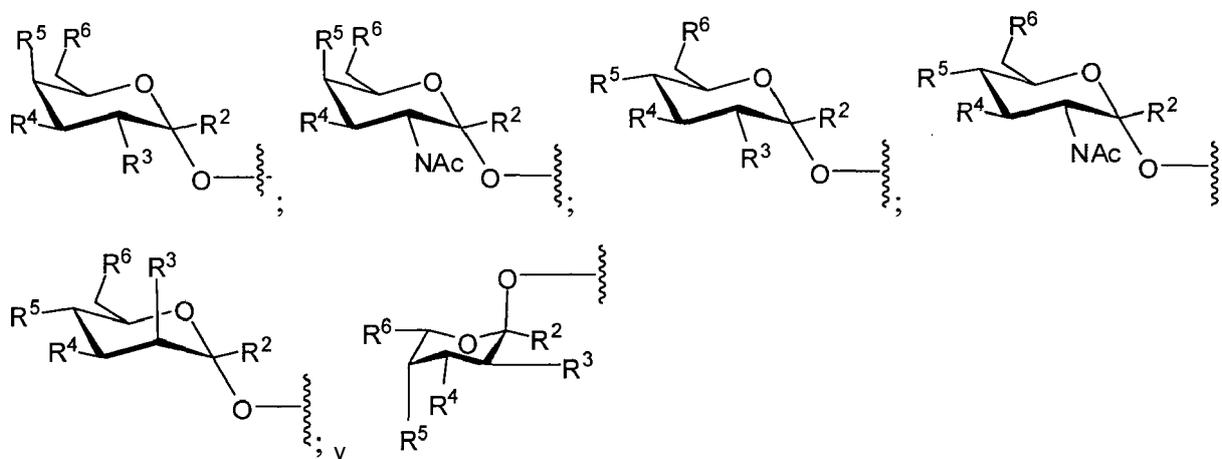
5 en las que el índice a y el resto de unión L^a son tal como se comentaron anteriormente. El índice p es un número entero de desde 1 hasta 10. Los índices t y a se seleccionan independientemente de 0 ó 1. Cada uno de estos grupos puede incluirse como componentes de las estructuras de sacárido mono, bi, tri y tetraantenarias expuestas anteriormente. AA es un residuo de aminoácido del péptido. Un experto en la técnica apreciará que el resto PEG en estas fórmulas puede reemplazarse por otro grupo no reactivo y restos poliméricos. Los polímeros a modo de ejemplo incluyen aquellos de la familia de poli(óxido de alquileo). Los grupos no reactivos incluyen grupos que se considera que son esencialmente no reactivos, neutros y/o estables a pH fisiológico, por ejemplo, H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y similares. Un resto polimérico a modo de ejemplo incluye las estructuras ramificadas expuestas en la fórmula IIIa y sus ejemplos.

10 En una realización a modo de ejemplo, el resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kD. En otra realización a modo de ejemplo, el resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kD. En otra realización

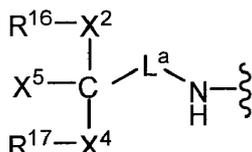
a modo de ejemplo, el resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kD. En otra realización a modo de ejemplo, el resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kD. En otras realizaciones, el grupo de modificación es un poli(óxido de alquileo) ramificado, por ejemplo, poli(etilenglicol), que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 80 kD, preferiblemente al menos aproximadamente 100 kD, más preferiblemente al menos aproximadamente 120 kD, al menos aproximadamente 140 kD o al menos aproximadamente 160 kD. En aún otra realización, el poli(óxido de alquileo) ramificado, por ejemplo, poli(etilenglicol) es de al menos aproximadamente 200 kD, tal como desde al menos aproximadamente 80 kD hasta al menos aproximadamente 200 kD, incluyendo al menos aproximadamente 160 kD y al menos aproximadamente 180 kD. En una realización a modo de ejemplo, el propio polímero ramificado se une a un resto de ramificación (por ejemplo, cisteína, serina, lisina, y oligómeros de lisina).

En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto ramificado SA-PEG-10 kD basado en un residuo de cisteína, y uno o dos de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido. En otra realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto ramificado SA-PEG-10 kD basado en un residuo de lisina, y uno o dos de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto ramificado SA-PEG-10 kD basado en un residuo de cisteína, y uno o dos de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto ramificado SA-PEG-10 kD basado en un residuo de lisina, y uno o dos de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto ramificado SA-PEG-5 kD basado en un residuo de cisteína, y uno, dos o tres de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto ramificado SA-PEG-5 kD basado en un residuo de lisina, y uno, dos o tres de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto ramificado SA-PEG-40 kD basado en un residuo de cisteína, y uno o dos de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto ramificado SA-PEG-40 kD basado en un residuo de lisina, y uno o dos de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido.

En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende un resto glicosilo seleccionado de las fórmulas:

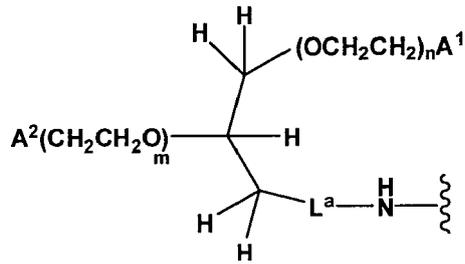


en las que al menos uno de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 o R^6 tiene una estructura que es un miembro seleccionado de



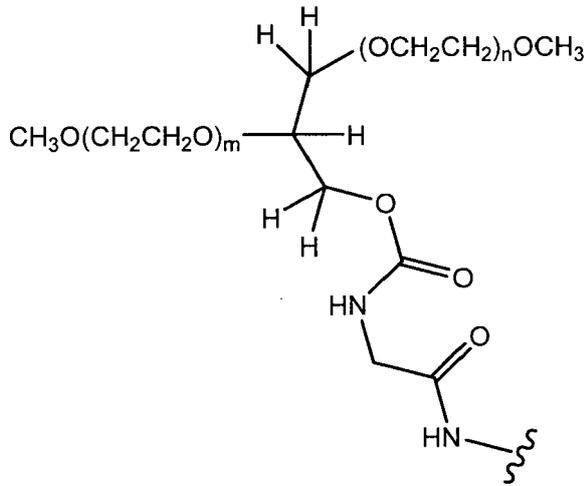
en la que las variables son tal como se describieron anteriormente. Los expertos apreciarán que la base de las estructuras de PEG ramificadas expuestas anteriormente es simplemente para mayor claridad de ilustración, el PEG puede reemplazarse sustancialmente por cualquier resto polimérico, incluyendo, sin limitación aquellas especies expuestas en la definición de "resto polimérico" que se encuentra en el presente documento.

En una realización a modo de ejemplo, al menos uno de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 o R^6 tiene una estructura según la siguiente fórmula:



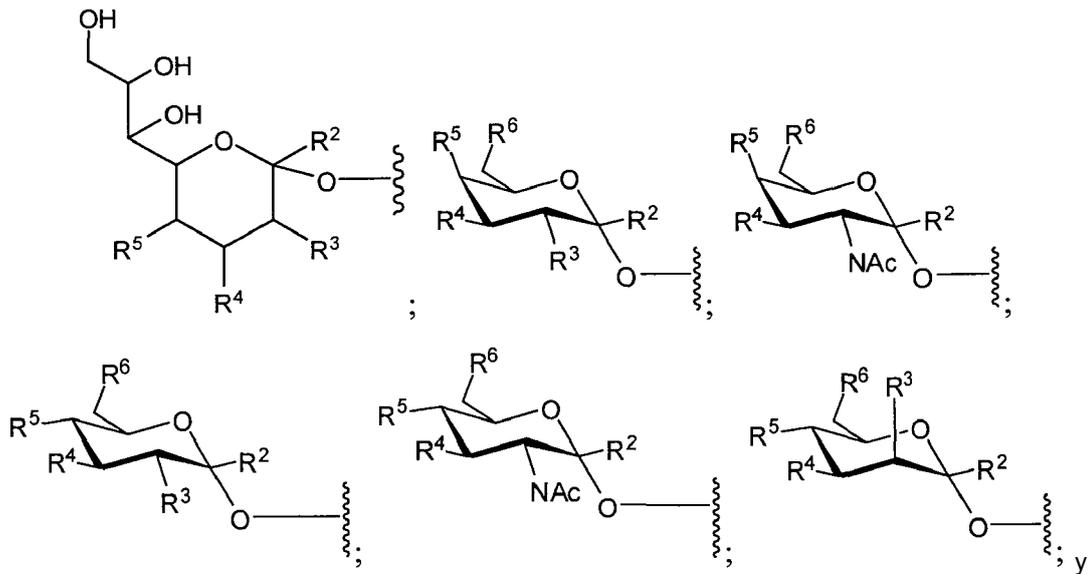
A¹ y A² son cada uno -OCH₃.

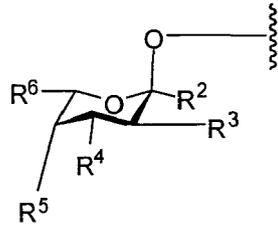
Los grupos de modificación poliméricos a modo de ejemplo según esta realización incluyen:



En una realización a modo de ejemplo, solo uno de R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ tiene una estructura que incluye los grupos de modificación descritos anteriormente.

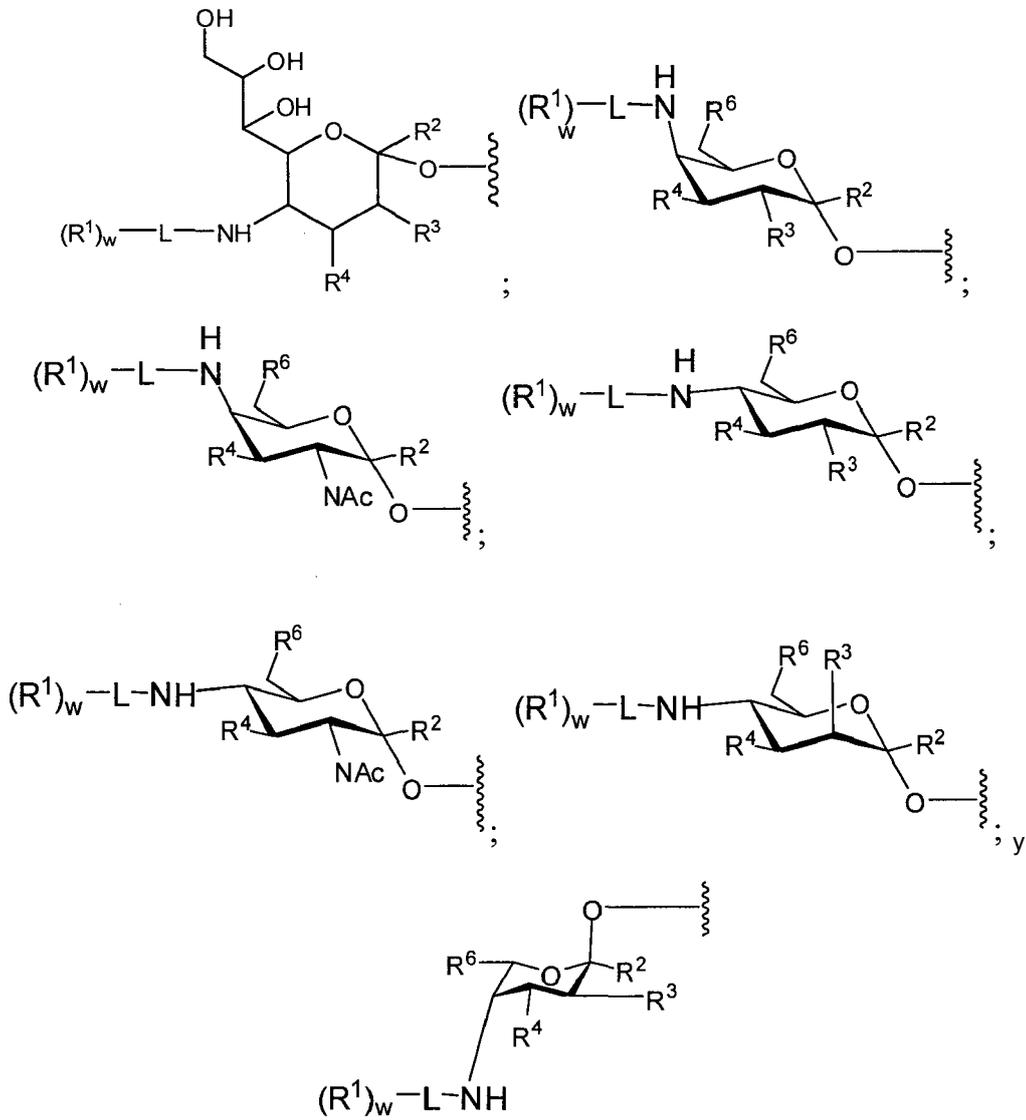
En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende un resto glicosilo seleccionado de las fórmulas:



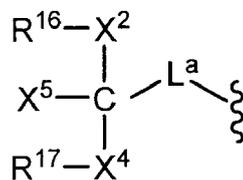


en las que R^2 , R^3 , R^4 , R^5 o R^6 son tal como se describieron anteriormente.

En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende un resto glicosilo seleccionado de las fórmulas:

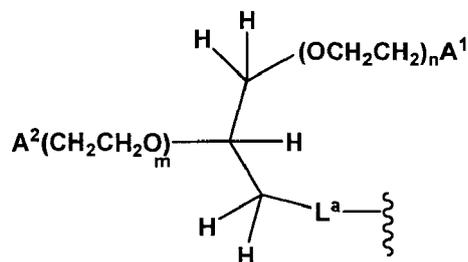


en las que $L-(R^1)_w$ es un miembro seleccionado de



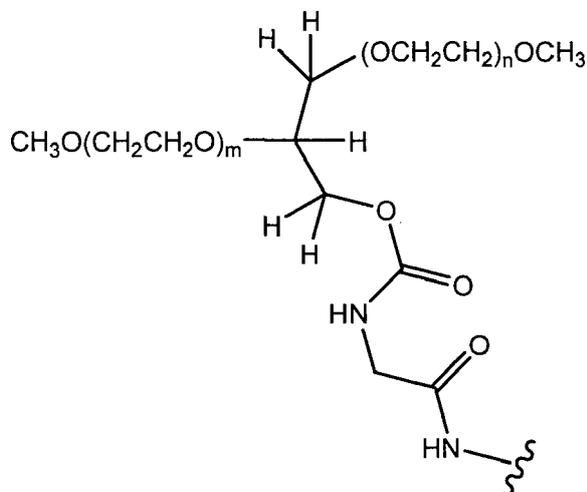
en la que las variables son tal como se describieron anteriormente.

En una realización a modo de ejemplo, $L-(R^1)_w$ tiene una estructura según la siguiente fórmula:



En una realización a modo de ejemplo, A^1 y A^2 son cada uno $-OCH_3$.

Los grupos de modificación poliméricos a modo de ejemplo según esta realización incluyen:

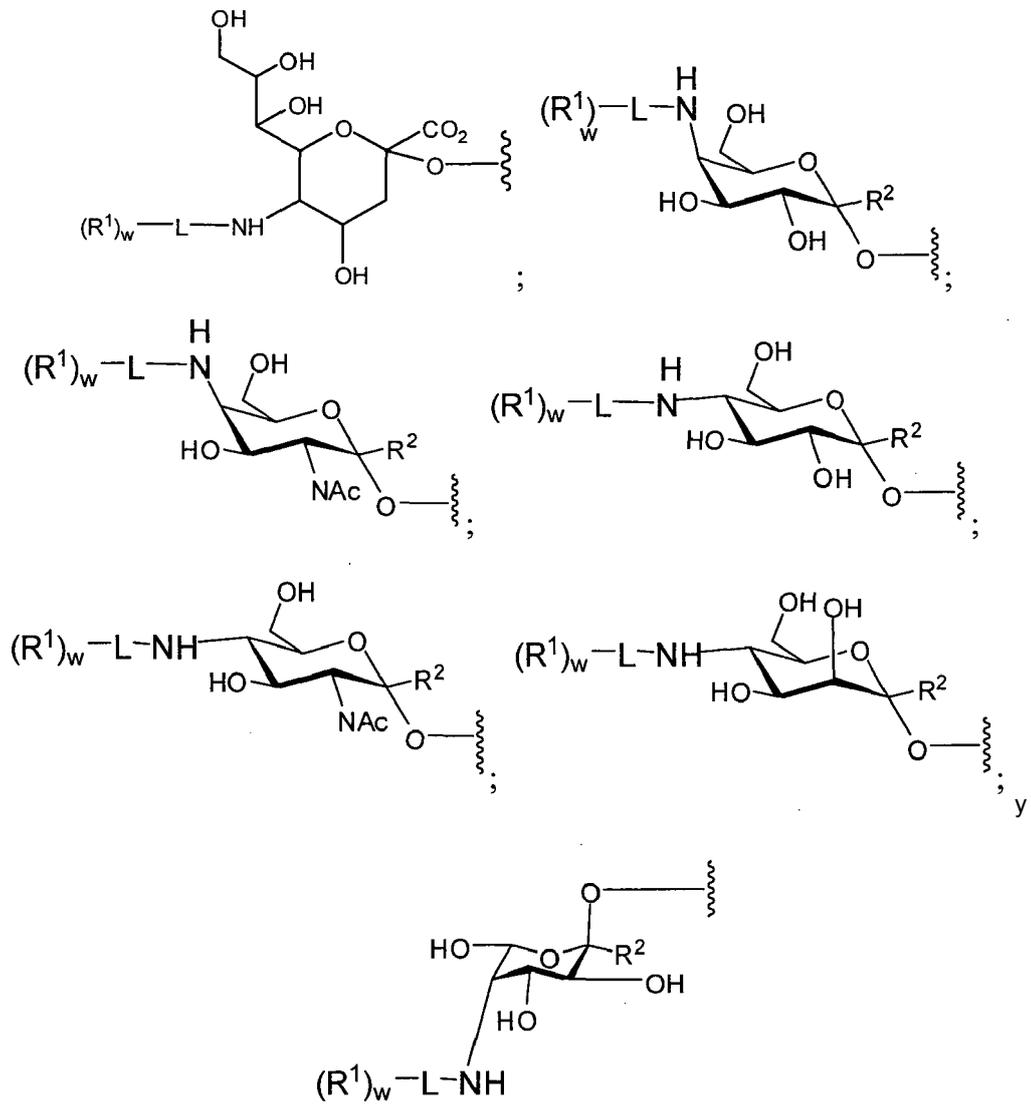


5

En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 70, de aproximadamente 70 a aproximadamente 150, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250, de aproximadamente 250 a aproximadamente 375 y de aproximadamente 375 a aproximadamente 500. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 35, de aproximadamente 45 a aproximadamente 65, de aproximadamente 95 a aproximadamente 130, de aproximadamente 210 a aproximadamente 240, de aproximadamente 310 a aproximadamente 370 y de aproximadamente 420 a aproximadamente 480. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 65. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 130. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 210 hasta aproximadamente 240. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 310 hasta aproximadamente 370. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 430 hasta aproximadamente 470.

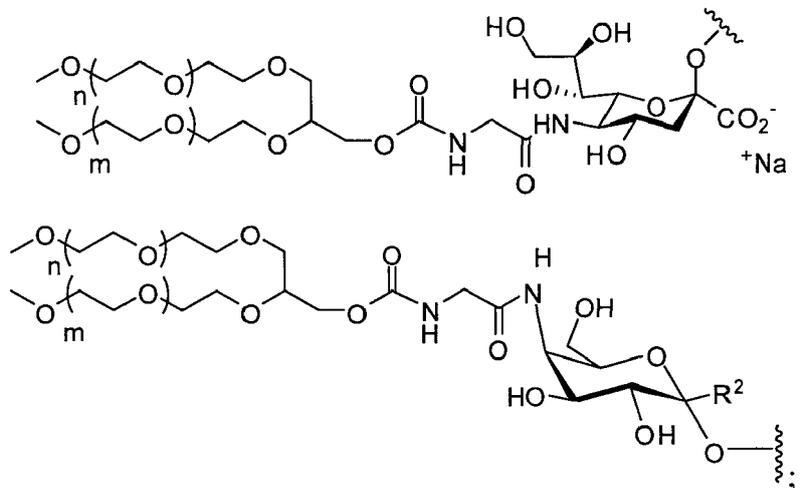
En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende un resto glicosilo seleccionado de las fórmulas:

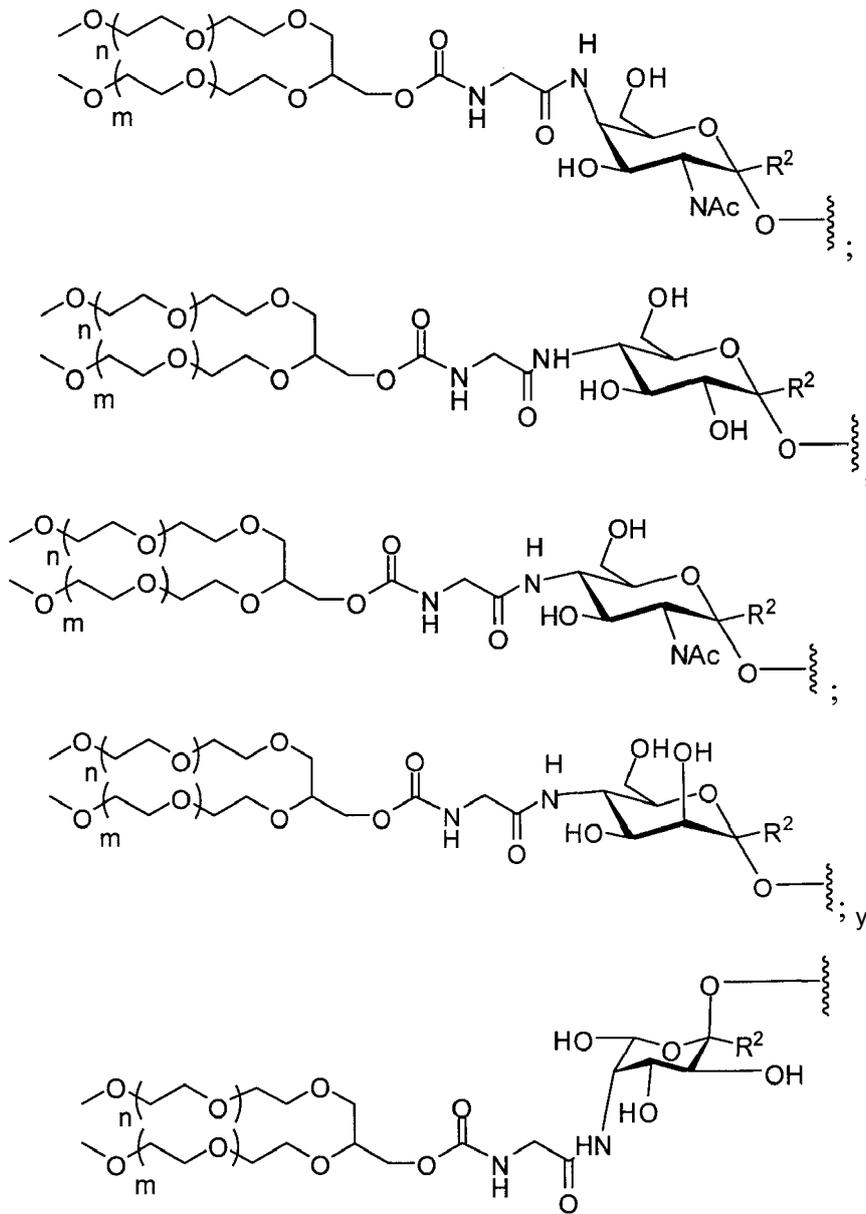
25



en las que las variables son tal como se describieron anteriormente.

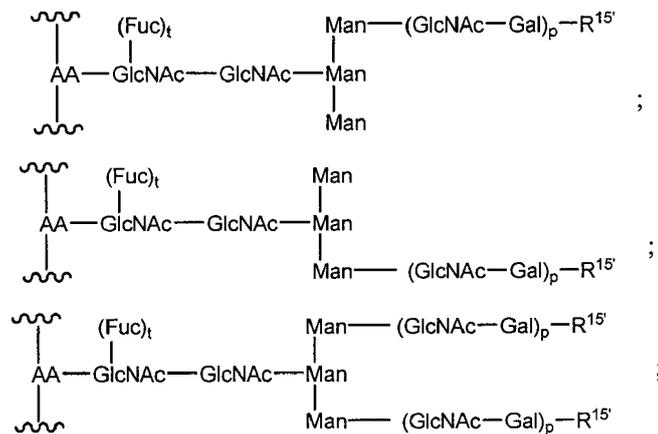
Las especies según esta realización incluyen:

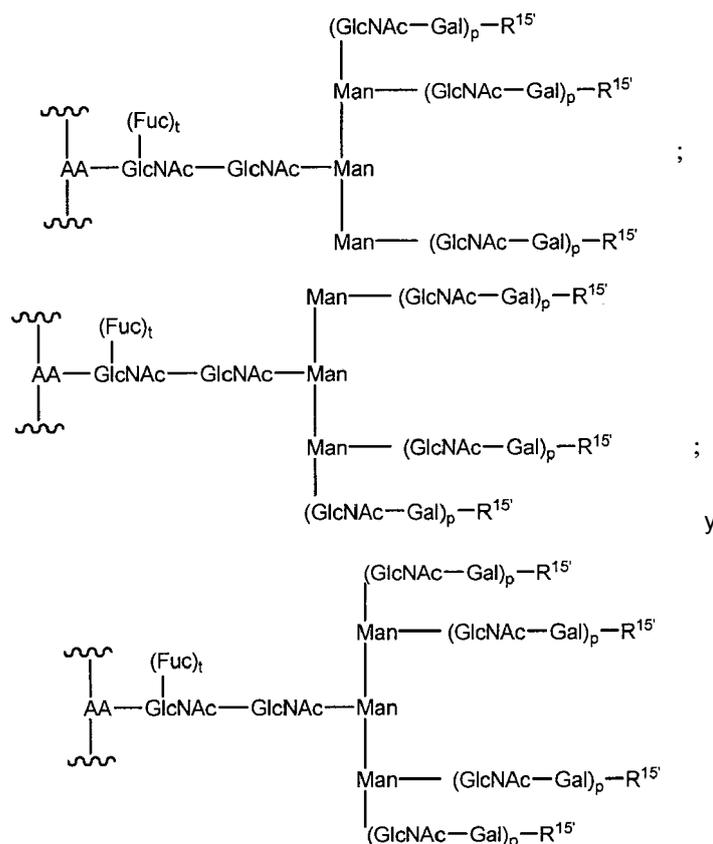




en las que las variables son tal como se comentaron anteriormente.

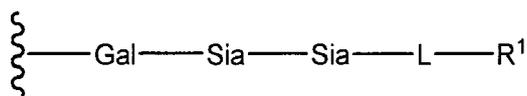
En una realización a modo de ejemplo, un conjugado peptídico glicopegulado de la invención se selecciona de las fórmulas expuestas a continuación:





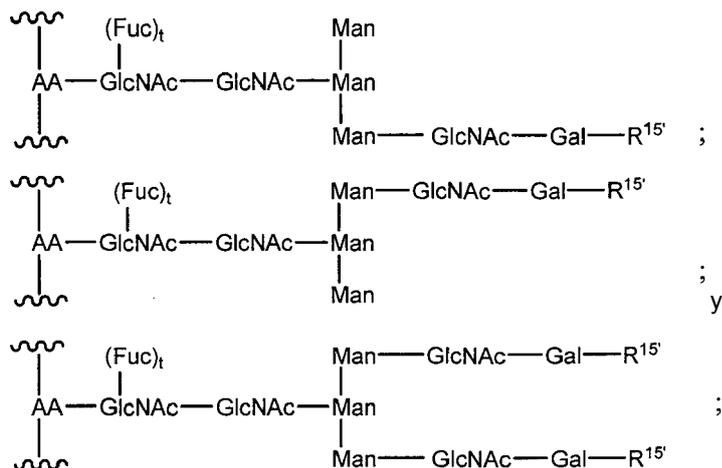
en las que las variables son tal como se describieron anteriormente.

- 5 En las fórmulas anteriores, el índice t es un número entero de desde 0 hasta 1 y el índice p es un número entero de desde 1 hasta 10. El símbolo R¹⁵ representa H, OH (por ejemplo, Gal-OH), un resto sialilo, un grupo de unión de sialilo (es decir, grupo de unión de sialilo-grupo de modificación polimérico (Sia-L-R¹), o un resto sialilo al que se une un resto sialilo modificado con polímero (por ejemplo, Sia-Sia-L-R¹) ("Sia-Sia^{pn}"), un resto galactosilo, un grupo de unión de galactosilo (es decir, grupo de unión de galactosilo-grupo de modificación polimérico (Gal-L-R¹), o un resto sialilo al que se une un resto galactosilo modificado con polímero (por ejemplo, Sia-Gal-L-R¹) ("Sia-Gal^{pn}"), un resto galactosaminilo, un grupo de unión de galactosaminilo (es decir, grupo de unión de galactosaminilo-grupo de modificación polimérico (GalNAc-L-R¹), o un resto sialilo al que se une un resto galactosaminilo modificado con polímero (por ejemplo, Sia-GalNAc-L-R¹) ("Sia-GalNAc^{pn}"), un resto glucosilo, un grupo de unión de glucosilo (es decir, grupo de unión de glucosilo-grupo de modificación polimérico (Glc-L-R¹), o un resto sialilo al que se une un resto glucosilo modificado con polímero (por ejemplo, Sia-Glc-L-R¹) ("Sia-Glc^{pn}"), un resto glucosaminilo, un grupo de unión de glucosaminilo (es decir, grupo de unión de glucosaminilo-grupo de modificación polimérico (GlcNAc-L-R¹), o un resto sialilo al que se une un resto glucosaminilo modificado con polímero (por ejemplo, Sia-GlcNAc-L-R¹) ("Sia-GlcNAc^{pn}"), un resto manosilo, un grupo de unión de manosilo (es decir, grupo de unión de manosilo-grupo de modificación polimérico (Man-L-R¹), o un resto sialilo al que se une un resto manosilo modificado con polímero (por ejemplo, Sia-Man-L-R¹) ("Sia-Man^{pn}"), un resto fucosilo, un grupo de unión de fucosilo (es decir, grupo de unión de fucosilo-grupo de modificación polimérico (Fuc-L-R¹), o un resto sialilo al que se une un resto fucosilo modificado con polímero (por ejemplo, Sia-Fuc-L-R¹) ("Sia-Fuc^{pn})). Los restos sacarilo modificados con polímero a modo de ejemplo tienen una estructura según las fórmulas I, Ia, II o IIa. Un conjugado peptídico a modo de ejemplo de la invención incluirá al menos un glicano que tiene un R¹⁵ que incluye una estructura según las fórmulas I, Ia, II y IIa. El oxígeno, con la valencia libre, de las fórmulas I, Ia, II o IIa se une preferiblemente a través de una unión glicosídica a un carbono de un resto Gal o GalNAc. En una realización a modo de ejemplo adicional, el oxígeno se une al carbono en la posición 3 de un residuo de galactosa. En una realización a modo de ejemplo, el ácido siálico modificado se une en α2,3 al residuo de galactosa. En otra realización a modo de ejemplo, el ácido siálico se une en α2,6 al residuo de galactosa.
- 30 En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de sialilo es un resto sialilo al que se une un resto sialilo modificado con polímero (por ejemplo, Sia-Sia-L-R¹) ("Sia-Sia^{pn}"). En este caso, el grupo de unión de glicosilo se une a un resto galactosilo a través de un resto sialilo:



Una especie a modo de ejemplo según este motivo se prepara mediante la conjugación de Sia-L-R¹ con un ácido siálico terminal de un glicano usando una enzima que forma enlaces Sia-Sia, por ejemplo, CST-II, ST8Sia-II, ST8Sia-III y ST8Sia-IV.

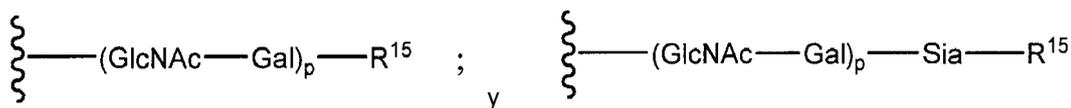
5 En otra realización a modo de ejemplo, los glicanos en los conjugados peptídicos tienen una fórmula que se selecciona del grupo:



10 y combinaciones de las mismas.

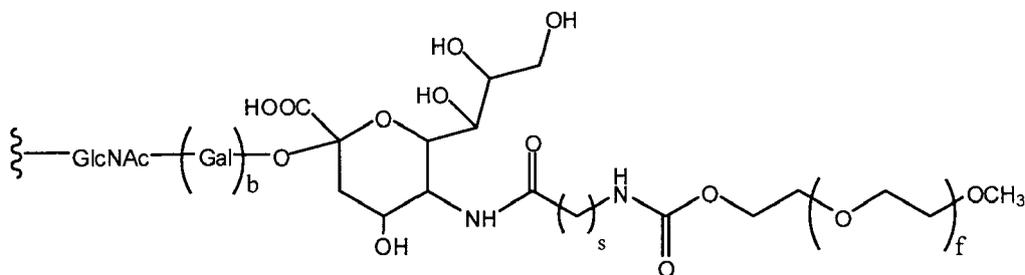
En cada una de las fórmulas anteriores, R^{15'} es tal como se comentó anteriormente. Además, un conjugado peptídico de a modo de ejemplo la invención incluirá al menos un glicano con un resto R¹⁵ que tiene una estructura según las fórmulas I, Ia, II o IIa.

15 En otra realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo comprende al menos un grupo de unión de glicosilo que tiene la fórmula:



en las que R¹⁵ es dicho grupo de unión de sialilo; y el índice p es un número entero seleccionado de desde 1 hasta 10.

En una realización a modo de ejemplo, el resto de unión de glicosilo tiene la fórmula:



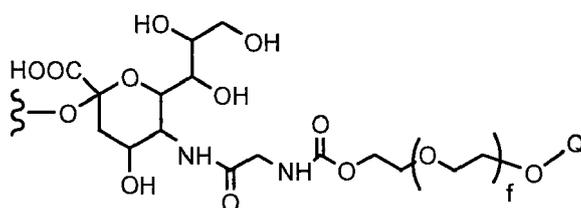
20 en la que b es un número entero de desde 0 hasta 1. El índice s representa un número entero de desde 1 hasta 10; y el índice f representa un número entero de desde 1 hasta 2500.

25 En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación polimérico es PEG. En otra realización a modo de ejemplo, el resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kD. En otra realización a modo de ejemplo, el resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kD. En otra realización a modo de ejemplo, el resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kD. En otra realización a modo de ejemplo, el resto PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kD. En otras realizaciones, el grupo de modificación es un poli(óxido de alquilen) ramificado, por ejemplo, poli(etilenglicol), que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 80

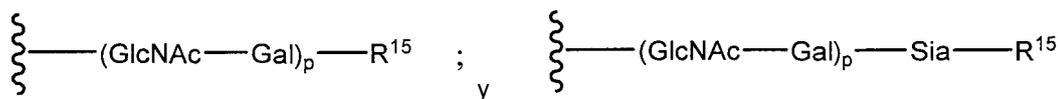
kD, preferiblemente al menos aproximadamente 100 kD, más preferiblemente al menos aproximadamente 120 kD, al menos aproximadamente 140 kD o al menos aproximadamente 160 kD. En aún otra realización, el poli(óxido de alquileo) ramificado, por ejemplo, poli(etilenglicol) es de al menos aproximadamente 200 kD, tal como desde al menos aproximadamente 80 kD hasta al menos aproximadamente 200 kD, incluyendo al menos aproximadamente 160 kD y al menos aproximadamente 180 kD.

En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto lineal SA-PEG-10 kD, y uno o dos de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido. En otra realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto lineal SA-PEG-20 kD, y uno o dos de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto lineal SA-PEG-5 kD, y uno, dos o tres de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un resto lineal SA-PEG-40 kD, y uno o dos de estos grupos de unión de glicosilo se unen covalentemente al péptido.

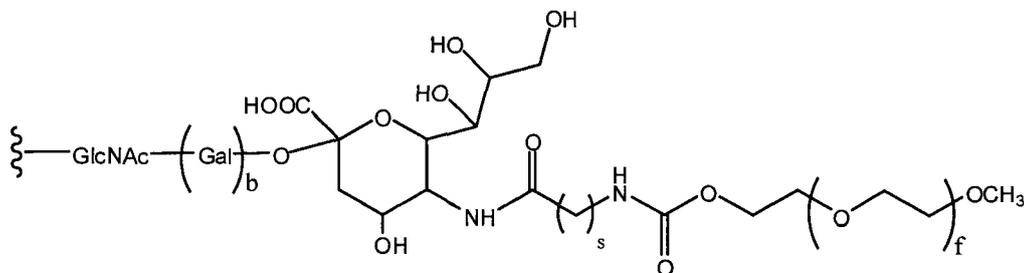
En otra realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo es un grupo de unión de sialilo que tiene la fórmula:



En otra realización a modo de ejemplo, Q es un miembro seleccionado de H y CH₃. En otra realización a modo de ejemplo, en el que dicho grupo de unión de glicosilo tiene la fórmula:



en las que R¹⁵ es dicho grupo de unión de sialilo; y el índice p es un número entero seleccionado de desde 1 hasta 10. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión de glicosilo comprende la fórmula:

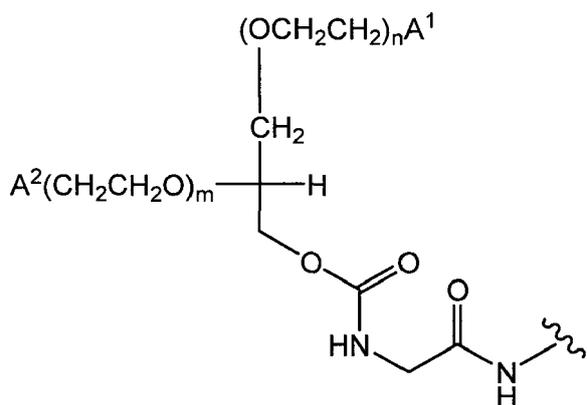


en el que el índice b es un número entero seleccionado de desde 0 hasta 1. En una realización a modo de ejemplo, el índice s es 1; y el índice f es un número entero seleccionado de desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 300.

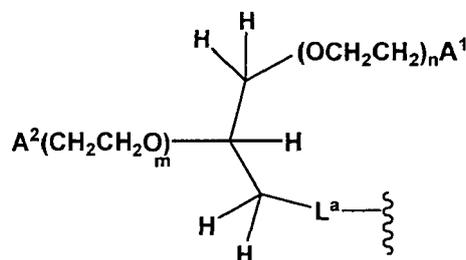
II. D. Grupos de modificación

Los conjugados peptídicos de la invención comprenden un grupo de modificación. Este grupo puede unirse covalentemente a un péptido a través de un aminoácido o un grupo de unión de glicosilo. El péptido en el conjugado peptídico es el factor IX. Los "grupos de modificación" pueden abarcar una variedad de estructuras que incluyen restos de direccionamiento, restos terapéuticos, biomoléculas. Adicionalmente, los "grupos de modificación" incluyen grupos de modificación poliméricos, que son polímeros que pueden alterar una propiedad del péptido tal como su biodisponibilidad o su semivida en el cuerpo.

En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación polimérico tiene una estructura que incluye un resto según las siguientes fórmulas:

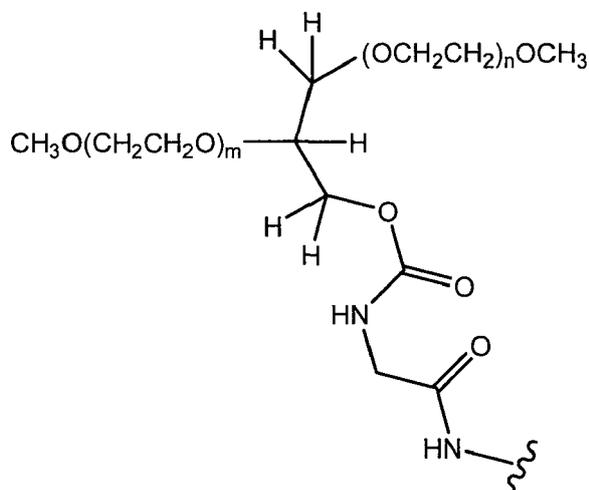


En otra realización a modo de ejemplo según la fórmula anterior, el grupo de modificación polimérico incluye un resto según la siguiente fórmula:



- 5 En una realización a modo de ejemplo, A¹ y A² son cada uno miembros seleccionados de -OH y -OCH₃.

Los grupos de modificación poliméricos a modo de ejemplo según esta realización incluyen el resto:

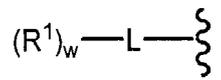


- 10 Con fines de conveniencia, los grupos de modificación en la parte restante de esta sección se basarán en gran medida en grupos de modificación poliméricos tales como polímeros solubles en agua e insolubles en agua. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que podrían usarse otros grupos de modificación, tales como restos de direccionamiento, restos terapéuticos y biomoléculas, en lugar de los grupos de modificación poliméricos. Además, los expertos apreciarán que la base de estructuras de PEG ramificadas expuestas anteriormente es simplemente para mayor claridad de ilustración, el PEG puede reemplazarse sustancialmente por cualquier resto polimérico, incluyendo, sin limitación aquellas especies expuestas en la definición de "resto polimérico" que se encuentra en el presente documento.
- 15

II. D. i. Restos de unión de los grupos de modificación

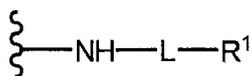
- Los restos de unión del grupo de modificación sirven para unir el grupo de modificación (es decir, grupos de modificación poliméricos, restos de direccionamiento, restos terapéuticos y biomoléculas) al péptido. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación polimérico se une a un grupo de unión de glicosilo, generalmente a través de un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, en el núcleo a través de un resto de unión, L, tal
- 20

como se muestra a continuación:

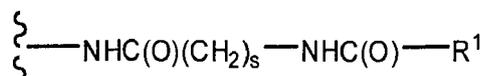


5 R^1 es el resto polimérico y L se selecciona de un enlace y un grupo de unión. El índice w representa un número entero seleccionado de 1-6, preferiblemente 1-3 y más preferiblemente 1-2. Los grupos de unión a modo de ejemplo incluyen restos alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y ácido siálico. Un componente a modo de ejemplo del resto de unión es un resto acilo.

Un compuesto a modo de ejemplo según la invención tiene una estructura según las fórmulas I, Ia, II o IIa anteriores, en las que al menos uno de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 o $R^{6'}$ tiene la fórmula:

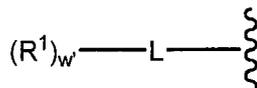


10 En otro ejemplo según esta realización al menos uno de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 o $R^{6'}$ tiene la fórmula:



en la que s es un número entero de desde 0 hasta 20 y R^1 es un resto de modificación polimérico lineal.

15 En una realización a modo de ejemplo, el constructo de grupo de modificación polimérico-resto de unión es una estructura ramificada que incluye dos o más cadenas poliméricas unidas al resto central. En esta realización, el constructo tiene la fórmula:



en la que R^1 y L son tal como se comentaron anteriormente y w' es un número entero de desde 2 hasta 6, preferiblemente desde 2 hasta 4 y más preferiblemente desde 2 hasta 3.

20 Cuando L es un enlace, se forma entre un grupo funcional reactivo en un precursor de R^1 y un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en el núcleo de sacarilo. Cuando L es un resto de unión de orden distinto de cero, un precursor de L puede estar en su lugar en el resto glicosilo antes de la reacción con el precursor de R^1 . Alternativamente, los precursores de R^1 y L pueden incorporarse en un casete formado previamente que se une posteriormente al resto glicosilo. Tal como se expone en el presente documento, la selección y preparación de precursores con grupos funcionales reactivos apropiados está dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica. Además, se lleva a cabo el acoplamiento de los precursores mediante una química que se entiende bien en la técnica.

25 En una realización a modo de ejemplo, L es un grupo de unión que se forma a partir de un aminoácido, o péptido pequeño (por ejemplo, 1-4 residuos de aminoácido) proporcionando un azúcar modificado en la que el grupo de modificación polimérico se une a través de un resto de unión de alquilo sustituido. Los restos de unión a modo de ejemplo incluyen glicina, lisina, serina y cisteína. El resto PEG puede unirse al resto de amina del resto de unión a través de un enlace amida o uretano. El PEG se une a los átomos de azufre o de oxígeno de cisteína y serina a través de enlaces tioéter o éter, respectivamente.

30 En una realización a modo de ejemplo, R^5 incluye el grupo de modificación polimérico. En otra realización a modo de ejemplo, R^5 incluye tanto el grupo de modificación polimérico como un resto de unión, L, que une el grupo de modificación a la parte restante de la molécula. Tal como se comentó anteriormente, L puede ser una estructura lineal o ramificada. De manera similar, el grupo de modificación polimérico puede ser ramificado o lineal.

II. D. ii. Polímeros solubles en agua

40 El polímero soluble en agua en los conjugados de la presente invención es poli(etilenglicol). Los expertos en la técnica conocen muchos polímeros solubles en agua y son útiles. El término polímero soluble en agua abarca especies tales como sacáridos (por ejemplo, dextrano, amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poli(aminoácidos), por ejemplo, poli(ácido aspártico) y poli(ácido glutámico); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(éteres), por ejemplo, poli(etilenglicol)); péptidos, proteínas, y similares. La presente invención se pone en práctica con poli(etilenglicol) con la única limitación de que el polímero debe incluir un punto en el que el resto del conjugado puede unirse.

45 Pueden encontrarse también métodos para la activación de polímeros en el documento WO 94/17039, la patente

estadounidense n.º 5.324.844, los documentos WO 94/18247, WO 94/04193, la patente estadounidense n.º 5.219.564, la patente estadounidense n.º 5.122.614, el documento WO 90/13540, la patente estadounidense n.º 5.281.698, y más 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 portadora de oxígeno (patente estadounidense n.º 4.412.989), ribonucleasa y superóxido dismutasa (Veronese *et al.*, App. Biochem. Biotech. 11: 141-45 (1985)).

Polímeros solubles en agua a modo de ejemplo son aquellos en los que una proporción sustancial de las moléculas de polímero en una muestra del polímero son de aproximadamente el mismo peso molecular; tales polímeros son "homodispersos".

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

La patente estadounidense n.º 6.376.604 expone un método para preparar un éster de carbonato de 1-benzotriazolilo soluble en agua de un polímero soluble en agua y no peptídico haciendo reaccionar un hidroxilo terminal del polímero con carbonato de di(1-benzotriazoilo) en un disolvente orgánico. El éster activo se usa para formar conjugados con un agente biológicamente activo tal como una proteína o un péptido.

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

Se describen conjugados que incluyen uniones de PEG degradables en el documento WO 99/34833; y el documento WO 99/14259, así como en la patente estadounidense n.º 6.348.558. Tales uniones degradables son aplicables en la presente invención.

Los métodos reconocidos en la técnica de activación de polímeros expuestos anteriormente son de uso en el contexto de la presente invención en la formación de los polímeros ramificados expuestos en el presente documento y también para la conjugación de estos polímeros ramificados con otras especies, por ejemplo, azúcares, nucleótidos de azúcar y similares.

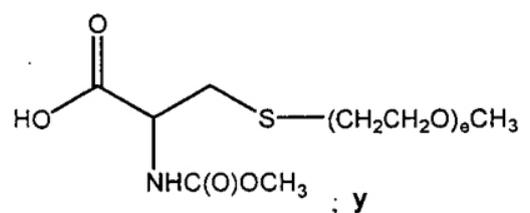
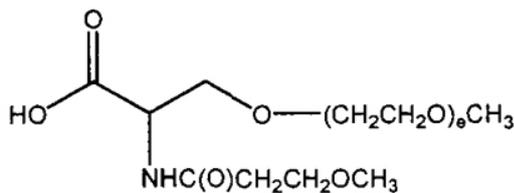
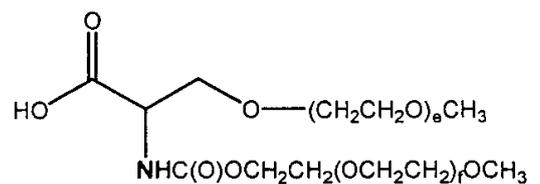
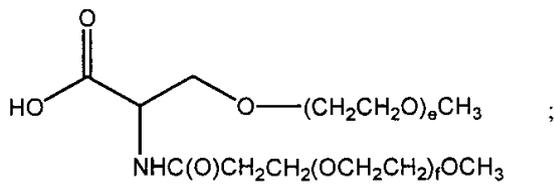
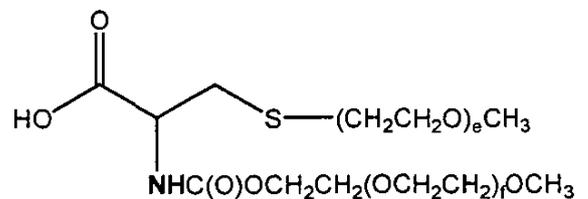
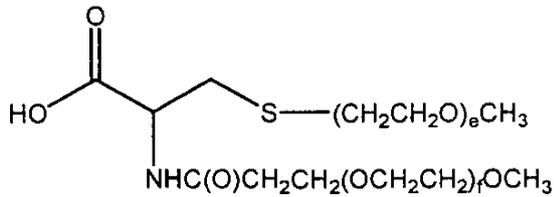
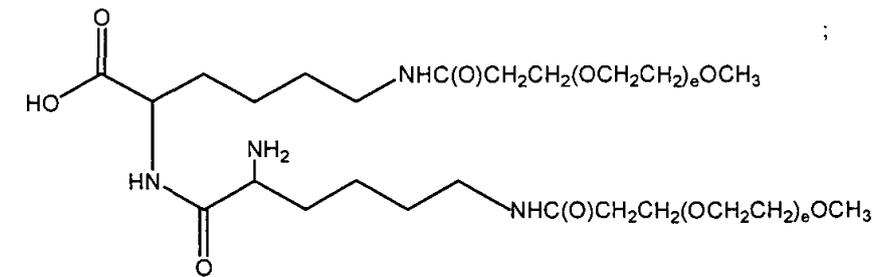
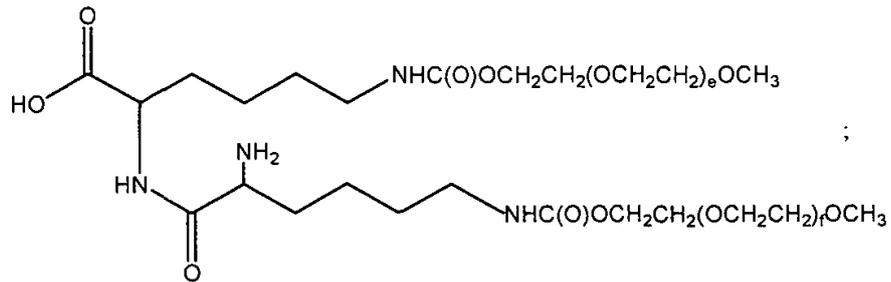
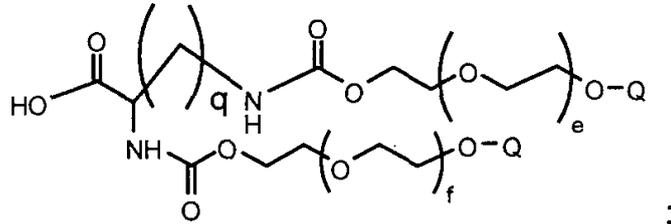
Un polímero soluble en agua a modo de ejemplo es poli(etilenglicol), por ejemplo, metoxi-poli(etilenglicol). El poli(etilenglicol) usado en la presente invención no está restringido a ninguna forma o intervalo de peso molecular particular. Para moléculas de poli(etilenglicol) no ramificadas el peso molecular es preferiblemente de entre 500 y 100.000. Se usa preferiblemente un peso molecular de 2000-60.000 y preferiblemente de desde aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 40.000.

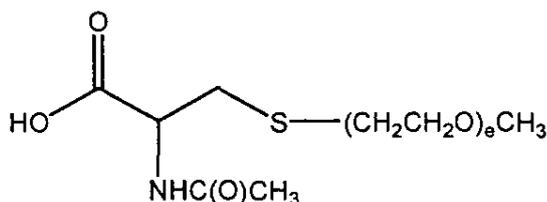
II. D. iii. Polímeros solubles en agua ramificados

En otra realización, el resto de modificación polimérico es una estructura de PEG ramificada que tiene más de un resto PEG lineal o ramificado unido. Se describen ejemplos de PEG ramificados en la patente estadounidense n.º 5.932.462; la patente estadounidense n.º 5.342.940; la patente estadounidense n.º 5.643.575; la patente estadounidense n.º 5.919.455; la patente estadounidense n.º 6.113.906; la patente estadounidense n.º 5.183.660; el documento WO 02/09766; Kodera Y., *Bioconjugate Chemistry* 5: 283-288 (1994); y Yamasaki *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, 52: 2125-2127, 1998.

Los restos de modificación poliméricos representativos incluyen estructuras que se basan en aminoácidos que contienen cadenas laterales, por ejemplo, serina, cisteína, lisina, y péptidos pequeños, por ejemplo, lys-lys. En algunas realizaciones, el resto de modificación polimérico es un resto PEG ramificado que se basa en un oligopéptido, tal como un péptido de tri-lisina. Los aminoácidos a modo de ejemplo adecuados para su uso incluyen lisina, cisteína y serina. En tales realizaciones, cada subunidad polimérica unida a la estructura peptídica puede ser

o bien un resto PEG lineal o bien un resto PEG ramificado. Por ejemplo, la tri-lisina puede estar mono-, di-, tri- o tetra-PEG-ilada con restos PEG lineales, restos PEG ramificados, o una combinación de restos PEG lineales y ramificados. Las estructuras ramificadas a modo de ejemplo incluyen los siguientes restos:





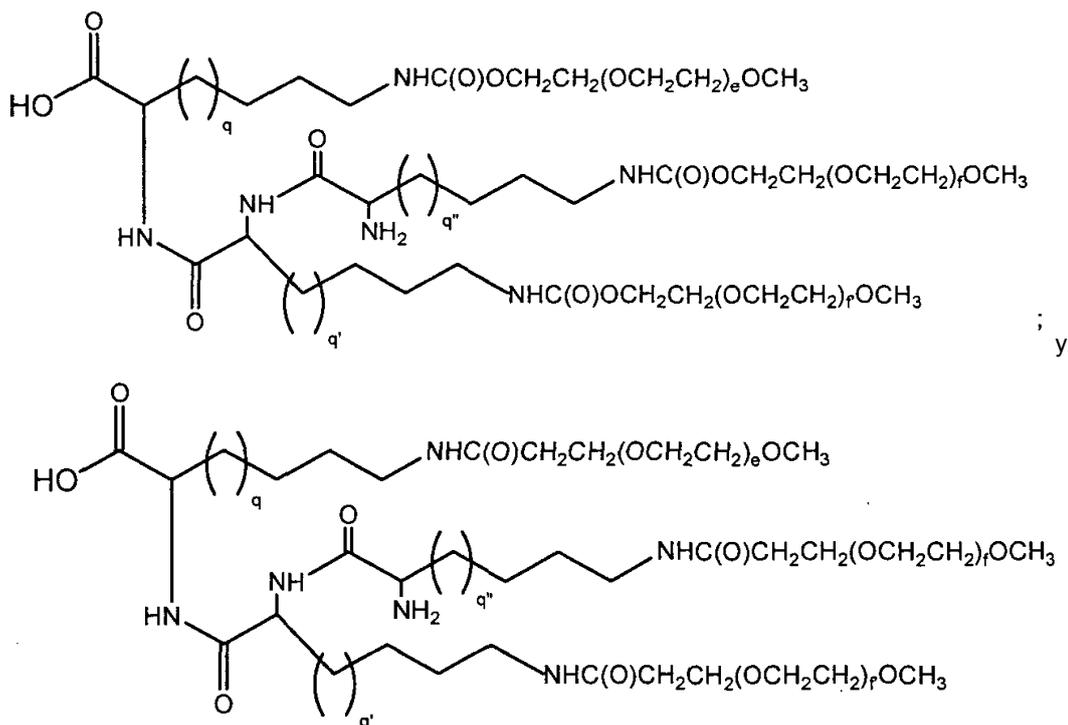
Los expertos apreciarán que la amina libre en las estructuras de di-lisina también puede pegilarse a través de un enlace amida o uretano con o bien un resto PEG lineal o bien un resto PEG ramificado.

5 Un experto en la técnica apreciará que además de las estructuras de PEG lineales mostradas anteriormente, los polímeros ramificados ejemplificados en las secciones anteriores también pueden unirse a un resto de ramificación (por ejemplo, cisteína, serina, lisina, y oligómeros de lisina) en lugar de una o más de las estructuras de PEG lineales. Además, los expertos apreciarán que la base de las estructuras de PEG expuestas anteriormente es simplemente por claridad de ilustración, el PEG puede reemplazarse por sustancialmente cualquier resto polimérico, incluyendo, sin limitación las especies expuestas en la definición de "resto polimérico" encontrada en el presente documento.

10 PEG de cualquier peso molecular, por ejemplo, 1 kD, 2 kD, 5 kD, 10 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 35 kD, 40 kD y 45 kD es de uso en la presente invención. También puede usarse PEG de un peso molecular mayor en la presente invención, incluyendo hasta aproximadamente 200 kD, tal como al menos aproximadamente 180 kD, aproximadamente 160 kD, aproximadamente 140 kD, aproximadamente 120 kD, aproximadamente 100 kD, aproximadamente 90 kD, aproximadamente 80 kD y aproximadamente 70 kD. En determinadas realizaciones, el peso molecular de PEG es de aproximadamente 80 kD. En otras realizaciones, el peso molecular de PEG es de al menos aproximadamente 200 kD, al menos aproximadamente 180 kD, al menos aproximadamente 160 kD, o al menos aproximadamente 140 kD.

20 Cada resto PEG del resto de modificación polimérico ramificado puede tener un peso molecular tal como se definió anteriormente o el peso molecular total de todos los restos PEG del resto de modificación polimérico puede ser tal como se definió anteriormente. Por ejemplo, en determinadas realizaciones cada resto PEG del resto de modificación polimérico ramificado puede ser de aproximadamente 80 kD o el peso molecular total de todos los restos PEG del resto de modificación polimérico puede ser de aproximadamente 80 kD. Asimismo, en determinadas realizaciones cada resto PEG del resto de modificación polimérico ramificado puede ser de aproximadamente 200 kD o el peso molecular total de todos los restos PEG del resto de modificación polimérico puede ser de aproximadamente 200 kD.

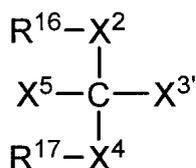
Especies a modo de ejemplo según esta realización tienen las fórmulas:



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

5 Tal como resultará evidente para los expertos, los polímeros ramificados de uso en la invención incluyen variaciones sobre los temas expuestos anteriormente. Por ejemplo, el conjugado de di-lisina-PEG mostrado anteriormente puede incluir tres subunidades poliméricas, la tercera unida a la α -amina mostrada como sin modificar en la estructura anterior. De manera similar, el uso de una tri-lisina funcionalizada con tres o cuatro subunidades poliméricas marcadas con el resto de modificación polimérico de una manera deseada está dentro del alcance de la invención.

10 Tal como se comenta en el presente documento, el PEG de uso en los conjugados de la invención puede ser lineal o ramificado. Un precursor de uso a modo de ejemplo para formar el PEG ramificado que contienen conjugados peptídicos según esta realización de la invención tiene la fórmula:



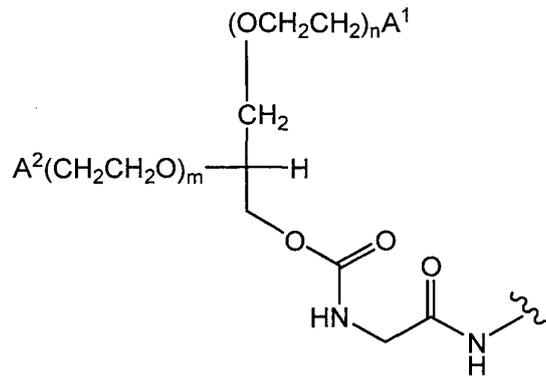
(III).

15 Las especies de polímero ramificado según esta fórmula son esencialmente polímeros solubles en agua puros. $X^{3'}$ es un resto que incluye un grupo funcional reactivo ionizable (por ejemplo, OH, COOH, H_2PO_4 , HSO_3 , HPO_3 , y sales de los mismos, etc.) u otro grupo funcional reactivo, por ejemplo, mencionados más adelante. C es carbono. X^5 , R^{16} y R^{17} se seleccionan independientemente de grupos no reactivos y restos poliméricos (por ejemplo poli(óxido de alquileo), por ejemplo, PEG). Los grupos no reactivos incluyen grupos que se considera que son esencialmente no reactivos, neutros y/o estables a pH fisiológico, por ejemplo, H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y similares. Un resto polimérico a modo de ejemplo incluye las estructuras ramificadas expuestas en la fórmula IIIa y sus ejemplos. Un experto en la técnica apreciará que el resto PEG en estas fórmulas puede reemplazarse por otros polímeros. Los polímeros a modo de ejemplo incluyen los de la familia del poli(óxido de alquileo). (Por ejemplo, H, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido) y brazos poliméricos (por ejemplo, PEG). X^2 y X^4 son fragmentos de unión que son preferiblemente no reactivos esencialmente en condiciones fisiológicas, que pueden ser iguales o diferentes. Un resto de unión a modo de ejemplo no incluye restos aromáticos ni de éster. Alternativamente, estas uniones pueden incluir uno o más restos que están diseñados para degradarse en condiciones fisiológicamente relevantes, por ejemplo, ésteres, disulfuros, etc. X^2 y X^4 unen los brazos poliméricos R^{16} y R^{17} a C. Cuando $X^{3'}$ se hace reaccionar con un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria sobre un resto de unión, azúcar o casete de resto de unión-azúcar, $X^{3'}$ se convierte en un componente del fragmento de unión X^3 .

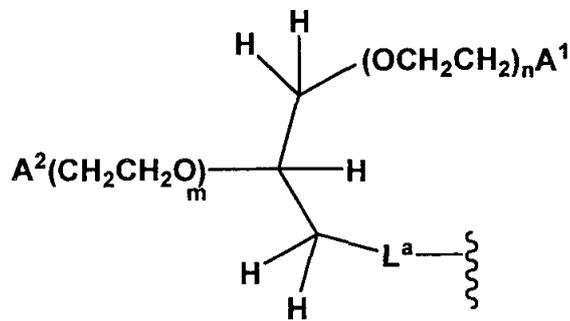
30 Fragmentos de unión a modo de ejemplo para X^2 , X^3 y X^4 se seleccionan independientemente e incluyen S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH y NHC(O)O y OC(O)NH, CH_2S , CH_2O , CH_2CH_2O , CH_2CH_2S , $(CH_2)_oO$, $(CH_2)_oS$ o $(CH_2)_oY'-PEG$ en el que, Y' es S, NH, NHC(O), C(O)NH, NHC(O)O, OC(O)NH u O y o es un número entero de desde 1 hasta 50. En una realización a modo de ejemplo, los fragmentos de unión X^2 y X^4 son fragmentos de unión diferentes.

35 En una realización a modo de ejemplo, el precursor (fórmula III), o un derivado activado del mismo, se hace reaccionar con, y de ese modo se une a un azúcar, un azúcar activado o un nucleótido de azúcar a través de una reacción entre $X^{3'}$ y un grupo de reactividad complementaria en el resto de azúcar, por ejemplo, una amina. Alternativamente, $X^{3'}$ reacciona con un grupo funcional reactivo en un precursor para resto de unión, L. Uno o más de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 o $R^{6'}$ de fórmulas I, Ia, II o IIa pueden incluir el resto de modificación polimérico ramificado, o este resto unido a través de L.

40 En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación polimérico tiene una estructura que incluye un resto según las siguientes fórmulas:

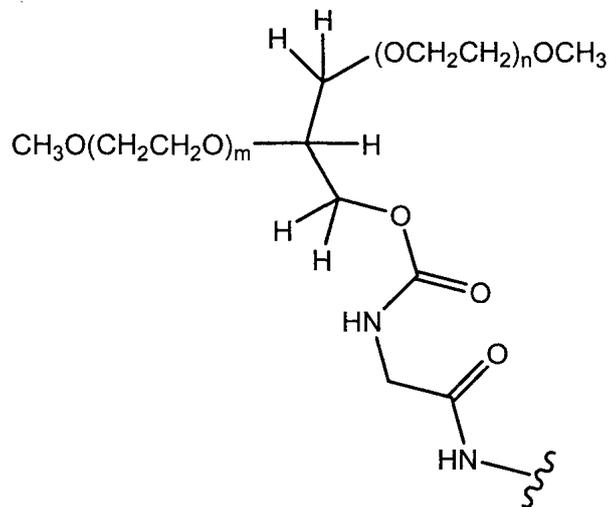


En otra realización a modo de ejemplo según la fórmula anterior, el polímero ramificado tiene una estructura según la siguiente fórmula:

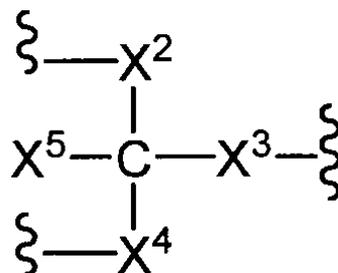


En una realización a modo de ejemplo, A¹ y A² se seleccionan cada uno de -OH y -OCH₃.

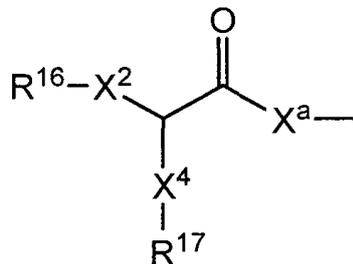
Los grupos de modificación poliméricos a modo de ejemplo según esta realización incluyen el resto:



En una realización a modo de ejemplo, el resto:



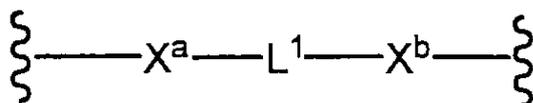
es el brazo de resto de unión, L. En esta realización, un resto de unión a modo de ejemplo se deriva de un aminoácido natural o no natural, análogo de aminoácido o mimético de aminoácido, o un péptido pequeño formado a partir de una o más de tales especies. Por ejemplo, determinados polímeros ramificados encontrados en los compuestos de la invención tienen la fórmula:



(IV).

X^a es un fragmento de unión que se forma mediante la reacción de un grupo funcional reactivo, por ejemplo, X^3 , en un precursor del resto de modificación polimérico ramificado y un grupo funcional reactivo en el resto de azúcar, o un precursor para un resto de unión. Por ejemplo, cuando X^3 es un ácido carboxílico, puede activarse y unirse directamente a un grupo amina colgante de un amino-sacárido (por ejemplo, Sia, GalNH₂, GlcNH₂, ManH₂, etc.), formando un X^a que es una amida. Se describen grupos funcionales reactivos a modo de ejemplo adicionales y precursores activados a continuación en el presente documento. El índice c representa un número entero de desde 1 hasta 10. Los otros símbolos tienen la misma identidad que los comentados anteriormente.

En otra realización a modo de ejemplo, X^a es un resto de unión formado con otro resto de unión:

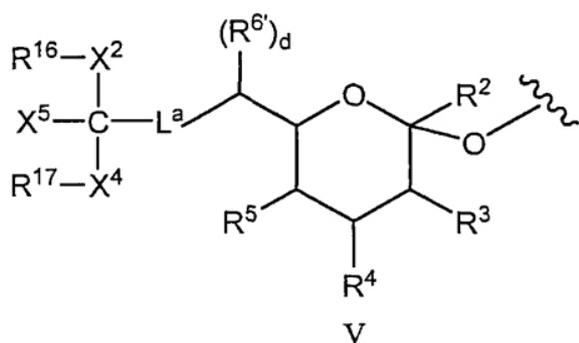


en el que X^b es un segundo fragmento de unión y se selecciona independientemente de los grupos expuestos para X^a , y, similar a L, L^1 es un enlace, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido.

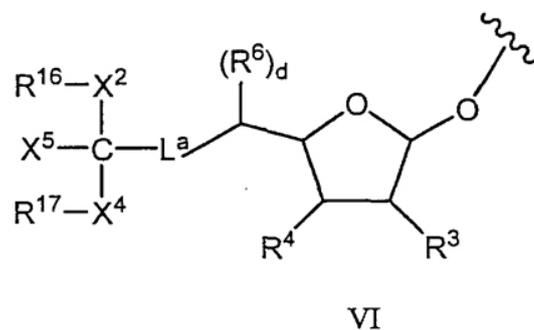
Las especies a modo de ejemplo para X^a y X^b incluyen S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), C(O)NH y NHC(O)O y OC(O)NH.

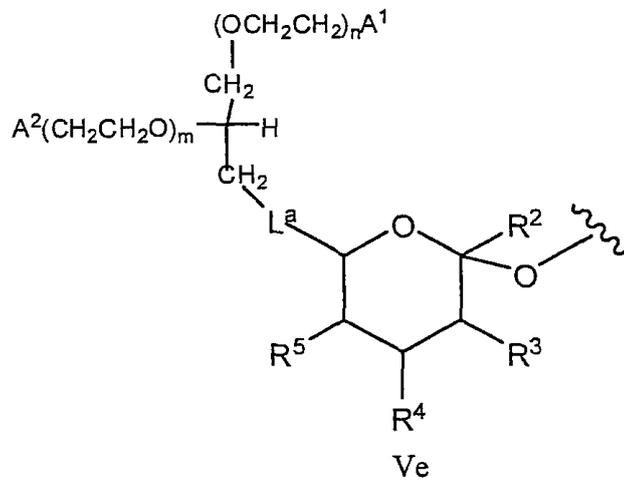
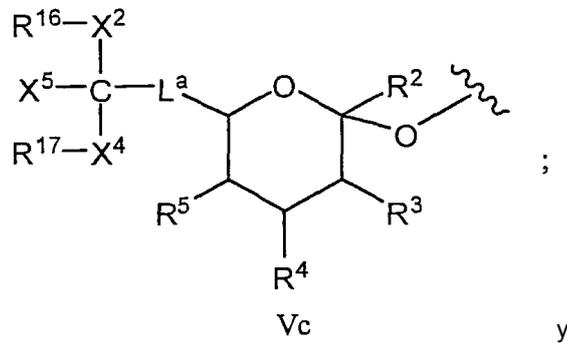
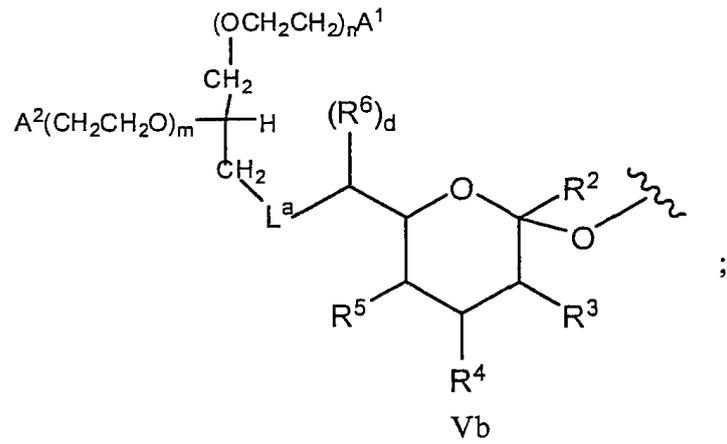
En otra realización a modo de ejemplo, X^4 es un enlace peptídico a R^{17} , que es un aminoácido, di-péptido (por ejemplo, Lys-Lys) o tri-péptido (por ejemplo, Lys-Lys-Lys) en el que el/los resto(s) alfa-amino y/o el/los heteroátomo(s) de la cadena lateral se modifica(n) con un resto de modificación polimérico.

En una realización a modo de ejemplo adicional, los conjugados peptídicos de la invención incluyen un resto, por ejemplo, un resto R^{15} que tiene una fórmula que se selecciona de:

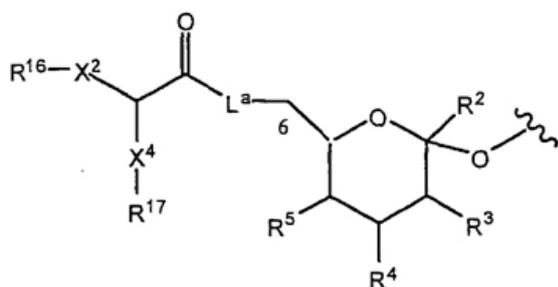


; y

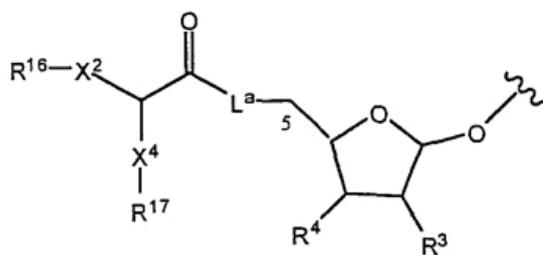




- 5 en la que la identidad de los radicales representados mediante los diversos símbolos es la misma que la comentada anteriormente en el presente documento. L^a es un enlace o un resto de unión tal como se comentó anteriormente para L y L^1 , por ejemplo, un resto alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido. En una realización a modo de ejemplo, L^a es un resto de la cadena lateral de ácido siálico que se funcionaliza con el resto de modificación polimérico tal como se muestra. Los restos L^a a modo de ejemplo incluyen cadenas de alquilo sustituido o no sustituido que incluyen uno o más OH o NH_2 .
- 10 En aún otra realización a modo de ejemplo, la invención proporciona conjugados peptídicos que tienen un resto, por ejemplo, un resto R^{15} con fórmula:



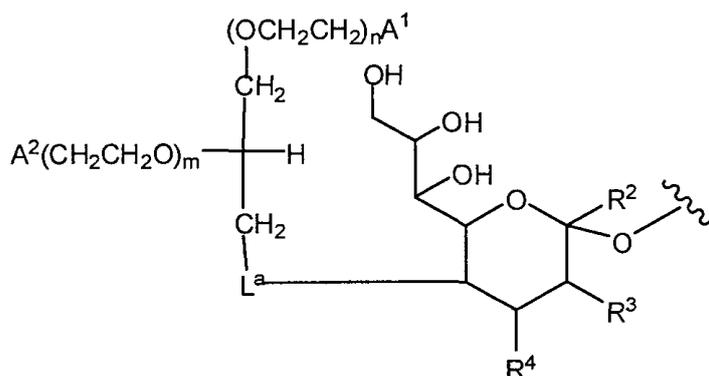
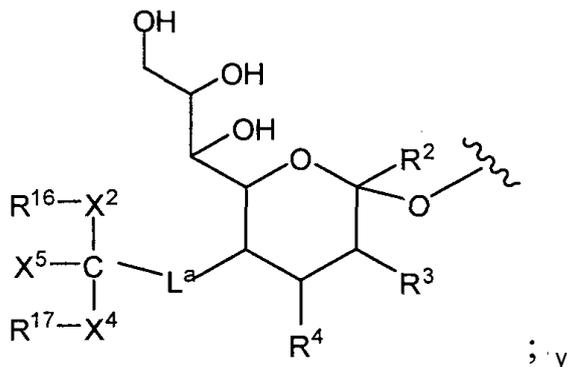
VII



IX

La identidad de los radicales representados mediante los diversos símbolos es la misma que se comentó anteriormente en el presente documento. Tal como apreciarán los expertos, el brazo de resto de unión en las fórmulas VIII es igualmente aplicable a otros azúcares modificados expuestos en el presente documento. En una realización a modo de ejemplo, las especies de fórmulas VIII son los restos R^{15} unidos a las estructuras de glicano expuestas en el presente documento.

En aún otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico incluye un resto R^{15} con una fórmula que es un miembro seleccionado de:

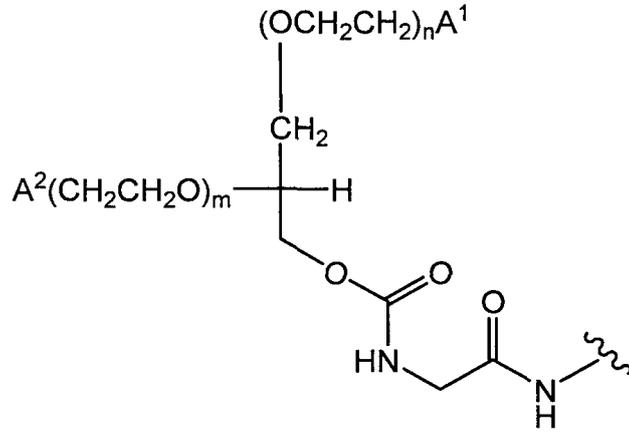


y en las que las identidades de los radicales son tal como se comentaron anteriormente. Una especie a modo de ejemplo para L^a es $-(CH_2)_jC(O)NH(CH_2)_hC(O)NH-$, en la que los índices h y j son números enteros seleccionados independientemente de desde 0 hasta 10. Una especie a modo de ejemplo adicional es $-C(O)NH-$. Los índices m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde 0 hasta 5000. $A^1, A^2, A^3, A^4, A^5, A^6, A^7, A^8, A^9, A^{10}$ y A^{11} son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, $-NA^{12}A^{13}$, $-OA^{12}$ y $-SiA^{12}A^{13}$. A^{12} y A^{13} son miembros seleccionados independientemente de alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido.

Las realizaciones de la invención expuestas anteriormente se ejemplifican adicionalmente mediante referencia a especies en las que el polímero es un polímero soluble en agua, particularmente poli(etilenglicol) ("PEG"), por ejemplo, metoxi-poli(etilenglicol).

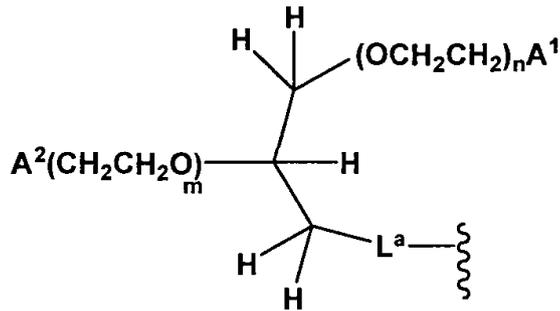
La fórmula IIIa es un subconjunto de la fórmula III. Las estructuras descritas mediante la fórmula IIIa también se abarcan mediante la fórmula III.

En una realización a modo de ejemplo, el grupo de modificación polimérico tiene una estructura que incluye un resto según las siguientes fórmulas:



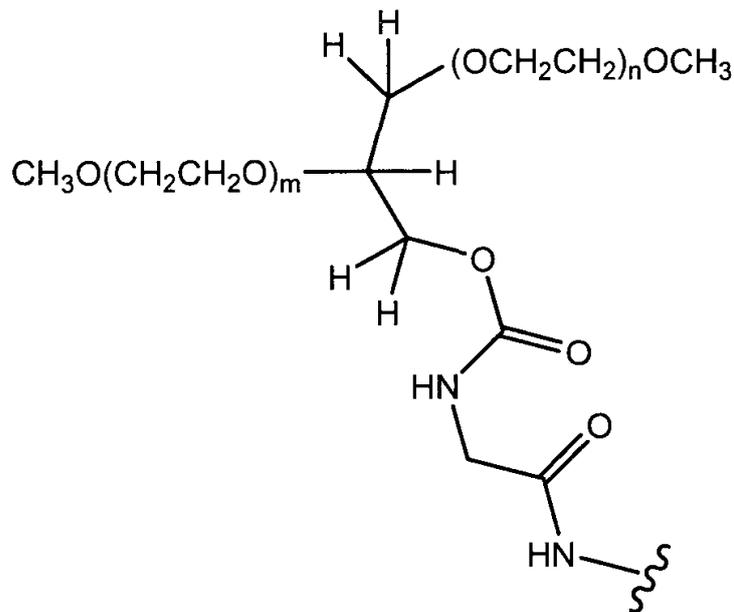
5

En otra realización a modo de ejemplo según la fórmula anterior, el polímero ramificado tiene una estructura que incluye un resto según la siguiente fórmula:



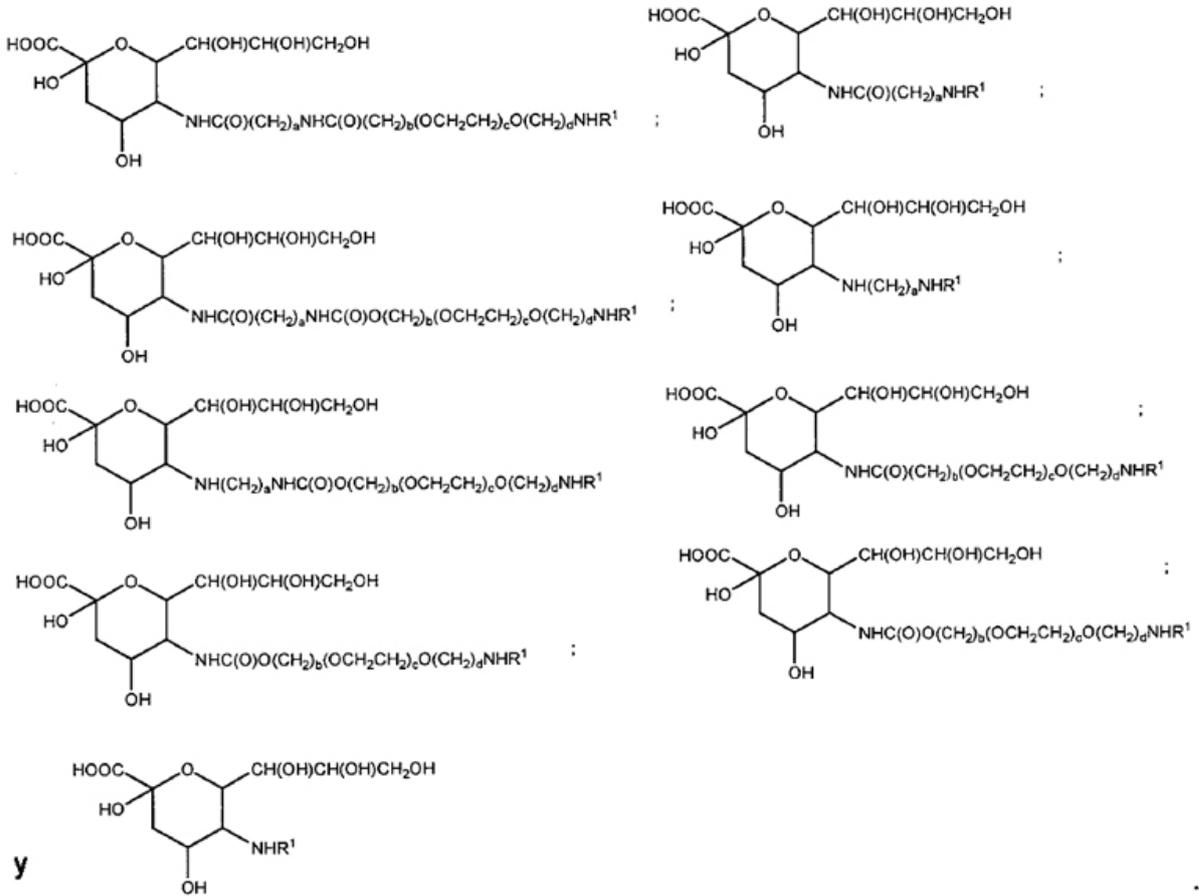
En una realización a modo de ejemplo, A¹ y A² son -OCH₃.

10 Los grupos de modificación poliméricos a modo de ejemplo según esta realización incluyen el resto:



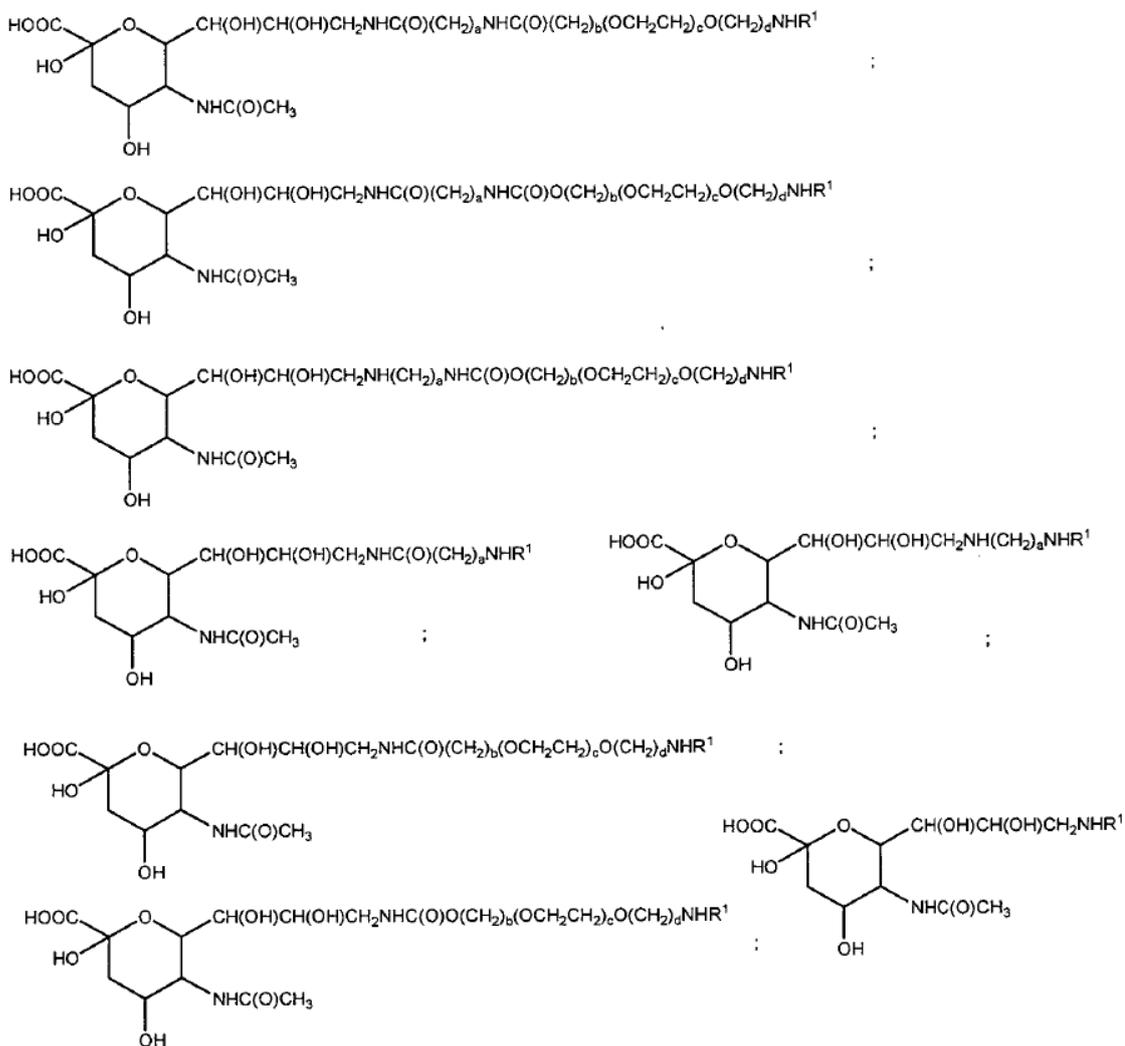
en el que las variables son tal como se describieron anteriormente.

En una realización ilustrativa, el azúcar modificado es ácido siálico y compuestos de azúcar modificados seleccionados de uso en la invención tienen las fórmulas:



5 Los índices a, b y d son números enteros de desde 0 hasta 20. El índice c es un número entero de desde 1 hasta 2500. Las estructuras expuestas anteriormente pueden ser componentes de R^{15} .

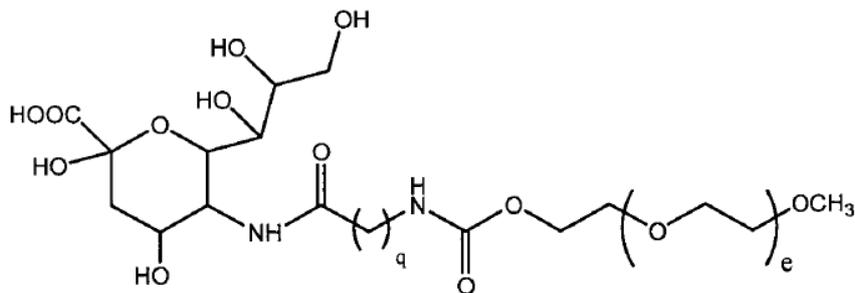
En otra realización ilustrativa, un resto hidroxilo primario del azúcar se funcionaliza con el grupo de modificación. Por ejemplo, el 9-hidroxilo del ácido siálico puede convertirse en la amina correspondiente y funcionalizarse para proporcionar un compuesto según la invención. Las fórmulas según esta realización incluyen:



Las estructuras expuestas anteriormente pueden ser componentes de R¹⁵.

En realizaciones seleccionadas, R¹ o L-R¹ es un PEG ramificado, por ejemplo, una de las especies expuestas anteriormente.

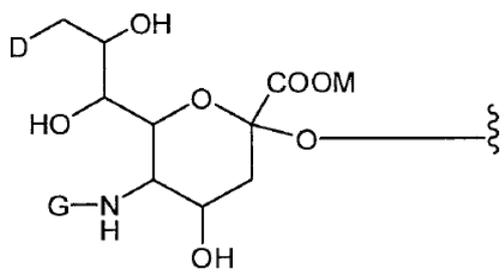
- 5 Tal como se comentó en el presente documento, los ácidos siálicos modificados con polímero de uso en la invención pueden ser también estructuras lineales. Por tanto, la invención proporciona conjugados que incluyen un resto ácido siálico derivado de una estructura tal como:



en la que los índices q y e son tal como se comentó anteriormente.

- 10 Azúcares modificados a modo de ejemplo se modifican con soluble en agua o polímeros. Se ejemplifican adicionalmente a continuación ejemplos de polímero útil.

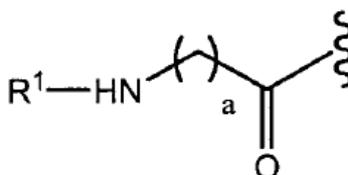
En una realización, la presente invención proporciona un conjugado peptídico que comprende el siguiente grupo de unión de glicosilo:



5 D es -OH; G es un miembro seleccionado de R¹-L- y -C(O)alquil (C₁-C₆)-R¹; R¹ es un resto que comprende un miembro seleccionado de un residuo de poli(etilenglicol) de cadena lineal y un residuo de poli(etilenglicol) ramificado; y

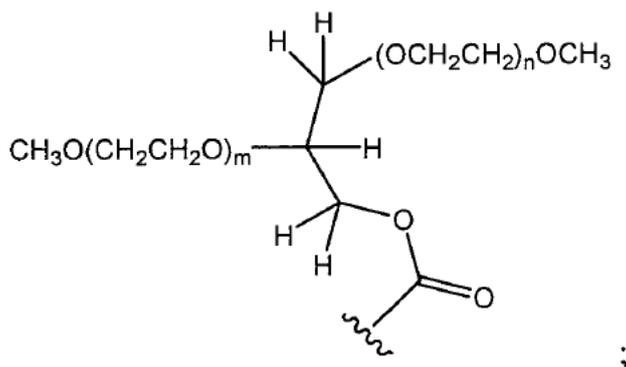
10 M es un miembro seleccionado de H, un contraión de sal y una única carga negativa; L es un resto de unión que es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. En una realización a modo de ejemplo, cuando D es OH, G es R¹-L-. En otra realización a modo de ejemplo, cuando G es -C(O)alquilo (C₁-C₆), D es R¹-LNH-.

En una realización a modo de ejemplo, L-R¹ tiene la fórmula:



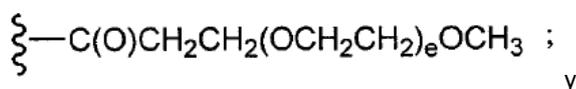
en la que a es un número entero seleccionado de desde 0 hasta 20.

15 En una realización a modo de ejemplo, R¹ tiene una estructura que incluye un resto seleccionado de:

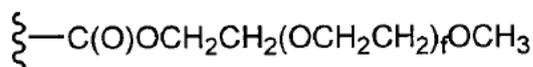


en el que e, f, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde 1 hasta 2500.

En otra realización a modo de ejemplo, R¹ tiene una estructura que es un miembro seleccionado de:

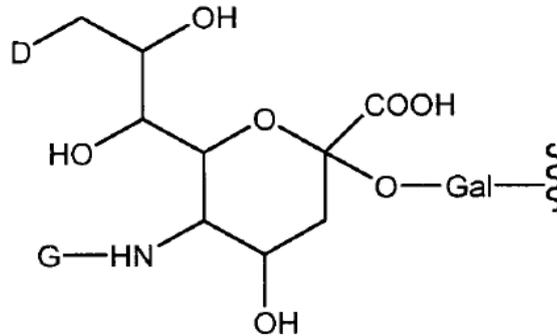


y



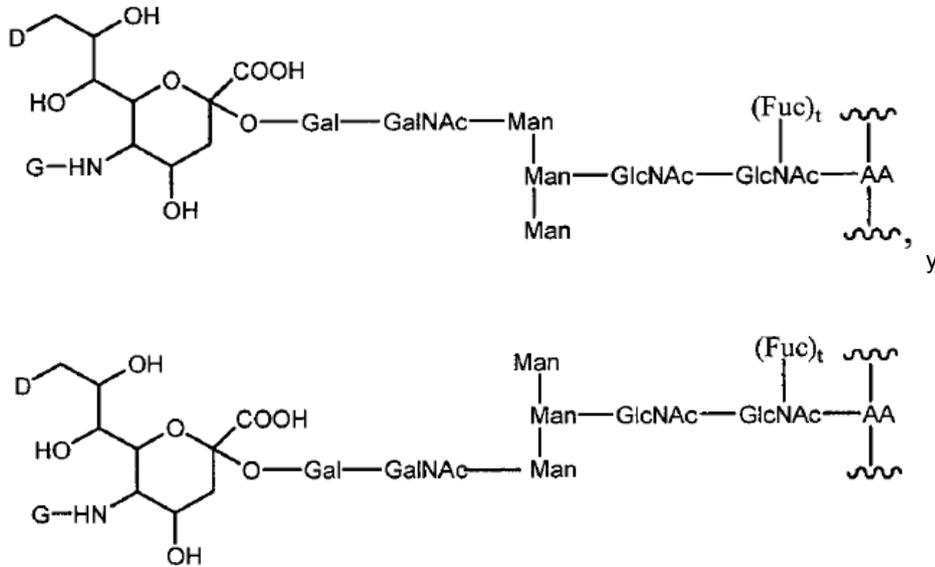
en las que e y f son números enteros seleccionados independientemente de desde 1 hasta 2500.

En otra realización a modo de ejemplo, e resto de unión glicosilo tiene la fórmula:



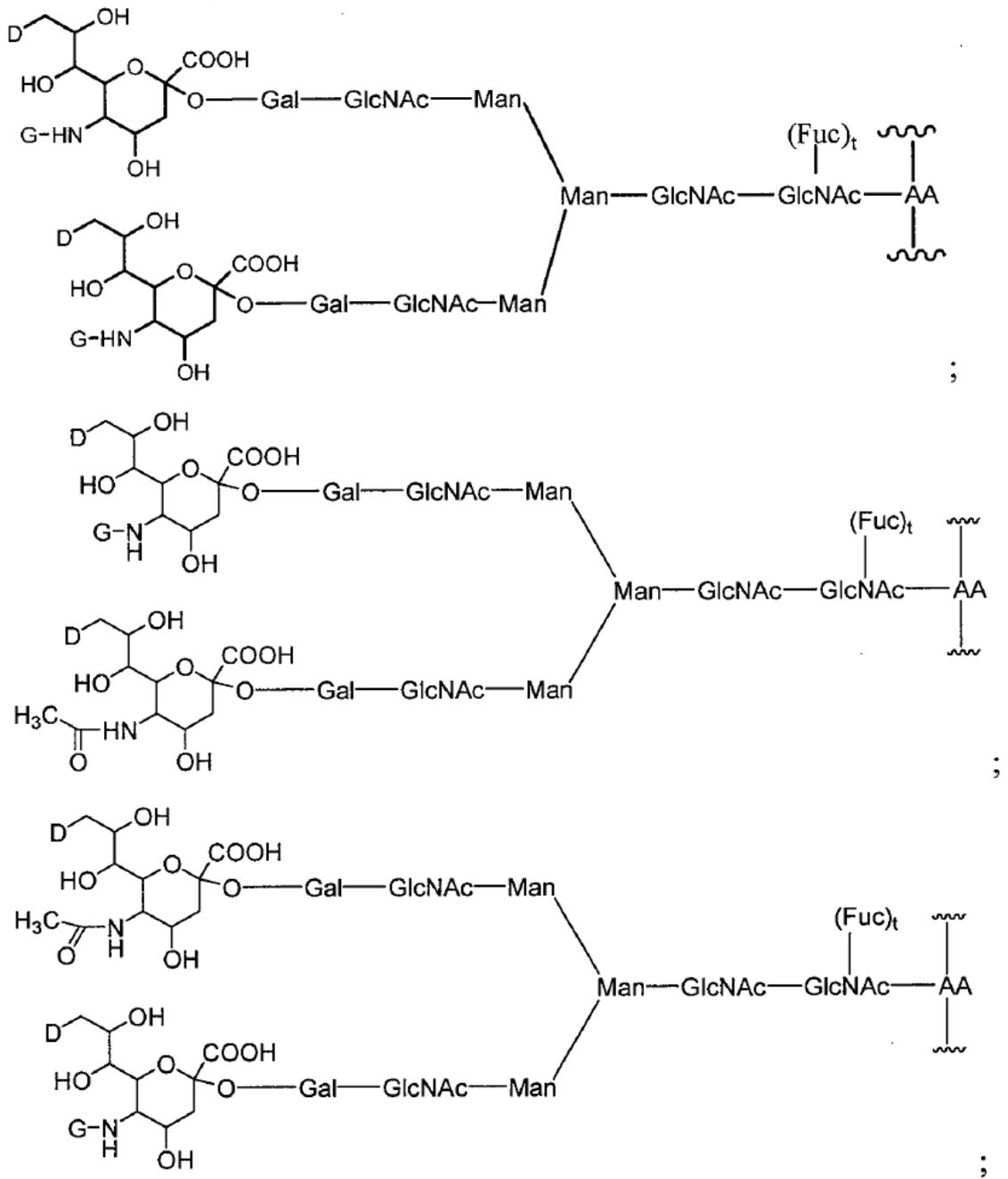
en la que las variables son tal como se describieron anteriormente.

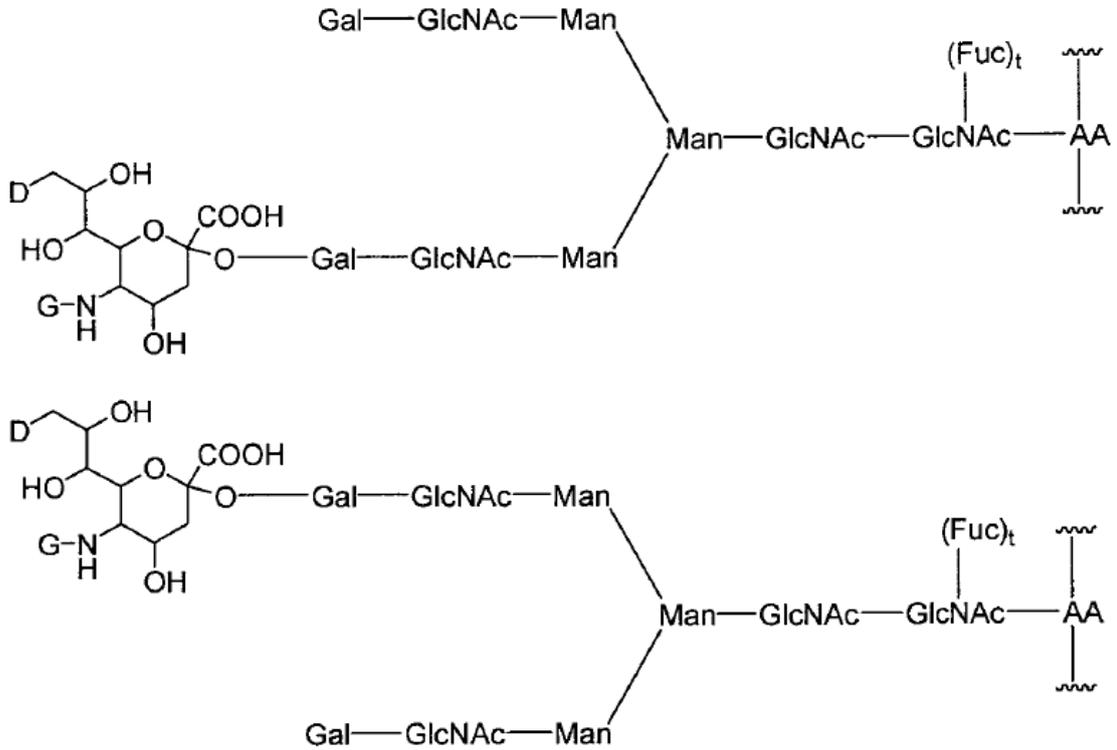
- 5 En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende al menos uno de dicho resto de unión glicosilo según una fórmula seleccionada de:



- 10 en las que D y G son tal como se describió anteriormente, AA es un residuo de aminoácido de dicho conjugado peptídico y t es un número entero seleccionado de 0 y 1.

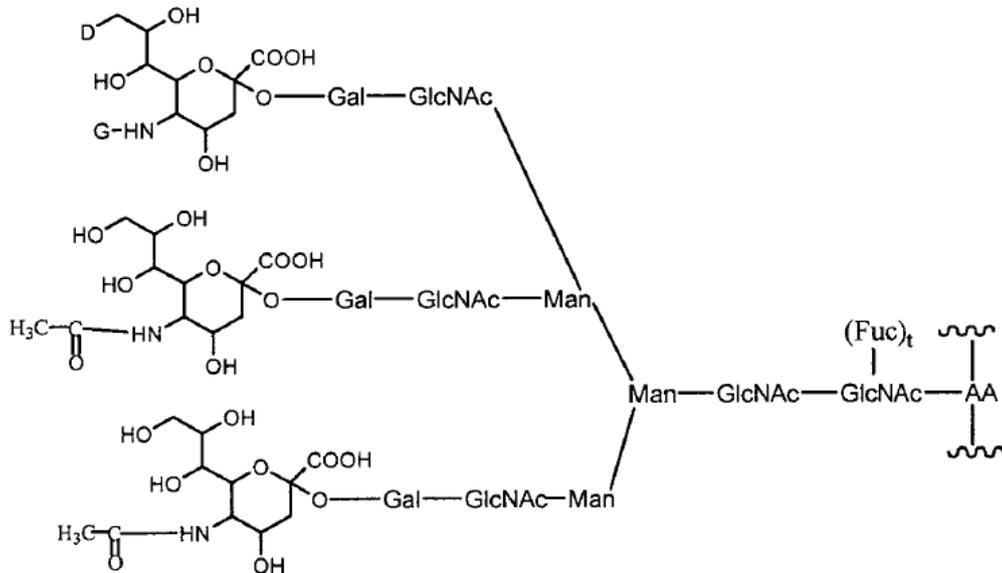
En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende al menos uno de dicho resto de unión glicosilo en el que cada uno de dicho resto de unión glicosilo tiene una estructura que es un miembro seleccionado independientemente de las siguientes fórmulas:

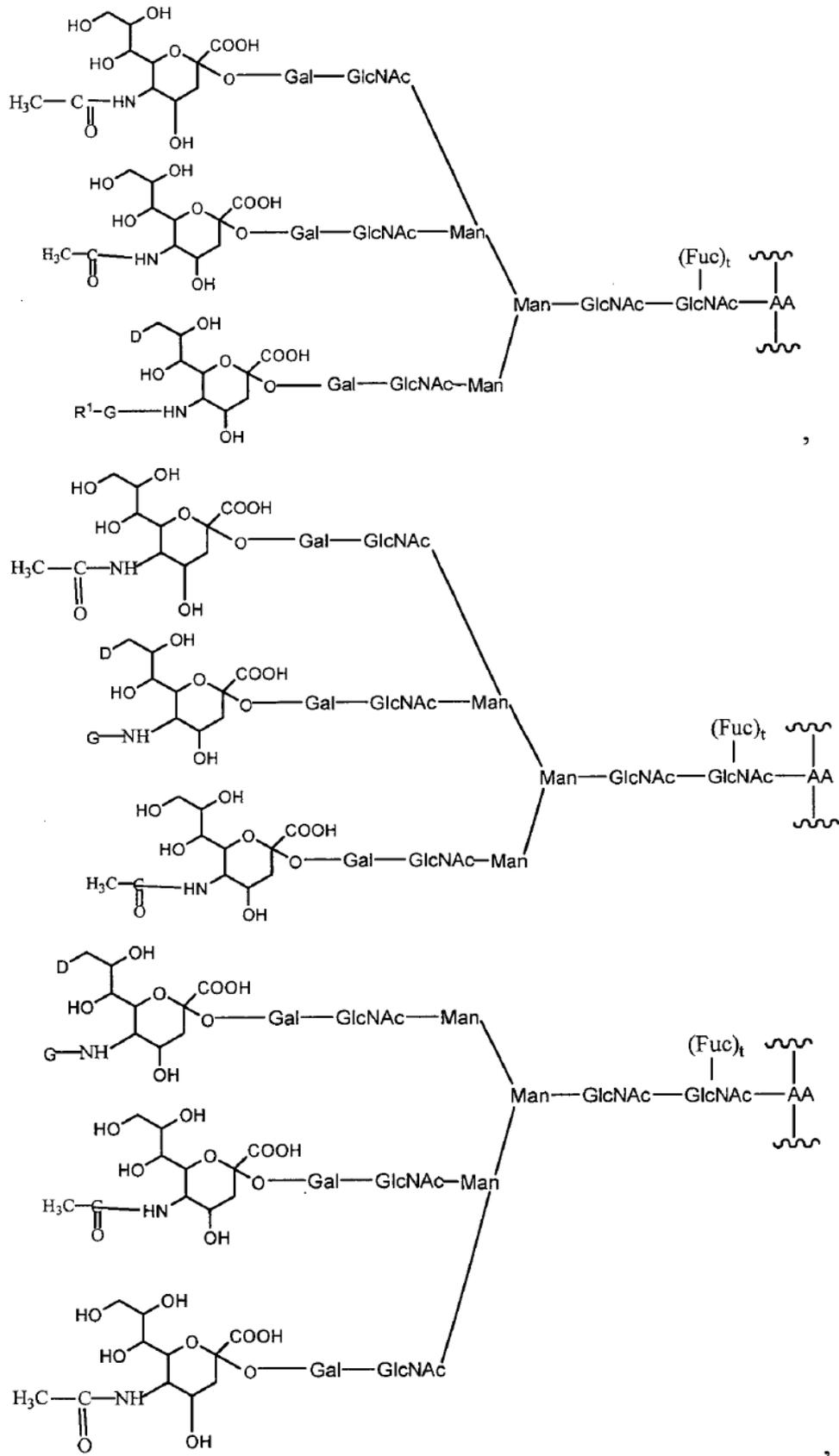


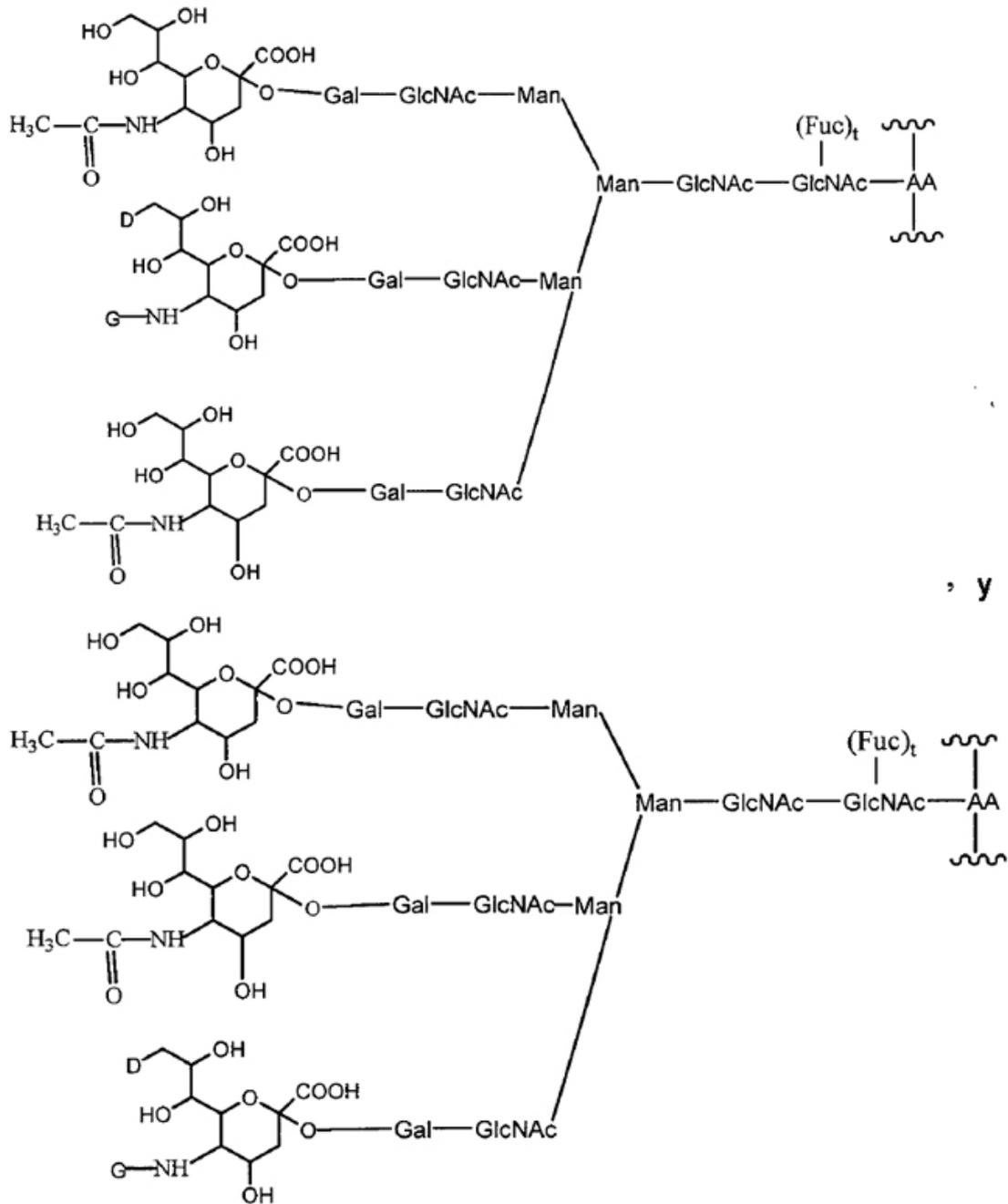


en las que D y G son tal como se describió anteriormente, AA es un residuo de aminoácido de dicho conjugado peptídico y t es un número entero seleccionado de 0 y 1.

En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende al menos uno de dicho resto de unión glicosilo según una fórmula seleccionada de:



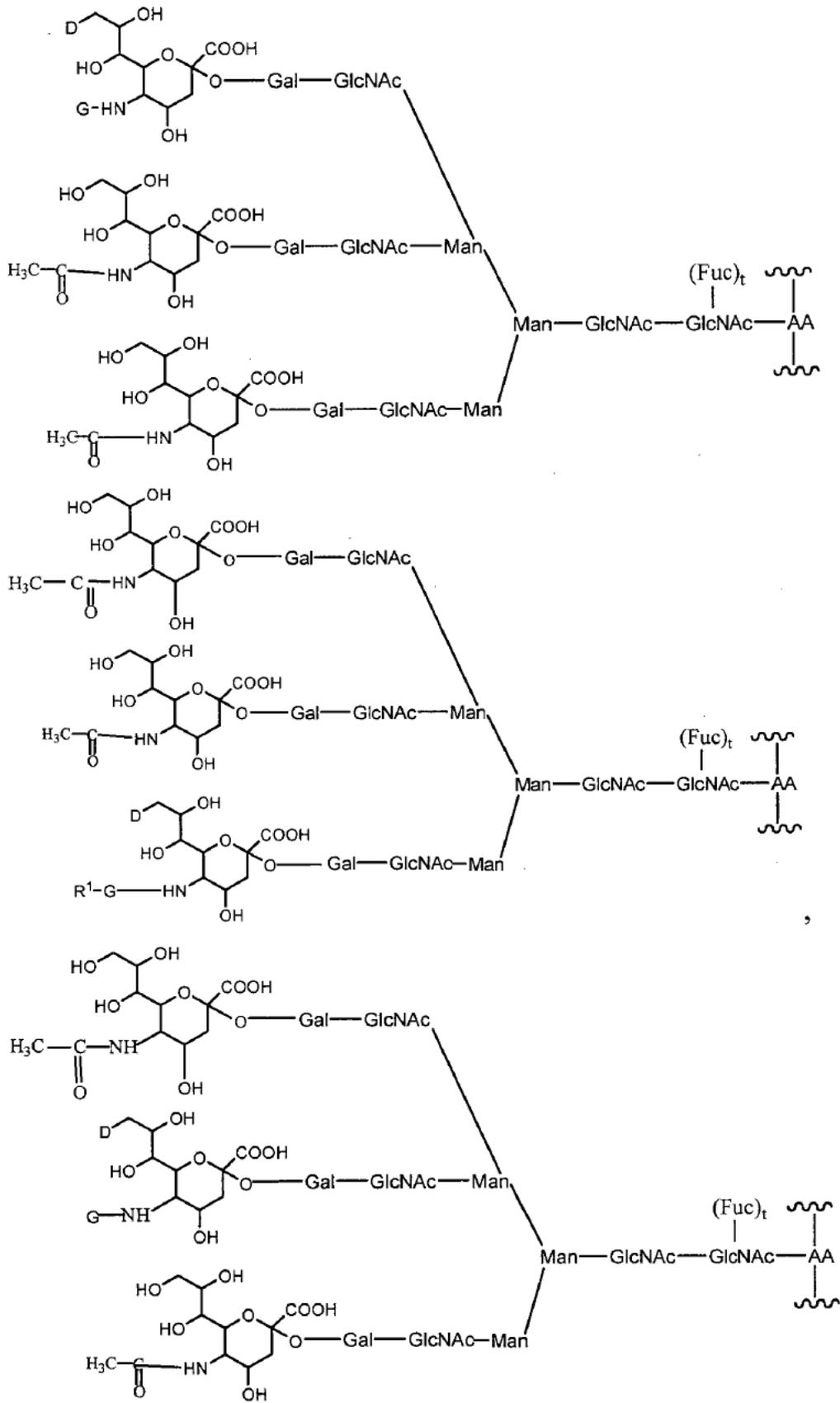


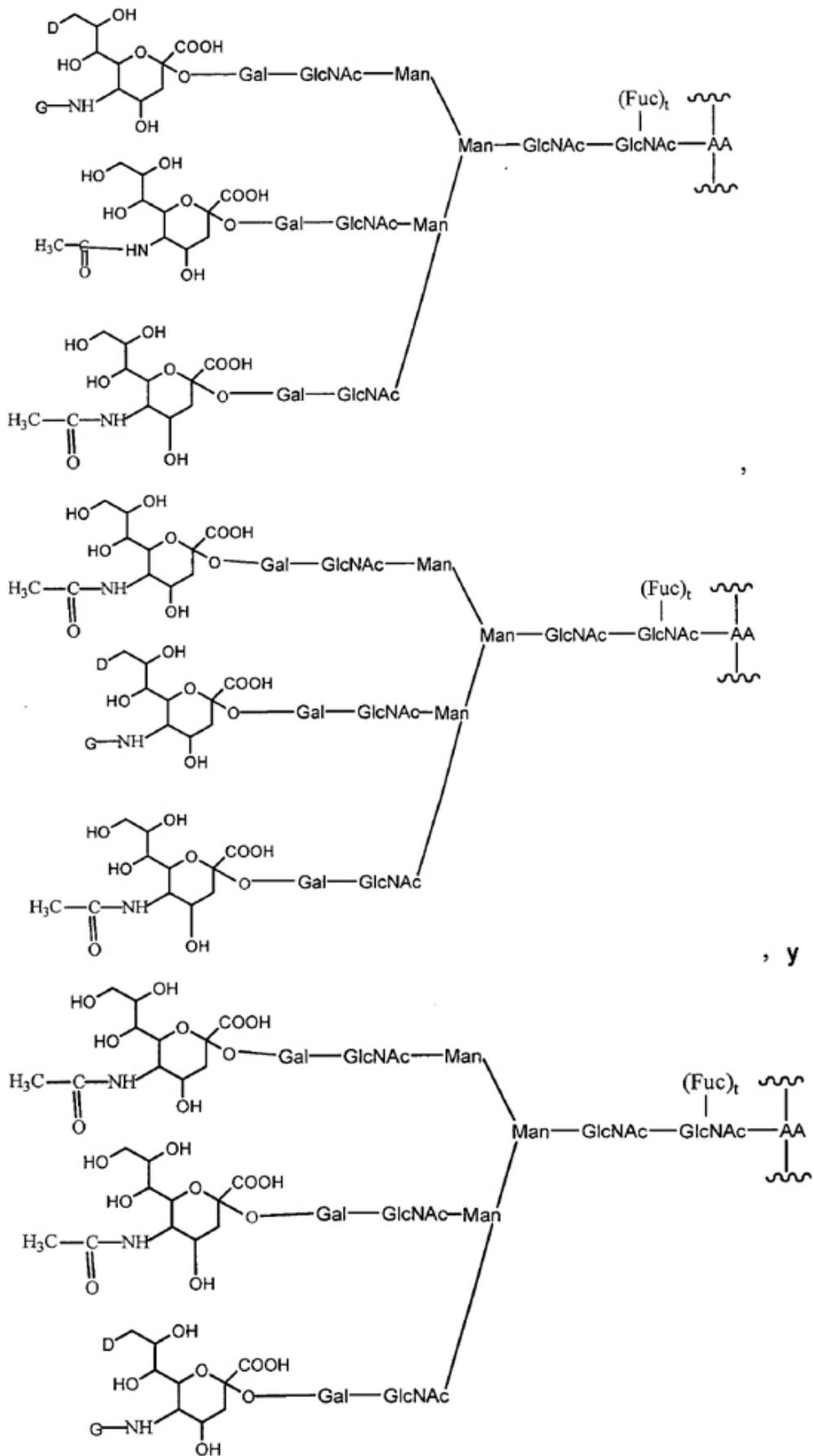


y

5 en las que D y G son tal como se describió anteriormente, AA es un residuo de aminoácido de dicho conjugado peptídico y t es un número entero seleccionado de 0 y 1. En una realización a modo de ejemplo, un miembro seleccionado de 0 y 2 de los restos sialilo que no comprenden G está ausente. En una realización a modo de ejemplo, un miembro seleccionado de 1 y 2 de los restos sialilo que no comprenden G está ausente.

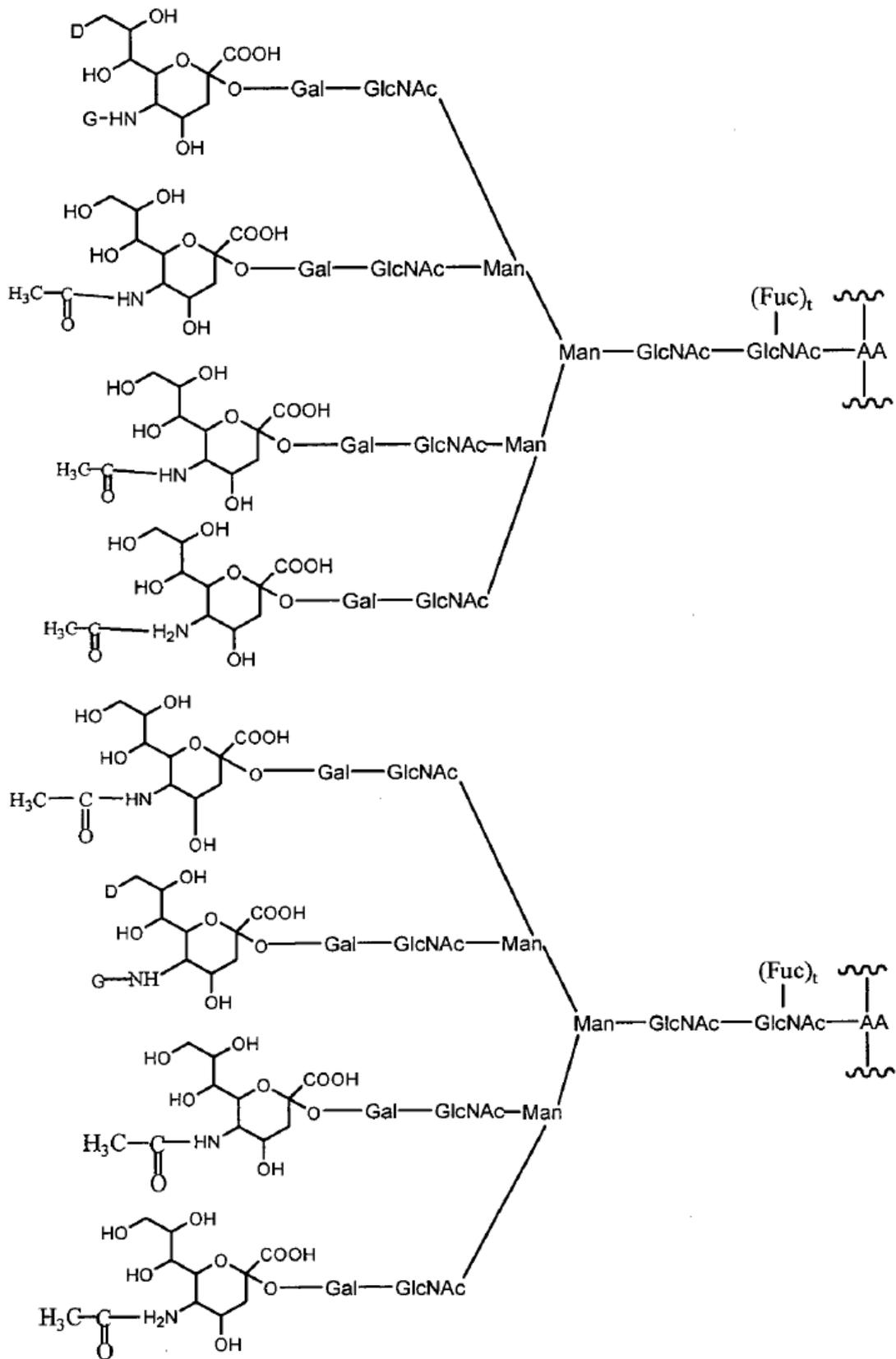
En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende al menos uno de dicho resto de unión glicosilo según una fórmula seleccionada de:

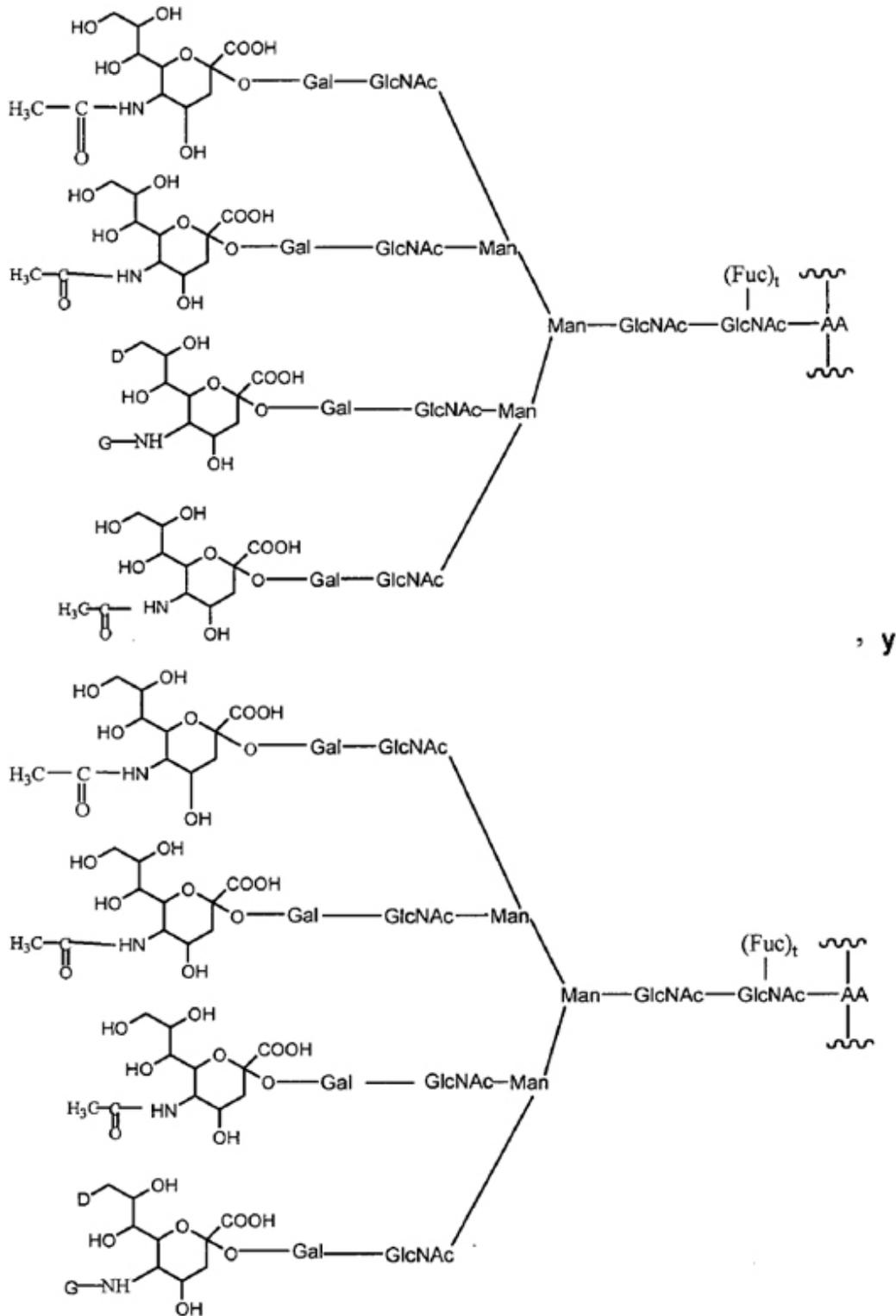




en las que D y G son tal como se describió anteriormente, AA es un residuo de aminoácido de dicho conjugado peptídico y t es un número entero seleccionado de 0 y 1. En una realización a modo de ejemplo, un miembro seleccionado de 0 y 2 de los restos sialilo que no comprende G está ausente. En una realización a modo de ejemplo, un miembro seleccionado de 1 y 2 de los restos sialilo que no comprenden G está ausente.

- 5 En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende al menos uno de dicho resto de unión glicosilo según una fórmula seleccionada de:



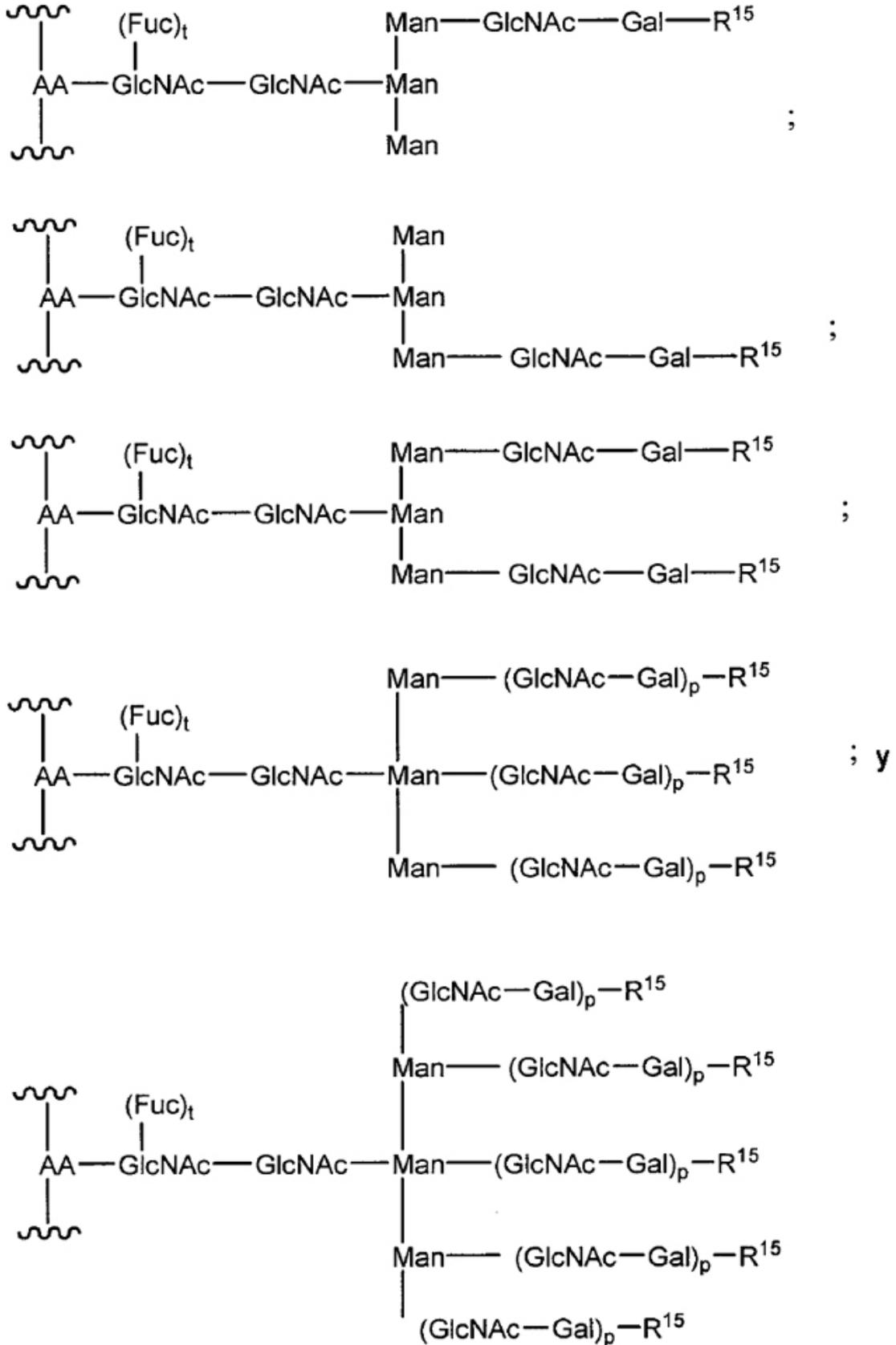


y

5 en las que D y G son tal como se describió anteriormente, AA es un residuo de aminoácido de dicho conjugado peptídico y t es un número entero seleccionado de 0 y 1. En una realización a modo de ejemplo, un miembro seleccionado de 0 y 2 de los restos sialilo que no comprenden G está ausente. En una realización a modo de ejemplo, un miembro seleccionado de 1 y 2 de los restos sialilo que no comprenden G está ausente.

En otra realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un péptido que se produce en un huésped adecuado. También se dan a conocer métodos de expresión de este péptido. En otro aspecto a modo de ejemplo, el huésped es un sistema de expresión de mamíferos.

En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico comprende al menos un resto de unión glicosilo que tiene la fórmula:



en las que AA es un residuo de aminoácido de dicho péptido; t es un número entero seleccionado de 0 y 1; y R¹⁵ es el resto sialilo modificado.

En otra realización a modo de ejemplo, el método comprende, antes de la etapa (a): (b) expresar el péptido en un huésped adecuado.

5 *II. D. iv. Polímeros insolubles en agua*

En otra realización, análoga a la comentada anteriormente, los azúcares modificados incluyen un polímero insoluble en agua, en vez de un polímero soluble en agua. Los conjugados de la invención pueden incluir también uno o más polímeros insolubles en agua. Esta realización de la invención se ilustra mediante el uso del conjugado como un vehículo con el que administrar un péptido terapéutico de manera controlada. Se conocen en la técnica sistemas de administración de fármacos poliméricos. Véase, por ejemplo, Dunn *et al.*, Eds. POLIMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Los expertos en la técnica apreciarán que sustancialmente cualquier sistema de administración de fármacos conocido puede aplicarse a los conjugados de la presente invención.

Los motivos expuestos anteriormente para R¹, L-R¹, R¹⁵, R¹⁵, y otros radicales son igualmente aplicables a polímeros insolubles en agua, que pueden incorporarse en las estructuras lineales y ramificadas sin limitación utilizando química fácilmente accesible para los expertos en la técnica.

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

Los polímeros naturales modificados de manera sintética de uso en conjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa y nitrocelulosas. Los miembros particularmente preferidos de las amplias clases polímeros naturales modificados de manera sintética incluyen, pero no se limitan a, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butirato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboximetilcelulosa, triacetato de celulosa, sal de sodio de sulfato de celulosa, y polímeros de ésteres acrílico y metacrílico y ácido algínico.

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

Los polímeros biodegradables representativos de uso en los conjugados de la invención incluyen, pero no se limitan a, polilactidas, poliglicolidas y copolímeros de las mismas, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), poli(lactida-co-glicolida), polianhídridos, poliortoésteres, combinaciones y copolímeros de los mismos. De uso particular son composiciones que forman geles, tales como los que incluyen colágeno, plurónicos y similares.

Los polímeros de uso en la invención incluyen polímeros "híbridos" que incluyen materiales insolubles en agua que tienen dentro de al menos una porción de su estructura una molécula biorreabsorbible. Un ejemplo de un polímero de este tipo es uno que incluye un copolímero insoluble en agua, que tiene una región biorreabsorbible, una región hidrófila y una pluralidad de grupos funcionales reticulables por cadena de polímero.

Para los fines de la presente invención, los "materiales insolubles en agua" incluyen materiales que son sustancialmente insolubles en agua o entornos que contienen agua. Por tanto, aunque determinadas regiones o segmentos del copolímero pueden ser hidrófilos o incluso solubles en agua, la molécula de polímero, en su totalidad, no se disuelve en agua en ninguna medida sustancial.

Para los fines de la presente invención, el término "molécula biorreabsorbible" incluye una región que puede metabolizarse o descomponerse y reabsorberse y/o eliminarse a través de rutas secretoras normales por el organismo. Tales metabolitos o productos de descomposición son preferiblemente no tóxicos sustancialmente para el organismo.

La región biorreabsorbible puede ser o bien hidrófoba o bien hidrófila, siempre que la composición de copolímero en su totalidad no se vuelva soluble en agua. Por tanto, la región biorreabsorbible se selecciona basándose en la preferencia de que el polímero, en su totalidad, permanezca insoluble en agua. Por consiguiente, las propiedades

relativas, es decir, los tipos de grupos funcionales contenidos por, y las proporciones relativas de la región biorreabsorbible, y la región hidrófila se seleccionan para garantizar que las composiciones biorreabsorbibles útiles permanezcan insolubles en agua.

5 Los polímeros reabsorbibles a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, copolímeros de bloque reabsorbibles producidos de manera sintética de poli(ácido α -hidroxi-carboxílico)/poli(oxialquileno), (véase Cohn *et al.*, patente estadounidense n.º 4.826.945). Estos copolímeros no están reticulados y son solubles en agua de modo que el organismo puede secretar las composiciones de copolímero de bloque degradado. Véanse, Younes *et al.*, J Biomed. Mater. Res. 21: 1301-1316 (1987); y Cohn *et al.*, J Biomed. Mater. Res. 22: 993-1009 (1988).

10 Los polímeros biorreabsorbibles preferidos en el presente documento incluyen uno o más componentes seleccionados de poli(ésteres), poli(hidroxiácidos), poli(lactonas), poli(amidas), poli(éster-amidas), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(fosfazinas), poli(fosfoésteres), poli(tioésteres), polisacáridos y mezclas de los mismos. Más preferiblemente todavía, el polímero biorreabsorbible incluye un componente de poli(hidroxi)ácido. De los poli(hidroxi)ácidos, se prefiere poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido caproico), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico) y copolímeros y mezclas de los mismos.

15 Además de formar fragmentos que se absorben *in vivo* ("se biorreabsorben"), recubrimientos poliméricos preferidos para su uso en los métodos de la invención también pueden formar un fragmento que puede excretarse y/o metabolizarse.

20 También pueden usarse copolímeros de orden superior en la presente invención. Por ejemplo, Casey *et al.*, patente estadounidense n.º 4.438.253, que se concedió el 20 de marzo de 1984, da a conocer copolímeros de tribloque producidos a partir de la transesterificación de poli(ácido glicólico) y un poli(alquilenglicol) terminado en hidroxilo. Tales composiciones se dan a conocer para su uso como suturas de monofilamento reabsorbibles. La flexibilidad de tales composiciones se controla mediante la incorporación de un ortocarbonato aromático, tal como ortocarbonato de tetra-*p*-tolilo dentro de la estructura de copolímero.

25 También pueden utilizarse otros polímeros basados en ácidos lácticos y/o glicólicos. Por ejemplo, Spinu, patente estadounidense n.º 5.202.413, que se concedió el 13 de abril de 1993, da a conocer copolímeros de múltiples bloques biodegradables que tienen secuencialmente bloques ordenados de polilactida y/o poliglicolida producidos mediante polimerización por apertura de anillo de lactida y/o glicolida sobre o bien un diol oligomérico o bien un residuo de diamina seguido por extensión de cadena con un compuesto difuncional, tal como, un diisocianato, cloruro de diacilo o diclorosilano.

30 Pueden diseñarse regiones biorreabsorbibles de recubrimientos útiles en la presente invención para que sean escindibles hidrolítica y/o enzimáticamente. Para los fines de la presente invención, "escindible hidrolíticamente" se refiere a la susceptibilidad del copolímero, especialmente la región biorreabsorbible, a la hidrólisis en agua o un entorno que contiene agua. De manera similar, "escindible enzimáticamente" tal como se usa en el presente documento se refiere a la susceptibilidad del copolímero, especialmente la región biorreabsorbible, a la escisión
35 mediante enzimas endógenas o exógenas.

Cuando se coloca dentro del cuerpo, la región hidrófila puede procesarse para dar fragmentos secretables y/o metabolizables. Por tanto, la región hidrófila puede incluir, por ejemplo, poliéteres, poli(óxidos de alquileno), polioles, poli(vinilpirrolidina), poli(alcohol vinílico), poli(alquinoxazolinas), polisacáridos, hidratos de carbono, péptidos, proteínas y copolímeros y mezclas de los mismos. Además, la región hidrófila puede ser también, por ejemplo, un
40 poli(óxido de alquileno). Tales poli(óxidos de alquileno) pueden incluir, por ejemplo, poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno) y mezclas y copolímeros de los mismos.

Los polímeros que son componentes de hidrogeles también son útiles en la presente invención. Los hidrogeles son materiales poliméricos que pueden absorber cantidades relativamente grandes de agua. Los ejemplos de compuestos que forman hidrogel incluyen, pero no se limitan a, poli(ácidos acrílicos), carboximetilcelulosa de sodio,
45 poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidina, gelatina, carragenanos y otros polisacáridos, ácido hidroxietilmetacrílico (HEMA), así como derivados de los mismos, y similares. Pueden producirse hidrogeles que son estables, biodegradables y biorreabsorbibles. Además, las composiciones de hidrogel pueden incluir subunidades que presentan una o más de estas propiedades.

Se conocen composiciones de hidrogel biocompatibles cuya integridad puede controlarse a través de la reticulación y se prefieren en el presente documento para su uso en los métodos de la invención. Por ejemplo, Hubbell *et al.*, patentes estadounidenses n.ºs 5.410.016, que se concedió el 25 de abril de 1995 y 5.529.914, que se concedió el 25 de junio de 1996, dan a conocer sistemas solubles en agua, que son copolímeros de bloque reticulados que tienen un segmento de bloque central soluble en agua intercalado entre dos extensiones hidrolíticamente lábiles. Los extremos activos de tales copolímeros se ocupan además con funcionalidades acrilato fotopolimerizables. Cuando
55 se reticulan, estos sistemas se vuelven hidrogeles. El bloque central soluble en agua de tales copolímeros puede incluir poli(etilenglicol); mientras que las extensiones hidrolíticamente lábiles pueden ser un poli(α -hidroxiácido), tal como poli(ácido glicólico) o poli(ácido láctico). Véase, Sawhney *et al.*, Macromolecules 26: 581-587 (1993).

En otra realización preferida, el gel es un gel termorreversible. Se prefieren en el presente documento geles

termorreversibles que incluyen componentes tales como plurónicos, colágeno, gelatina, ácido hialurónico, polisacáridos, hidrogel de poliuretano, hidrogel de poliuretano-urea y combinaciones de los mismos.

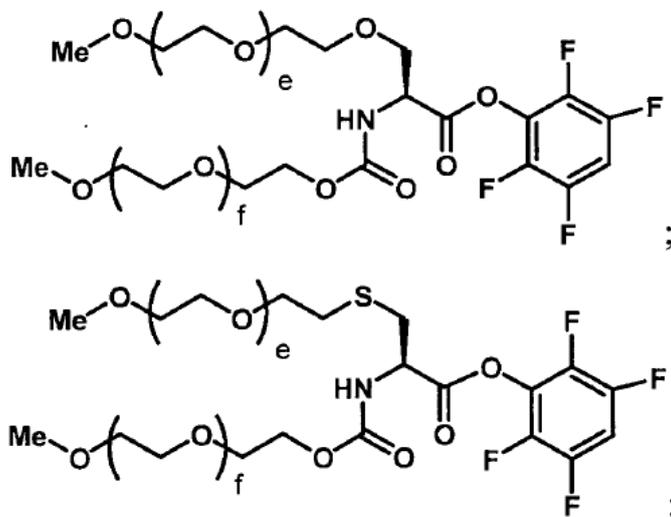
En aún otra realización a modo de ejemplo, el conjugado de la invención incluye un componente de un liposoma. Pueden prepararse liposomas según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Eppstein *et al.*, patente estadounidense n.º 4.522.811. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones de liposomas disolviendo lípido(s) apropiado(s) (tal(es) como estearoilfosfatidiletanolamina, estearoilfosfatidilcolina, aracadoilfosfatidilcolina y colesterol) en un disolvente inorgánico que luego se evapora, dejando una película delgada de lípido secado sobre la superficie del recipiente. Se introduce entonces una disolución acuosa del compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable dentro del recipiente. El recipiente se agita entonces a mano para liberar el material lipídico de los laterales del recipiente y dispersar los agregados líquidos, formando de ese modo la suspensión liposomal.

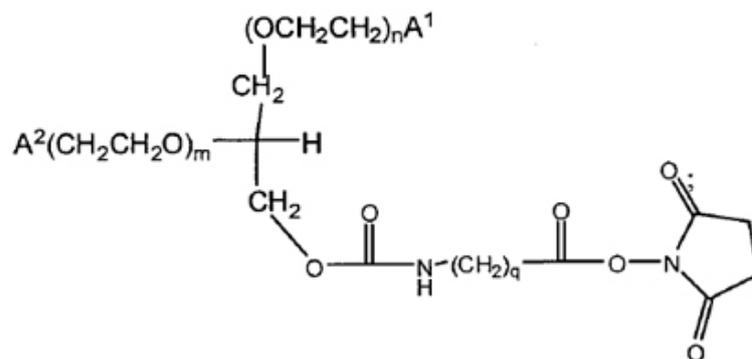
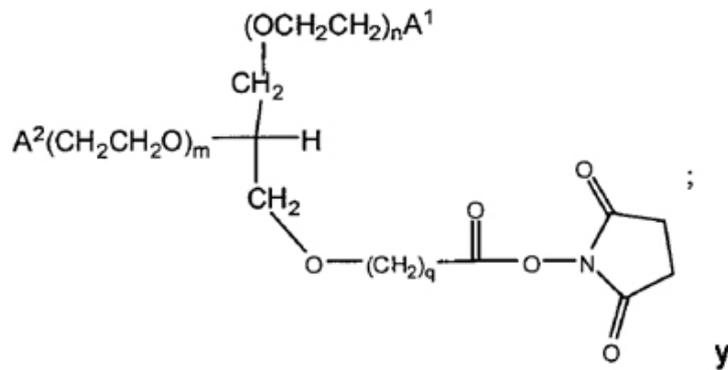
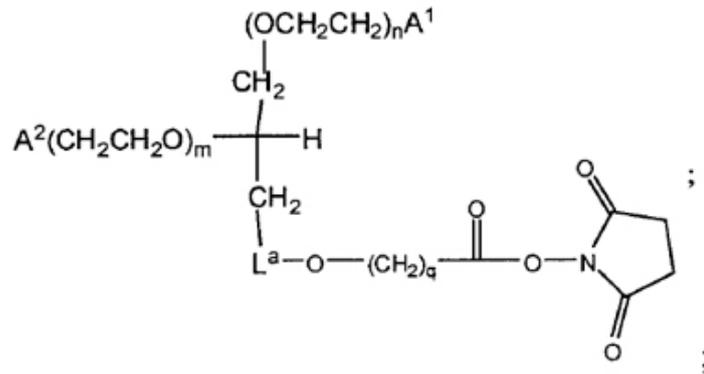
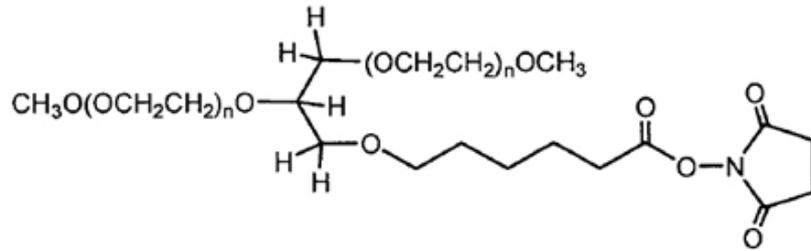
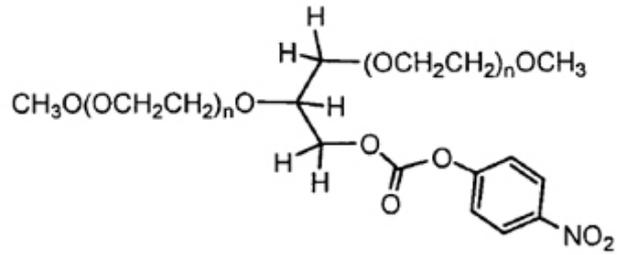
Las micropartículas mencionadas anteriormente y los métodos de preparación de las micropartículas se ofrecen a modo de ejemplo y no pretenden definir el alcance de las micropartículas de uso en la presente invención. Resultará evidente para los expertos en la técnica que una serie de micropartículas, fabricadas mediante diferentes métodos, es de uso en la presente invención.

Los formatos estructurales comentados anteriormente en el contexto de los polímeros soluble en agua, tanto de cadena lineal como ramificados son generalmente aplicables con respecto a los polímeros insolubles en agua también. Por tanto, por ejemplo, los núcleos de ramificación de cisteína, serina, dilisina y trilisina pueden funcionalizarse con dos restos de polímero insoluble en agua. Los métodos usados para producir estas especies son generalmente análogos de manera estrecha a los usados para producir los polímeros solubles en agua.

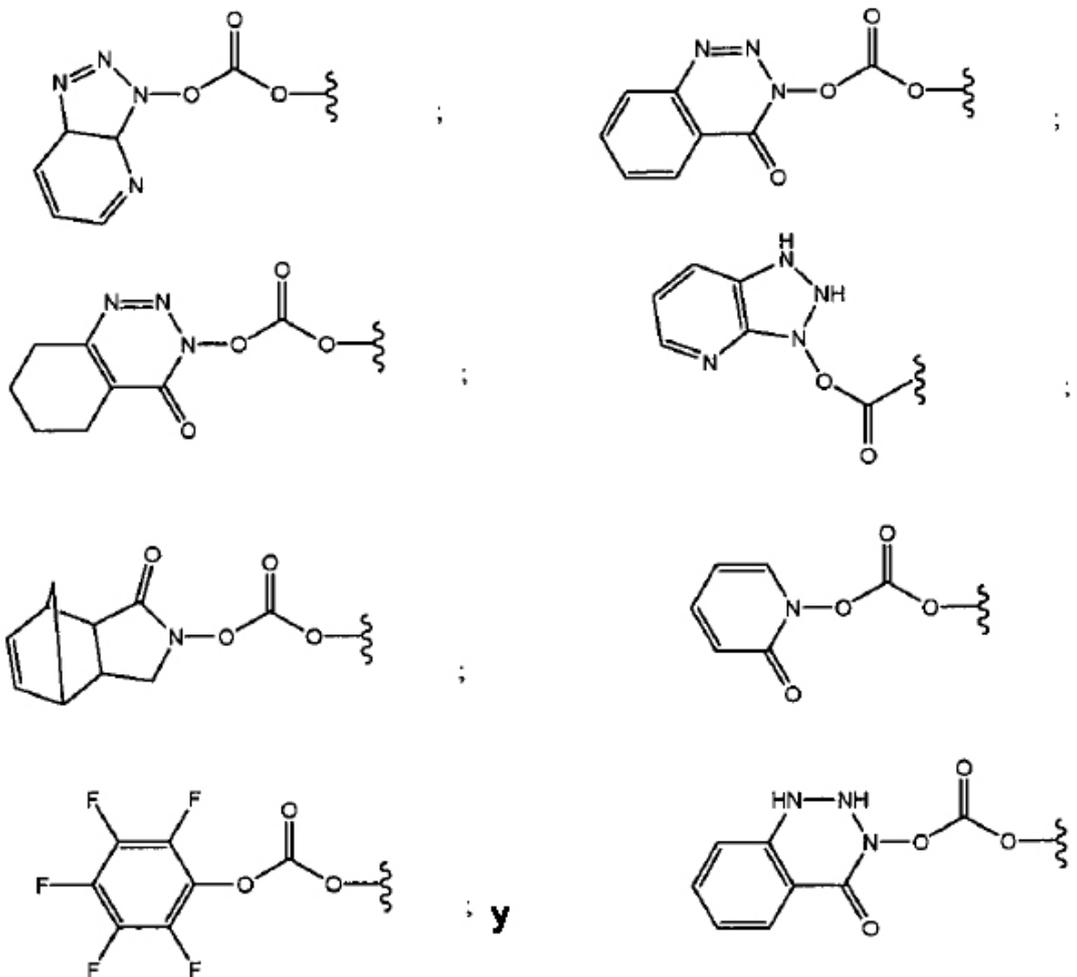
II. D. v. Métodos de producción de grupos de modificación poliméricos

Los grupos de modificación poliméricos pueden activarse para su reacción con un resto glicosilo o resto sacarilo o un resto aminoácido. Las estructuras a modo de ejemplo de especies activadas (por ejemplo, carbonatos y ésteres activos) incluyen:





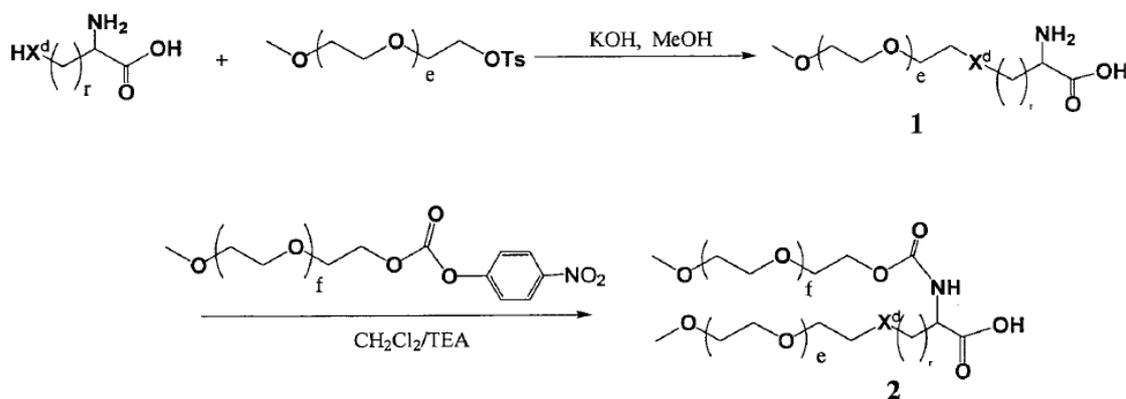
En la figura anterior, q es un miembro seleccionado de 1-40. Otros grupos activantes, o salientes, apropiados para activar PEG lineales y ramificados de uso en la preparación de los compuestos expuestos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a las especies:



5 En el documento WO 04/083259 se exponen moléculas de PEG que se activan con estas y otras especies y métodos de preparación de los PEG activados.

10 Los expertos en la técnica apreciarán que uno o más de los brazos de m-PEG de los polímeros ramificados mostrados anteriormente pueden reemplazarse por un resto PEG con un extremo terminal diferente, por ejemplo, OH, COOH, NH₂, alquilo C₂-C₁₀, etc. Además, las estructuras anteriores se modifican fácilmente insertando restos de unión de alquilo (o eliminando átomos de carbono) entre el átomo de carbono α y el grupo funcional de la cadena lateral de aminoácidos. Por tanto, "homo" derivados y homólogos superiores, así como homólogos inferiores están dentro del alcance de núcleos para PEG ramificados de uso en la presente invención.

Las especies de PEG ramificadas expuestas en el presente documento se preparan fácilmente mediante métodos tales como los que se exponen en el esquema a continuación:



en el que X^d es O o S y r es un número entero de desde 1 hasta 5. Los índices e y f son números enteros seleccionados independientemente de desde 1 hasta 2500. En una realización a modo de ejemplo, uno o ambos de estos índices se seleccionan de manera que el polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kD, 10 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 35 kD o 40 kD. También puede usarse PEG de un peso molecular mayor en la presente invención, incluyendo hasta aproximadamente 200 kD, tal como al menos aproximadamente 180 kD, aproximadamente 160 kD, aproximadamente 140 kD, aproximadamente 120 kD, aproximadamente 100 kD, aproximadamente 90 kD, aproximadamente 80 kD y aproximadamente 70 kD. En determinadas realizaciones el peso molecular de PEG es de aproximadamente 80 kD. En otras realizaciones, el peso molecular de PEG es de al menos aproximadamente 200 kD, al menos aproximadamente 180 kD, al menos aproximadamente 160 kD o al menos aproximadamente 140 kD.

Por tanto, según este esquema, se pone en contacto un aminoácido natural o no natural con un derivado de m-PEG activado, en este caso el tosilato, formando **1** mediante la alquilación del heteroátomo de la cadena lateral X^d . El aminoácido de m-PEG monofuncionalizado se somete a condiciones de N-acilación con un derivado de m-PEG reactivo, ensamblando de ese modo m-PEG **2** ramificado. Tal como apreciará un experto, el grupo saliente tosilato puede reemplazarse por cualquier grupo saliente adecuado, por ejemplo, halógeno, mesilato, triflato, etc. De manera similar, el carbonato reactivo utilizado para acilar la amina puede reemplazarse por un éster activo, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida, etc., o el ácido puede activarse *in situ* usando un agente de deshidratación tal como dicitohexilcarbodiimida, carbonildiimidazol, etc.

En otras realizaciones a modo de ejemplo, el resto urea se reemplaza por un grupo tal como una amida.

II. E. Composiciones de materia de conjugado peptídico homodisperso

Además de proporcionar conjugados peptídicos que se forman a través de un grupo de unión de glicosilo añadido química o enzimáticamente, la presente invención proporciona composiciones de materia que comprenden conjugados peptídicos que son altamente homogéneos en sus patrones de sustitución. Usando los métodos de la invención, es posible formar conjugados peptídicos en los que una proporción sustancial de los grupos de unión de glicosilo y restos glicosilo a través de una población de conjugados peptídicos se unen a un residuo glicosilo o de aminoácido estructuralmente idéntico. Por tanto, en un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos de polímero soluble en agua, que se unen covalentemente al péptido a través de un grupo de unión de glicosilo, por ejemplo, un grupo de unión de glicosilo intacto. En un conjugado peptídico a modo de ejemplo de la invención, esencialmente cada miembro de la población de polímero soluble en agua se une mediante el grupo de unión de glicosilo a un residuo glicosilo del péptido, y cada residuo glicosilo del péptido al que se une el grupo de unión de glicosilo tiene la misma estructura.

La presente invención también proporciona conjugados análogos a los descritos anteriormente en los que el péptido se conjuga con un grupo de modificación, por ejemplo resto terapéutico, resto de diagnóstico, resto de direccionamiento, resto de toxina o similar mediante un grupo de unión de glicosilo. Cada uno de los grupos de modificación mencionados anteriormente puede ser una molécula pequeña, polímero natural (por ejemplo, polipéptido) o polímero sintético. Cuando el grupo de modificación se une a un ácido siálico, se prefiere generalmente que el grupo de modificación sea sustancialmente no fluorescente.

En una realización a modo de ejemplo, los péptidos de la invención incluyen al menos un sitio de glicosilación unido en O o unido en N, que está glicosilado con un azúcar modificado que incluye un grupo de modificación polimérico, por ejemplo, un resto PEG. En una realización a modo de ejemplo, el PEG se une covalentemente al péptido mediante un grupo de unión de glicosilo intacto, o mediante un resto de unión distinto de glicosilo, por ejemplo, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido. El grupo de unión de glicosilo se une covalentemente a o bien un residuo de aminoácido o bien un residuo glicosilo del péptido. Alternativamente, el grupo de unión de glicosilo se une a una o más unidades de glicosilo de un glicopéptido. La invención también proporciona conjugados en los que un grupo de unión de glicosilo se une a tanto un residuo de aminoácido como un residuo

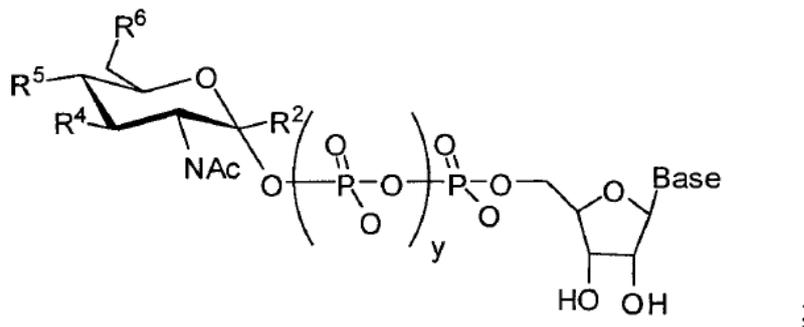
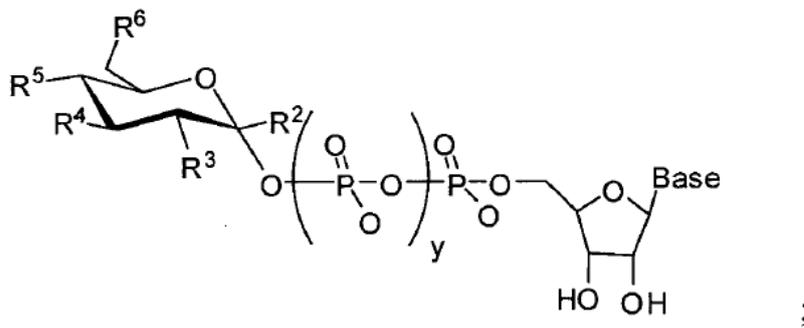
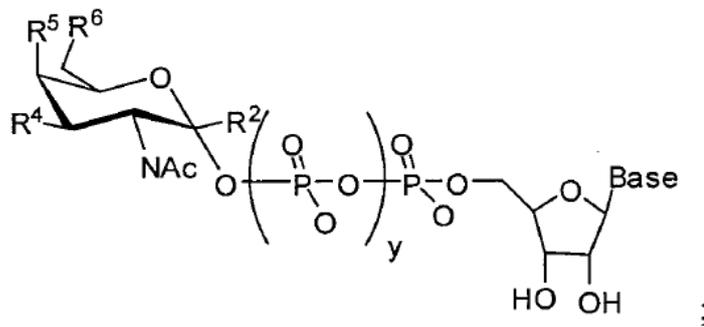
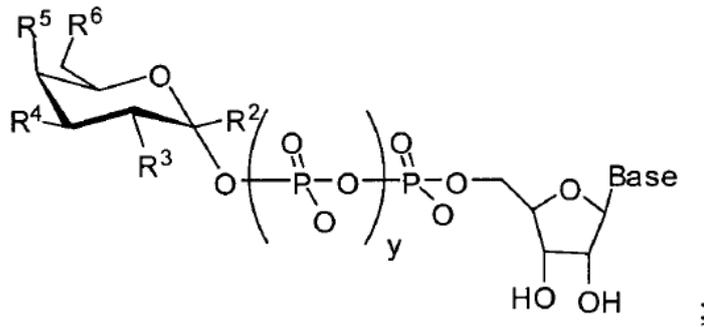
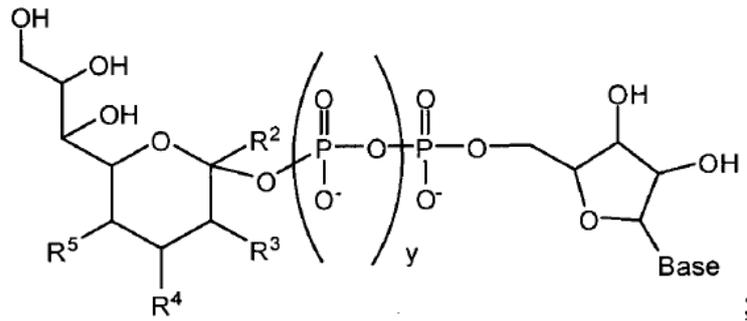
glicosilo.

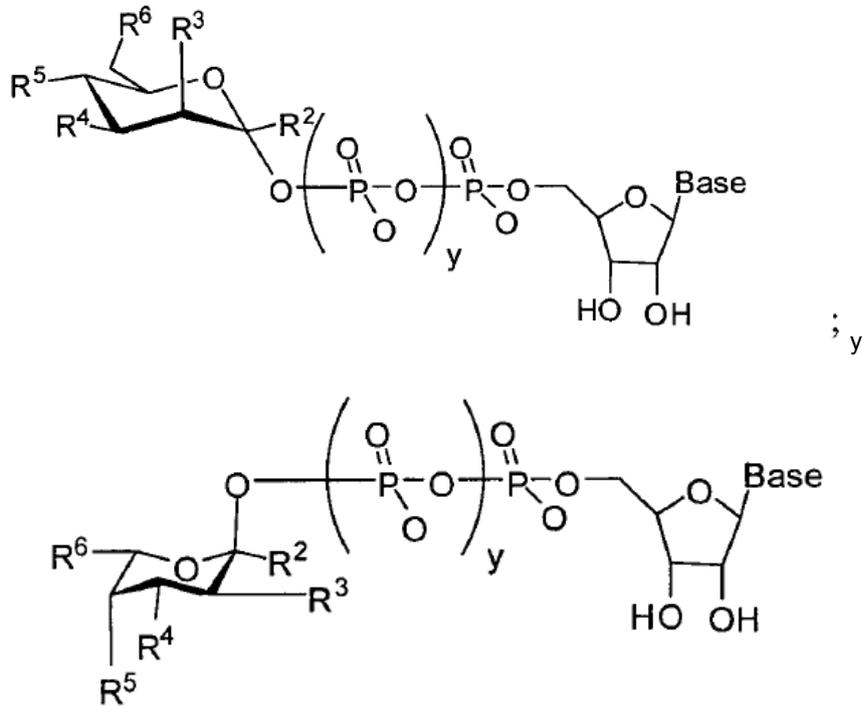
5 Los glicanos en los péptidos de la invención se corresponden generalmente con los encontrados en un péptido que se produce por células de mamífero (BHK, CHO) o células de insecto (por ejemplo, Sf-9), tras la remodelación según los métodos expuestos en el presente documento. Por ejemplo, un péptido derivado de insecto que se expresa con un núcleo de tri-manosilo se pone en contacto posteriormente con un donador de GlcNAc y una GlcNAc transferasa y un donador de Gal y una Gal transferasa. La agregación de GlcNAc y Gal al núcleo de trimanosilo se logra en o bien dos etapas o bien una única etapa. Se añade un ácido siálico modificado a al menos una rama del resto glicosilo tal como se comenta en el presente documento. Esos restos Gal que no están funcionalizados con el ácido siálico modificado tienen "los sitios activos ocupados" opcionalmente mediante reacción con un donador de ácido siálico en presencia de una sialil transferasa.

10 En una realización a modo de ejemplo, al menos el 60% de los restos Gal terminales en una población de péptidos tienen los sitios activos ocupados con ácido siálico, preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente, al menos el 80%, todavía más preferiblemente al menos el 90% e incluso más preferiblemente al menos el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% tienen los sitios activos ocupados con ácido siálico.

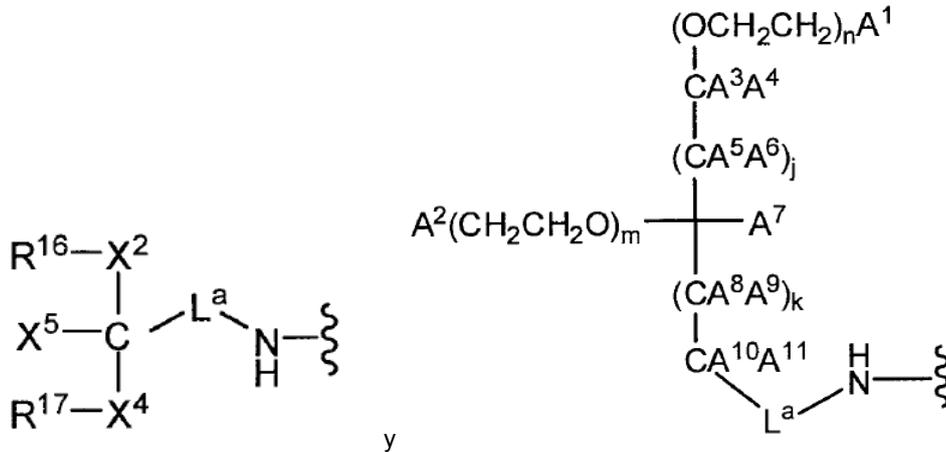
15 *II. F. Azúcares de nucleótido*

En otro aspecto de la invención, la invención también proporciona nucleótidos de azúcar. Las especies a modo de ejemplo según esta realización incluyen:





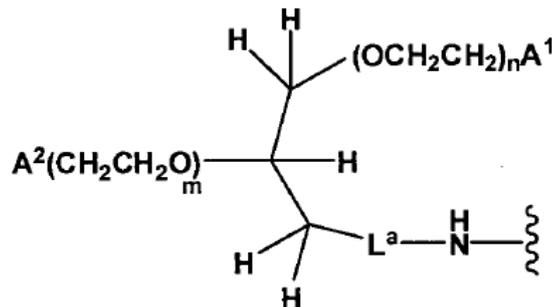
en las que y es un número entero seleccionado de desde 0 hasta 2 y al menos uno de R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ tiene una estructura que es un miembro seleccionado de



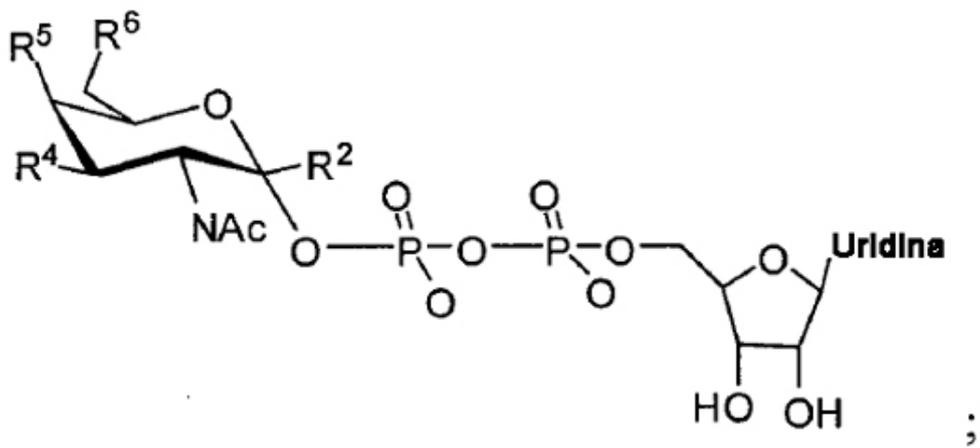
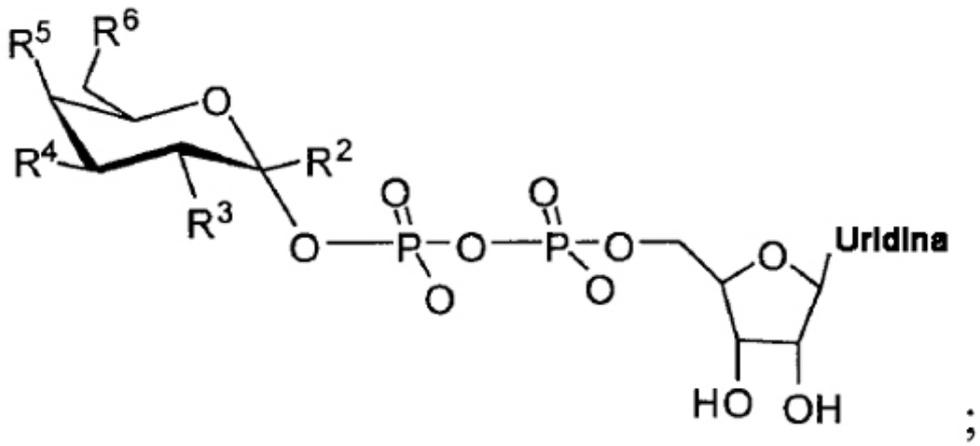
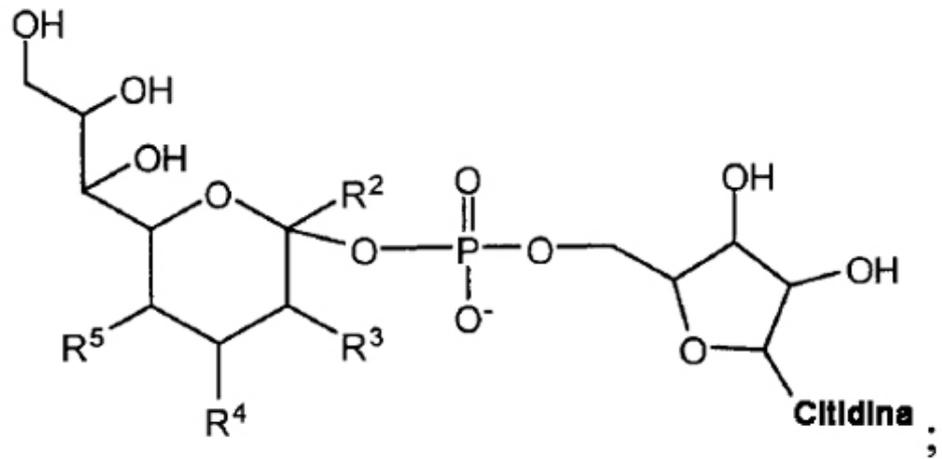
5

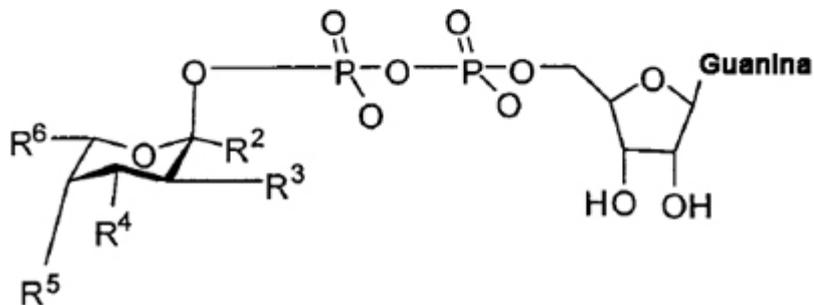
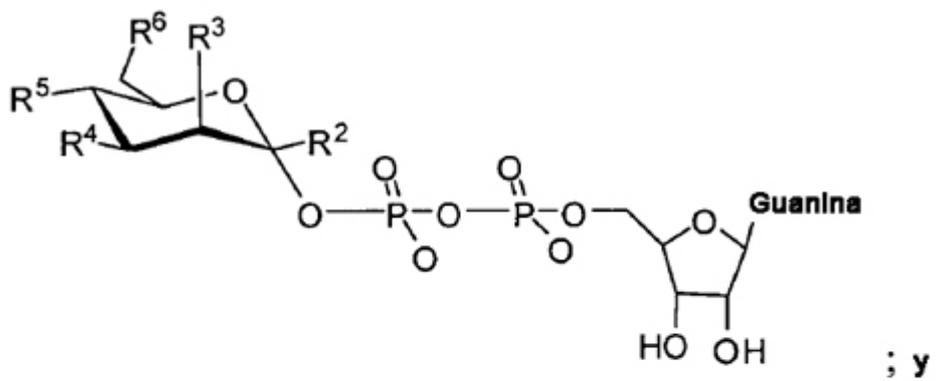
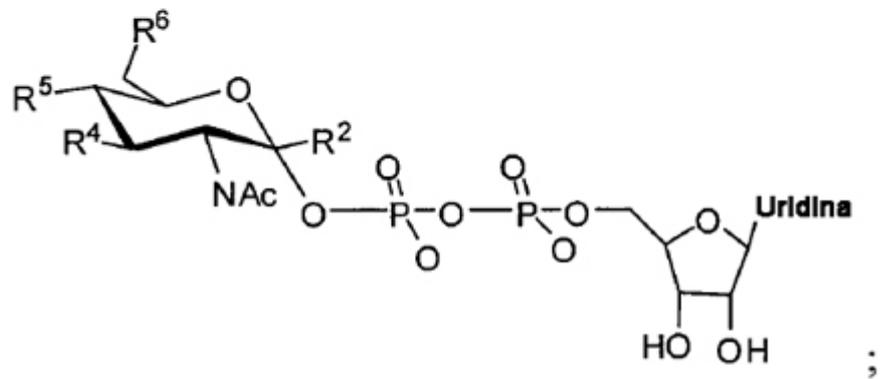
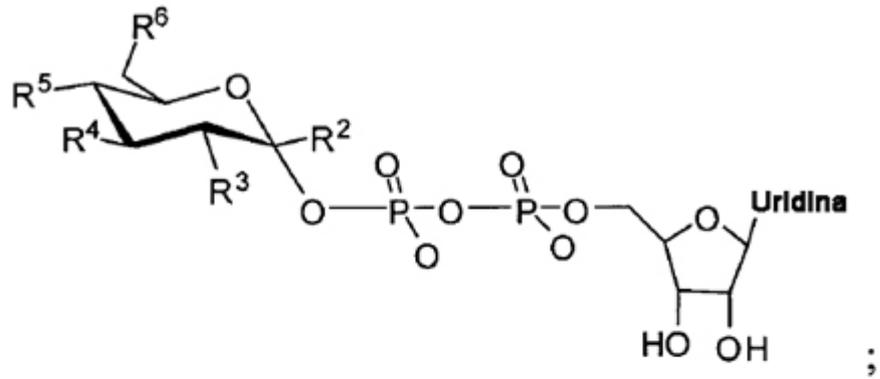
en las que las variables son tal como se describió anteriormente.

En una realización a modo de ejemplo, al menos uno de R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ tiene una estructura según la siguiente fórmula:



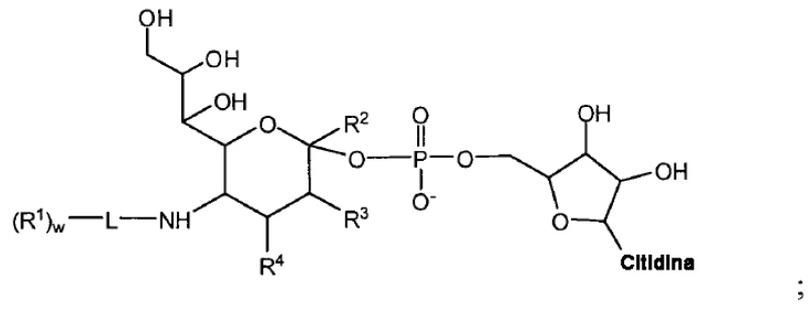
10 En una realización a modo de ejemplo, A¹ y A² se seleccionan cada uno de -OH y -OCH₃.

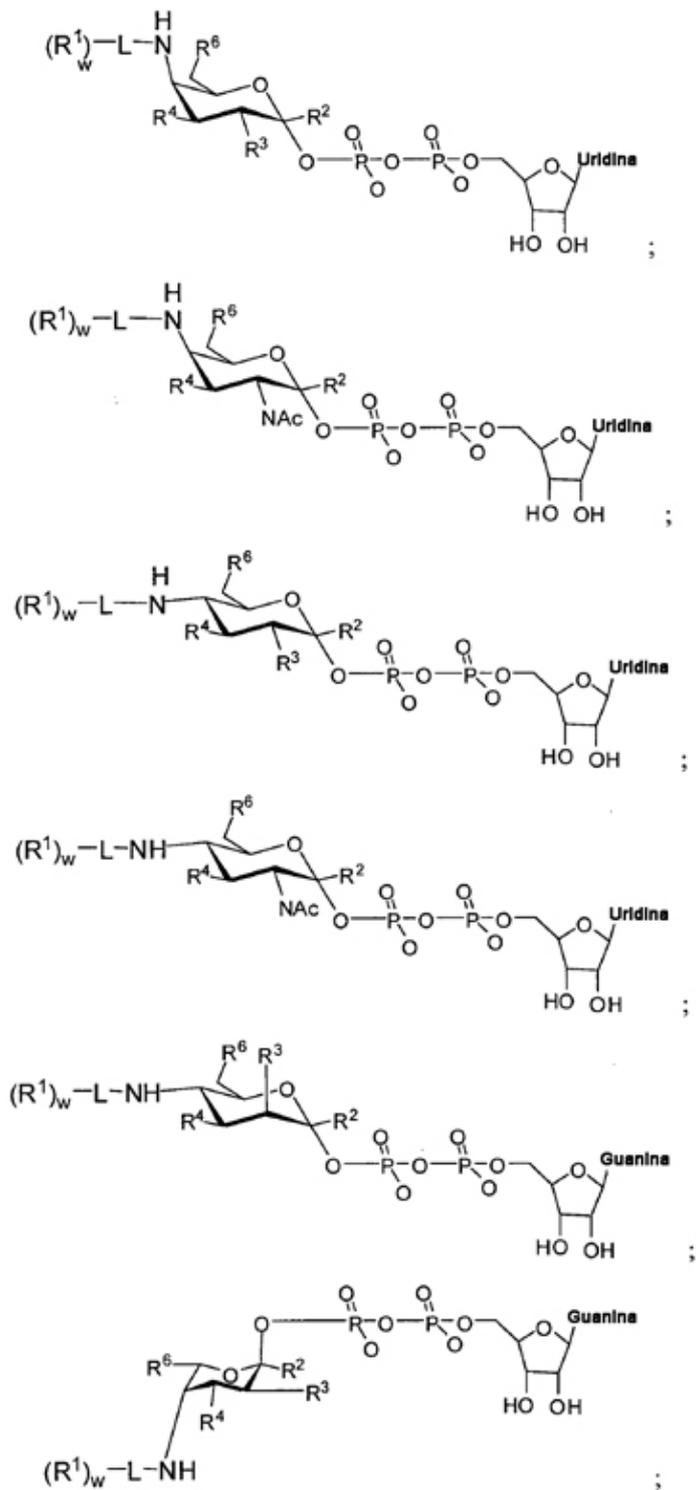




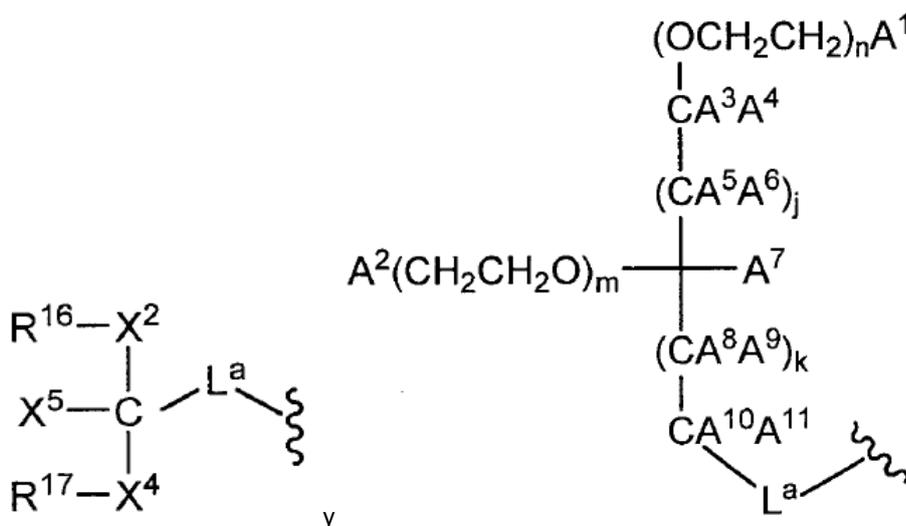
en las que las variables son tal como se describió anteriormente.

En otra realización a modo de ejemplo, las especies según esta realización incluyen:



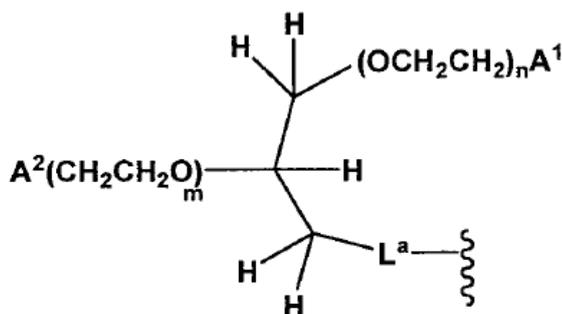


en las que $L-(R^1)_w$ es un miembro seleccionado de



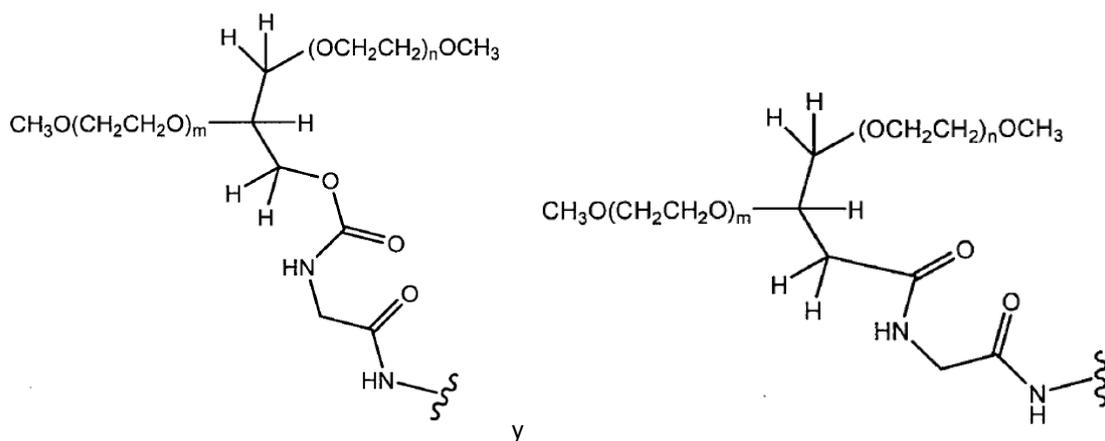
en las que las variables son tal como se describió anteriormente.

En una realización a modo de ejemplo, L-(R¹)_w tiene una estructura según la siguiente fórmula:



5 En una realización a modo de ejemplo, A¹ y A² se seleccionan cada uno de -OH y -OCH₃.

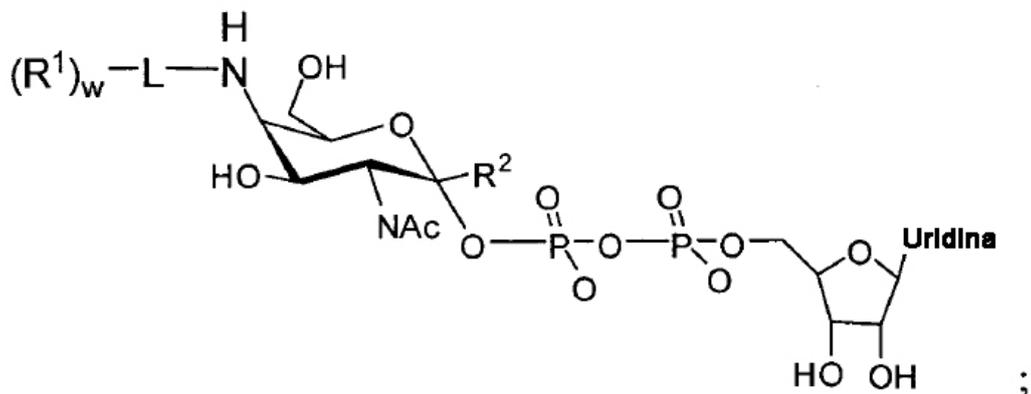
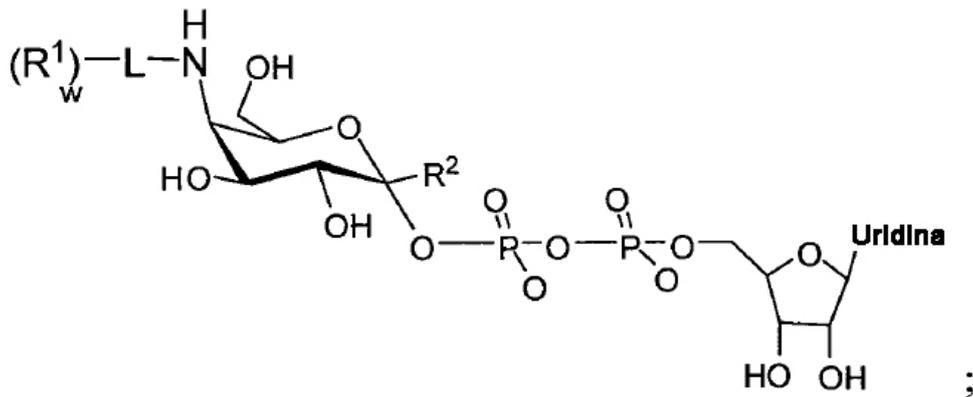
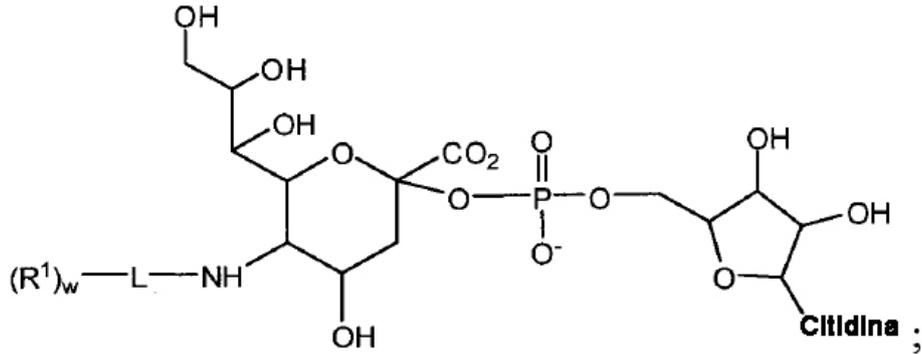
Los grupos de modificación poliméricos a modo de ejemplo según esta realización incluyen el resto:

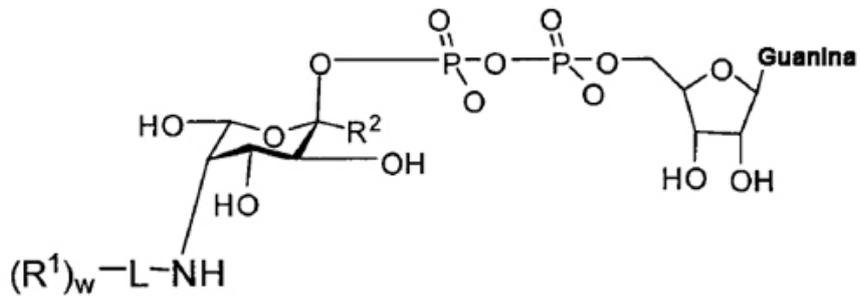
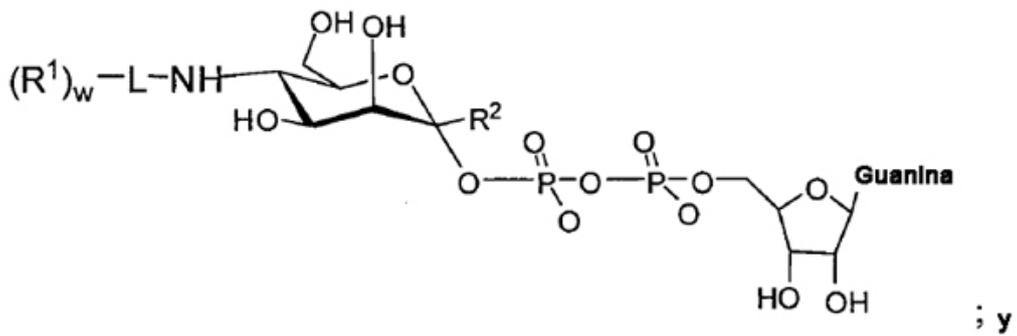
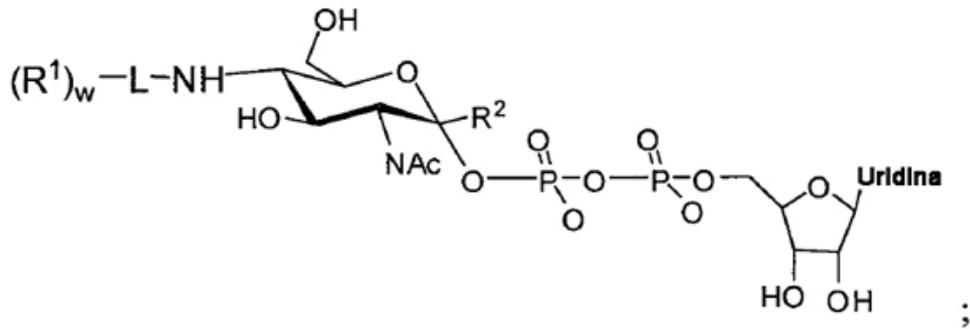
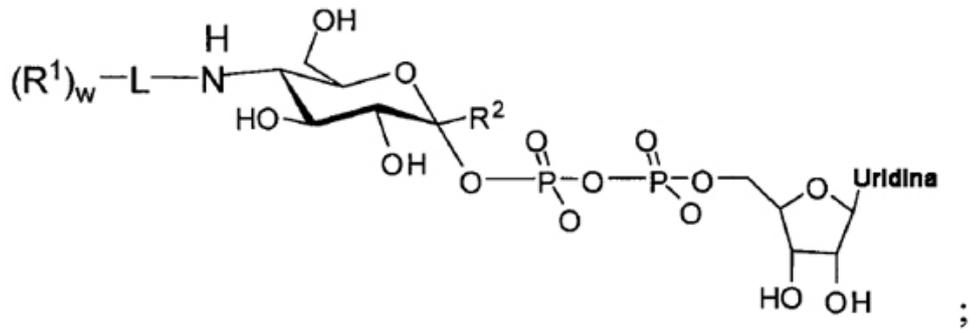


10 En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 70, de aproximadamente 70 a aproximadamente 150, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250, de aproximadamente 250 a aproximadamente 375 y de aproximadamente 375 a aproximadamente 500. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 35, de aproximadamente 45 a aproximadamente 65, de aproximadamente 95 a aproximadamente 130, de

aproximadamente 210 a aproximadamente 240, de aproximadamente 310 a aproximadamente 370 y de aproximadamente 420 a aproximadamente 480. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 65. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 130. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 210 hasta aproximadamente 240. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 310 hasta aproximadamente 370. En una realización a modo de ejemplo, m y n son números enteros seleccionados de desde aproximadamente 430 hasta aproximadamente 470.

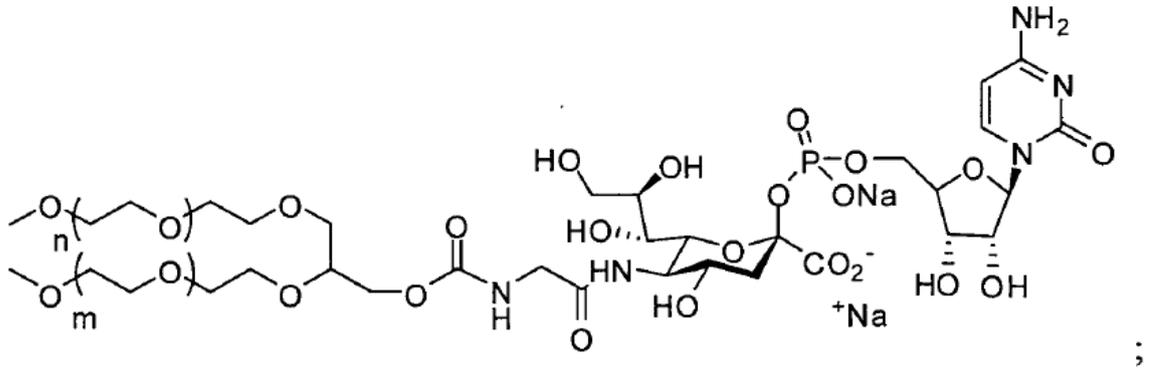
10 En otra realización a modo de ejemplo, las especies según esta realización incluyen:

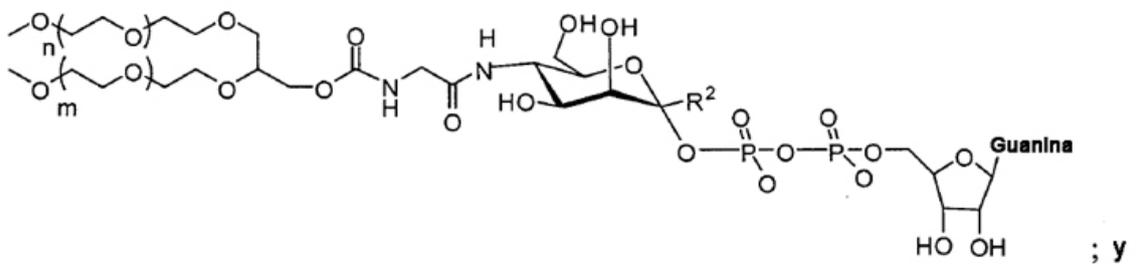
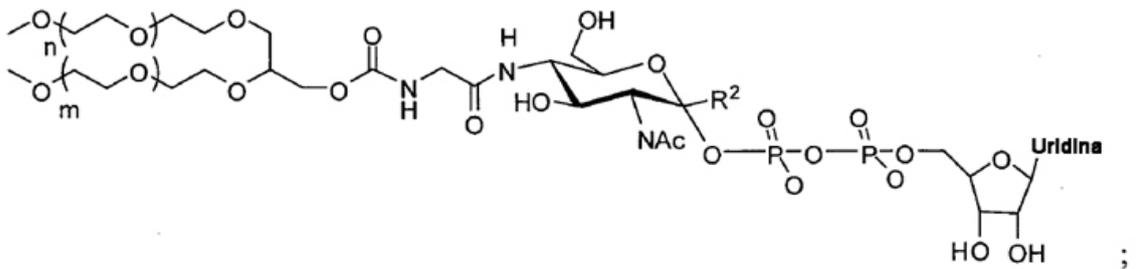
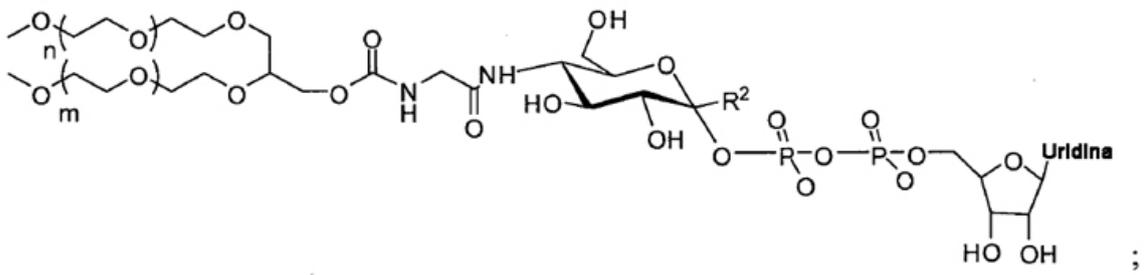
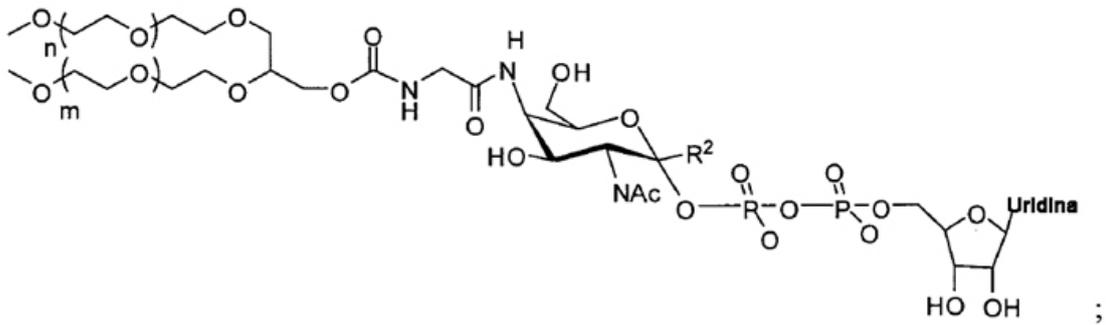
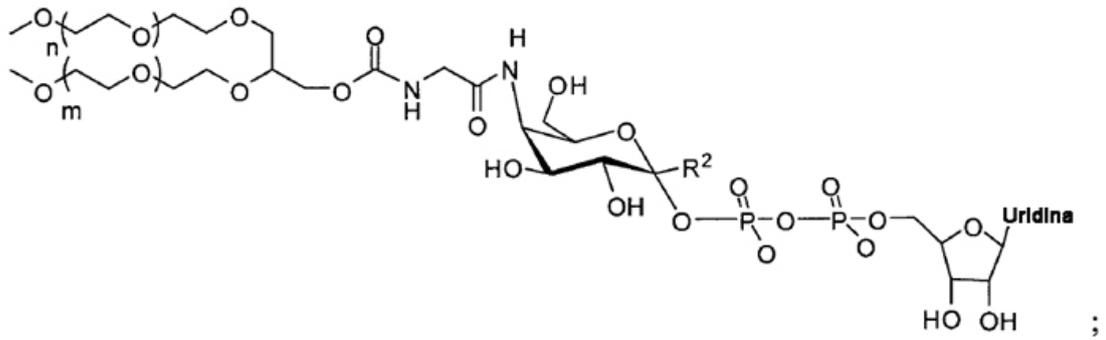


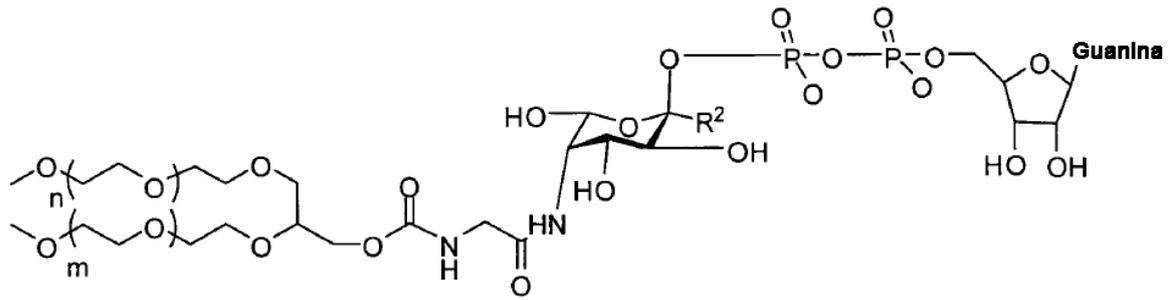


en las que las variables son tal como se describieron anteriormente.

En otra realización a modo de ejemplo, las especies según esta realización incluyen:

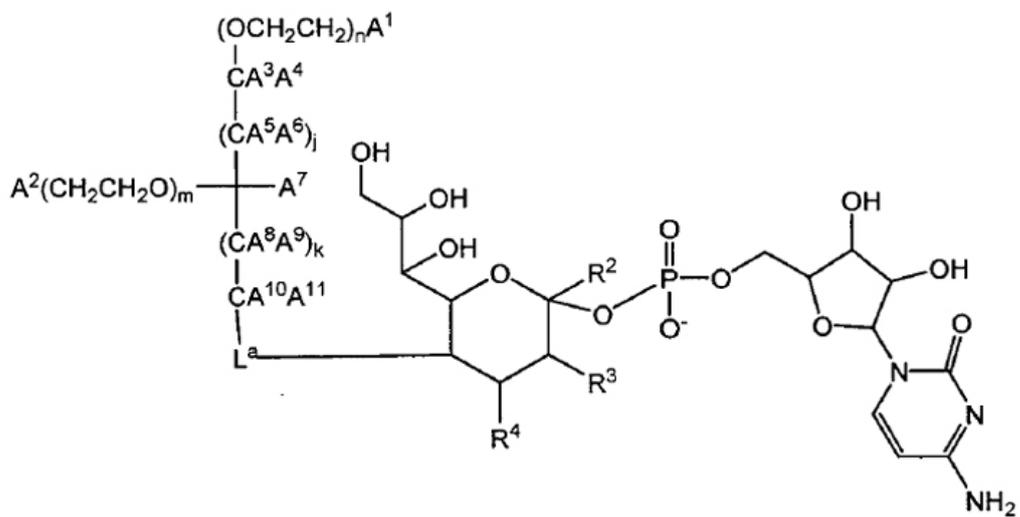
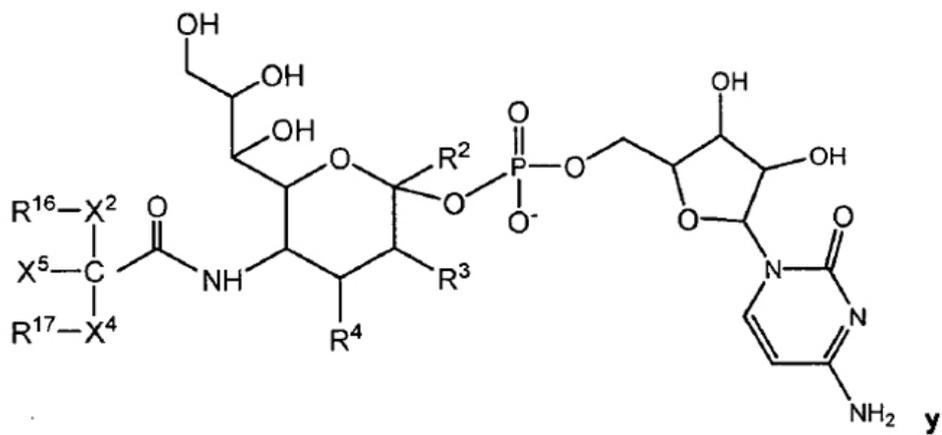
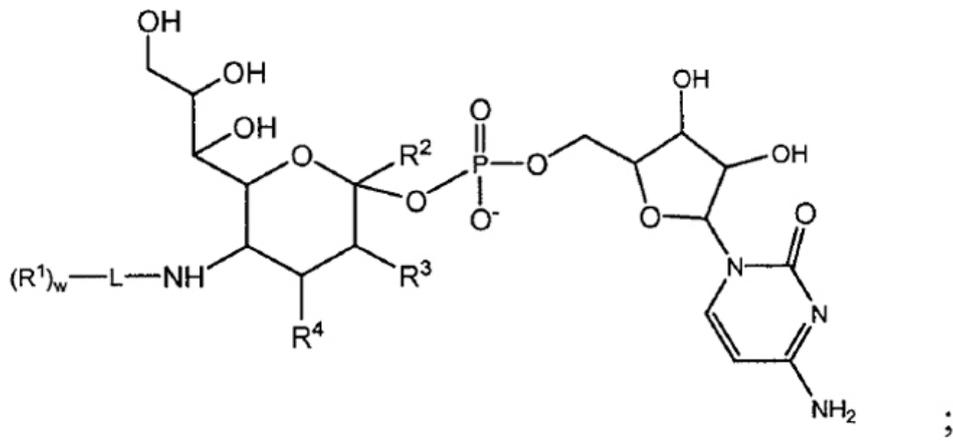






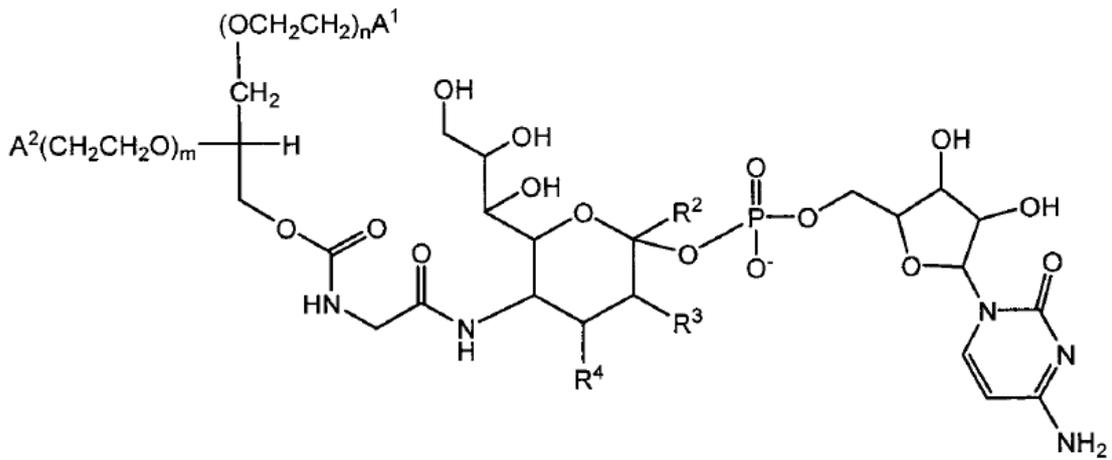
en las que la variables son tal como se describió anteriormente.

En otra realización a modo de ejemplo, los azúcares de nucleótido tienen una fórmula que es un miembro seleccionado de:



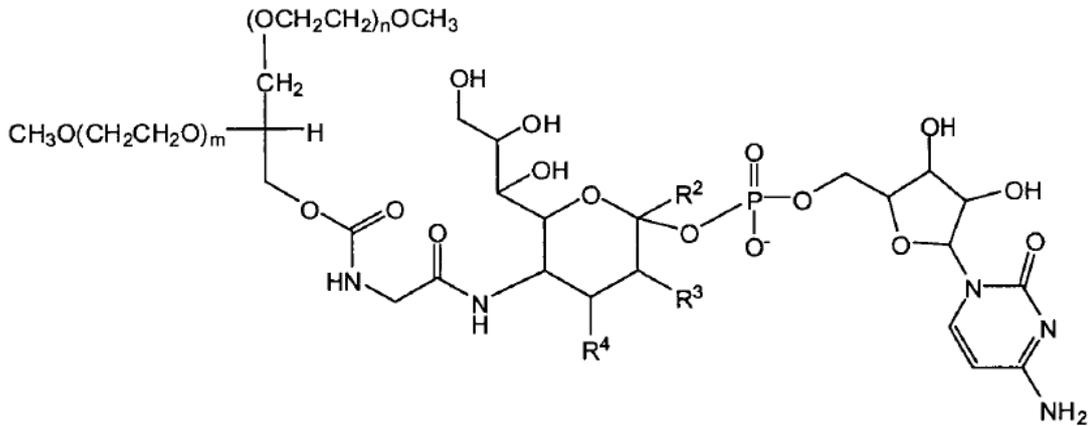
en las que la variables son tal como se describió anteriormente.

Un azúcar de nucleótido modo de ejemplo según esta realización tiene la estructura:



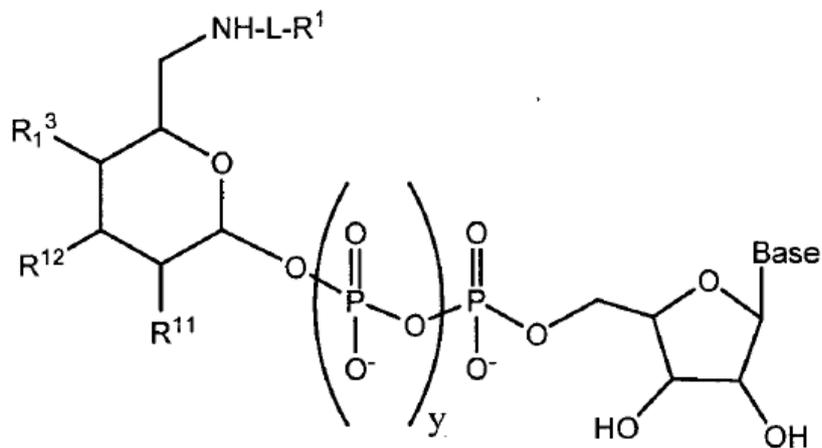
en la que la variables son tal como se describió anteriormente.

Un azúcar de nucleótido a modo de ejemplo según esta realización tiene la estructura:



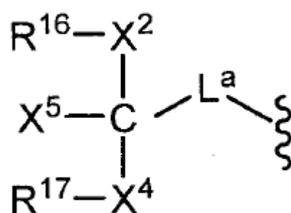
5 en la que la variables son tal como se describió anteriormente.

En otra realización a modo de ejemplo, el azúcar de nucleótido se basa en la siguiente fórmula:



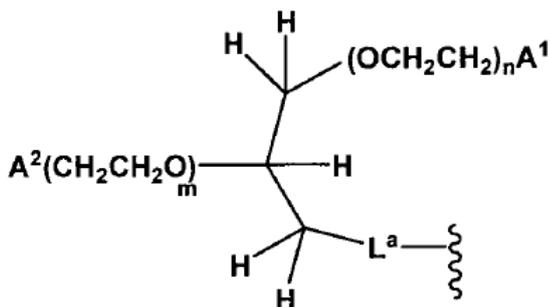
en la que los grupos R, y L, representan restos tal como se comentó anteriormente. El índice "y" es 0, 1 ó 2. En una realización a modo de ejemplo, L es un enlace entre NH y R^1 . La base es una base de ácido nucleico.

10 En una realización a modo de ejemplo, $\text{L}-\text{R}^1$ es un miembro seleccionado de



en la que la variables son tal como se describió anteriormente.

En una realización a modo de ejemplo, L-R¹ tiene una estructura según la siguiente fórmula:



- 5 A¹ y A² son cada uno -OCH₃.

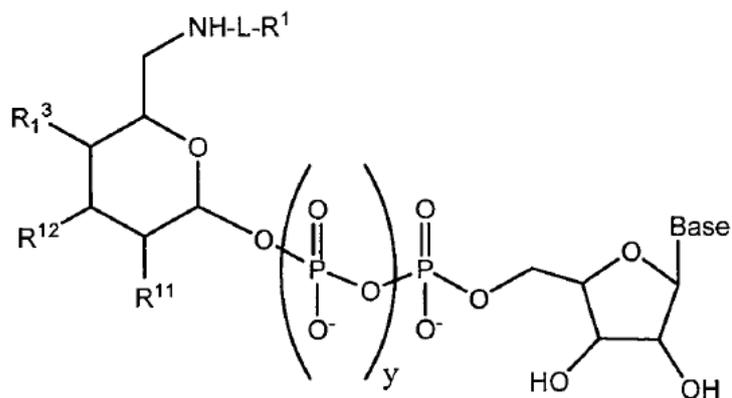
III. Los métodos

Además de los conjugados comentados anteriormente, la presente invención proporciona métodos para preparar estos y otros conjugados. Además, la invención proporciona métodos de prevención, curado o mejora de un estado patológico mediante la administración de un conjugado de la invención a un sujeto que corre el riesgo de desarrollar la enfermedad o un sujeto que tiene la enfermedad.

En realizaciones a modo de ejemplo, el conjugado se forma entre un resto de modificación polimérico y un péptido glicosilado o no glicosilado. El polímero se conjuga al péptido mediante un grupo de unión de glicosilo, que está interpuesto entre, y covalentemente unido a tanto el péptido (o residuo glicosilo) como el grupo de modificación (por ejemplo, polímero soluble en agua). El método incluye poner en contacto el péptido con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una enzima, por ejemplo, una glicosiltransferasa que conjuga con el azúcar modificado al sustrato. La reacción se realiza en condiciones apropiadas para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido. El resto de azúcar del azúcar modificado se selecciona preferiblemente de azúcares de nucleótido. El método de síntesis de un conjugado peptídico, que comprende combinar a) sialidasa; b) una enzima que puede catalizar la transferencia de un grupo de unión de glicosilo tal como una glicosiltransferasa, exoglicosidasa o endoglicosidasa; c) azúcar modificado; d) péptido, sintetizando así el conjugado peptídico. La reacción se realiza en condiciones apropiadas para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido. El resto de azúcar del azúcar modificado se selecciona preferiblemente de azúcares de nucleótido.

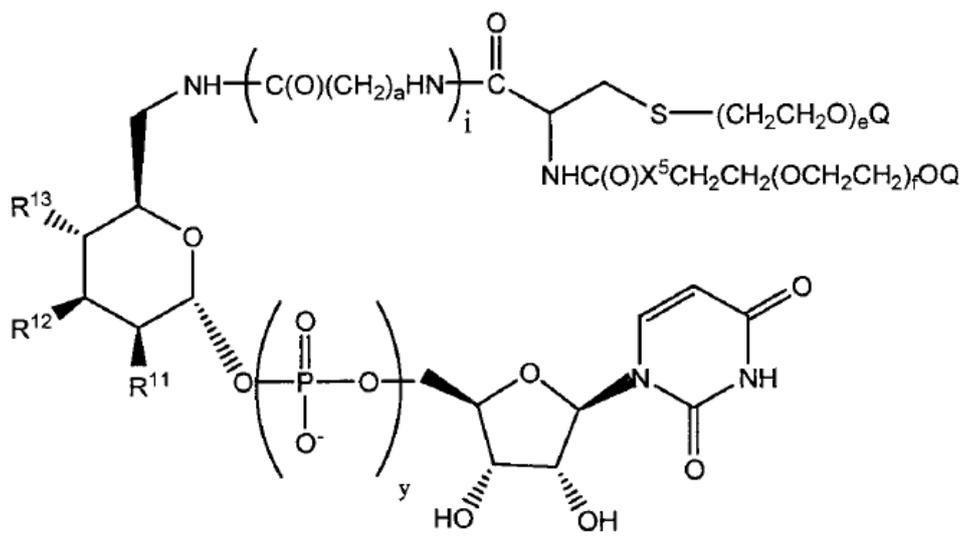
En una realización a modo de ejemplo, el azúcar modificado, tal como los expuestos anteriormente, se activa como los azúcares de nucleótido correspondientes. Los nucleótidos de azúcar a modo de ejemplo que se usan en la presente invención en su forma modificada incluyen nucleótido mono-, di- o trifosfatos o análogos de los mismos. En una realización preferida, el nucleótido de azúcar modificado se selecciona de un UDP-glicósido, CMP-glicósido o un GDP-glicósido. Incluso más preferiblemente, la porción de nucleótido de azúcar del nucleótido de azúcar modificado se selecciona de UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, GDP-manosa, GDP-fucosa, CMP-ácido siálico o CMP-NeuAc. En una realización a modo de ejemplo, el fosfato de nucleótido se une a C-1.

También se da a conocer el uso de nucleótidos de azúcar modificados con L-R¹ en la posición de carbono 6. Las especies a modo de ejemplo según esta realización incluyen:

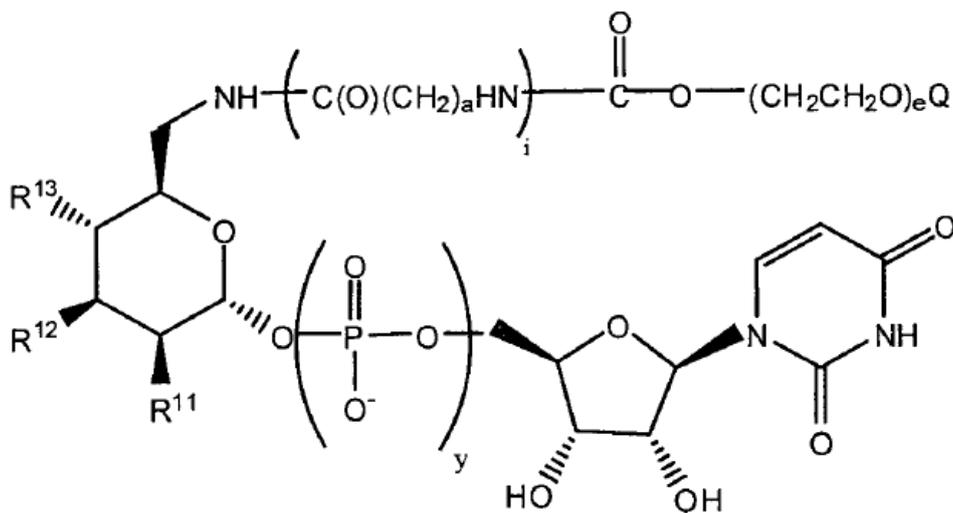


en la que los grupos R, y L, representan restos tal como se comentó anteriormente. El índice "y" es 0, 1 ó 2. En una realización a modo de ejemplo, L es un enlace entre NH y R¹. La base es una base de ácido nucleico.

- 5 Los azúcares de nucleótido a modo de ejemplo de uso en la invención se describen en el presente documento. En otra realización a modo de ejemplo, azúcares de nucleótido de uso en la invención son aquellos en los que el carbono en la posición 6 está modificado, e incluyen especies que tienen la esteoquímica de GDP manosa, por ejemplo:



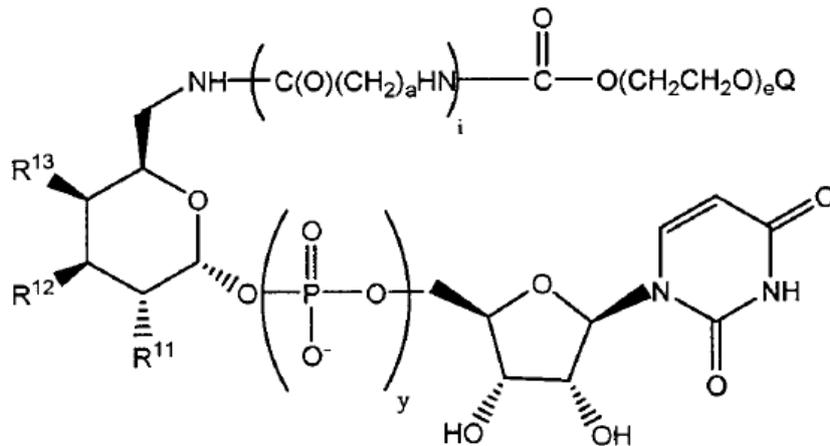
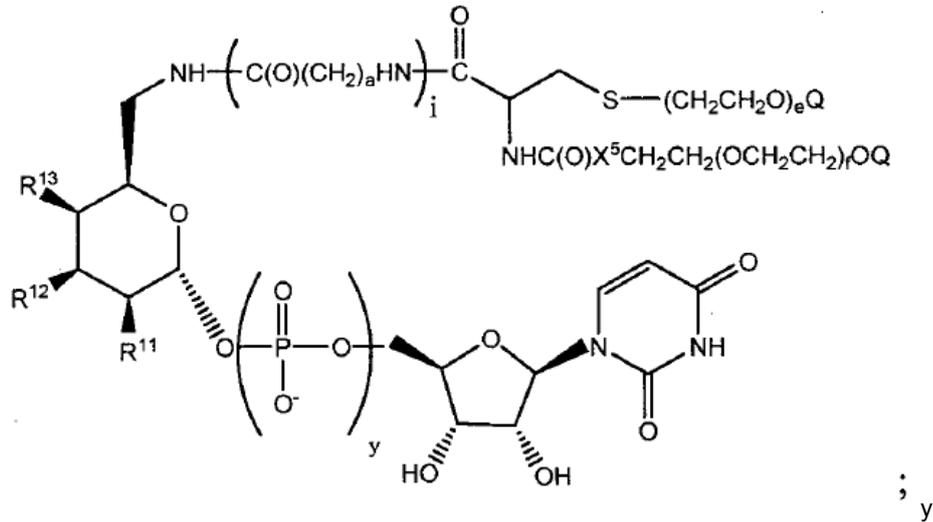
; y



- 10 en las que X⁵ es un enlace u O y las variables restantes son tal como se describió anteriormente. El índice i representa 0 ó 1. El índice a representa un número entero de desde 1 hasta 20. Los índices e y f representan

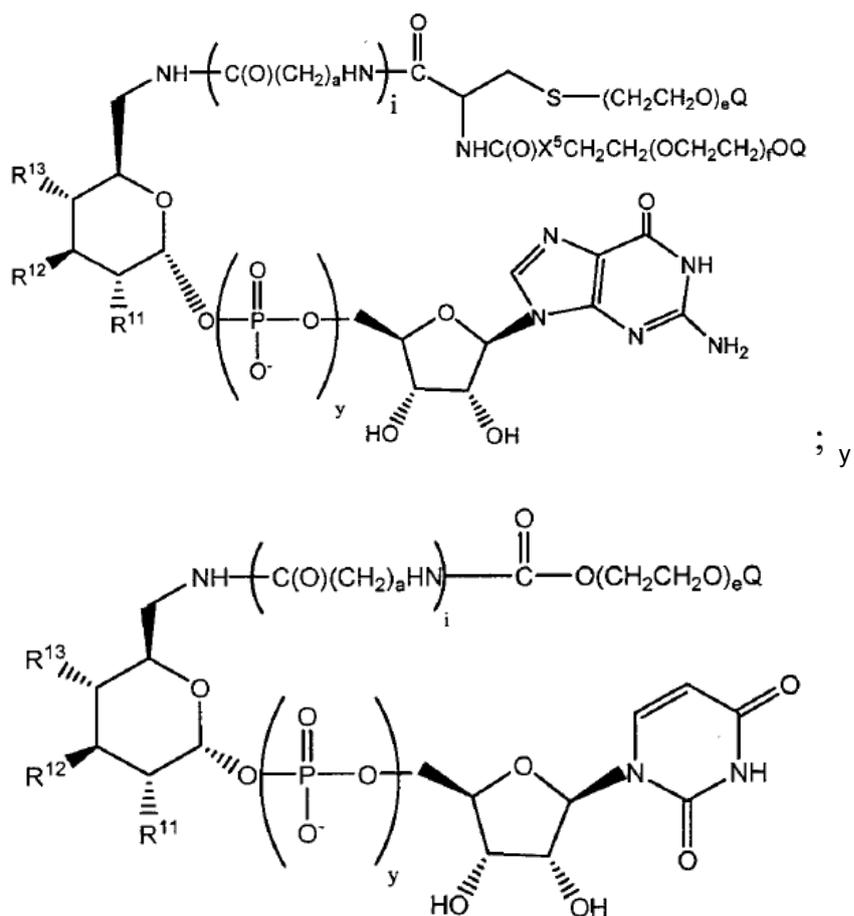
independientemente números enteros de desde 1 hasta 2500. Q, tal como se comentó anteriormente, es H o alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido. Tal como apreciarán los expertos, el derivado de serina, en el que S se reemplaza por O, también se encuentra dentro de este motivo general.

- 5 En una realización a modo de ejemplo todavía adicional, la invención proporciona un conjugado en el que el azúcar modificado se basa en la estereoquímica de UDP galactosa. Un azúcar de nucleótido a modo de ejemplo de uso en esta invención tiene la estructura:



en las que la variables son tal como se describió anteriormente.

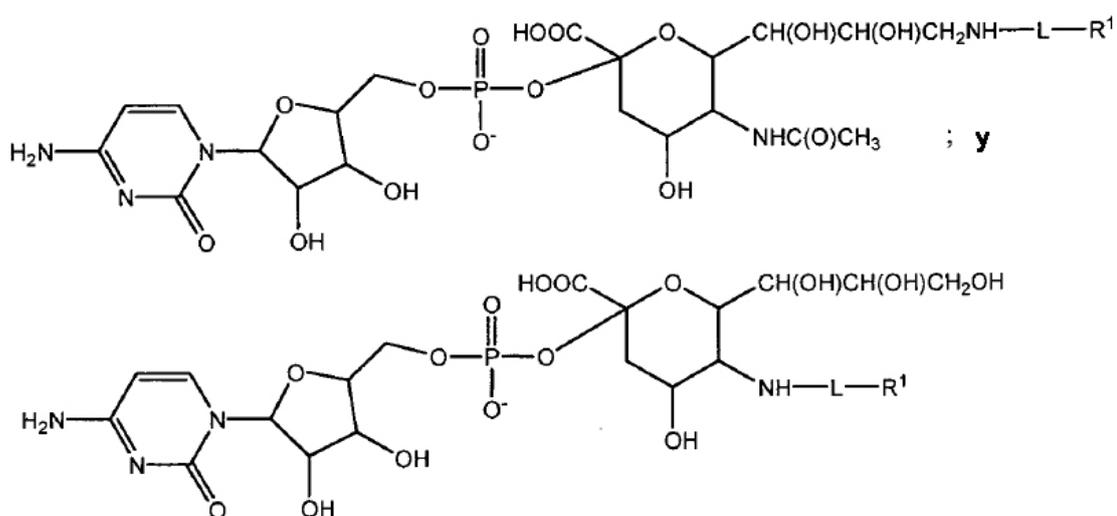
- 10 En otra realización a modo de ejemplo, el azúcar de nucleótido se basa en la estereoquímica de glucosa. Las especies a modo de ejemplo según esta realización tienen las fórmulas:



en las que la variables son tal como se describió anteriormente.

Por tanto, en una realización ilustrativa en la que el resto glicosilo es ácido siálico, el método de la invención utiliza compuestos que tienen las fórmulas:

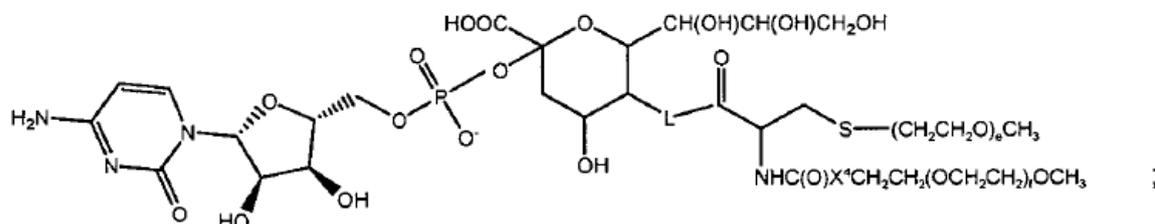
5



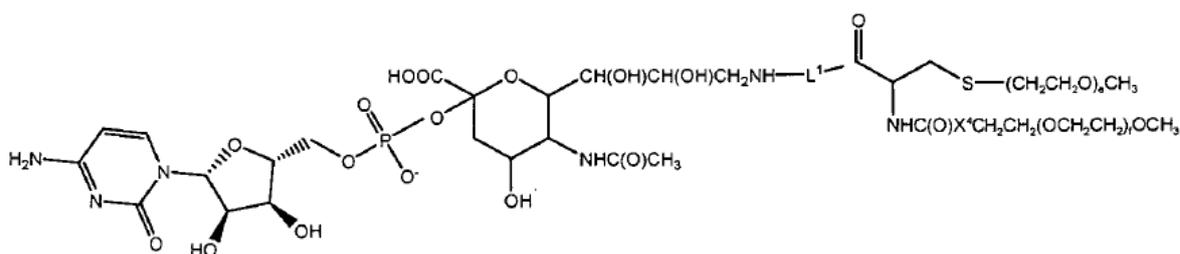
en las que $L-R^1$ es tal como se comentó anteriormente, y L^1-R^1 representa un resto de unión unido al grupo de modificación. Como con L, las especies de resto de unión a modo de ejemplo según L^1 incluyen un enlace, restos alquilo o heteroalquilo.

10 Además, tal como se comentó anteriormente, también se da a conocer el uso de azúcares de nucleótido que se modifican con un polímero soluble en agua, que es o bien de cadena lineal o bien ramificado. Por ejemplo, los

compuestos que tienen la fórmula mostrada a continuación son de uso para preparar conjugados dentro del alcance de la presente invención:



y



5 en las que X^4 es O o un enlace.

En general, el resto de azúcar o casete de resto de azúcar-resto de unión y los grupos de PEG o casete de PEG-resto de unión se unen entre sí a través del uso de grupos reactivos, que se transforman normalmente mediante el proceso de unión para dar un nuevo grupo funcional orgánico o especie no reactiva. El/los grupo(s) funcional(es) reactivo(s) de azúcar se ubica(n) en cualquier posición en el resto de azúcar. Los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la puesta en práctica de la presente invención son generalmente lo que se conocen bien en la técnica de química de bioconjugados. Actualmente las clases favorecidas de reacciones disponibles con restos de azúcar reactivos son aquellas que se realizan en condiciones relativamente leves. Estas incluyen, pero no se limitan a sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrófilas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples de carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se comentan en, por ejemplo, March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney *et al.*, *MODIFICATION OF PROTEINS*; *Advances in Chemistry Series*, vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

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

(a) grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos incluyendo, pero no se limitan a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, acil-imidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres alquílicos, alquénílicos, alquínílicos y aromáticos;

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

(c) grupos haloalquilo, en los que el haluro puede desplazarse posteriormente con un grupo nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión, o un ión alcóxido, dando así como resultado la unión covalente de un nuevo grupo en el grupo funcional del átomo de halógeno;

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

(e) grupos aldehído o cetona, de manera que es posible una derivatización posterior mediante 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 haluro de sulfonilo para su posterior reacción con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas;

35 (g) grupos tiol, que pueden convertirse, por ejemplo, en disulfuros o hacerse reaccionar con haluros de acilo;

(h) grupos amina o sulfhidrilo, que, por ejemplo, pueden acilarse, alquilarse u oxidarse;

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

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

Los grupos funcionales reactivos pueden elegirse de manera que no participan en, o interfieren con, las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o grupo de modificación. Alternativamente, un grupo funcional reactivo puede protegerse frente a su participación en la reacción mediante la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica entienden cómo proteger un grupo funcional particular de manera que no interfiera con un conjunto elegido de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo, Greene *et al.*, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

En la siguiente discusión se exponen varios ejemplos específicos de azúcares modificados que son útiles en la puesta en práctica de la presente invención. En las realizaciones a modo de ejemplo, se usa un derivado de ácido siálico como núcleo de azúcar al que se une el grupo de modificación. Centrarse en la discusión sobre derivados de ácido siálico es únicamente por motivos de claridad de la ilustración y no debe interpretarse como que limita el alcance de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que una variedad de otros restos de azúcar pueden activarse y derivatizarse de una manera análoga a la expuesta usando ácido siálico como ejemplo. Por ejemplo, hay numerosos métodos disponibles para modificar galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y fucosa por nombrar algunos sustratos de azúcar, que se modifican fácilmente mediante métodos reconocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Elhalabi *et al.*, Curr. Med. Chem. 6: 93 (1999); y Schafer *et al.*, J. Org. Chem. 65: 24 (2000).

En una realización a modo de ejemplo, el azúcar modificado se basa en un resto 6-amino-N-acetil-glicosilo.

En el esquema anterior, el índice n representa un número entero de desde 1 hasta 2500. En una realización a modo de ejemplo, este índice se selecciona de manera que el polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kD, 15 kD o 20 kD. El símbolo "A" representa un grupo activante, por ejemplo, un halo, un componente de un éster activado (por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida), un componente de un carbonato (por ejemplo, carbonato de p-nitrofenilo) y similares. Los expertos en la técnica apreciarán que otros azúcares de nucleótido con PEG-amida se preparan fácilmente mediante este y otros métodos análogos.

El péptido es sintetizado normalmente *de novo*, o se expresa de manera recombinante en una célula procarionta (por ejemplo, célula bacteriana, tal como *E. coli*) o en una célula eucariota tal como una célula de mamífero, levadura, insecto, fúngica o vegetal. El péptido puede ser o bien una proteína de longitud completa o un fragmento. Además, el péptido puede ser un péptido silvestre o mutado. En una realización a modo de ejemplo, el péptido incluye una mutación que añade uno o más sitios de glicosilación unidos en N u O a la secuencia peptídica.

El método de la invención también proporciona la modificación de péptidos glicosilados de manera incompleta que se producen de manera recombinante. Muchas glicoproteínas producidas de manera recombinante están glicosiladas de manera incompleta, exponiendo residuos de hidratos de carbono que pueden tener propiedades indeseables, por ejemplo, inmunogenicidad, reconocimiento por el RES. Empleando un azúcar modificado en un método de la invención, el péptido puede simultáneamente glicosilarse adicionalmente y derivatizarse, por ejemplo, con un polímero soluble en agua, agente terapéutico, o similar. El resto de azúcar del azúcar modificado puede ser el residuo que se conjugará de manera apropiada al aceptor en un péptido completamente glicosilado, u otro resto de azúcar con propiedades deseables.

Los expertos apreciarán que la invención puede ponerse en práctica usando sustancialmente cualquier péptido o glicopéptido de cualquier fuente. En el documento WO 03/031464, y las referencias expuestas en el mismo, se exponen péptidos a modo de ejemplo con los que puede ponerse en práctica la invención.

Los péptidos modificados mediante los métodos de la invención pueden ser péptidos sintéticos o silvestres o pueden ser péptidos mutados, producidos mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio. Normalmente la glicosilación de péptidos está o bien unida en N o bien unida en O. Una unión en N a modo de ejemplo 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 de un resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación unida en O se refiere a la unión de un azúcar (por ejemplo, N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa, GlcNAc, glucosa, fucosa o xilosa) a la cadena lateral de hidroxilo de un hidroxiaminoácido, preferiblemente serina o treonina, aunque también pueden usarse aminoácidos no habituales o no naturales, por ejemplo, 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Adicionalmente, además de péptidos, los métodos de la presente invención pueden ponerse en práctica con otras estructuras biológicas (por ejemplo, glicolípidos, lípidos, esfingoides, ceramidas, células completas y similares, que contienen un sitio de glicosilación).

La adición de sitios de glicosilación a un péptido u otra estructura se logra de manera conveniente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que contiene uno o más sitios de glicosilación. La adición también puede realizarse mediante la incorporación de una o más especies que presentan un grupo -OH, preferiblemente residuos de serina o treonina, dentro de la secuencia del péptido (para sitios de glicosilación unidos en O). La adición puede realizarse mediante mutación o mediante síntesis química completa del péptido. La

secuencia de aminoácidos del péptido se altera preferiblemente mediante cambios a nivel de ADN, particularmente mediante mutación del ADN que codifica para el péptido en bases preseleccionadas de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La(s) mutación/mutaciones de ADN se realiza(n) preferiblemente usando métodos conocidos en la técnica.

- 5 En una realización a modo de ejemplo, el sitio de glicosilación se añade mediante intercambio de polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican para un péptido candidato pueden modularse con protocolos de intercambio de ADN. El intercambio de ADN es un proceso de recombinación y mutación recursivas, realizado mediante fragmentación al azar de una combinación de genes relacionados, seguido por nuevo ensamblaje de los fragmentos mediante un proceso de tipo reacción en cadena de la polimerasa. Véase, por ejemplo, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 (1994); Stemmer, Nature 370:389-391 (1994); y las patentes estadounidenses n.^{os} 5.605.793, 5.837.458, 5.830.721 y 5.811.238.

En el documento WO03/031464 y las solicitudes estadounidense y PCT relacionadas se describen en detalle péptidos a modo de ejemplo con los que puede ponerse en práctica la presente invención, métodos de adición o eliminación de sitios de glicosilación, y adición o eliminación de estructuras o subestructuras de glicosilo.

- 15 La presente invención también aprovecha la ventaja de añadir a (o eliminar de) un péptido uno o más residuos glicosilo seleccionados, tras lo cual se conjuga un azúcar modificado a al menos uno de los residuos glicosilo seleccionados del péptido. La presente realización es útil, por ejemplo, cuando se desea conjugar el azúcar modificado a un residuo glicosilo seleccionado que o bien no está presente en un péptido o bien no está presente en una cantidad deseada. Por tanto, antes del acoplamiento de un azúcar modificado a un péptido, el residuo glicosilo seleccionado se conjuga al péptido mediante acoplamiento enzimático o químico. En otra realización, el patrón de glicosilación de un glicopéptido se altera antes de la conjugación del azúcar modificado mediante la eliminación de un residuo de hidrato de carbono del glicopéptido. Véase, por ejemplo, el documento WO 98/31826.

- La adición o eliminación de cualquier resto de hidrato de carbono presente en el glicopéptido se logra de manera o bien química o bien enzimática. Una desglicosilación química a modo de ejemplo se produce mediante exposición de la variante de polipéptido al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o la totalidad de los azúcares excepto por el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras se deja el péptido intacto. La desglicosilación química se describe por Hakimuddin *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) y por Edge *et al.*, Anal. Biochem. 118: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono en variantes de polipéptido puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo y exo-glicosidasas tal como se describe por Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol. 138: 350 (1987).

- En una realización a modo de ejemplo, el péptido se desialila de manera esencialmente completa con neuraminidasa antes de la realización de las etapas de glicoconjugación o remodelación en el péptido. Tras la glicoconjugación o remodelación, el péptido vuelve a sialilarse opcionalmente usando una sialiltransferasa. En una realización a modo de ejemplo, la nueva sialilación se produce esencialmente en todos (por ejemplo, >80%, preferiblemente más del 85%, más del 90%, preferiblemente más del 95% y más preferiblemente más del 96%, el 97%, el 98% o el 99%) los aceptores de sacarilo terminales en una población de aceptores de sialilo. En una realización preferida, el sacárido tiene un patrón de sialilación sustancialmente uniforme (es decir, patrón de glicosilación sustancialmente uniforme).

- La adición química de restos glicosilo se lleva a cabo mediante cualquier método reconocido en la técnica. La adición enzimática de restos de azúcar se logra preferiblemente usando una modificación de los métodos expuestos en el presente documento, sustituyendo unidades de glicosilo nativas por los azúcares modificados usados en la invención. Otros métodos de añadir restos de azúcar se dan a conocer en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554 y 5.922.577.

- 45 Los puntos de unión a modo de ejemplo para residuo glicosilo seleccionado incluyen, pero no se limitan a: (a) sitios consenso para glicosilación unida en N, y sitios para glicosilación unida en O; (b) restos glicosilo terminales que son aceptores para una glicosiltransferasa; (c) arginina, asparagina e histidina; (d) grupos carboxilo libre; (e) grupos sulfhidrilo libre tales como los de cisteína; (f) grupos hidroxilo libre tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (g) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (h) el grupo amida de glutamina. En el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin y Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM., págs. 259-306 (1981) se describen métodos de uso a modo de ejemplo en la presente invención.

- También se da a conocer un método para unir dos o más péptidos a través de un grupo de unión. El grupo de unión tiene cualquier estructura útil y puede seleccionarse de estructuras de cadena lineal y ramificada. Preferiblemente, cada extremo terminal del resto de unión, que se une a un péptido, incluye un azúcar modificado (es decir, un grupo de unión de glicosilo intacto naciente).

En un método a modo de ejemplo, dos péptidos se unen entre sí mediante un resto de unión que incluye uno polimérico (por ejemplo, resto de unión de PEG). El constructo se adapta a la estructura general expuesta en el dibujo anterior. Tal como se describe en el presente documento, el constructo de la invención incluye dos grupos de

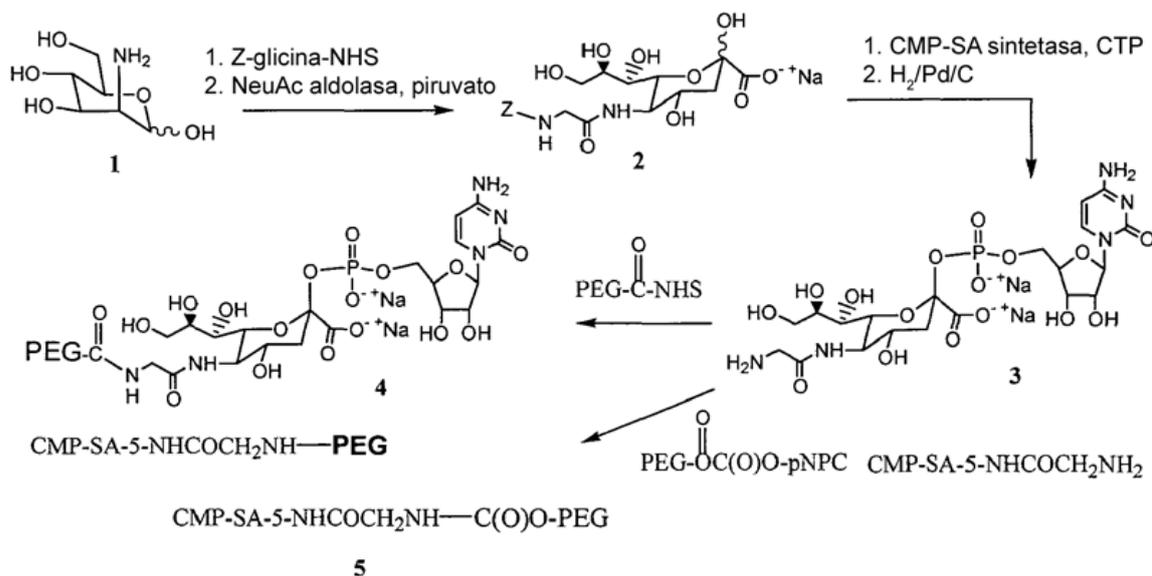
unión de glicosilo intactos (es decir, $s + t = 1$). Centrarse en un resto de unión de PEG que incluye dos grupos glicosilo es por motivos de claridad y no debe interpretarse como que limita la identidad de brazos de unión de uso en esta realización de la invención.

5 Por tanto, un resto PEG se funcionaliza en un primer extremo terminal con una primera unidad de glicosilo y en un segundo extremo terminal con una segunda unidad de glicosilo. Las unidades de glicosilo primera y segunda son preferiblemente sustratos para transferasas diferentes, permitiendo la unión ortogonal de los péptidos primero y segundo a las unidades de glicosilo primera y segunda, respectivamente. En la práctica, se pone en contacto el resto de unión (glicosil)¹-PEG-(glicosil)² con el primer péptido y una primera transferasa para la que la primera unidad de glicosilo es un sustrato, formando así (péptido)¹-(glicosil)¹-PEG-(glicosil)². Después se eliminan
 10 opcionalmente la transferasa y/o péptido sin reaccionar de la mezcla de reacción. Se añaden el segundo péptido y una segunda transferasa para la que la segunda unidad de glicosilo es un sustrato al conjugado (péptido)¹-(glicosil)¹-PEG-(glicosil)², formando (péptido)¹-(glicosil)¹-PEG-(glicosil)²-(péptido)²; al menos uno de los residuos glicosilo está unido en O o bien directa o bien indirectamente. Los expertos en la técnica apreciarán que el método expuesto anteriormente también puede aplicarse a la formación de conjugados entre más de dos péptidos, por ejemplo, mediante el uso de un PEG ramificado, dendrímero, poli(aminoácido), polisacárido o similar.

En una realización a modo de ejemplo, el péptido que se modifica mediante un método de la invención es un glicopéptido que se produce en células de mamífero (por ejemplo, células CHO) o en un animal transgénico y, por tanto, contiene cadenas de oligosacárido unidas en N y/o en O, que están sialiladas de manera incompleta. Las cadenas de oligosacárido del glicopéptido que carecen de un ácido siálico y que contienen un residuo de galactosa terminal pueden modificarse con PEG, PPG o de otro modo con un ácido siálico modificado.

En el esquema 1, el aminoglicósido 1 se trata con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (por ejemplo, glicina), convirtiendo el residuo amina de azúcar en el aducto de aminoácido-amida protegido correspondiente. Se trata el aducto con una aldolasa para formar un α -hidroxi-carboxilato 2. Se convierte el compuesto 2 en el derivado de CMP correspondiente mediante la acción de CMP-SA sintetasa, seguido por
 25 hidrogenación catalítica del derivado de CMP para producir el compuesto 3. La amina introducida mediante formación del aducto de glicina se usa como locus de unión de PEG haciendo reaccionar el compuesto 3 con un derivado de PEG o PPG activado (por ejemplo, PEG-C(O)NHS, PEG-OC(O)O-p-nitrofenilo), produciendo especies tales como 4 ó 5, respectivamente.

Esquema 1



30 En una realización a modo de ejemplo, un azúcar modificado puede unirse a un sitio de unión de O-glicano en un péptido. Las glicosiltransferasas que pueden usarse para producir este conjugado peptídico incluyen: para Ser56 -Glc-(Xyl)_n-Gal-SA-PEG, una galactosiltransferasa y sialiltransferasa; para Ser56 -Glc-(Xyl)_n-Xyl-PEG, una xilosiltransferasa; y para Ser60-Fuc- GlcNAc-(Gal)_n-(SA)_m-PEG, una GlcNAc transferasa.

35 **III. A. Conjugación de azúcares modificados a péptidos**

Los azúcares modificados con PEG se conjugan a un péptido glicosilado o no glicosilado usando una enzima apropiada para mediar en la conjugación. Preferiblemente, las concentraciones del/de los azúcar(es) donador(es) modificado(s), enzima(s) y péptido(s) aceptor(es) se seleccionan de manera que la glicosilación avanza hasta que se

consume el aceptor. Las consideraciones comentadas a continuación, aunque se exponen en el contexto de una sialiltransferasa, pueden aplicarse generalmente a otras reacciones con glicosiltransferasa. En la figura 6 se proporciona una lista de sialiltransferasas preferidas para su uso en la invención.

5 Se conocen varios métodos de uso de glicosiltransferasas para sintetizar estructuras de oligosacárido deseadas y pueden aplicarse generalmente a la presente invención. Se describen métodos a modo de ejemplo, por ejemplo, en el documento WO 96/32491, Ito *et al.*, Pure Appl. Chem. 65: 753 (1993), las patentes estadounidenses n.^{os} 5.352.670, 5.374.541, 5.545.553, las patentes estadounidenses de titularidad conjunta n.^{os} 6.399.336 y 6.440.703, y las solicitudes PCT publicadas de titularidad conjunta WO 03/031464, WO 04/033651, WO 04/099231.

10 La presente invención se pone en práctica usando una única glicosiltransferasa o una combinación de glicosiltransferasas. Por ejemplo, puede usarse una combinación de una sialiltransferasa y una galactosiltransferasa. En aquellas realizaciones que usan más de una enzima, las enzimas y los sustratos se combinan preferiblemente en una mezcla de reacción inicial, o las enzimas y los reactivos para una segunda reacción enzimática se añaden al medio de reacción una vez que la primera reacción enzimática está completa o casi completa. Al realizar dos reacciones enzimáticas en secuencia en un único recipiente, se mejoran los rendimientos globales con respecto a procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Además, se reduce la limpieza y eliminación de disolventes adicionales y subproductos.

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

20 En otra realización, el método emplea una o más exo o endoglicosidasas. La glicosidasa es normalmente una mutante, que se modifica por ingeniería para formar enlaces glicosilo en vez de romperlos. La glicanasa mutante incluye normalmente una sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido ácido de sitio activo. Por ejemplo, cuando la endoglicanasa es endo-H, los residuos de sitio activo sustituidos serán normalmente Asp en la posición 130, Glu en la posición 132 o una combinación de los mismos. Los aminoácidos se sustituyen generalmente por serina, alanina, asparagina o glutamina.

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

30 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 particular varía según la concentración del sustrato de esa enzima así como las condiciones de reacción tales como temperatura, tiempo y valor de pH. Los expertos en la técnica conocen bien medios para determinar la cantidad catalítica para una enzima dada en concentraciones de sustrato y condiciones de reacción preseleccionadas.

35 La temperatura a la que se lleva a cabo el procedimiento anterior puede oscilar entre justo por encima del punto de congelación y la temperatura a la que se desnaturaliza la enzima más sensible. Intervalos de temperatura preferidos son de aproximadamente 0°C a aproximadamente 55°C, y más preferiblemente de aproximadamente 20°C a aproximadamente 37°C. En otra realización a modo de ejemplo, uno o más componentes del presente método se llevan a cabo a una temperatura elevada usando una enzima termófila.

40 La mezcla de reacción se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para glicosilar el aceptor, formando así el conjugado deseado. Con frecuencia, parte del conjugado puede detectarse tras unas pocas horas, obteniéndose habitualmente cantidades recuperables en el plazo de 24 h o menos. Los expertos en la técnica entienden que la velocidad de reacción depende de varios factores variables (por ejemplo, concentración de enzima, concentración de donador, concentración de aceptor, temperatura, volumen de disolvente), que se optimizan para un sistema seleccionado.

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

50 En la siguiente discusión, la invención se muestra a modo de ejemplo mediante la conjugación de restos ácido siálico modificado a un péptido glicosilado. El ácido siálico modificado a modo de ejemplo se marca con PEG. Centrarse en la siguiente discusión en el uso de ácido siálico modificado con PEG y péptidos glicosilados es por claridad de la ilustración y no se pretende que implique que la invención se limita a la conjugación de estas dos parejas. Un experto entiende que la discusión puede aplicarse de manera general a las adiciones de restos glicosilo

modificado distintos de ácido siálico. Además, la discusión también puede aplicarse a la modificación de una unidad de glicosilo con agentes distintos de PEG incluyendo otros restos PEG, restos terapéuticos y biomoléculas.

5 Puede usarse un enfoque enzimático para la introducción selectiva de hidratos de carbono modificados con PEG o con PPG en un péptido o glicopéptido. El método usa azúcares modificados que contienen PEG, PPG o un grupo funcional reactivo enmascarado, y se combina con la glicosiltransferasa o glicosintasa apropiada. Al seleccionar la glicosiltransferasa que producirá la unión de hidrato de carbono deseada y usar el azúcar modificado como sustrato donador, el PEG o PPG puede introducirse directamente en la estructura principal peptídica, en residuos de azúcar existentes de un glicopéptido o en residuos de azúcar que se han añadido a un péptido.

10 En una realización a modo de ejemplo, un aceptor para una sialiltransferasa está presente en el péptido que va a modificarse o bien como estructura que se produce de manera natural o bien se coloca ahí de manera 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-N-tetraosa, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,3Ara, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,4Glc (lactosa), y otros aceptores conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Paulson *et al.*, J. Biol. Chem. 253: 5617-5624 (1978)). En el presente documento se exponen sialiltransferasas a modo de ejemplo.

15 En una realización, un aceptor para la sialiltransferasa está presente en el glicopéptido que va a modificarse tras la síntesis *in vivo* del glicopéptido. Tales glicopéptidos pueden sialilarse usando los métodos reivindicados sin modificación previa del patrón de glicosilación del glicopéptido. Alternativamente, los métodos de la invención pueden usarse para sialilar un péptido que no incluye un aceptor adecuado; en primer lugar se modifica el péptido para incluir un aceptor mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. En una realización a modo de ejemplo, se añade un residuo de GalNAc mediante la acción de una GalNAc transferasa.

20 En una realización a modo de ejemplo, el aceptor de galactosilo se ensambla mediante la unión de un residuo de galactosa a un aceptor apropiado unido al péptido, por ejemplo, un GlcNAc. El método incluye incubar el péptido que va a modificarse con una mezcla de reacción que contiene una cantidad adecuada de una galactosiltransferasa (por ejemplo, Gal β 1,3 o Gal β 1,4), y un donador de galactosilo adecuado (por ejemplo, UDP-galactosa). Se deja que la reacción avance sustancialmente hasta completarse o, alternativamente, se termina la reacción cuando se añade una cantidad preseleccionada del residuo de galactosa. Otros métodos de ensamblar un aceptor de sacárido seleccionado resultarán evidentes a los expertos en la técnica.

25 En aún otra realización, en primer lugar se "recortan" oligosacáridos unidos a glicopéptido, o bien en su totalidad o bien en parte, para exponer o bien un aceptor para la sialiltransferasa o bien un resto al que pueden añadirse uno o más residuos apropiados para obtener un aceptor adecuado. Enzimas tales como glicosiltransferasas y endoglicosidasas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.716.812) son útiles para las reacciones de unión y recorte. En otra realización de este método, los restos ácido siálico del péptido se eliminan de manera esencialmente completa (por ejemplo, al menos el 90, al menos el 95 o al menos el 99%), exponiendo un aceptor para un ácido siálico modificado.

30 En la siguiente discusión, el método de la invención se muestra a modo de ejemplo mediante el uso de azúcares modificados que tienen un resto PEG unido a los mismos. Centrar la discusión es por claridad de la ilustración. Los expertos apreciarán que la discusión es igualmente relevante a aquellas realizaciones en las que el azúcar modificado porta un resto terapéutico, biomolécula o similar.

35 En una realización a modo de ejemplo de la invención en la que se "recorta" un residuo de hidrato de carbono antes de la adición del azúcar modificado, se recorta una estructura con alto contenido en manosa para dar la estructura biantenaria de primera generación. Un azúcar modificado que porta un resto PEG se conjuga a uno o más de los residuos de azúcar expuestos mediante el "recorte". En un ejemplo, se añade un resto PEG mediante un resto GlcNAc conjugado al resto PEG. El GlcNAc modificado se une a uno o ambos de los residuos de manosa terminal de la estructura biantenaria. Alternativamente, puede añadirse un GlcNAc sin modificar a uno o ambos de los extremos terminales de la especie ramificada.

40 En otra realización a modo de ejemplo, se añade un resto PEG a uno o ambos de los residuos de manosa terminal de la estructura biantenaria mediante un azúcar modificado que tiene un residuo de galactosa, que se conjuga a un residuo de GlcNAc añadido a los residuos de manosa terminal. Alternativamente, puede añadirse un Gal sin modificar a uno o ambos residuos de GlcNAc terminales.

45 En aún un ejemplo adicional, se añade un resto PEG a un residuo de Gal usando un ácido siálico modificado tal como los comentados anteriormente.

50 En otra realización a modo de ejemplo, se "recorta" una estructura con alto contenido en manosa para dar la manosa de la que se ramifica la estructura biantenaria. En un ejemplo, se añade un resto PEG mediante un GlcNAc modificado con el polímero. Alternativamente, se añade un GlcNAc sin modificar a la manosa, seguido por un Gal con un resto PEG unido. En aún otra realización, se añaden secuencialmente residuos de GlcNAc y Gal sin modificar a la manosa, seguido por un resto ácido siálico modificado con un resto PEG.

También puede recortarse una estructura con alto contenido en manosa para dar el núcleo trimanosilo elemental.

5 En una realización adicional a modo de ejemplo, se “recorta” la estructura con alto contenido en manosa para dar el GlcNAc al que se une la primera manosa. El GlcNAc se conjuga a un residuo de Gal que porta un resto PEG. Alternativamente, se añade un Gal sin modificar al GlcNAc, seguido por la adición de un ácido siálico modificado con un azúcar soluble en agua. En aún un ejemplo adicional, el GlcNAc terminal se conjuga con Gal y el GlcNAc se fucosila posteriormente con una fucosa modificada que porta un resto PEG.

10 También puede recortarse una estructura con alto contenido en manosa para dar el primer GlcNAc unido a la Asn del péptido. En un ejemplo, el GlcNAc del residuo de GlcNAc-(Fuc)_a se conjuga con un GlcNAc que porta un polímero soluble en agua. En otro ejemplo, el GlcNAc del residuo de GlcNAc-(Fuc)_a se modifica con Gal, que porta un polímero soluble en agua. En todavía una realización adicional, el GlcNAc se modifica con Gal, seguido por conjugación al Gal de un ácido siálico modificado con un resto PEG.

En las publicaciones de solicitud de patente estadounidense de titularidad conjunta 20040132640; 20040063911; 20040137557; las solicitudes de patente estadounidense n.ºs 10/369.979; 10/410.913; 10/360.770; 10/410.945 y PCT/US02/32263 se exponen otras realizaciones a modo de ejemplo.

15 Los ejemplos expuestos anteriormente proporcionan una ilustración del poder de los métodos expuestos en el presente documento. Usando los métodos descritos en el presente documento, es posible “recortar” y construir un residuo de hidrato de carbono sustancialmente de cualquier estructura deseada. El azúcar modificado puede añadirse a los extremos terminales del resto de hidrato de carbono tal como se expuso anteriormente, o puede ser un resto intermedio entre el núcleo peptídico y el extremo terminal del hidrato de carbono.

20 En una realización a modo de ejemplo, se retira un ácido siálico existente de un glicopéptido usando una sialidasa, desenmascarando así la totalidad o la mayoría de los residuos galactosilo subyacentes. Alternativamente, se marca un péptido o glicopéptido con residuos de galactosa, o un residuo de oligosacárido que termina en una unidad de galactosa. Tras la exposición o adición de los residuos de galactosa, se usa una sialiltransferasa apropiada para añadir un ácido siálico modificado.

25 En otra realización a modo de ejemplo, se usa una enzima que transfiere ácido siálico a ácido siálico. Este método puede ponerse en práctica sin tratar un glicano sialilado con una sialidasa para exponer residuos de glicano debajo del ácido siálico. Un ácido siálico modificado con polímero a modo de ejemplo es un ácido siálico modificado con poli(etilenglicol). Otras enzimas a modo de ejemplo que añaden ácido siálico y restos ácido siálico modificado a glicanos que incluyen un residuo ácido siálico o intercambian un residuo ácido siálico existente en un glicano por esas especies incluyen ST3Gal3, CST-II, ST8Sia-II, ST8Sia-III y ST8Sia-IV.

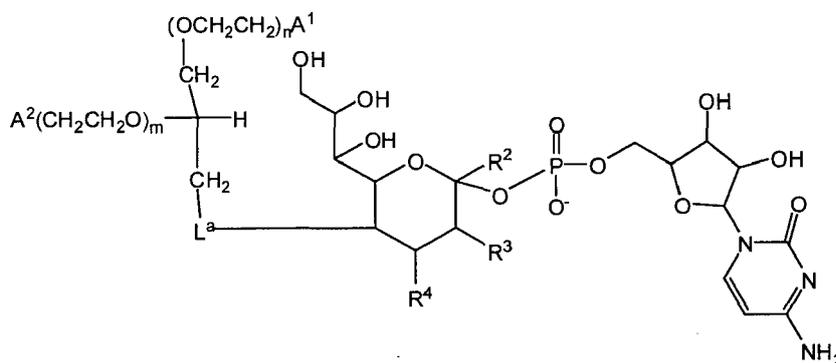
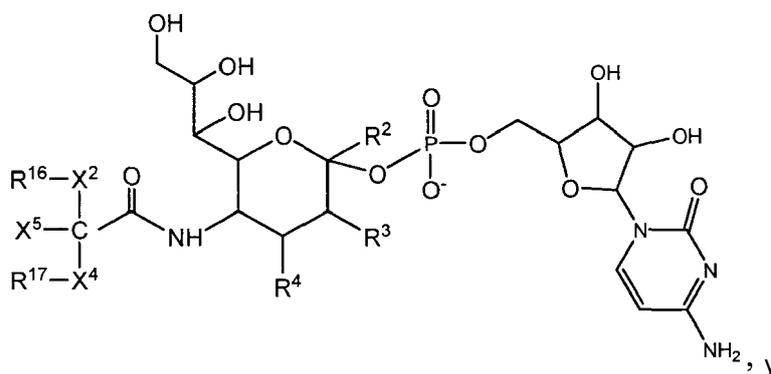
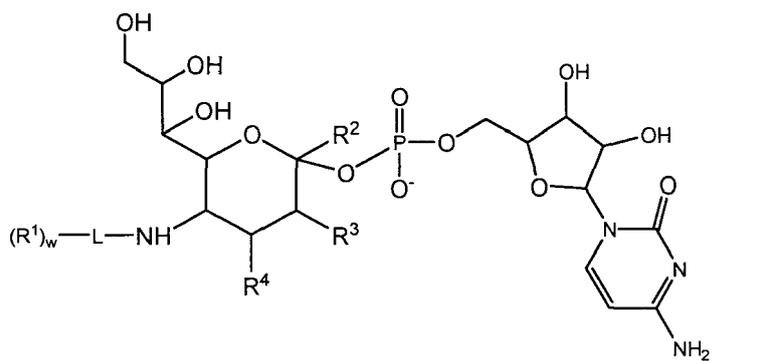
30 En aún un enfoque adicional, una funcionalidad reactiva enmascarada está presente en el ácido siálico. Preferiblemente, el grupo reactivo enmascarado no se ve afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al péptido de factor VII/factor VIIa. Tras la unión covalente del ácido siálico modificado al péptido, se elimina el enmascaramiento y se conjuga el péptido con un agente tal como PEG. El agente se conjuga al péptido de una manera específica mediante su reacción con el grupo reactivo desenmascarado en el residuo de azúcar modificado.

35 Puede usarse cualquier azúcar modificado con su glicosiltransferasa apropiada, dependiendo de los azúcares terminales de las cadenas laterales de oligosacárido del glicopéptido. Tal como se comentó anteriormente, el azúcar terminal del glicopéptido requerido para la introducción de la estructura pegilada puede introducirse de manera natural durante la expresión o puede producirse tras la expresión usando la(s) glicosidasa(s), glicosiltransferasa(s) o mezcla de glicosidasa(s) y glicosiltransferasa(s) apropiadas.

40 En una realización a modo de ejemplo adicional, se hace reaccionar UDP-galactosa-PEG con β 1,4-galactosiltransferasa, transfiriendo así la galactosa modificada a la estructura de N-acetilglucosamina terminal apropiada. Los residuos de GlcNAc terminal en el glicopéptido pueden producirse durante la expresión, tal como puede producirse en sistemas de expresión tales como de mamíferos, insectos, plantas u hongos, pero también pueden producirse mediante tratamiento del glicopéptido con una sialidasa y/o glicosidasa y/o glicosiltransferasa, según se requiera.

45 En otra realización a modo de ejemplo, se usa una GlcNAc transferasa, tal como GNT1-5, para transferir GlcNAc pegilado a un residuo de manosa terminal en un glicopéptido. En una realización a modo de ejemplo todavía adicional, las estructuras de glicano unidas en N y/o en O se eliminan enzimáticamente de un glicopéptido para exponer un aminoácido o un residuo glicosilo terminal que posteriormente se conjuga con el azúcar modificado. Por ejemplo, se usa una endoglicanasa para eliminar las estructuras unidas en N de un glicopéptido para exponer un GlcNAc terminal tal como una Asn unida a GlcNAc en el glicopéptido. Se usa UDPGal-PEG y la galactosiltransferasa apropiada para introducir la funcionalidad PEG-galactosa en el GlcNAc expuesto.

55 En una realización alternativa, el azúcar modificado se añade directamente a la estructura principal peptídica usando una glicosiltransferasa que se sabe que transfiere residuos de azúcar a la estructura principal peptídica. Las glicosiltransferasas a modo de ejemplo útiles en la puesta en práctica de la presente invención incluyen, pero no se

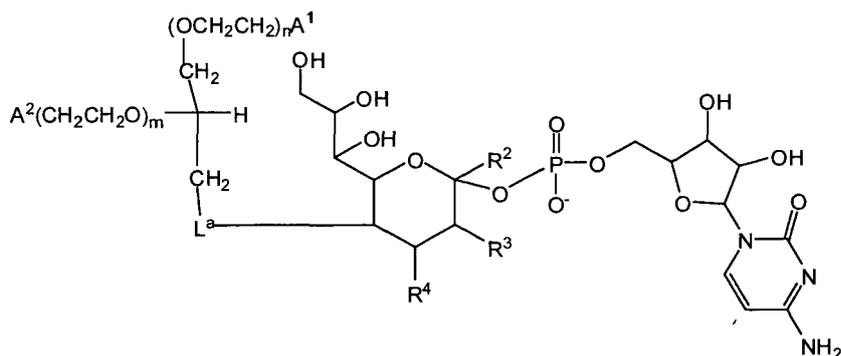
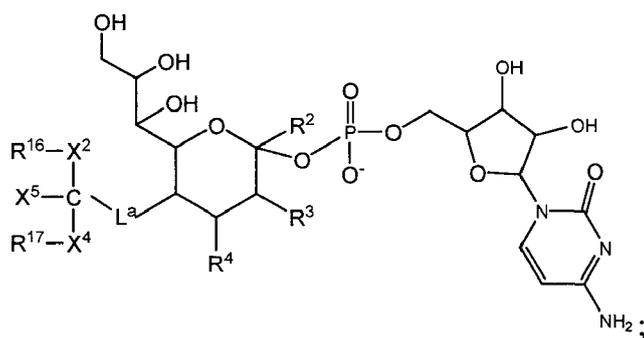


- 5 en las que las variables son tal como se describieron anteriormente, y una enzima que transfiera PEG-ácido siálico de dicho donador a un miembro seleccionado del GalNAc, Gal y el Sia de dicho grupo glicosilo, en condiciones apropiadas para dicha transferencia. Un donador de ácido siálico modificado a modo de ejemplo es CMP-ácido siálico modificado, mediante un resto de unión, con un polímero, por ejemplo, un resto poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificado. Tal como se comenta en el presente documento, el péptido se glicosila opcionalmente con GalNAc y/o Gal y/o Sia ("remodela") antes de la unión del azúcar modificado. Las etapas de remodelación pueden producirse en secuencia en el mismo recipiente sin purificación del péptido glicosilado entre etapas. Alternativamente, tras una o más etapas de remodelación, puede purificarse el péptido glicosilado antes de someterlo a la siguiente etapa de glicosilación o glicopegilación. En una realización a modo de ejemplo, el método comprende además expresar el péptido en un huésped. En una realización a modo de ejemplo, el huésped es una célula de mamífero o una célula de insecto. En otra realización a modo de ejemplo, la célula de mamífero es un miembro seleccionado de una célula BHK y una célula CHO y la célula de insecto es una célula *Spodoptera frugiperda*.
- 10
- 15

Tal como se ilustra en los ejemplos y se comenta adicionalmente a continuación, la colocación de un resto aceptor para el PEG-azúcar se logra en cualquier número deseado de etapas. Por ejemplo, en una realización, la adición de GalNAc al péptido puede ir seguida por una segunda etapa en la que se conjuga el PEG-azúcar al GalNAc en el mismo recipiente de reacción. Alternativamente, estas dos etapas pueden llevarse a cabo en un único recipiente de manera aproximadamente simultánea.

20

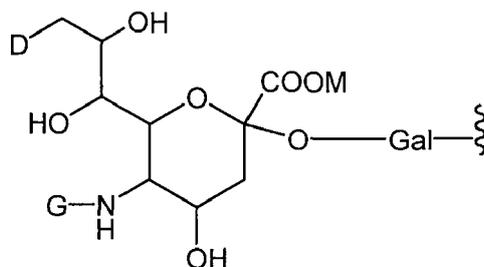
En una realización a modo de ejemplo, el donador de PEG-ácido siálico tiene la fórmula:



en las que las variables son tal como se describieron anteriormente.

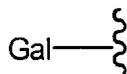
5 En una realización a modo de ejemplo adicional, el péptido se expresa en un sistema de expresión apropiado antes de glicopegilarse o remodelarse. Los sistemas de expresión a modo de ejemplo incluyen Sf-9/baculovirus y células de ovario de hámster chino (CHO).

En una realización a modo de ejemplo, la invención proporciona un método de preparación de un conjugado peptídico que comprende un resto de unión de glicosilo que comprende un residuo sialilo modificado que tiene la fórmula:

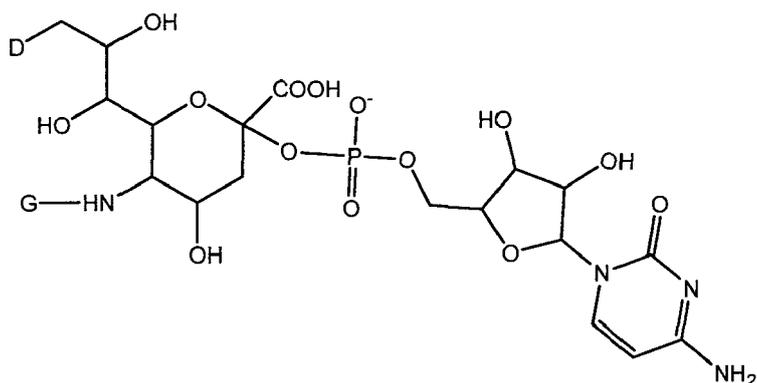


10 en la que D es un miembro seleccionado de -OH y R¹-L-NH-; G es un miembro seleccionado de R¹-L-y -C(O)-alquil (C₁-C₆)-R¹; R¹ es un resto que comprende un miembro seleccionado de un residuo de poli(etilenglicol) de cadena lineal y residuo de poli(etilenglicol) ramificado; M es un miembro seleccionado de H, un metal y una carga negativa única; L es un resto de unión que es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido, de manera que cuando D es OH, G es R¹-L-, y cuando G es -C(O)-alquil(C₁-C₆), D es R¹-L-NH,

comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto un péptido que comprende el resto glicosilo:

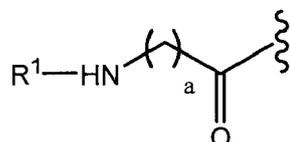


con un resto donador de PEG-ácido siálico que tiene la fórmula:



en la que las variables son tal como se describieron anteriormente, y una enzima que transfiere dicho PEG-ácido siálico al Gal de dicho resto glicosilo, en condiciones apropiadas para dicha transferencia.

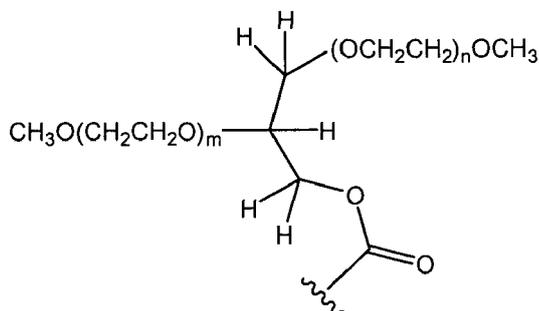
En una realización a modo de ejemplo, L-R¹ tiene la fórmula:



5

en la que a es un número entero seleccionado de desde 0 hasta 20.

En otra realización a modo de ejemplo, R¹ tiene una estructura que es un miembro seleccionado de:



10

en el que m y n son números enteros seleccionados independientemente de desde 1 hasta 2500; y q es un número entero seleccionado de desde 0 hasta 20.

15

Pueden producirse cantidades a gran escala o a pequeña escala de conjugado peptídico mediante los métodos descritos en el presente documento. En una realización a modo de ejemplo, la cantidad de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 100 kg. En una realización a modo de ejemplo, la cantidad de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,1 kg hasta aproximadamente 1 kg. En una realización a modo de ejemplo, la cantidad de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,5 kg hasta aproximadamente 10 kg. En una realización a modo de ejemplo, la cantidad de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,5 kg hasta aproximadamente 3 kg. En una realización a modo de ejemplo, la cantidad de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,1 kg hasta aproximadamente 5 kg. En una realización a modo de ejemplo, la cantidad de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,08 kg hasta aproximadamente 0,2 kg. En una realización a modo de ejemplo, la cantidad de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,05 kg hasta aproximadamente 0,4 kg. En una realización a modo de ejemplo, la cantidad de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,1 kg hasta aproximadamente 0,7 kg. En una realización a modo de ejemplo, la cantidad de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,3 kg hasta aproximadamente 1,75 kg. En una realización a modo de ejemplo, la cantidad de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 25 kg hasta aproximadamente 65 kg.

25

30

La concentración de péptido usado en las reacciones descritas en el presente documento es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 10 mg de péptido/ml de mezcla de reacción. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1 mg de péptido/ml de mezcla de reacción. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,8 hasta

aproximadamente 3 mg de péptido/ml de mezcla de reacción. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6 mg de péptido/ml de mezcla de reacción. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 9 mg de péptido/ml de mezcla de reacción. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 1,2 hasta aproximadamente 7,8 mg de péptido/ml de mezcla de reacción. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de péptido es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 9,5 mg de péptido/ml de mezcla de reacción.

La concentración de azúcar de nucleótido pegilado que puede usarse en las reacciones descritas en el presente documento es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1,0 mM. Los factores que pueden aumentar o reducir la concentración incluyen el tamaño del PEG, tiempo de incubación, temperatura, componentes de tampón, así como el tipo y la concentración de glicosiltransferasa usada. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de azúcar de nucleótido pegilado es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1,0 mM. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de nucleótido pegilado es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5 mM. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de azúcar de nucleótido pegilado es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,3 mM. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de azúcar de nucleótido pegilado es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 0,7 mM. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de azúcar de nucleótido pegilado es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 0,5 mM. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de azúcar de nucleótido pegilado es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,4 hasta aproximadamente 1,0 mM. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de azúcar de nucleótido pegilado es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 0,7 mM. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de azúcar de nucleótido pegilado es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,8 hasta aproximadamente 0,95 mM. En una realización a modo de ejemplo, la concentración de azúcar de nucleótido pegilado es un miembro seleccionado de desde aproximadamente 0,55 hasta aproximadamente 1,0 mM.

Los equivalentes molares del azúcar de nucleótido pegilado que pueden usarse en las reacciones descritas en el presente documento se basan en el número teórico de azúcares pegilados que pueden añadirse a la proteína. El número teórico de azúcares pegilados se basa en el número teórico de sitios de azúcar en la proteína así como en el P.M. de la proteína en comparación con el P.M. y por tanto los moles de nucleótido pegilado. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 1 hasta 20. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 1 hasta 20. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 2 hasta 6. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 3 hasta 17. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 4 hasta 11. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 5 hasta 20. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 1 hasta 10. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 12 hasta 20. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 14 hasta 17. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 7 hasta 15. En una realización a modo de ejemplo, los equivalentes molares de azúcar de nucleótido pegilado es un número entero seleccionado de desde 8 hasta 16.

III. B. Desialilación y glicopegilación simultáneas

La presente invención proporciona un método de glicopegilación "en un solo recipiente". El método en un solo recipiente es distinto de otros procedimientos a modo de ejemplo para preparar un conjugado peptídico, que emplean una desialilación secuencial con sialidasa, posterior purificación del asialo-péptido en una columna de intercambio aniónico, después glicopegilación usando CMP-ácido siálico-PEG y una glicosiltransferasa (tal como ST3Gal3), exoglicosidasa o una endoglicosidasa. Después se purifica el conjugado peptídico mediante intercambio aniónico seguido por cromatografía de exclusión molecular para producir el conjugado peptídico purificado.

El método en un solo recipiente es un método mejorado para fabricar un conjugado peptídico. En este método, las reacciones de desialilación y glicopegilación se combinan en una reacción en un solo recipiente que elimina la primera etapa de cromatografía de intercambio aniónico usada en el procedimiento anteriormente descrito para purificar el asialo-péptido. Esta reducción de las etapas de procedimiento produce varias ventajas. En primer lugar, se reduce el número de etapas de procedimiento requeridas para producir el conjugado peptídico, lo que también reduce la complejidad de funcionamiento del procedimiento. En segundo lugar, se reduce el tiempo de procedimiento para la producción de los conjugados peptídicos, por ejemplo, de 4 a 2 días. Esto reduce los requisitos de materia prima y costes de control de calidad asociados con controles en proceso. En tercer lugar, la invención usa menos sialidasa, por ejemplo, hasta 20 veces menos sialidasa, por ejemplo, se requieren 500 mU/l

para producir el conjugado peptídico con respecto al procedimiento. Esta reducción en el uso de sialidasa reduce significativamente la cantidad de contaminantes, tales como sialidasa, en la mezcla de reacción.

En una realización a modo de ejemplo, se prepara un conjugado peptídico mediante el siguiente método. En una primera etapa, se combina un péptido con una sialidasa, un azúcar modificado de la invención y una enzima que puede catalizar la transferencia del grupo de unión de glicosilo desde el azúcar modificado al péptido, preparando por tanto el conjugado peptídico. En este método puede usarse cualquier sialidasa. Pueden encontrarse sialidasas a modo de ejemplo de uso en la invención en la base de datos CAZY (véase afmb.cnrsmrs.fr/CAZY/index.html y www.cazy.org/CAZY). Pueden adquirirse sialidasas a modo de ejemplo de cualquier número de fuentes (QA-Bio, Calbiochem, Marukin, Prozyme, etc.). En una realización a modo de ejemplo, la sialidasa es un miembro seleccionado de sialidasas citoplasmáticas, sialidasas lisosomales, exo- α -sialidasas y endosialidasas. En otra realización a modo de ejemplo, la sialidasa usada se produce a partir de bacterias tales como *Clostridium perfringens* o *Streptococcus pneumoniae*, o a partir de un virus tal como un adenovirus. En una realización a modo de ejemplo, la enzima que puede catalizar la transferencia del grupo de unión de glicosilo desde el azúcar modificado al péptido es un miembro seleccionado de una glicosiltransferasa, tal como sialiltransferasas y fucosiltransferasas, así como exoglicosidasas y endoglicosidasas. En una realización a modo de ejemplo, la enzima es una glicosiltransferasa, que es ST3Gal3. En otra realización a modo de ejemplo, la enzima usada se produce a partir de bacterias tales como *Escherichia Coli* o un hongo tal como *Aspergillus niger*. En otra realización a modo de ejemplo, la sialidasa se añade al péptido antes que la glicosiltransferasa durante un tiempo especificado, permitiendo que la reacción de sialidasa avance antes de iniciar la reacción de glicopegilación con la adición del reactivo de PEG-ácido siálico y la glicosiltransferasa. Muchos de estos ejemplos se comentan en el presente documento. Finalmente, en esta reacción puede usarse cualquier azúcar modificado descrito en el presente documento.

En otra realización a modo de ejemplo, el método comprende además una etapa de "ocupación de sitios activos". En esta etapa, se añade ácido siálico no pegilado adicional a la mezcla de reacción. En una realización a modo de ejemplo, este ácido siálico se añade al péptido o conjugado peptídico previniendo así la adición adicional de PEG-ácido siálico. En otra realización a modo de ejemplo, este ácido siálico impide la función de la glicosiltransferasa en la mezcla de reacción, deteniendo eficazmente la adición de grupos de unión de glicosilo a los péptidos o conjugados peptídicos. Lo más importante es que el ácido siálico que se añade a la mezcla de reacción ocupa los sitios activos de los glicanos no glicopegilados proporcionando así un conjugado peptídico que tiene una farmacocinética mejorada. Además, esta sialidasa puede añadirse directamente a la mezcla de reacción de glicopegilación cuando se desea el grado de pegilación a ciertas cantidades sin purificación previa.

En una realización a modo de ejemplo, tras la etapa de ocupación de sitios activos, menos de aproximadamente el 50% de los sitios de sialilación en el péptido o conjugado peptídico no comprenden un resto sialilo. En una realización a modo de ejemplo, tras la etapa de ocupación de sitios activos, menos de aproximadamente el 40% de los sitios de sialilación en el péptido o conjugado peptídico no comprenden un resto sialilo. En una realización a modo de ejemplo, tras la etapa de ocupación de sitios activos, menos de aproximadamente el 30% de los sitios de sialilación en el péptido o conjugado peptídico no comprenden un resto sialilo. En una realización a modo de ejemplo, tras la etapa de ocupación de sitios activos, menos de aproximadamente el 20% de los sitios de sialilación en el péptido o conjugado peptídico no comprenden un resto sialilo. En una realización a modo de ejemplo, tras la etapa de ocupación de sitios activos, menos de aproximadamente el 10% de los sitios de sialilación en el péptido o conjugado peptídico no comprenden un resto sialilo. En una realización a modo de ejemplo, entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 5% de los sitios de sialilación en el péptido o conjugado peptídico no comprenden un resto sialilo. En una realización a modo de ejemplo, entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 10% de los sitios de sialilación en el péptido o conjugado peptídico no comprenden un resto sialilo. En una realización a modo de ejemplo, tras la etapa de ocupación de sitios activos, esencialmente todos los sitios de sialilación en el péptido o conjugado peptídico comprenden un resto sialilo.

III. C. Desialilación y modificación selectiva de péptidos

En otra realización a modo de ejemplo, la presente invención proporciona un método para desialilar un péptido. El método proporciona preferiblemente un péptido que está desialilado en al menos aproximadamente el 40%, preferiblemente el 45%, de manera preferible aproximadamente el 50%, de manera preferible aproximadamente el 55%, de manera preferible aproximadamente el 60%, de manera preferible aproximadamente el 65%, de manera preferible aproximadamente el 70%, de manera preferible aproximadamente el 75%, de manera preferible aproximadamente el 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos el 90%, todavía más preferiblemente al menos el 92%, preferiblemente al menos el 94%, incluso más preferiblemente al menos el 96%, todavía más preferiblemente al menos el 98% y todavía más preferiblemente el 100%.

El método incluye poner en contacto el péptido con una sialidasa, preferiblemente durante un periodo de tiempo. El periodo de tiempo preseleccionado es suficiente para desialilar el péptido hasta el grado deseado. En una realización preferida, el péptido desialilado se separa de la sialidasa cuando se alcanza el grado deseado de desialilación. En el presente documento se expone un ciclo de reacción de desialilación y purificación a modo de ejemplo.

Los expertos pueden determinar un periodo de tiempo preseleccionado apropiado a lo largo del cual llevar a cabo la reacción de desialilación. En una realización a modo de ejemplo, el periodo es de menos de 24 horas, preferiblemente menos de 8 horas, más preferiblemente menos de 6 horas, más preferiblemente menos de 4 horas, todavía más preferiblemente menos de 2 horas e incluso más preferiblemente menos de 1 hora.

5 En otra realización a modo de ejemplo, en la preparación de conjugado peptídico al final de la reacción de desialilación, al menos 10% de los miembros de la población de péptidos tienen sólo un único ácido siálico unido a los mismos, preferiblemente al menos el 20%, más preferiblemente al menos el 30%, todavía más preferiblemente al menos el 40%, incluso todavía más preferiblemente al menos el 50% y más preferiblemente al menos el 60%, y todavía más preferiblemente están completamente desialilados.

10 En aún una realización a modo de ejemplo adicional, en la preparación al final de la reacción de desialilación, al menos el 10% de los miembros de la población de péptidos están totalmente desialilados, preferiblemente al menos el 20%, más preferiblemente al menos el 30%, incluso más preferiblemente al menos el 40%, todavía más preferiblemente al menos el 50% e incluso todavía más preferiblemente al menos el 60%.

15 En todavía otra realización a modo de ejemplo, en la preparación al final de la reacción de desialilación, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% de los miembros de la población peptídica tienen sólo un único ácido siálico, y al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% de los péptidos están completamente desialilados.

En una realización preferida, en la preparación al final de la reacción de desialilación, al menos el 50% de la población de péptidos están completamente desialilados y al menos el 40% de los miembros de la población peptídica portan sólo un único resto ácido siálico.

20 Tras la desialilación, el péptido se conjuga opcionalmente con un azúcar modificado. Un azúcar modificado a modo de ejemplo incluye un resto sacarilo unido a un resto poli(etilenglicol) ramificado o lineal. La conjugación se cataliza mediante una enzima que transfiere el azúcar modificado desde un donador de azúcar modificado a un resto de aminoácido o glicosilo del péptido. Un donador de azúcar modificado a modo de ejemplo es un CMP-ácido siálico que porta un resto poli(etilenglicol) ramificado o lineal. Un resto poli(etilenglicol) a modo de ejemplo tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 2 kD, más preferiblemente al menos aproximadamente 5 kD, más preferiblemente al menos aproximadamente 10 kD, preferiblemente al menos aproximadamente 20 kD, más preferiblemente al menos aproximadamente 30 kD y más preferiblemente al menos aproximadamente 40 kD.

25 En una realización a modo de ejemplo, la enzima usada para transferir el resto de azúcar modificado desde el donador de azúcar modificado es una glicosiltransferasa, por ejemplo, sialiltransferasa. Una sialiltransferasa a modo de ejemplo de uso en los métodos de la invención es ST3Gal3.

30 Un método a modo de ejemplo de la invención da como resultado un péptido modificado que porta al menos uno, preferiblemente al menos dos, preferiblemente al menos tres grupos de modificación. En una realización, el péptido producido porta un único grupo de modificación en la cadena ligera del péptido. En otra realización, el método proporciona un péptido modificado que porta un único grupo de modificación en la cadena pesada. En todavía otra realización, el método proporciona un péptido modificado con un único grupo de modificación en la cadena ligera y un único grupo de modificación en la cadena pesada.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método de preparación de un péptido modificado. El método incluye poner en contacto el péptido con un donador de azúcar modificado que porta un grupo de modificación y una enzima que puede transferir un resto de azúcar modificado desde el donador de azúcar modificado a un residuo de aminoácido o glicosilo del péptido.

40 En una realización a modo de ejemplo, el método proporciona una población de péptidos modificados en la que al menos el 40%, preferiblemente al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70% e incluso más preferiblemente al menos el 80% de los miembros de la población están monoconjugados en la cadena ligera del péptido.

45 En una realización a modo de ejemplo, el método proporciona una población de péptidos modificados en la que al menos el 40%, preferiblemente al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70% e incluso más preferiblemente al menos el 80% de los miembros de la población están diconjugados en la cadena ligera del péptido.

50 En una realización a modo de ejemplo de este aspecto, el método proporciona una población de péptidos modificados en la que no más del 50%, preferiblemente no más del 30%, preferiblemente no más del 20%, más preferiblemente no más del 10% de los miembros de la población están monoconjugados en la cadena pesada del péptido.

55 En una realización a modo de ejemplo de este aspecto, el método proporciona una población de péptidos modificados en la que no más del 50%, preferiblemente no más del 30%, preferiblemente no más del 20%, más preferiblemente no más del 10% de los miembros de la población están diconjugados en la cadena pesada del péptido.

El péptido puede someterse a la acción de una sialidasa antes de la etapa de puesta en contacto, o el péptido puede usarse sin desialilación previa. Cuando se pone el péptido en contacto con una sialidasa puede estar o bien desialilado de manera esencialmente completa o bien sólo desialilado de manera parcial. En una realización preferida, el péptido está al menos parcialmente desialilado antes de la etapa de puesta en contacto. El péptido puede estar desialilado de manera esencialmente completa (esencialmente asialo) o sólo desialilado de manera parcial. En una realización preferida, el péptido desialilado es una de las realizaciones desialiladas descritas anteriormente en el presente documento.

III. D. Alícuotas adicionales de reactivos añadidos en la síntesis de conjugados peptídicos

En una realización a modo de ejemplo de la síntesis de los conjugados peptídicos descritos en el presente documento, se añaden una o más alícuotas adicionales de un componente de reacción/reactivo a la mezcla de reacción tras un periodo de time seleccionado. En una realización a modo de ejemplo, el conjugado peptídico es un conjugado peptídico. En otra realización a modo de ejemplo, el componente de reacción/reactivo añadido es un nucleótido de azúcar modificado. La introducción de un nucleótido de azúcar modificado en la reacción aumentará la probabilidad de impulsar la reacción de glicopegilación hasta completarse. En una realización a modo de ejemplo, el azúcar de nucleótido es un CMP-SA-PEG descrito en el presente documento. En una realización a modo de ejemplo, el componente de reacción/reactivo añadido es una sialidasa. En una realización a modo de ejemplo, el componente de reacción/reactivo añadido es una glicosiltransferasa. En una realización a modo de ejemplo, el componente de reacción/reactivo añadido es magnesio. En una realización a modo de ejemplo, la alícuota adicional añadida representa aproximadamente el 10% o el 20% o el 30% o el 40% o el 50% o el 60% o el 70% o el 80% o el 90% de la cantidad original añadida al comienzo de la reacción. En una realización a modo de ejemplo, el componente de reacción/reactivo se añade a la reacción aproximadamente 3 horas o 6 horas o 8 horas o 10 horas o 12 horas o 18 horas o 24 horas o 30 horas o 36 horas tras su comienzo.

III. E. Purificación de conjugados peptídicos

Los productos producidos mediante los procedimientos anteriores pueden usarse sin purificación. Sin embargo, habitualmente se prefiere recuperar el producto y uno o más de los productos intermedios, por ejemplo, azúcares de nucleótido, especies de PEG ramificado y lineal, azúcares modificados y azúcares de nucleótido modificados. Pueden usarse técnicas convencionales bien conocidas para la recuperación de péptidos glicosilados tales como cromatografía de capa fina o gruesa, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico o filtración en membrana. Se prefiere usar filtración en membrana, usando más preferiblemente una membrana de osmosis inversa, o una o más técnicas de cromatografía en columna para la recuperación tal como se comenta a continuación en el presente documento y en la bibliografía citada en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse filtración en membrana en la que las membranas tienen un punto de corte de peso molecular de aproximadamente 3000 a aproximadamente 10.000 para eliminar proteínas tales como glicosil transferasas. En determinados casos, se usarán las diferencias de punto de corte de peso molecular entre la impureza y el producto con el fin de garantizar la purificación del producto. Por ejemplo, con el fin de purificar el producto péptido-SA-PEG-40 kD frente a CMP-SA-PEG-40 kD sin reaccionar, debe elegirse un filtro que permita, por ejemplo, que péptido-SA-PEG-40 kD quede en el material retenido mientras permita que CMP-SA-PEG-40 kD fluya al filtrado. Entonces puede usarse nanofiltración u osmosis inversa para eliminar sales y/o purificar el producto de sacáridos (véase, por ejemplo, el documento WO 98/15581). Las membranas de nanofiltro son una clase de membranas de osmosis inversa que dejan pasar sales monovalentes pero retienen sales polivalentes y solutos sin carga de más de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Dalton, dependiendo de la membrana usada. Por tanto, en una aplicación típica, los sacáridos preparados mediante los métodos de la presente invención se retendrán en la membrana y las sales contaminantes pasarán a través de la misma.

Si el péptido se produce de manera intracelular, como primera etapa, se eliminan los residuos particulados, o bien células huésped o bien fragmentos sometidos a lisis. Tras la glicopegilación, el péptido pegilado se purifica mediante métodos reconocidos en la técnica, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, la proteína puede concentrarse con un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, seguido por separación de la variante de polipéptido de otras impurezas mediante una o más etapas seleccionadas de cromatografía por inmunoafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (por ejemplo, sobre dietilaminoetilo (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía en Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, lectina de lenteja-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, éter-Toyopearl, butilo-Toyopearl, fenilo-Toyopearl o proteína A-Sepharose, cromatografía en SDS-PAGE, cromatografía en sílice, cromatografía en HPLC de fase inversa (por ejemplo, gel de sílice con grupos alifáticos añadidos), filtración en gel usando, por ejemplo, tamiz molecular Sephadex o cromatografía de exclusión molecular, cromatografía sobre columnas a las que se une selectivamente el polipéptido, y precipitación con etanol o sulfato de amonio. Puede usarse la purificación para separar una cadena del conjugado peptídico de factor VII/factor VIIa de la otra, tal como se describe adicionalmente en esta sección.

Los glicopéptidos modificados producidos en cultivo se aíslan habitualmente mediante extracción inicial de células, enzimas, etc., seguido por una o más etapas de concentración, precipitación con formación de sal, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión molecular. Adicionalmente, la glicoproteína modificada puede purificarse mediante cromatografía de afinidad. Finalmente, puede emplearse HPLC para etapas de purificación final.

Puede incluirse un inhibidor de proteasa en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos o conservantes para prevenir el crecimiento de contaminantes imprevistos. Los inhibidores de proteasa usados en las etapas anteriores pueden ser inhibidores de bajo peso molecular, incluyendo antipaina, alfa-1-antitripsina, anti-trombina, leupeptina, amastatina, quimostatina, banzamidina, así como otros inhibidores de serina proteasa (es decir, serpinas). Generalmente, los inhibidores de serina proteasa deben usarse en concentraciones que oscilan entre 0,5 - 100 μM , aunque la quimostatina en cultivo celular puede usarse en concentraciones superiores a 200 μM . Otros inhibidores de serina proteasa incluirán inhibidores específicos para la familias de serina proteasas de tipo quimotripsina, de tipo subtilisina, alfa/beta-hidrolasa o peptidasa señal. Además de las serina proteasas, también pueden usarse otros tipos de inhibidores de proteasa, incluyendo inhibidores de cisteína proteasa (1-10 μM) e inhibidores de aspártico proteasa (1 - 5 μM), así como inhibidores de proteasa no específicos tales como pepstatina (0,1 - 5 μM). Los inhibidores de proteasa usados en esta invención también pueden incluir inhibidores de proteasa naturales, tales como el inhibidor hirustasina aislado de sanguijuelas. En algunas realizaciones, los inhibidores de proteasa comprenderán anticuerpos o péptidos sintéticos que pueden unirse con especificidad al sitio catalítico de proteasa para estabilizar el factor VII/factor VIIa sin interferir con una reacción de glicopegilación.

Dentro de otra realización, en primer lugar se concentran sobrenadantes de sistemas que producen el glicopéptido modificado de la invención usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Pellicon de Millipore o Amicon. Tras la etapa de concentración, puede aplicarse 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 molécula de anticuerpo unida a un soporte adecuado. Alternativamente, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos DEAE colgantes. Las matrices adecuadas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren particularmente grupos sulfopropilo.

Otros métodos de uso en la purificación incluyen cromatografía de exclusión molecular (SEC), cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía sobre Blue Sepharose. Estos y otros métodos útiles se ilustran en la patente provisional estadounidense de cesión conjunta n.º (n.º de expediente del apoderado 40853-01-5168-P1, presentado el 6 de mayo de 2005).

Pueden emplearse una o más etapas de RP-HPLC que emplean medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo colgantes u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente una composición de conjugado polipeptídico. También pueden emplearse algunas o todas de las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una glicoproteína modificada homogénea o esencialmente homogénea.

El glicopéptido modificado de la invención resultante de una fermentación a gran escala puede purificarse mediante métodos análogos a los dados a conocer por Urdal *et al.*, J. Chromatog. 296: 171 (1984). Esta referencia describe dos etapas de RP-HPLC secuenciales para la purificación de IL-2 humana recombinante sobre una columna de HPLC preparativa. Alternativamente, pueden usarse técnicas tales como cromatografía de afinidad para purificar la glicoproteína modificada.

En una realización a modo de ejemplo, la purificación se logra mediante los métodos expuestos en la patente provisional estadounidense de titularidad conjunta, de cesión conjunta, n.º 60/665.588, presentada el 24 de marzo de 2005.

Según la presente invención, péptidos pegilados o conjugado peptídico producidos o bien mediante desialilación secuencial o bien mediante sialilación simultánea pueden purificarse o resolverse usando gradiente de cloruro de magnesio.

45 IV. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica según las reivindicaciones adjuntas. La composición farmacéutica incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un resto PEG que no se produce de manera natural y un péptido glicosilado o no glicosilado. El polímero, resto terapéutico o biomolécula se conjuga al péptido mediante un grupo de unión de glicosilo intacto interpuesto entre, y unido de manera covalente a, tanto el péptido como el polímero, resto terapéutico o biomolécula.

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

55 En una realización a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica comprende un conjugado peptídico y un diluyente farmacéuticamente aceptable que es un miembro seleccionado de cloruro de sodio, cloruro de calcio dihidratado, glicilglicina, polisorbato 80 y manitol. En otra realización a modo de ejemplo, el diluyente

farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio y glicilglicina. En otra realización a modo de ejemplo, el diluyente farmacéuticamente aceptable es cloruro de calcio dihidratado y polisorbato 80. En otra realización a modo de ejemplo, el diluyente farmacéuticamente aceptable es manitol.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier manera apropiada de administración, incluyendo, por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el portador comprende preferiblemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, puede emplearse cualquiera de los portadores anteriores o un portador sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. También pueden
10 emplearse microesferas biodegradables (por ejemplo, polilactato-poliglicolato) como portadores para las composiciones farmacéuticas de esta invención. Se dan a conocer microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.^{os} 4.897.268 y 5.075.109.

Comúnmente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, intravenosa. Por tanto, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que incluyen el compuesto disuelto o suspendido en un portador aceptable, preferiblemente un portador acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de tamponamiento y de ajuste de pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden esterilizarse por filtración. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso según están, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones estará normalmente entre 3 y 11, más preferiblemente entre 5 y 9 y lo más preferiblemente entre 7 y 8.

En algunas realizaciones, los glicopéptidos de la invención pueden incorporarse en liposomas formadas a partir de lípidos de formación de vesículas convencionales. Hay una variedad de métodos disponibles para preparar liposomas, tal como se describe, por ejemplo, en Szoka *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), patentes estadounidenses n.^{os} 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028. El direccionamiento de liposomas usando una variedad de agentes de direccionamiento (por ejemplo, los sialilo-galactósidos de la invención) se conoce bien en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 4.957.773 y 4.603.044).

30 Pueden usarse métodos convencionales para el acoplamiento de agentes de direccionamiento a liposomas. Estos métodos implican generalmente la incorporación en liposomas de componentes lipídicos, tales como fosfatidiletanolamina, que pueden activarse para la unión de agentes de direccionamiento, o compuestos lipófilos derivatizados, tales como glicopéptidos derivatizados con lípidos de la invención.

Los mecanismos de direccionamiento requieren generalmente colocar los agentes de direccionamiento sobre la superficie del liposoma de una manera tal que los restos de direccionamiento estén disponibles para su interacción con la diana, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Los hidratos de carbono de la invención pueden unirse a una molécula lipídica antes de formar el liposoma usando métodos conocidos por los expertos en la técnica (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). Alternativamente, el liposoma puede diseñarse de tal manera que en primer lugar se incorpora una parte de conector en la membrana en el momento de formar la membrana. La parte de conector debe tener una parte lipófila, que se incorpora firmemente y se ancla en la membrana. También debe tener una parte reactiva, que está químicamente disponible en la superficie acuosa del liposoma. La parte reactiva se selecciona de modo que es químicamente adecuada para formar un enlace químico estable con el agente de direccionamiento o hidrato de carbono, que se añade posteriormente. En algunos casos, es posible unir directamente el agente de direccionamiento a la molécula de conector, pero en la mayoría de los casos es más adecuado usar una tercera molécula para actuar como puente químico, uniendo por tanto la molécula de conector que está en la membrana con el agente de direccionamiento o hidrato de carbono que se extiende, de manera tridimensional, desde la superficie de vesícula.

Los compuestos preparados mediante los métodos de la invención también pueden encontrar uso como reactivos de diagnóstico. Por ejemplo, los compuestos marcados pueden usarse para localizar zonas de inflamación o metástasis tumoral en un paciente que se sospecha que tiene una inflamación. Para este uso, los compuestos pueden marcarse con ¹²⁵I, ¹⁴C o tritio.

En diversas publicaciones de patente, por ejemplo, los documentos US 20040137557; WO 04/083258; y WO 04/033651, se exponen de manera general métodos preparativos para especies de uso en la preparación de las composiciones de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar los conjugados y métodos y de la presente invención, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplos (que no forman parte de la invención)

EJEMPLO 1

Desialilación del factor VIIa.

Factor VIIa que se expresó en medios libres de suero, factor VIIa que se produjo en medios que contenían suero, más tres mutantes de factor VIIa N145Q, N322Q y DVQ análogo (V158D/E296V/M298Q).

- 5 En la preparación para desialilación enzimática, se dializó factor VIIa en MES, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, MES 50 mM, pH 6 durante la noche a 4°C en tubos de diálisis Snakeskin con un MWCO de 10 kD. Se realizó la desialilación del factor VIIa (1 mg/ml) con sialidasa soluble 10 U/l de *Arthrobacter ureafaciens* (Calbiochem) a 32°C durante 18 horas en el tampón sometido a intercambio.

EJEMPLO 2

Sialil-pegilación del factor VIIa.

- 10 Se realizó la sialil-pegilación ("glicopegilación") con asialo-factor VIIa (1 mg/ml) con ST3Gal-III 100 U/l y CMP-ácido siálico-PEG 200 μM (40 kD, 20 kD, 10 kD, 5 kD y 2 kD) a 32°C en el tampón de desialilación durante 2-6 horas. Tras transcurrir el tiempo de reacción apropiado, se purificó inmediatamente la muestra pegilada para minimizar la glicopegilación adicional.

- 15 Para ocupar los sitios activos de factor VII/factor VIIa glicopegilado con muestras con sitios activos ocupados con ácido siálico, en primer lugar se retiró la sialidasa del asialo-factor VIIa mediante cromatografía de intercambio aniónico tal como se indica a continuación. Se añadió CMP-ácido siálico en exceso (5 mM) y se incubó a 32°C durante 2 horas, ocupando los sitios activos de factor VIIa glicopegilado con ácido siálico. Se analizaron las formas sialil-pegiladas del factor VIIa mediante SDS-PAGE no reductora (geles de tris-glicina y/o geles de NuPAGE) y un kit de tinción azul coloidal, tal como se describe por Invitrogen.

EJEMPLO 3

Purificación del factor VIIa pegilado.

- 25 Se purificaron muestras pegiladas del factor VIIa con un método de intercambio aniónico modificado. Se manipularon las muestras a 5°C. Inmediatamente antes de cargar la columna, se añadió 1 g de Chelex 100 (BioRad) por 10 ml de disolución de factor VIIa a la muestra remodelada. Tras agitar durante 10 min, se filtró la suspensión sobre una membrana de acetato de celulosa (0,2 μm) con un sistema de vacío. Se lavó la resina de quelante retenida en el filtro una vez con 1-2 ml de agua por 10 ml de producto a granel. Se ajustó la conductividad del filtrado a 10 mS/cm a 5°C, y se ajustó a pH 8,6, si fue necesario.

- 30 Se realizó el intercambio aniónico a 8-10°C. Se preparó una columna que contenía Q Sepharose FF antes de cargar mediante lavado con NaOH 1 M (10 volúmenes de columna), agua (5 volúmenes de columna), NaCl 2 M, HOAc 50 mM, pH 3 (10 volúmenes de columna) y equilibrando con NaCl 175 mM, glicilglicina 10 mM, pH 8,6 (10 volúmenes de columna). Para cada reacción de pegilación, se cargaron 15-20 mg de factor VIIa en una columna XK16 (Amersham Biosciences) con 10 ml de Q Sepharose FF (no más de 2 mg de proteína por ml de resina) a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Para el PEG lineal de 2 kD, se cargaron 20 mg de factor VIIa en una columna XK26 (Amersham Biosciences) con 40 ml de Q Sepharose FF (0,5 mg de proteína por mg de resina) a una velocidad de flujo de 100 cm/h.

- 35 Tras cargar, se lavó la columna con NaCl 175 mM, glicilglicina 10 mM, pH 8,6 (10 volúmenes de columna) y NaCl 50 mM, glicilglicina 10 mM, pH 8,6 (2 volúmenes de columna). Se realizó la elución con un gradiente gradual de CaCl₂ 15 mM usando NaCl 50 mM, glicilglicina 10 mM, CaCl₂ 15 mM, pH 8,6 (5 volúmenes de columna). Después se lavó la columna con NaCl 1 M, glicilglicina 10 mM, pH 8,6 (5 volúmenes de columna). Se monitorizó el efluente mediante absorbancia a 280 nm. Se recogieron fracciones (5 ml) durante el flujo a través y los dos lavados; se recogieron fracciones de 2,5 ml durante las eluciones con CaCl₂ y sal 1 M. Se analizaron las fracciones que contenían factor VIIa mediante SDS-PAGE no reductora (geles de tris-glicina y/o geles de NUPAGE) y un kit de tinción azul coloidal. Se combinaron las fracciones apropiadas con factor VIIa y se ajustó el pH a 7,2 con HCl 4 M.

- 45 Se purificó el factor VIIa-SA-PEG-10 kD tal como se describió anteriormente, excepto por los siguientes cambios. Se añadió EDTA (10 mM) a la disolución de factor VIIa pegilado, se ajustó el pH a pH 6 y se ajustó la conductividad a 5 mS/cm, a 5°C. Se cargaron aproximadamente 20 mg del factor VIIa-SA-PEG-10 kD en una columna XK16 (Amersham Biosciences) con 10 ml de resina Poros 50 Micron HQ (no más de 2 mg de proteína por ml de resina) a una velocidad de flujo de 100 cm/h. Tras cargar, se lavó la columna con NaCl 175 mM, histidina 10 mM pH 6 (10 volúmenes de columna) y NaCl 50 mM, histidina 10 mM, pH 6 (2 volúmenes de columna). Se realizó la elución con un gradiente gradual de CaCl₂ 20 mM en NaCl 50 mM, histidina 10 mM, pH 6 (5 volúmenes de columna). Después se lavó la columna con NaCl 1 M, histidina 10 mM, pH 6 (5 volúmenes de columna).

- 55 Se concentró el eluato de intercambio aniónico que contenía factor VIIa-SA-PEG-10 kD (25 ml) hasta 5-7 ml usando un dispositivo de filtro centrífugo Ultra-15 10K de Amicon, según las instrucciones del fabricante (Millipore). Tras la concentración, se realizó una cromatografía de exclusión molecular. Se cargó la muestra (5-7 ml) en una columna que contenía Superdex 200 (HiLoad 16/60, calidad prep.; Amersham Biosciences) equilibrada en NaCl 50 mM,

- glicilglicina 10 mM, CaCl₂ 15 mM, pH 7,2 para la mayoría de las variantes pegiladas. Se separó el factor VIIa-SA-PEG-10 kD del asialo-factor VIIa sin modificar a una velocidad de flujo de 1 ml/min, y se monitorizó la absorbancia a 280 nm. Se recogieron las fracciones (1 ml) que contenían factor VIIa y se analizaron mediante SDS-PAGE no reductora (geles de tris-glicina y/o geles de NuPAGE) y un kit de tinción azul coloidal. Se combinaron las fracciones que contenían la isoforma pegilada objetivo y carentes del asialo-factor VIIa sin modificar y se concentraron hasta 1 mg/ml usando un dispositivo de filtro centrífugo Ultra-15 10K de Amicon. Se determinó la concentración de proteína a partir de lecturas de absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 1,37 (mg/ml)⁻¹cm⁻¹.

EJEMPLO 4

Determinación de isoformas pegiladas mediante análisis por HPLC de fase inversa.

- Se analizó el factor VIIa pegilado mediante HPLC en una columna de fase inversa (Zorbax 300SB-C3, tamaño de partícula de 5 µm, 2,1 x 150 mm). Los eluyentes eran A) TFA 0,1 % en agua y B) TFA al 0,09% en acetonitrilo. La detección se realizó a 214 nm. El gradiente, la velocidad de flujo y la temperatura de columna dependieron de la longitud del PEG (PEG de 40 kD, 20 kD y 10 kD: el 35-65% de B en 30 min, 0,5 ml/min, 45°C; PEG de 10 kD: el 35-60% de B en 30 min, 0,5 ml/min, 45°C; 5 kD: el 40-50% de B en 40 min, 0,5 ml/min, 45°C; 2 kD: el 38-43% de B en 67 min, 0,6 ml/min, 55°C). La identidad de cada pico se asignó basándose en dos o más de cuatro evidencias diferentes: el tiempo de retención conocido del factor VIIa nativo, la migración en SDS-PAGE del pico aislado, el espectro de masas de MALDI-TOF del pico aislado y la progresión ordenada del tiempo de retención de cada pico con un número creciente de PEG unido.

EJEMPLO 5

- Determinación del sitio de unión de PEG mediante HPLC de fase inversa.*

- Se redujeron factor VIIa y variantes de factor VIIa pegilado mezclando la muestra (10 µl a una concentración de 1 mg/ml) con tampón reductor (40 µl, NaCl 50 mM, glicilglicina 10 mM, EDTA 15 mM, urea 8 M, DTT 20 mM, pH 8,6) durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadió agua (50 µl) y se enfrió la muestra hasta 4°C hasta que se inyectó en la HPLC (< 12 h). La columna de HPLC, los eluyentes y la detección fueron tal como se describió anteriormente para muestras no reducidas. La velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min y el gradiente fue del 30-55% de B en 90 min, seguido por un breve ciclo de lavado hasta el 90% de B. La identidad de cada pico se asignó tal como se describió en el ejemplo 4.

EJEMPLO 6

Ensayo de coagulación del factor VIIa.

- Se sometieron a prueba muestras pegiladas y patrones por duplicado y se diluyeron en NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, BSA al 0,1% (p/v), Tris 50 mM, pH 7,4. Se sometieron a ensayo el patrón y las muestras a lo largo de un intervalo de desde 0,1 hasta 10 ng/ml. Se mezclaron volúmenes iguales de patrones diluidos y muestras con plasma deficiente en factor VIIa (Diagnostica Stago) y se almacenaron en hielo durante no más de 4 horas antes de someterse a ensayo.

- Se midieron los tiempos de coagulación en un coagulómetro STart4 (Diagnostica Stago). El coagulómetro midió el tiempo transcurrido hasta que se formó un coágulo *in vitro*, tal como se indica mediante la parada del suave movimiento hacia delante y hacia atrás de una bola magnética en una cubeta de muestra.

- En cada cubeta se depositó una bola magnética, más 100 µl de muestra de factor VIIa/plasma deficiente y 100 µl de una disolución de cefalina de cerebro de rata diluida (almacenada en hielo durante no más de 4 horas). Se añadió cada reactivo con 5 segundos entre cada pocillo, y se incubó la mezcla final durante 300 segundos a 37°C. La disolución de cefalina de cerebro de rata (RBC) diluida se preparó a partir de 2 ml de disolución madre de RBC (1 vial de disolución madre de RBC, de Haemachem, más 10 ml de NaCl 150 mM) y 4 ml de NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, BSA al 0,1% (p/v), Tris 50 mM, pH 7,4.

- A los 300 segundos, se inició el ensayo mediante la adición de 100 µl de una disolución precalentada (37°C) de factor tisular soluble (2 µg/ml; aminoácidos 1-209) en NaCl 100 mM, CaCl₂ 12,5 mM, BSA al 0,1% (p/v), Tris 50 mM, pH 7,4. De nuevo, esta siguiente disolución se añadió con un intervalo de 5 segundos entre muestras.

- Se usaron los tiempos de coagulación de los patrones diluidos para generar una curva patrón (log de tiempo de coagulación frente a log de concentración de factor VIIa). Se usó la regresión lineal resultante a partir de la curva para determinar las actividades de coagulación relativas de variantes pegiladas. Se compararon variantes de factor VIIa pegiladas frente a disolución madre extraída en alícuotas del factor VIIa.

EJEMPLO 7

Glicopegilación del factor VIIa recombinante producido en células BHK

Este ejemplo expone la pegilación de factor VIIa recombinante realizada en células BHK.

Preparación de asialo-factor VIIa. Se produjo factor VIIa recombinante en células BHK (células de riñón de cría de hámster). Se disolvió factor VIIa (14,2 mg) a 1 mg/ml en disolución de tampón (pH 7,4, Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 0,001 M, NaN₃ al 0,05%) y se incubó con conjugado de sialidasa (*Vibrio cholera*)-agarosa 300 mU/ml durante 3 días a 32°C. Para monitorizar la reacción se diluyó una pequeña alícuota de la reacción con el tampón apropiado y se realizó un gel de IEF según procedimientos de Invitrogen (figura 157). Se centrifugó la mezcla a 3.500 rpm y se recogió el sobrenadante. Se lavó la resina tres veces (3x2 ml) con la disolución de tampón anterior (pH 7,4, Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05%) y se concentraron los lavados combinados en un dispositivo Centricon-Plus-20. Se sometió la disolución restante a intercambio 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 del factor VIIa-SA-PEG-1kD y factor VIIa-SA-PEG-10 kD. Se dividió la disolución de desialilación del factor VIIa en dos muestras iguales de 7,2 ml. A cada muestra se le añadió o bien CMP-SA-PEG-1 kD (7,4 mg) o bien CMP-SA-PEG-10 kD (7,4 mg). Se añadió ST3Gal3 (1,58 U) a ambos tubos y se incubaron las mezclas de reacción a 32°C durante 96 h. Se monitorizó la reacción mediante gel de SDS-PAGE usando reactivos y condiciones descritos por Invitrogen. Cuando la reacción fue completa, se purificó la mezcla de reacción usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo fracciones basándose en absorción UV. Se concentraron las fracciones combinadas que contenían el producto a 4°C en filtros centrífugos Centricon-Plus-20 (Millipore, Bedford, MA) y se reformuló la disolución concentrada para proporcionar 1,97 mg (ensayo de proteínas de ácido bicinconínico, ensayo BCA, Sigma-Aldrich, St. Louis MO) del factor VIIa-SA-PEG. Se analizó el producto de la reacción usando SDS-PAGE y análisis de IEF según los procedimientos y reactivos suministrados por Invitrogen. Se sometieron muestras a diálisis frente a agua y se analizaron mediante MALDI-TOF.

EJEMPLO 8

Factor VIIa-SA-PEG-10kD: Método de un solo recipiente

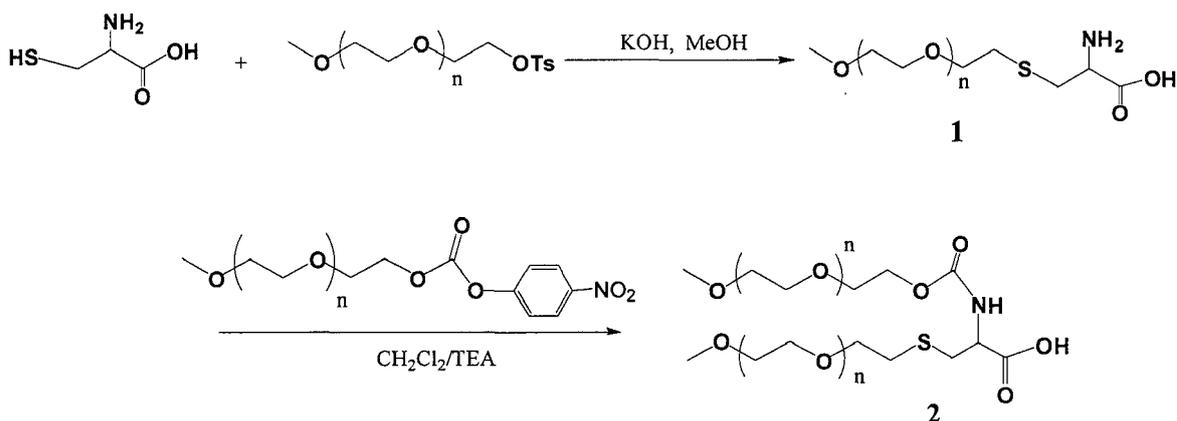
Se combinaron factor VIIa (5 mg diluidos en el tampón de formulación de producto hasta una concentración final de 1 mg/ml), CMP-SA-PEG-10 kD (10 mM, 60 µl) y enzima ST3Gal3 de *A. niger* (33 U/l) e histidina 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM en un recipiente de reacción junto con 10 U/l, 1 U/l, 0,5 U/l o 0,1 U/l de sialidasa (CalBiochem). Se mezclaron los componentes y se incubaron a 32°C. Se midió el avance de la reacción analizando alícuotas a intervalos de 30 minutos durante las primeras cuatro horas. Después se retiró una alícuota en el punto de tiempo de 20 horas y se sometió a SDS-PAGE. Se determinó el grado de pegilación retirando 1 ml en los puntos de tiempo de 1,5, 2,5 y 3,5 horas y purificando la muestra en una columna Poros 50HQ.

Para las condiciones de reacción que contenían 10 U/l de sialidasa, no se formó ninguna cantidad apreciable del producto de factor VIIa-SA-PEG. Para las condiciones de reacción que contenían 1 U/l de sialidasa, aproximadamente el 17,6% del factor VIIa en la mezcla de reacción estaba o bien mono o bien dipegilado tras 1,5 horas. Esto aumentó hasta el 29% tras 2,5 horas, y el 40,3% tras 3,5 horas. Para las condiciones de reacción que contenían 0,5 U/l de sialidasa, aproximadamente el 44,5% del factor VIIa en la mezcla de reacción estaba o bien mono o bien dipegilado tras 3 horas, y el 0,8% estaba tripegilado o más. Tras 20 horas, el 69,4% estaba o bien mono o bien dipegilado, y el 18,3% estaba tripegilado o más.

Para las condiciones de reacción que contenían 0,1 U/l de sialidasa, aproximadamente el 29,6% del factor VIIa en la mezcla de reacción estaba o bien mono o bien dipegilado tras 3 horas. Tras 20 horas, el 71,3% estaba o bien mono o bien dipegilado, y el 15,1% estaba tripegilado o más.

EJEMPLO 9

Preparación de cisteína-PEG₂ (2)



a. Síntesis del compuesto 1

Se añadió hidróxido de potasio (84,2 mg, 1,5 mmol, como polvo) a una disolución de L-cisteína (93,7 mg, 0,75 mmol) en metanol anhidro (20 l) bajo argón. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min, y después se añadió mPEG-O-tosilato con un peso molecular de 20 kilodalton (Ts; 1,0 g, 0,05 mmol) en varias porciones a lo largo de 2 horas. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 días, y se concentró mediante evaporación rotatoria. Se diluyó el residuo con agua (30 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para destruir cualquier exceso de mPEG-O-tosilato de 20 kilodalton. Después se neutralizó la disolución con ácido acético, se ajustó el pH a pH 5,0 y se cargó en una columna de cromatografía de fase inversa (sílice C-18). Se eluyó la columna con un gradiente de metanol/agua (el producto eluye a aproximadamente el 70% de metanol), se monitorizó la elución de producto mediante dispersión de luz evaporativa, y se recogieron las fracciones apropiadas y se diluyeron con agua (500 ml). Se sometió esta disolución a cromatografía (intercambio iónico, XK 50 Q, BIG Beads, 300 ml, forma de hidróxido; gradiente de agua a agua/ácido acético 0,75 N) y se redujo el pH de las fracciones apropiadas a 6,0 con ácido acético. Después se capturó esta disolución en una columna de fase inversa (sílice C-18) y se eluyó con un gradiente de metanol/agua tal como se describió anteriormente. Se combinaron las fracciones de producto, se concentraron, se redisolviéron en agua y se liofilizaron para proporcionar 453 mg (44%) de un sólido blanco (1).

Los datos estructurales para el compuesto fueron los siguientes: $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz; D_2O) δ 2,83 (t, 2H, O-C-CH₂-S), 3,05 (q, 1H, S-CHH-CHN), 3,18 (q, 1H, (q, 1H, S-CHH-CHN), 3,38 (s, 3H, CH₃O), 3,7 (t, OCH₂CH₂O), 3,95 (q, 1H, CHN). Se confirmó la pureza del producto mediante SDS PAGE.

b. Síntesis de cisteína-PEG₂ (2)

Se añadió trietilamina (~0,5 ml) gota a gota a una disolución de compuesto 1 (440 mg, 22 μmol) disuelto en CH_2Cl_2 anhidro (30 ml) hasta que la disolución fue básica. Se añadió una disolución de mPEG-O-carbonato de p-nitrofenilo de 20 kilodalton (660 mg, 33 μmol) y N-hidroxisuccinimida (3,6 mg, 30,8 μmol) en CH_2Cl_2 (20 ml) en varias porciones a lo largo de 1 hora a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Después se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria, se disolvió el residuo en agua (100 ml) y se ajustó el pH a 9,5 con NaOH 1,0 N. Se agitó la disolución básica a temperatura ambiente durante 2 horas y después se neutralizó con ácido acético a un pH 7,0. Después se cargó la disolución en una columna de cromatografía de fase inversa (sílice C-18). Se eluyó la columna con un gradiente de metanol/agua (el producto eluye a aproximadamente el 70% de metanol), se monitorizó la elución de producto mediante dispersión de luz evaporativa y se recogieron las fracciones apropiadas y se diluyeron con agua (500 ml). Se sometió esta disolución a cromatografía (intercambio iónico, XK 50 Q, BIG Beads, 300 ml, forma de hidróxido; gradiente de agua a agua/ácido acético 0,75 N) y se redujo el pH de las fracciones apropiadas a 6,0 con ácido acético. Después se capturó esta disolución en una columna de fase inversa (sílice C-18) y se eluyó con un gradiente de metanol/agua tal como se describió anteriormente. Se combinaron las fracciones de producto, se concentraron, se redisolviéron en agua y se liofilizaron para proporcionar 575 mg (70%) de un sólido blanco (2).

Los datos estructurales para el compuesto fueron los siguientes: $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz; D_2O) δ 2,83 (t, 2H, O-C-CH₂-S), 2,95 (t, 2H, O-C-CH₂-S), 3,12 (q, 1H, S-CHH-CHN), 3,39 (s, 3H, CH₃O), 3,71 (t, OCH₂CH₂O). Se confirmó la pureza del producto mediante SDS PAGE.

EJEMPLO 10

Factor VIIa-SA-PEG-40 kD

Glicopegilación del factor VIIa (un solo recipiente con ocupación de sitios activos). Se logró la glicopegilación del factor VIIa en una reacción en un solo recipiente en la que la desialación y la pegilación se producen de manera simultánea, seguido por ocupación de sitios activos con ácido siálico. Se realizó la reacción en un recipiente de vidrio con camisa controlado a 32°C mediante un baño de agua en recirculación. En primer lugar, se introdujo el factor VIIa filtrado a 0,2 μm concentrado en el recipiente y se calentó hasta 32°C mediante mezclado con una barra de agitación durante 20 minutos. Se preparó una disolución de sialidasa a partir de polvo seco en histidina 10 mM/NaCl 50 mM/CaCl₂ 20 mM, pH 6,0 a una concentración de 4.000 U/l. Una vez que el factor VIIa alcanzó 32°C, se añadió la sialidasa al factor VIIa y se mezcló la reacción durante aproximadamente 5 minutos para garantizar una disolución uniforme tras el momento en el que se detuvo el mezclado. Se dejó avanzar la desialación durante 1,0 h a 32°C. Durante la reacción de desialación, se disolvió el CMP-SA-PEG-40 kD en tampón de histidina 10 mM/NaCl 50 mM/CaCl₂ 20 mM, pH 6,0, y se determinó la concentración mediante absorbancia UV a 271 nm. Tras disolverse el CMP-SA-PEG-40 kD, se añadió el CMP-SA-PEG-40 kD a la reacción, así como la ST3Gal3, y se mezcló la reacción durante aproximadamente 15 minutos con una barra de agitación para garantizar una disolución uniforme. Se añadió un volumen adicional de 85 ml de tampón para llevar la reacción a 1,0 l. Se dejó avanzar la reacción sin agitación durante 24 horas antes de añadir CMP-SA hasta una concentración de 4,3 mM para extinguir la reacción y ocupar los sitios activos de los residuos de galactosa terminal restantes con ácido siálico. Se dejó avanzar la extinción con mezclado durante 30 minutos a 32°C. El volumen total de la reacción era de 1,0 l antes de la extinción. Se tomaron muestras de puntos de tiempo (1 ml) a las 0, 4,5, 7,5 y 24 h, se extinguieron con CMP-SA y se analizaron mediante RP-HPLC y SDS-PAGE.

5 *Purificación del factor VIIa-SA-PEG-40 kD.* Tras la ocupación de sitios activos, se diluyó la disolución con 2,0 l de histidina 10 mM, pH 6,0 que se había almacenado durante la noche a 4°C y se filtró la muestra a través de un filtro Millipak 60 de 0,2 µm. El volumen de carga resultante fue de 3,1 l. Se realizó la cromatografía AEX2 a 20-25°C (temperatura ambiente ambiental) en un sistema Akta Pilot. Tras la carga, se realizó un lavado con 10 volúmenes de columna con tampón de equilibrado, y se eluyó el producto de la columna usando un gradiente de 10 volúmenes de columna de MgCl₂ lo que dio como resultado una resolución de especies de factor VIIa pegilado frente a factor VIIa sin pegilar. La carga para esta columna se mantuvo intencionadamente baja, seleccionando como objetivo < 2 mg de factor VIIa/ml de resina. Se realizaron geles de SDS-PAGE además de análisis mediante RP-HPLC de fracciones seleccionadas y combinaciones de fracciones con el fin de preparar la combinación de producto a granel. Se ajustó el pH de las fracciones combinadas a 6,0 con NaOH 1 M y se almacenaron en la cámara frigorífica a 2-8°C durante la noche.

10 *Concentración final/diafiltración, filtración aséptica y extracción en alícuotas.* Se filtraron las fracciones combinadas a través de un filtro Millipak 20 de 0,2 µm y se almacenaron durante la noche a 2-8°C. Para realizar la concentración/diafiltración, se usó una membrana de celulosa regenerada Millipore de 0,1 m² y 30 kD en un sistema equipado con una bomba peristáltica y tubos de silicona. Se ensambló el sistema y se lavó con agua, después se limpió con NaOH 0,1 M durante al menos 1 hora y después se almacenó en NaOH 0,1 M hasta el equilibrado con tampón de diafiltración de histidina 10 mM/CaCl₂ 5 mM/NaCl 100 mM pH 6,0 inmediatamente antes de su uso. Se concentró el producto hasta aproximadamente 400 ml y después se sometió a diafiltración a volumen constante con aproximadamente 5 diavolumenes de tampón. Después se concentró el producto hasta aproximadamente 300 ml y se recuperó tras una recirculación a baja presión durante 5 minutos y se aclararon las membranas con 200 ml de tampón de diafiltración mediante una recirculación durante 5 minutos. Se recuperó el lavado con producto y se hicieron recircular otros 50 ml de tampón durante otros 5 minutos para un lavado final. El producto a granel resultante tenía aproximadamente 510 ml, y se filtró a través de un filtro de vacío de 1 l equipado con una membrana de PES de 0,2 µm (Millipore). Después se extrajeron en alícuotas de 25 ml del producto a granel filtrado de manera aséptica en tubos Falcon estériles de 50 ml y se congelaron a -80°C.

25 *Análisis de la reacción de pegilación mediante HPLC (ejemplo 10)*

	Tiempo de reacción de conjugación				Purificación
	0 h	4,5 h	7,5 h	24 h	Tras la cromatografía
% sin pegilar	94,7	76,1	66,6	51,0	0,6
% monopegilado	0,9	17,9	26,1	39,1	85,6
% dipegilado	0,1	0,9	1,9	5,1	5,1
% tripegilado	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2

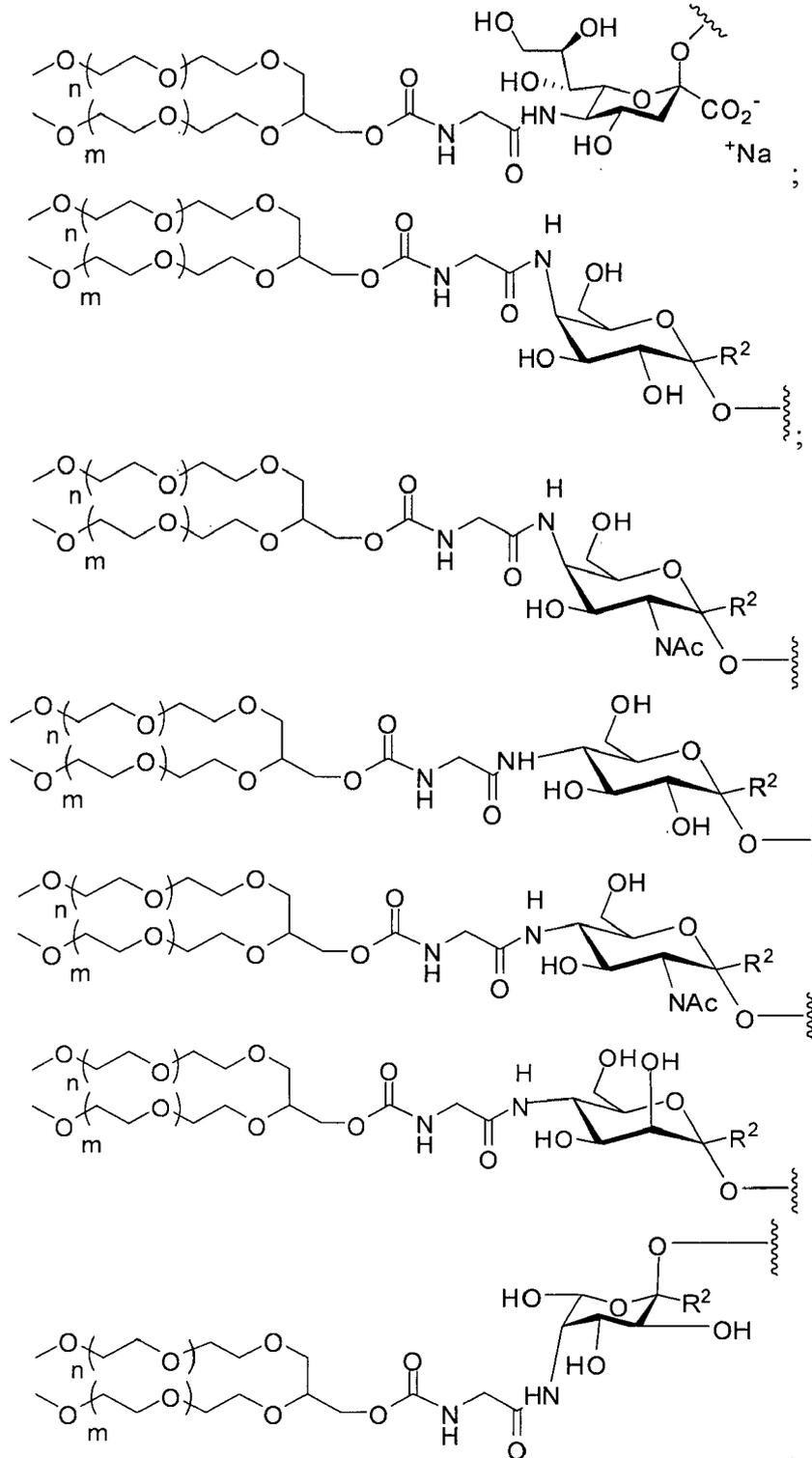
30 Tras 24 horas, la distribución del estado de PEG del producto a granel era de: el 0,7% sin pegilar, el 85,3% monopegilado, el 11,5% dipegilado y el 0,3% tripegilado. La cromatografía en columna es la etapa principal en el procedimiento que genera la distribución de producto, en gran medida mediante la eliminación de material sin pegilar de las especies mono y dipegiladas.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son únicamente para fines ilustrativos y que a los expertos en la técnica se les ocurrirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos y deben incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

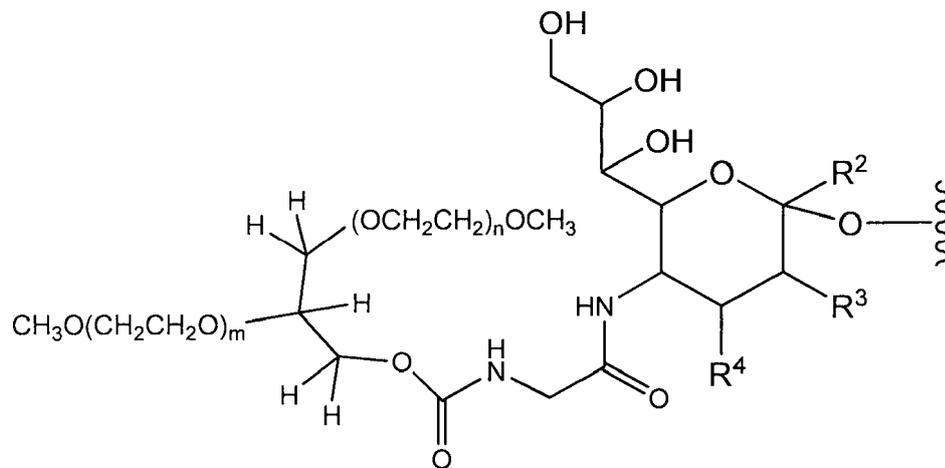
REIVINDICACIONES

1. Conjugado peptídico que comprende:

a) un péptido que es factor IX y que se une covalentemente a un resto que es un miembro seleccionado de:



en las que los índices m y n son números enteros seleccionados independientemente de 100 a 4000, en las que R^2 es un miembro seleccionado de H , CH_2OR^7 , COOR^7 y OR^7 , en los que R^7 es un miembro seleccionado de H , alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido, o en los que dicho resto es:



en la que m, n y R² son tal como se definieron anteriormente, y en la que R³ y R⁴ son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, OR⁸ y NHC(O)R⁹, y

en los que R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, ácido siálico y poli(ácido siálico).

2. Formulación farmacéutica que comprende un conjugado peptídico según la reivindicación 1 y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 2

Condiciones de reacción de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa

Parámetros de reacción	
CMP-SA-Gly (Forma de sal)	2,3 eq. mol. (1,2 g) Sal de sodio
mPEG-40 kDa-carbonato de nitrofenilo (NOF)	1 eq. mol. (30 g)
Disolventes	THF:H ₂ O (3:1)
pH	7,5 - 8
Temperatura	20 °C
Tiempo de reacción	5 días
Rendimiento purificado	36% 10,11 g
Pureza (UV a 274 nm frente a CMP-SA-glicina)	100%

Procedimiento de purificación de CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa

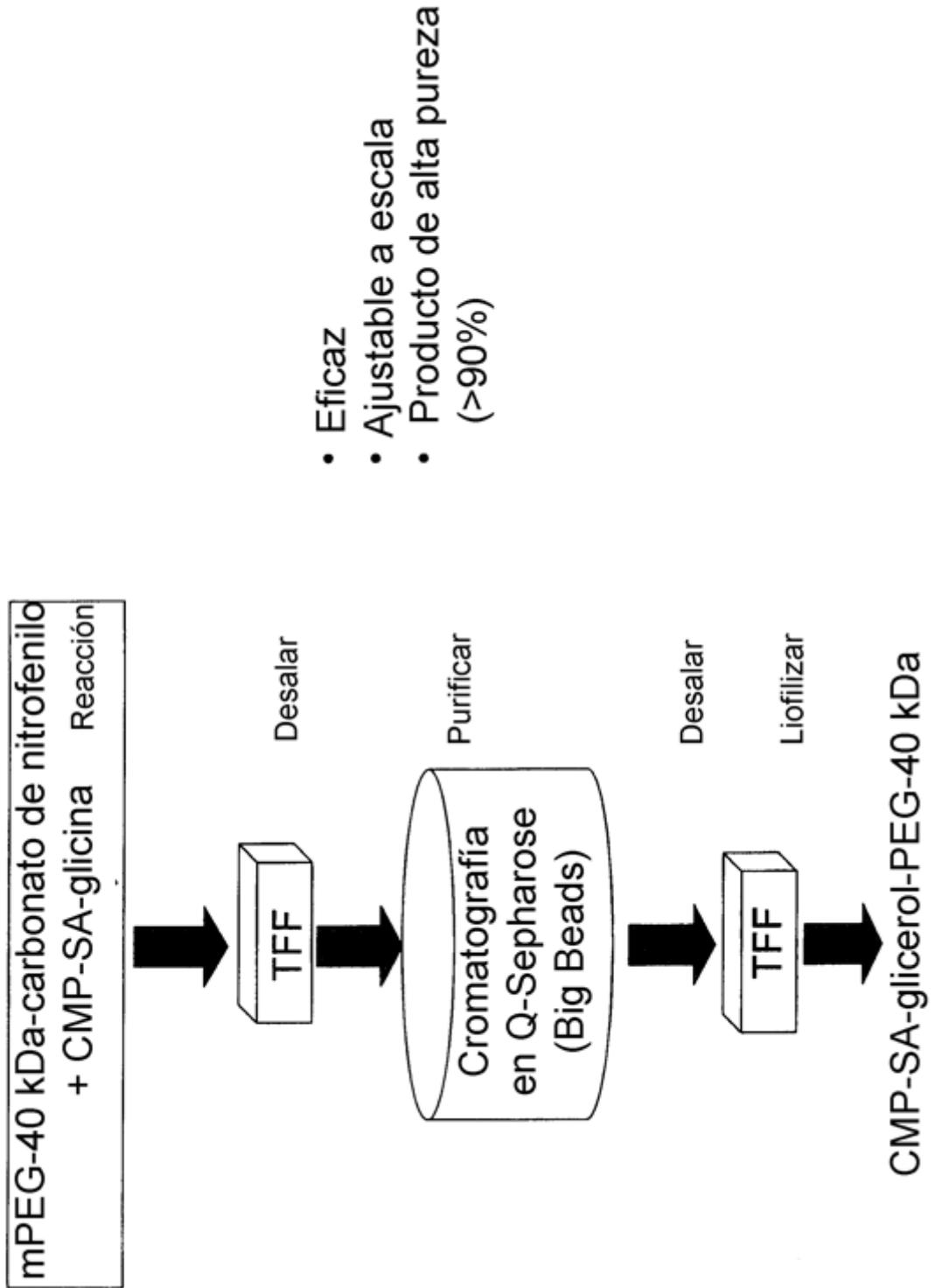


FIGURA 3

- Eficaz
- Ajustable a escala
- Producto de alta pureza (>90%)

Purificación en Q-Sepharose de CMP-SA-glicerol-40 kDa

Q-Sepharose Big Beads (6 l, 18 x 23 cm)

Forma de bicarbonato de la resina

Fase móvil A: agua

Fase móvil B: NaCl 1,0 N

UV: 274 nm

Carga: aproximadamente 15 g de mezcla de reacción de

CMP-SA-glicerol-PEG-40 kDa (30 g) tras

TFF (conductividad: 0,53 mS)

Velocidad de carga: 60 ml/min

Elución:

1,67 VC de fase móvil A

Gradiente de 2 VC desde el 10% hasta el 80% de fase móvil B a 125 ml/min.

Se desaló la combinación de elución mediante TFF

Pellicon 2 "MINI" de 1 kDa de Millipore (2 x Membrana de celulosa regenerada PLAC 1 kDa; tipo de tamiz V; 0,1 m²).

Se secó por congelación el producto desalado.

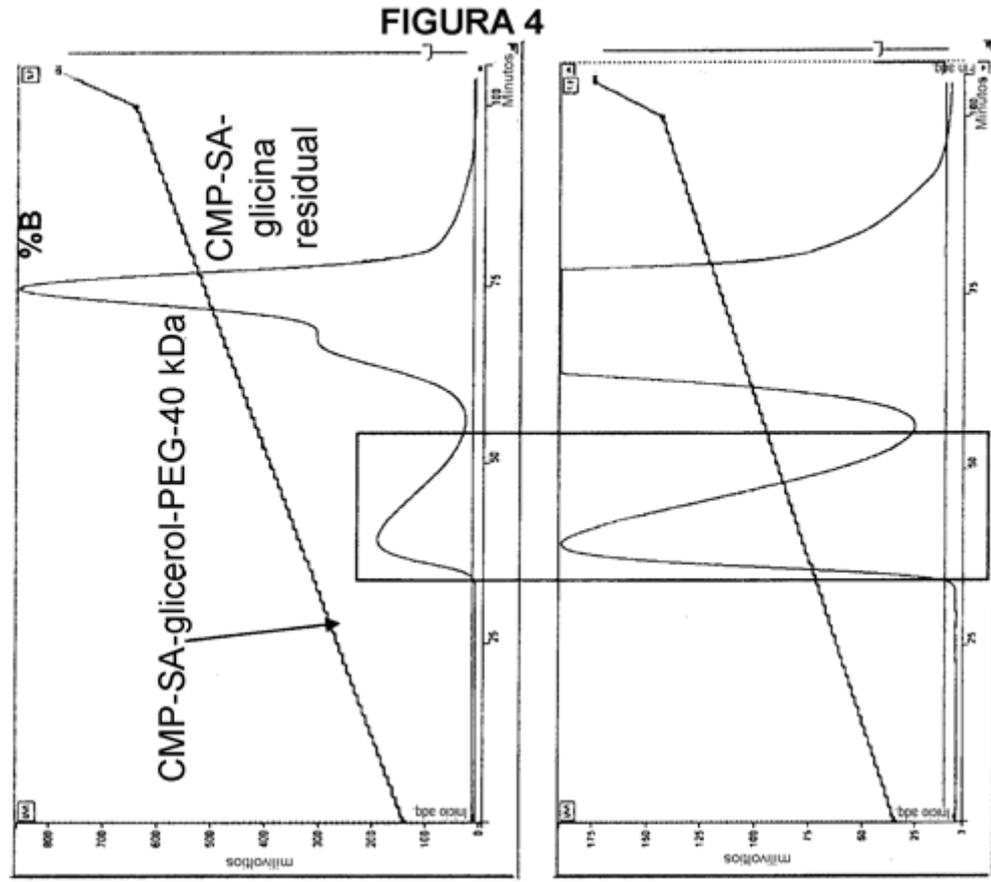


FIGURA 6A

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
At1g08280	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC011438 BT004583 NC_003070	AAF18241.1 AAO42829.1 NP_172305.1	Q84W00 Q9SGD2
At1g08660/F22O13.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC003981 AY064135 AY124807 NC_003070 NM_180609	AAF99778.1 AAL36042.1 AAM70516.1 NP_172342.1 NP_850940.1	Q8VZJ0 Q9FRR9
At3g48820/T21J18_90	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AY080589 AY133816 AL132963 NM_114741	AAL85966.1 AAM91750.1 CAB87910.1 NP_190451.1	Q8RY00 Q9M301
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-IV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ584673	CAE48298.1	
α -2,3-sialiltransferasa (St3Gal-V)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ585768	CAE51392.1	
α -2,6-sialiltransferasa (Siat7b)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620651	CAF05850.1	
α -2,8-sialiltransferasa (Siat8A)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.8	AJ699418	CAG27880.1	
α -2,8-sialiltransferasa (Siat8D)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ699421	CAG27883.1	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia-III (Siat8C)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ704563	CAG28696.1	
CMP α -2,6-sialiltransferasa (ST6Gal I)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.1	Y15111 NM_177517	CAA75385.1 NP_803483.1	O18974
sialiltransferasa 8 (fragmento)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AF450088	AAL47018.1	Q8WN13
sialiltransferasa ST3Gal-II (Siat4B)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748841	CAG44450.1	
sialiltransferasa ST3Gal-III (Siat6)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748842	CAG44451.1	
sialiltransferasa ST3Gal-VI (Siat10)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748843	CAG44452.1	
ST3Gal I	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ305086	CAC24698.1	Q9BEG4
St6GalNAc-VI	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620949	CAF06586.1	
CDS4	<i>Branchiostoma floridae</i>	n.d.	AF391289	AAM18873.1	Q8T771
polisialiltransferasa (PST) (fragmento) ST8Sia IV	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210729	AAF17105.1	Q9TT09
polisialiltransferasa (STX) (fragmento) ST8Sia II	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210318	AAF17104.1	Q9TT10
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona intestinalis</i>	n.d.	AJ626815	CAF25173.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona savignyi</i>	n.d.	AJ626814	CAF25172.1	
α -2,8-polisialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Cricetulus griseus</i>	2.4.99.-	- Z46801	AAE28634 CAA86822.1	Q64690
Gal β -1,3/4-GlcNAc α -2,3-sialiltransferasa St3Gal I	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY266675	AAP22942.1	Q80WLO
Gal β -1,3/4-GlcNAc α -2,3-sialiltransferasa St3Gal II (fragmento)	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY266676	AAP22943.1	Q80WK9
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783740	CAH04017.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783741	CAH04018.1	

FIGURA 6B

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ626821 CAF25179.1		
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744809 CAG32845.1		
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal V-r (relacionado con Siat5)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ783742 CAH04019.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I (Siat1)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ744801 CAG32837.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ634459 CAG25680.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646874 CAG26703.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ646883 CAG26712.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715535 CAG29374.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715543 CAG29382.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IV (Siat 8D) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715545 CAG29384.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715546 CAG29385.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VI (Siat 8F) (fragmento)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ715551 CAG29390.1		
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ627627 CAF29495.1		
N-glicano α -2,8-sialiltransferasa	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC050483 AAH50483.1 AY055462 AAL17875.1 NM_153662 NP_705948.1	Q7ZU51 Q8QH83	
Relacionado con ST3Gal III (siat6r)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC053179 AAH53179.1 AJ626820 CAF25178.1 NM_200355 NP_956649.1	Q7T3B9	
St3Gal-V	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ619960 CAF04061.1		
st6GalNAc-VI	<i>Danio rerio</i>	n.d.	BC060932 AAH60932.1 AJ620947 CAF06584.1		
α -2,6-sialiltransferasa (CG4871) ST6Gal I	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.4.99.1	AE003465 AAF47256.1 AF218237 AAG13185.1 AF397532 AAK92126.1 AE003465 AAM70791.1 NM_079129 NP_523853.1 NM_166684 NP_726474.1	Q9GU23 Q9W121	
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-VI)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585767 CAE51391.1 AJ627204 CAF25503.1		
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.4	X80503 CAA56666.1 NM_205217 NP_990548.1	Q11200	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (fragmento)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF035250 AAC14163.1	O73724	
α -2,3-sialiltransferasa (ST3GAL-II)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585761 CAE51385.2		
α -2,6-sialiltransferasa (Siat7b)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ620653 CAF05852.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	X75558 CAA53235.1 NM_205241 NP_990572.1	Q92182	
α -2,6-sialiltransferasa	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.3	- AAE68028.1	Q92183	

FIGURA 6C

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
ST6GalNAc I			- X74946 NM_205240	AAE68029.1 CAA52902.1 NP_990571.1	
α -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc II	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	X77775 NM_205233	AAE68030.1 CAA54813.1 NP_990564.1	Q92184
α -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc III (SIAT7C) (fragmento)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ634455	CAG25677.1	
α -2,6- sialiltransferasa ST6GalNAc V (SIAT7E) (fragmento)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ646877	CAG26706.1	
α -2,8- sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	U73176	AAC28888.1	P79783
α -2,8- sialiltransferasa (SIAT8B)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699419	CAG27881.1	
α -2,8- sialiltransferasa (SIAT8C)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699420	CAG27882.1	
α -2,8- sialiltransferasa (SIAT8F)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699424	CAG27886.1	
α -2,8- sialiltransferasa ST8Sia-V (SIAT8C)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ704564	CAG28697.1	
β -galactosamida α -2,6- sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ627629	CAF29497.1	
GM3 sintasa (SIAT9)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.9	AY515255	AAS83519.1	
polisialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF008194	AAB95120.1	O42399
α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	L29555 AF059321 L13972 AF155238 AF186191 BC018357 NM_003033 NM_173344	AAA36612.1 AAC17874.1 AAC37574.1 AAD39238.1 AAG29876.1 AAH18357.1 NP_003024.1 NP_775479.1	Q11201 O60677 Q9UN51
α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	U63090 BC036777 X96667 NM_006927	AAB40389.1 AAH36777.1 CAA65447.1 NP_008858.1	Q16842 O00654
α -2,3- sialiltransferasa ST3Gal III (SiaT6)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.6	L23768 BC050380 AF425851 AF425852 AF425853 AF425854 AF425855 AF425856 AF425857 AF425858 AF425859 AF425860 AF425861 AF425862 AF425863 AF425864 AF425865 AF425866 AF425867 AY167992 AY167993 AY167994	AAA35778.1 AAH50380.1 AAO13859.1 AAO13860.1 AAO13861.1 AAO13862.1 AAO13863.1 AAO13864.1 AAO13865.1 AAO13866.1 AAO13867.1 AAO13868.1 AAO13869.1 AAO13870.1 AAO13871.1 AAO13872.1 AAO13873.1 AAO13874.1 AAO13875.1 AAO38806.1 AAO38807.1 AAO38808.1	Q11203 Q86UR6 Q86UR7 Q86UR8 Q86UR9 Q86US0 Q86US1 Q86US2 Q8IX43 Q8IX44 Q8IX45 Q8IX46 Q8IX47 Q8IX48 Q8IX49 Q8IX50 Q8IX51 Q8IX52 Q8IX53 Q8IX54 Q8IX55 Q8IX56

FIGURA 6D

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
			AY167995 AAO38809.1 AY167996 AAO38810.1 AY167997 AAO38811.1 AY167998 AAO38812.1 NM_006279 NP_006270.1 NM_174964 NP_777624.1 NM_174965 NP_777625.1 NM_174966 NP_777626.1 NM_174967 NP_777627.1 NM_174969 NP_777629.1 NM_174970 NP_777630.1 NM_174972 NP_777632.1	Q8IX57 Q8IX58	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L23767 AAA16460.1 AF035249 AAC14162.1 BC010645 AAH10645.1 AY040826 AAK93790.1 AF516602 AAM86431.1 AF516603 AAM86432.1 AF516604 AAM86433.1 AF525084 AAM81378.1 X74570 CAA52662.1 CR456858 CAG33139.1 NM_006278 NP_006269.1	Q11206 O60497 Q96QQ9 Q8N6A6 Q8N6A7 Q8NFD3 Q8NFG7	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	AF119391 AAD39131.1 BC023312 AAH23312.1 AB022918 BAA77609.1 AX877828 CAE89895.1 AX886023 CAF00161.1 NM_006100 NP_006091.1	Q9Y274	
α -2,6-sialiltransferasa (ST6Gal II ; KIAA1877)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC008680 AAH08680.1 AB058780 BAB47506.1 AB059555 BAC24793.1 AJ512141 CAD54408.1 AX795193 CAE48260.1 AX795193 CAE48261.1 NM_032528 NP_115917.1	Q86Y44 Q8IUG7 Q96HE4 Q96JF0	
α -2,6-sialiltransferasa (ST6GALNAC III)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC059363 AAH59363.1 AY358540 AAQ88904.1 AK091215 BAC03611.1 AJ507291 CAD45371.1 NM_152996 NP_694541.1	Q8N259 Q8NDV1	
α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc V)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC001201 AAH01201.1 AK056241 BAB71127.1 AL035409 CAB72344.1 AJ507292 CAD45372.1 NM_030965 NP_112227.1	Q9BVH7	
α -2,6-sialiltransferasa (SThM) ST6GalNAc II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U14550 AAA52228.1 BC040455 AAH40455.1 AJ251053 CAB61434.1 NM_006456 NP_006447.1	Q9UJ37 Q12971	
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.1	BC031476 AAH31476.1 BC040009 AAH40009.1 A17362 CAA01327.1 A23699 CAA01686.1 X17247 CAA35111.1 X54363 CAA38246.1 X62822 CAA44634.1 NM_003032 NP_003023.1 NM_173216 NP_775323.1	P15907	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.3	BC022462 AAH22462.1 AY096001 AAM22800.1 AY358918 AAQ89277.1 AK000113 BAA90953.1 Y11339 CAA72179.2	Q8TBJ6 Q9NSC7 Q9NXQ7	

FIGURA 6E

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
			NM_018414	NP_060884.1	
α -2,8-polisialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L41680 BC027866 BC053657 NM_005668	AAC41775.1 AAH27866.1 AAH53657.1 NP_005659.1	Q8N1F4 Q92187 Q92693
α -2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.8	L32867 L43494 BC046158 - AY569975 D26360 X77922 NM_003034	AAA62366.1 AAC37586.1 AAH46158.1 AAQ53140.1 AAS75783.1 BAA05391.1 CAA54891.1 NP_003025.1	Q86X71 Q92185 Q93064
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L29556 U82762 U33551 BC069584 NM_006011	AAA36613.1 AAB51242.1 AAC24458.1 AAH69584.1 NP_006002.1	Q92186 Q92470 Q92746
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF004668 AF003092 NM_015879	AAB87642.1 AAC15901.2 NP_056963.1	Q43173 Q9NS41
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U91641 CR457037 NM_013305	AAC51727.1 CAG33318.1 NP_037437.1	O15466
ENSP00000020221 (fragmento)		n.d.	AC023295	-	
lactosilceramida α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal V)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.9	AF105026 AF119415 BC065936 AY152815 AAP65066 AY359105 AB018356 AX876536 NM_003896	AAD14634.1 AAF66146.1 AAH65936.1 AAO16866.1 AAP65066.1 AAQ89463.1 BAA33950.1 CAE89320.1 NP_003887.2	Q9UNP4 Q94902
<i>N</i> -acetilgalactosaminida α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc VI)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	BC006564 BC007802 BC016299 AY358672 AB035173 AK023900 AJ507293 AX880950 CR457318 NM_013443	AAH06564.1 AAH07802.1 AAH16299.1 AAQ89035.1 BAA87035.1 BAB14715.1 CAD45373.1 CAE91145.1 CAG33599.1 NP_038471.2	Q969X2 Q9H8A2 Q9ULB8
<i>N</i> -acetilgalactosaminida α -2,6-sialiltransferasa IV (ST6GalNAc IV)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF127142 BC036705 - AB035172 AK000600 Y17461 AJ271734 AX061620 AX068265 AX969252 NM_014403 NM_175039	AAF00102.1 AAH36705.1 AAP63349.1 BAA87034.1 BAA91281.1 CAB44354.1 CAC07404.1 CAC24981.1 CAC27250.1 CAF14360.1 NP_055218.3 NP_778204.1	Q9H4F1 Q9NWU6 Q9UKU1 Q9ULB9 Q9Y3G3 Q9Y3G4
ST8SIA-VI (fragmento)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AJ621583 XM_291725	CAF21722.1 XP_291725.2	
producto proteico sin nombrar	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AK021929 AX881696	BAB13940.1 CAE91353.1	Q9HAA9
Gal β -1,3/4-GlcNAc α -	<i>Mesocricetus</i>	2.4.99.6	AJ245699	CAB53394.1	Q9QXF6

FIGURA 6F

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
2,3-sialiltransferasa (ST3Gal III)	<i>auratus</i>				
Gal β -1,3/4-GlcNAc α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal IV)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.6	AJ245700	CAB53395.1	Q9QXF5
GD3 sintasa (fragmento) ST8Sia I	<i>Mesocricetus auratus</i>	n.d.	AF141657	AAD33879.1	Q9WUL1
polisialiltransferasa (ST8Sia IV)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.-	AJ245701	CAB53396.1	Q9QXF4
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>St3gal1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF214028 AK031344 AK078469 X73523 NM_009177	AAF60973.1 BAC27356.1 BAC37290.1 CAA51919.1 NP_033203.1	P54751 Q11202 Q9JL30
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II	<i>St3gal2</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC015264 BC066064 AK034554 AK034863 AK053827 X76989 NM_009179 NM_178048	AAH15264.1 AAH66064.1 BAC28752.1 BAC28859.1 BAC35543.1 CAA54294.1 NP_033205.1 NP_835149.1	Q11204 Q8BPL0 Q8BSA0 Q8BSE9 Q91WH6
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III	<i>St3gal3</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC006710 AK005053 AK013016 X84234 NM_009176	AAH06710.1 BAB23779.1 BAB28598.1 CAA59013.1 NP_033202.2	P97325 Q922X5 Q9CZ48 Q9DBB6
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV	<i>St3gal4</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC011121 BC050773 D28941 AK008543 AB061305 X95809 NM_009178	AAH11121.1 AAH50773.1 BAA06068.1 BAB25732.1 BAB47508.1 CAA65076.1 NP_033204.2	P97354 Q61325 Q91Y74 Q921R5 Q9CVE8
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI	<i>St3gal6</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF119390 BC052338 AB063326 AK033562 AK041173 NM_018784	AAD39130.1 AAH52338.1 BAB79494.1 BAC28360.1 BAC30851.1 NP_061254	Q80UR7 Q8BLV1 Q8VIB3 Q9WVG2
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II	<i>St6galnac2</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	NM_009180 BC010208 AB027198 AK004613 X93999 X94000 NM_009180	6677963 AAH10208.1 BAB00637.1 BAB23410.1 CAA63821.1 CAA63822.1 NP_033206.2	P70277 Q9DC24 Q9JJM5
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I	<i>St6gal1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.1	- BC027833 D16106 AK034768 AK084124 NM_145933	AAE68031.1 AAH27833.1 BAA03680.1 BAC28828.1 BAC39120.1 NP_666045.1	Q64685 Q8BM62 Q8K1L1
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal II	<i>St6gal2</i> <i>Mus musculus</i>	n.d.	AK082566 AB095093 AK129462 NM_172829	BAC38534.1 BAC87752.1 BAC98272.1 NP_766417.1	Q8BUU4
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I	<i>St6gainac1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.3	Y11274 NM_011371	CAA72137.1 NP_035501.1	Q9QZ39 Q9JJP5
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III	<i>St6gainac3</i> <i>Mus musculus</i>	n.d.	BC058387 AK034804 Y11342 Y11343	AAH58387.1 BAC28836.1 CAA72181.2 CAB95031.1	Q9WUV2 Q9JHP5

FIGURA 6G

Proteína	Organismo		N.º EC	GenBank / GenPept		SwissProt	PDB / 3D
α-2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV	<i>St6galnac4</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.7	NM_011372	NP_035502		
				BC056451 AK085730 AJ007310 Y15779 Y15780 Y19055 Y19057 NM_011373	AAH56451.1 BAC39523.1 CAA07446.1 CAB43507.1 CAB43514.1 CAB93946.1 CAB93948.1 NP_035503.1	Q8C3J2 Q9JHP2 Q9R2B6 Q88725 Q9JHP0 Q9QUP9 Q9R2B5	
α-2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I	<i>St8sia1</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	L38677 BC024821 AK046188 AK052444 X84235 AJ401102 NM_011374	AAA91869.1 AAH24821.1 BAC32625.1 BAC34994.1 CAA59014.1 CAC20706.1 NP_035504.1	Q64468 Q64687 Q8BL76 Q8BW10 Q8K1C1 Q9EPK0	
α-2,8-sialiltransferasa (ST8Sia VI)	<i>St8sia6</i>	<i>Mus musculus</i>	n.d.	AB059554 AK085105 NM_145838	BAC01265.1 BAC39367.1 NP_665837.1	Q8BI43 Q8K4T1	
α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia II	<i>St8sia2</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	X83562 X99646 X99647 X99648 X99649 X99650 X99651 NM_009181	CAA58548.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 NP_033207.1	O35696	
α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia IV	<i>St8sia4</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	BC060112 AK003690 AK041723 AJ223956 X86000 Y09484 NM_009183	AAH60112.1 BAB22941.1 BAC31044.1 CAA11685.1 CAA59992.1 CAA70692.1 NP_033209.1	Q64692 Q8BY70	
α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia V	<i>St8sia5</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC034855 AK078670 X98014 X98014 X98014 NM_013666 NM_153124 NM_177416	AAH34855.1 BAC37354.1 CAA66642.1 CAA66643.1 CAA66644.1 NP_038694.1 NP_694764.1 NP_803135.1	P70126 P70127 P70128 Q8BJW0 Q8JZQ3	
α-2,8-sialiltransferasa ST8Sia III	<i>St8sia3</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC075645 AK015874 X80502 NM_009182	AAH75645.1 BAB30012.1 CAA56665.1 NP_033208.1	Q64689 Q9CUJ6	
GD1 sintasa (ST6GalNAc V)	<i>St6galnac5</i>	<i>Mus musculus</i>	n.d.	BC055737 AB030836 AB028840 AK034387 AK038434 AK042683 NM_012028	AAH55737.1 BAA85747.1 BAA89292.1 BAC28693.1 BAC29997.1 BAC31331.1 NP_036158.2	Q8CAM7 Q8CBX1 Q9QYJ1 Q9R0K6	
GM3 sintasa (α-2,3- sialiltransferasa) ST3Gal V	<i>St3gal5</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.9	AF119416 - AB018048 AB013302 AK012961 Y15003 NM_011375	AAF66147.1 AAP65063.1 BAA33491.1 BAA76467.1 BAB28571.1 CAA75235.1 NP_035505.1	O88829 Q9CZ65 Q9QWF9	
N- acetilgalactosaminida α-2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc VI)	<i>St6galnac6</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC036985 AB035174 AB035123 AK030648	AAH36985.1 BAA87036.1 BAA95940.1 BAC27064.1	Q8CDC3 Q8JZW3 Q9JM95 Q9R0G9	

FIGURA 6H

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
M138L	<i>Myxoma virus</i>	n.d.	NM_016973 U46578 AF170726 NC_001132	NP_058669.1 AAD00069.1 AAE61323.1 AAE61326.1 AAF15026.1 NP_051852.1	
α -2,3-sialiltransferasa (St3Gal-I)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ585760	CAE51384.1	
α -2,6-sialiltransferasa (Siat1)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ620649	CAF05848.1	
α -2,8-polisialiltransferasa IV (ST8Sia IV)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB094402	BAC77411.1	Q7T2X5
GalNAc α -2,6-sialiltransferasa (RtST6GalNAc)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB097943	BAC77520.1	Q7T2X4
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	2.4.99.-	AF121967	AAF28871.1	Q9N257
OJ1217_F02.7	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AP004084	BAD07616.1	
OSJNBa0043L24.2 o OSJNBb0002J11.9	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AL731626 AL662969	CAD41185.1 CAE04714.1	
P0683f02.18 o P0489B03.1	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AP003289 AP003794	BAB63715.1 BAB90552.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Oryzias latipes</i>	n.d.	AJ646876	CAG26705.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744803	CAG32839.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744804	CAG32840.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626819	CAF25177.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626824	CAF25182.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI (Siat10)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744808	CAG32844.1	
α -2,6-sialiltransferasa (Sia7A)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748740	CAG38615.1	
α -2,6-sialiltransferasa (Sia7B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748741	CAG38616.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (Siat7C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ634454	CAG25676.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646870	CAG26699.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646875	CAG26704.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646882	CAG26711.1	
α -2,8-sialiltransferasa 8A (Siat8A)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.8	AJ697658	CAG26896.1	
α -2,8-sialiltransferasa 8B (Siat8B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697659	CAG26897.1	
α -2,8-sialiltransferasa 8C (Siat8C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697660	CAG26898.1	
α -2,8-sialiltransferasa 8D (Siat8D)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697661	CAG26899.1	
α -2,8-sialiltransferasa	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697662	CAG26900.1	

FIGURA 6I

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
8E (Siat8E)					
α -2,8-sialiltransferasa 8F (Siat8F)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697663	CAG26901.1	
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferasa I (ST6Gal I; Siat1)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.1	AJ627624	CAF29492.1	
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ627625	CAF29493.1	
GM3 sintasa ST3Gal V (Siat9)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744807	CAG32843.1	
S138L	<i>Rabbit fibroma virus Kasza</i>	n.d.	NC_001266	NP_052025	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.6	M97754 NM_031697	AAA42146.1 NP_113885.1	Q02734
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626825	CAF25183.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal VI	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626743	CAF25053.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST3Gal II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	X76988 NM_031695	CAA54293.1 NP_113883.1	Q11205
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.1	M18769 M83143	AAA41196.1 AAB07233.1	P13721
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc I (Siat7A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634458	CAG25684.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634457	CAG25679.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L29554 BC072501 NM_019123	AAC42086.1 AAH72501.1 NP_061996.1	Q64686
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragmento)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646871	CAG26700.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646872	CAG26701.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646881	CAG26710.1	
α -2,8-sialiltransferasa (GD3 sintasa) ST8Sia I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U53883 D45255	AAC27541.1 BAA08213.1	P70554 P97713
α -2,8-sialiltransferasa (SIAT8E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699422	CAG27884.1	
α -2,8-sialiltransferasa (SIAT8F)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699423	CAG27885.1	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L13445 NM_057156	AAA42147.1 NP_476497.1	Q07977 Q64688
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U55938 NM_013029	AAB50061.1 NP_037161.1	P97877
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IV	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U90215	AAB49989.1	O08563
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ627626	CAF29494.1	
GM3 sintasa ST3Gal V	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AB018049 NM_031337	BAA33492.1 NP_112627.1	O88830

FIGURA 6J

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept		SwissProt	PDB / 3D
sialiltransferasa ST3Gal-I (Siat4A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ748840	CAG44449.1		
α -2,3-sialiltransferasa (ST3Gal-II)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ585763	CAE51387.1		
α -2,6-sialiltransferasa (Siat7b)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ620650	CAF05849.1		
α -2,6-sialiltransferasa (ST6galnac)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	n.d.	AJ699425	CAG27887.1		
α -2,3-sialiltransferasa (ST3GAL-III)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ585765	CAE51389.1		
α -2,3-sialiltransferasa (ST3GAL-IV)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ584674	CAE48299.1		
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.4	M97753	AAA31125.1	Q02745	
α -2,6-sialiltransferasa (fragmento) ST6Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.1	AF136746	AAD33059.1	Q9XSG8	
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferasa (ST6GalNAc-V)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620948	CAF06585.2		
sialiltransferasa (fragmento) ST6Gal I	<i>sus scrofa</i>	n.d.	AF041031	AAC15633.1	O62717	
ST6GALNAc-V	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620948	CAF06585.1		
α -2,3-sialiltransferasa (Siat5-r)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744805	CAG32841.1		
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626816	CAF25174.1		
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal II (Siat5) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626817	CAF25175.1		
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626818	CAF25176.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6Gal I (Siat1)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ744800	CAG32836.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634460	CAG25681.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II B (relacionado con Siat7B)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634461	CAG25682.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc III (Siat7C) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634456	CAG25678.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc IV (siat7D) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	2.4.99.3	Y17466 AJ646869	CAB44338.1 CAG26698.1	Q9W6U6	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646873	CAG26702.1		
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646880	CAG26709.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715534	CAG29373.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II (Siat 8B) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715538	CAG29377.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715541	CAG29380.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IIIr (Siat 8Cr)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715542	CAG29381.1		
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715547	CAG29386.1		

FIGURA 6K

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
(fragmento)					
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VI (Siat 8F) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715549	CAG29388.1	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia VIr (Siat 8Fr)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715550	CAG29389.1	
α -2,3-sialiltransferasa (Siat5-r)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744806	CAG32842.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal I (Siat4)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744802	CAG32838.1	
α -2,3-sialiltransferasa ST3Gal III (Siat6)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ626822	CAF25180.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc II (Siat7B)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ634462	CAG25683.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ646879	CAG26708.1	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715536	CAG29375.1	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia II (Siat 8B) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715537	CAG29376.1	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715539	CAG29378.1	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia IIIr (Siat 8Cr) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715540	CAG29379.1	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia V (Siat 8E) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715548	CAG29387.1	
α -2,3-sialiltransferasa (St3Gal-II)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585762	CAE51386.1	
α -2,3-sialiltransferasa (St3Gal-VI)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585766	CAE51390.1	
α -2,3-sialiltransferasa St3Gal-III (Siat6)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585764 AJ626823	CAE51388.1 CAF25181.1	
α -2,8-polisialiltransferasa	<i>Xenopus laevis</i>	2.4.99.-	AB007468	BAA32617.1	O93234
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia-1 (Siat8A;GD3 sintasa)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AY272056 AY272057 AJ704562	AAQ16162.1 AAQ16163.1 CAG28695.1	
Desconocida (proteína para MGC:81265)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	BC068760	AAH68760.1	
α -2,3-sialiltransferasa (3Gal-VI)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ626744	CAF25054.1	
α -2,3-sialiltransferasa (Siat4c)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ622908	CAF22058.1	
α -2,6-sialiltransferasa ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ646878	CAG26707.1	
α -2,8-sialiltransferasa ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ715544	CAG29383.1	
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferasa II (ST6Gal II)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ627628	CAF29496.1	
sialiltransferasa St8Sial	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AY652775	AAT67042	
poli- α -2,8-sialosil sialiltransferasa (NeuS)	<i>Escherichia coli K1</i>	2.4.-.-	M76370 X60598	AAA24213.1 CAA43053.1	Q57269
polisialiltransferasa	<i>Escherichia coli K92</i>	2.4.-.-	M88479	AAA24215.1	Q47404

FIGURA 6L

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
α -2,8 polisialiltransferasa SiaD	<i>Neisseria meningitidis</i> B1940	2.4.-.-	M95053 X78068	AAA20478.1 CAA54985.1	Q51281 Q51145
SynE	<i>Neisseria meningitidis</i> FAM18	n.d.	U75650	AAB53842.1	O06435
polisialiltransferasa (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M1019	n.d.	AY234192	AAO85290.1	
SiaD(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M209	n.d.	AY281046	AAP34769.1	
SiaD(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3045	n.d.	AY281044	AAP34767.1	
polisialiltransferasa (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3315	n.d.	AY234191	AAO85289.1	
SiaD(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3515	n.d.	AY281047	AAP34770.1	
polisialiltransferasa (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M4211	n.d.	AY234190	AAO85288.1	
SiaD(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M4642	n.d.	AY281048	AAP34771.1	
polisialiltransferasa (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M5177	n.d.	AY234193	AAO85291.1	
SiaD	<i>Neisseria meningitidis</i> M5178	n.d.	AY281043	AAP34766.1	
SiaD(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M980	n.d.	AY281045	AAP34768.1	
NMB0067	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	n.d.	NC_003112	NP_273131	
Lst	<i>Aeromonas punctata</i> Sch3	n.d.	AF126256	AAS66624.1	
ORF2	<i>Haemophilus influenzae</i> A2	n.d.	M94855	AAA24979.1	
HI1699	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	n.d.	U32842 NC_000907	AAC23345.1 NP_439841.1	Q48211
α -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> F62	2.4.99.4	U60664	AAC44539.1 AAE67205.1	P72074
α -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria meningitidis</i> 126E, NRCC 4010	2.4.99.4	U60662	AAC44544.2	
α -2,3-sialiltransferasa	<i>Neisseria meningitidis</i> 406Y, NRCC 4030	2.4.99.4	U60661	AAC44543.1	
α -2,3-sialiltransferasa (NMB0922)	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	2.4.99.4	U60660 AE002443 NC_003112	AAC44541.1 AAF41330.1 NP_273962.1	P72097
NMA1118	<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	n.d.	AL162755 NC_003116	CAB84380.1 NP_283887.1	Q9JUV5
PM0508	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d.	AE006086 NC_002663	AAK02592.1 NP_245445.1	Q9CNC4
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB25	n.d.	AF519787	AAM82550.1	Q8KS93
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB3	n.d.	AF519788	AAM82551.1	Q8KS92
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB39	n.d.	AF519789	AAM82552.1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB53	n.d.	AF519790	AAM82553.1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB57	n.d.	AF519791	AAM82554.1	Q8KS91
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB71	n.d.	AF519793	AAM82556.1	Q8KS89
WaaH	<i>Salmonella enterica</i>	n.d.	AF519792	AAM82555.1	Q8KS90

FIGURA 6M

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
	SARB8				
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC10V	n.d.	AF519779	AAM88840.1	Q8KS99
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC12	n.d.	AF519781	AAM88842.1	
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC13I	n.d.	AF519782	AAM88843.1	Q8KS98
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC14I	n.d.	AF519783	AAM88844.1	Q8KS97
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC15II	n.d.	AF519784	AAM88845.1	Q8KS96
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC16II	n.d.	AF519785	AAM88846.1	Q8KS95
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC3I	n.d.	AF519772	AAM88834.1	Q8KSA4
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica</i> SARC4I	n.d.	AF519773	AAM88835.1	Q8KSA3
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC5IIa	n.d.	AF519774	AAM88836.1	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC6IIa	n.d.	AF519775	AAM88837.1	Q8KSA2
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC8	n.d.	AF519777	AAM88838.1	Q8KSA1
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARC9V	n.d.	AF519778	AAM88839.1	Q8KSA0
UDP- glucosa α -1,2- glucosiltransferasa (WaaH)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> SARC 5	2.4.1.-	AF511116	AAM48166.1	
α -2,3/-2,8-sialiltransfe- rasa bifuncional(Cst-II)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> ATCC 43449	n.d.	AF401529	AAL06004.1	Q93CZ5
Cst	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> 81-176	n.d.	AF305571	AAL09368.1	
α -2,3- sialiltransferasa (Cst-III)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> ATCC 43429	2.4.99.-	AY044156	AAK73183.1	
α -2,3- sialiltransferasa (Cst-III)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> ATCC 43430	2.4.99.-	AF400047	AAK85419.1	
α -2,3-sialiltransferasa (Cst-II)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> ATCC 43432	2.4.99.-	AF215659	AAG43979.1	Q9F0M9
α -2,3/8- sialiltransferasa(CstII)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> ATCC 43438	n.d.	AF400048	AAK91725.1	Q93MQ0
α -2,3-sialiltransferasa cst-II	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> ATCC 43446	2.4.99.-	AF167344	AAF34137.1	
α -2,3- sialiltransferasa (Cst-II)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> ATCC 43456	2.4.99.-	AF401528	AAL05990.1	Q93D05
α -2,3/- α -2,8- sialiltransferasa(CstII)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> ATCC 43460	2.4.99.-	AY044868	AAK96001.1	Q938X6
α -2,3/8- sialiltransferasa(Cst-II)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> ATCC 700297	n.d.	AF216647	AAL36462.1	
ORF	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> GB11	n.d.	AY422197	AAR82875.1	
α -2,3-sialiltransferasa cstIII	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> MSC57360	2.4.99.-	AF195055	AAG29922.1	
α -2,3-sialiltransferasa cstIII Cj1140	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> NCTC 11168	2.4.99.-	AL139077 NC 002163	CAB73395.1 NP_282288.1	Q9PNF4
α -2,3/ α -2,8- sialiltransferasa II(cstIII)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> O:10	n.d.	- AX934427	AAO96669.1 CAF04167.1	
α -2,3/ α -2,8- sialiltransferasa II (CstII)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> O:19	n.d.	AX934431	CAF04169.1	
α -2,3/ α -2,8- sialiltransferasa II (CstII)	<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i> O:36	n.d.	AX934436	CAF04171.1	
α -2,3/ α -2,8-	<i>Campylobacter</i>	n.d.	AX934434	CAF04170.1	

FIGURA 6N

Proteína	Organismo	N.º EC	GenBank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D	
sialiltransferasa II (CstII)	<i>jejuni</i> O:4					
α -2,3/ α -2,8-sialiltransferasa II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:41	n.d.	- AX934429	AAO96670.1 AAT17967.1 CAF04168.1		
α -2,3-sialiltransferasa cst-I	<i>Campylobacter jejuni</i> OH4384	2.4.99.-	AF130466 -	AAF13495.1 AAS36261.1	Q9RGF1	
α -2,3/-2,8-sialiltransferasa bifuncional (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> OH4384	2.4.99.-	AF130984 AX934425	AAF31771.1 CAF04166.1	1RO7 1RO8	C A
HI0352 (fragmento)	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	n.d.	U32720 X57315 NC_000907	AAC22013.1 CAA40567.1 NP_438516.1	P24324	
PM1174	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d.	AE006157 NC_002663	AAK03258.1 NP_246111.1	Q9CLP3	
Secuencia 10 de la patente US 6503744	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAO96672.1		
Secuencia 10 de la patente US 6699705	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAT17969.1		
Secuencia 12 de la patente US 6699705	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAT17970.1		
Secuencia 2 de la patente US 6709834	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAT23232.1		
Secuencia 3 de la patente US 6503744	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAO96668.1		
Secuencia 3 de la patente US 6699705	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAT17965.1		
Secuencia 34 de la patente US 6503744	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAO96684.1		
Secuencia 35 de la patente US 6503744 (fragmento)	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAO96685.1 AAS36262.1		
Secuencia 48 de la patente US 6699705	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAT17988.1		
Secuencia 5 de la patente US 6699705	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAT17966.1		
Secuencia 9 de la patente US 6503744	<i>Desconocido.</i>	n.d.	-	AAO96671.1		

FIGURA 7A

12AP1/E5 -- Viventia Biotech	Vacuna contra SIDA -- ANRS, CIBG, Hersed
1964 -- Aventis	Biomed, Hollis-Eden, Rome, United
Hormona de crecimiento 20K -- AMUR	Biomedical, American Home Products,
28P6/E6 -- Viventia Biotech	Maxygen
3-Hidroxiftaloil-beta-lactoglobulina -	ligando de receptor de vías respiratorias -- IC Innovations
Terapia génica con ligando de 4-IBB -	AJvW 2 -- Ajinomoto
Conjugado de 64-Cu AcM TETA-1A3 --	AK 30 NGF -- Alkermes
Mallinckrodt institute of Radiology	Albuferón -- Human Genome Sciences
Conjugado de 64-Cu AcM TETA-cT84.66 --	albúmina-- Biogen, DSM Anti-Infectives,
Conjugado de 64-Cu Trastuzumab TETA --	Genzyme Transgenics, PPL Therapeutics,
Genentech	TranXenoGen, Welfide Corp.
A 200 -- Amgen	aldesleucina -- Chiron
A10255 -- Eli Lilly	alefacept -- Biogen
A1PDX -- Hedral Therapeutics	Alemtuzumab
A6 -- Angstrom	Terapia contra alergia -- ALK-Abello/Maxygen,
aaAT-III -- Genzyme	ALK-Abello/RP Scherer
Abciximab -- Centocor	vacunas contra alergia-- Allergy Therapeutics
ABI.001 -- Atlantic BioPharmaceuticals	Alnidofibatida -- Aventis Pasteur
ABT-828 -- Abbott	Alnorina -- SRC VB VECTOR
Accutin	ALP 242 -- Gruenenthal
Actinohivina	Alfa-antitripsina -- Arriva/Hyland
activina-- Biotech Australia, Human	Immuno/ProMetic/Protease Sciences
Therapeutics, Curis	Alfa-1-antitripsina -- Cutter, Bayer, PPL
AD 439 -- Tanox	Therapeutics, Profile, ZymoGenetics,
AD 519 -- Tanox	Arriva
Adalimumab -- Cambridge Antibody Tech.	Inhibidor de alfa-1-proteasa -- Genzyme
Vacuna contra adenocarcinoma-- Biomira -- NIS	Transgenics, Welfide Corp.
Adenosina desaminasa -- Enzond	Proteína de fusión de alfa-galactosa -
Antagonistas de receptor de adenosina A2B --	Immunomedics
Adenosine Therapeutics	Alfa-galactosidasa A -- Research
ADP-001 -- Axis Genetics	Corporation Technologies, Genzyme
AF 13948 -- Affymax	Alfa-glucosidasa -- Genzyme, Novazyme
Afelimomab -- Knoll	Alfa-lactoalbúmina
AFP-SCAN -- Immunomedics	Alfa-L-iduronidasa -- Transkaryotic
AG 2195 -- Corixa	Therapies, BioMarin
agalsidasa alfa -- Transkaryotic Therapies	alteplasa -- Genentech
agalsidasa beta -- Genzyme	alvircept sudotox -- NIH
AGENT-- Antisoma	ALX1-11 --sNPS Pharmaceuticals
AI 300 -- AutoImmune	Terapia génica contra enfermedad de Alzheimer
AI-101 -- Teva	AM-133 -- AMRAD
AI-102 -- Teva	Conj. inmunoestim. de Amb a 1 -- Dynavax
AI-201 -- AutoImmune	AMD 3100 -- AnorMED -- NIS
AI-301 -- AutoImmune	AMD 3465 -- AnorMED -- NIS

FIGURA 7B

AMD 3465 – AnorMED -- NIS	AcM anti-B7-2 GL-1
AMD Fab -- Genentech	Inmunotoxina anti-B7-2-gelonina --
Amediplasa-- Menarini, Novartis	Antibacterianos/antifúngicos --
AM-F9	Diversa/IntraBiotics
Vacuna contra amebiasis	Anticuerpos monoclonales anti-beta-amiloide --
Anfirregulina -- Octagene	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	AcM anti-C5 BB5-1 -- Alexion
inhibidores de angiogénesis -- ILEX	AcM anti-C5 N19-8 -- Alexion
AngioMab – Antisoma	AcM anti-C8
Angiopoyetinas -Regeneron/Procter &	citocinas anticancerígenas -- BioPulse
Gamble	matriz anticancerígena -- Telios Integra
angiostatina -- EntreMed	anticuerpos monoclonales contra cáncer – ARIUS,
Terapia génica con angiostatina/endostatina --	Immunex
Genetix Pharmaceuticals	péptidos anticancerígenos -- Maxygen, Micrologix
angiotensina II, tópica -- Maret	Tec. de profármacos anticancerígenos -- Alexion
Carbunco -- EluSys Therapeutics/US Army	Antibody Technologies
Medical Research Institute	Troy-Bodies anticancerígenos -- Affite -- Affitech
Vacuna contra carbunco	vacuna contra el cáncer -- NIH
Anticuerpos monoclonales humanos anti-factor	anticancerígenos -- Epimmune
crecimiento derivado de plaquetas D -- Curagen	AcM de oveja anti-CCR5/CXCR4 -- KS
AcM anti-17-1A 3622W94 --	Biomedix Holdings
GlaxoSmithKline	AcM anti-CD11a KBA –
AcM anti-2C4 -- Genentech	AcM anti-CD11a M17
anticuerpos monoclonales anti-4-1BB -- Bristol	AcM anti-CD11a TA-3 –
Myers Squibb	AcM anti-CD11a WT.1 –
Tec. de plataforma anti-adhesión -- Cytovax	AcM anti-CD11b -- Pharmacia
AcM anti-adipocitos -- Cambridge Antibody	AcM anti-CD11b LM2
Tech./ObeSys	AcM anti-CD154 -- Biogen
antialérgicos - Maxygen	AcM anti-CD16-anti-CD30 -- Biotest
vacuna contra alergia -- Acambis	AcM anti-CD18 -- Pharmacia
AcM anti-alfa-4-integrina	AcM anti-CD19 B43 –
AcM anti-alfavβ3-integrina	Conjugado de AcM anti-CD19- butirato de
Molecular Evolution	sodio liposomal
Anticuerpos monoclonales anti-angiogénesis --	Anticuerpo anti-CD147
KS Biomedix/Schering AG	Conjugado de AcM anti-CD19-saporina -
Conjugado AcM anti-B4-DC1 -- ImmunoGen	Inmunotoxina anti-CD19-dsFv-PE38 -
Anticuerpo anti-B7 PRIMATIZADO - IDEC	AcM anti-CD2 12-15 –
AcM anti-B7-1 16-10A1	AcM anti-CD2 B-E2 -- Diaclone
AcM anti-B7-1 16-1G10	AcM anti-CD2 OX34 –

FIGURA 7C

AcM anti-CD2 OX54 –	AcM anti-CD4 YTS 177-9
AcM anti-CD2 OX55 –	AcM anti-ligando de CD40 -- Biogen
AcM anti-CD2 RM2-1	AcM anti-CD40
AcM anti-CD2 RM2-2	AcM anti-CD40 5D12 – Tanox
AcM anti-CD2 RM2-4	AcM anti-CD44 A3D8
AcM anti-CD20 BCA B20	AcM anti-CD44 GKWA3
AcM anti-CD20-anti-Fc-alfa-RI biespecífico - Medarex, Tenovus	AcM anti-CD44 IM7
Complejo de AcM anti-CD22-saporina-6 - Inmunotoxina anti-CD3 -	AcM anti-CD44 KM81
AcM anti-CD3 145-2C11 -- Pharming	Anticuerpos monoclonales variantes anti-CD44 -- Corixa/Hebrew University
Conjugado de AcM anti-CD3 CD1gG -- Genentech	AcM anti-CD45 BC8-I-131
AcM anti-CD3 humanizado– Protein Design, RW Johnson	AcM anti-CD45RB
AcM anti-CD3 WT32	AcM anti-CD48 HuLy-m3
Conjugado de AcM anti-CD3-cadena A de ricina	AcM anti-CD48 WM-63
Conjugado de AcM anti-CD3-xantina oxidasa	AcM anti-CD5 -- Becton Dickinson
–	AcM anti-CD5 OX19
AcM anti-CD30 BerH2 -- Medac	AcM anti-CD6
Conjugado de AcM anti-CD30-saporina	Conjugado de AcM anti-CD7-PAP
Inmunotoxina AcM anti-CD30-scFv-ETA'	Conjugado de AcM anti-CD7-cadena A de ricina
AcM anti-CD38 AT13/5	AcM anti-CD8 – Amerimmune, Cytodyn, Becton Dickinson
Conjugado de AcM anti-CD38-saporina	AcM anti-CD8 2-43
AcM anti-CD38-anti-CD19 biespecífico	AcM anti-CD8 OX8
AcM anti-CD3-anti-EGFR	AcM anti-CD80 P16C10 -- IDEC
AcM anti-CD3-anti-receptor de interleucina 2	AcM anti-CD80 P7C10 -- ID Vaccine
AcM anti-CD3-anti-MOV18 -- Centocor	Conjugado anti-CD8-idarubicina
AcM anti-CD3-anti-SCLC biespecífico	AcM anti-CEA CE-25
Vacuna anti-idiotipo CD4	AcM anti-CEA MN 14 – Immunomedics
AcM anti-CD4 – Centocor, IDEC	Conjugado de AcM anti-CEA-MN14-PE40- Immunomedics
Pharmaceuticals, Xenova Group	Conjugado de AcM anti-CEA-T84.66-inter- leucina-2
AcM anti-CD4 16H5	AcM de oveja anti-CEA -- KS Biomedix Holdings
AcM anti-CD4 4162W94 -- GlaxoSmithKline	Anticuerpos monoclonales anti-superficie celular-- Cambridge Antibody Tech. /Farmacia
AcM anti-CD4 B-F5 -- Diaclone	AcM anti-c-erbB2-anti-CD3 bifuncional -- Otsuka
AcM anti-CD4 GK1-5	AcM anti-CMV -- Scotgen
AcM anti-CD4 KT6	Anti-complemento
AcM anti-CD4 OX38	AcM anti-CTLA-4
Conjugado de AcM anti-CD4-PAP	Anticuerpo catalítico anti-EGFR -- Hesen Biomed
Myers Squibb	
AcM anti-CD4 RIB 5-2	
AcM anti-CD4 W3/25	
AcM anti-CD4 YTA 3.1.2	

FIGURA 7D

Immunotoxina anti-EGFR -- IVAX	AcM anti-ICAM-1 HA58
AcM anti-EGFR -- Abgenix	AcM anti-ICAM-1 YN1/1.7.4
AcM anti-EGFR 528	AcM anti-ICAM-3 ICM3 -- ICOS
AcM anti-EGFR KSB 107 -- KS Biomedix	Vacuna contra cáncer de mama anti-idiotipo 11D10
Conjugado de AcM anti-EGFR-DM1 -- ImmunoGen	Vacuna contra cáncer de mama anti-idiotipo ACA14C5 --
AcM anti-EGFR-LA1 --	Vacuna contra cáncer anti-idiotipo -- ImClone Systems/Merck KGaA ImClone, Viventia Biotech
AcM de oveja anti-EGFR-- KS Biomedix	Vacuna contra cáncer anti-idiotipo 1A7 -- Titan
AcM anti-FAP F19-I-131	Vacuna contra cáncer anti-idiotipo 3H1 -- Titan
AcM anti-Fas IgM CH11	Vacuna contra cáncer anti-idiotipo TriAb -- Titan
AcM anti-Fas Jo2	Vacuna contra Chlamydia trachomatis anti-idiotipo
AcM anti-Fas RK-8	Vacuna contra cáncer colorrectal anti-idiotipo -- Novartis
Anticuerpos monoclonales anti-Fit-1 -- ImClone	Vacuna contra cáncer colorrectal anti-idiotipo -- Onyvax
Péptidos antifúngicos -- State University of New York	Vacuna contra melanoma anti-idiotipo -- IDEC Pharmaceuticals
tripéptidos antifúngicos -- BTG	Vacuna contra cáncer de ovario anti-idiotipo ACA 125
Proteína de fusión anticuerpo anti-gangliósido GD2-interleucina 2 -- Lexigen	Vacuna contra cáncer de ovario anti-idiotipo AR54 - - AltaRex
AcM anti-GM2 -- Kyowa	Vacuna contra cáncer de ovario anti-idiotipo CA- 125 -- AltaRex, Biomira
Anticuerpos monoclonales anti-receptor de GM-CSF -- AMRAD	Anticuerpo catalítico anti-IgE -- Hersed Biomed
AcM anti-gp130 -- Tosoh	AcM anti-IgE E26 -- Genentech
Anticuerpos monoclonales anti-HCA -- AltaRex/Epigen	AcM anti-IGF-1
Anticuerpos anti-hCG-- Abgenix/AVI BioPharma	antiinflamatorio -- GeneMax
Anticuerpos monoclonales humanos anti- heparanasa -- Oxford	péptido antiinflamatorio -- BTG
Glycosciences/Medarex	péptidos anti-integrina -- Bumha
Anticuerpos monoclonales humanos anti-virus hepatitis C -- XTL Biopharmaceuticals	AcM anti-receptor de interferón-alfa64G12 -- Pharma Pacific Management
Terapia génica con anticuerpo anti-HER-2	AcM anti-interferón gamma -- Protein Design Labs
Anticuerpo anti-herpes -- Epicyte	Anticuerpo policlonal anti-interferón-gamma - Advanced Biotherapy
Anticuerpo anti-VIH -- Epicyte	AcM anti-interleucina-10 -
Anticuerpo catalítico anti-VIH -- Hersed Biomed	AcM anti-interleucina-12 -
Proteína de fusión anti-VIH -- Idun	Anticuerpo policlonal anti-interleucina-1-beta -- R&D Systems
Proteínas anti-VIH -- Cangene	AcM anti-receptor de interleucina-2 2A3
AcM anti-HM1-24 -- Chugai	
AcM anti-hR3	
AcM anti-antígeno de carcinoma humano -- Epicyte	
AcM anti-ICAM-1 -- Boehringer Ingelheim	
AcM anti-ICAM-1 1A-29 -- Pharmacia	

FIGURA 7E

AcM anti-receptor de interleucina-2 33B3-1 -- Immunotech	Anticuerpos monoclonales anti-properdina -- Abgenix/Gliatech
AcM anti-receptor de interleucina-2 ART-18	Anti-PSMA (antígeno de membrana específico de próstata)
AcM anti-receptor de interleucina-2 LO-Tact-1	AcM anti-PSMA J591 -- BZL Biologics
AcM anti-receptor de interleucina-2 Mikbeta1	Terapia génica con AcM anti-Rev -
AcM anti-receptor de interleucina-2 NDS61	Anticuerpos anti-VRS - Epicyte, Intracell
AcM anti-interleucina-4 11B11	Anticuerpos monoclonales anti-VRS -- Medarex/MedImmune, Applied Molecular Evolution/MedImmune
AcM anti-interleucina-5 -- Wallace Laboratories	AcM anti-VRS, inhalación -- Alkermes/MedImmune
AcM anti-interleucina-6 -- Centocor, Diaclone, Pharmadigm	Terapia génica anti-RT
AcM anti-interleucina-8 -- Abgenix	Terapia génica con ARN de K-ras antisentido
AcM anti-interleucina-8 -- Xenotech	AcM anti-SF-25
AcM anti-JL1	Anticuerpo antiesperma -- Epicyte
AcM de oveja anti-Klebsiella-- KS Biomedix Holdings	Conjugado anti-Tac(Fv)-PE38
Conjugado de AcM anti-receptor de laminina-doxorubicina liposomal	AcM anti-TAPA/CD81 AMP1
AcM anti-LCG -- Cytoconal	Terapia génica anti-tat
AcM anti-lipopolisacárido -- VitaResc	AcM anti-TCR-alfabeta H57-597
Anticuerpos monoclonales anti-L-selectina Protein Design Labs, Abgenix, Stanford University	AcM anti-TCR-alfabeta R73
Anticuerpos monoclonales anti-MBL -- Alexion/Brigham and Women's Hospital	AcM anti-tenascina BC-4-I-131
Anticuerpos monoclonales anti-MHC	Anticuerpos monoclonales humanos anti-TGF beta -- Cambridge Antibody Tech., Genzyme
Anticuerpo anti-MIF humanizado -- IDEC Cytokine PharmaSciences	AcM anti-TGF-beta 2G7 -- Genentech
AcM de oveja anti-MRSA/VRSA -- KS Biomedix Holdings	Antitrombina III -- Genzyme Transgenics, Aventis, Bayer, Behringwerke, CSL, Myriad
AcM anti-mu -- Novartis	AcM anti-Thy1
AcM anti-MUC-1	AcM anti-Thy1.1
Anti-MUC 18	AcM de oveja anti-factor tisular/factor VIIA -- KS Biomedix
AcM anti-Nogo-A IN1	Anticuerpos monoclonales anti-TNF Centocor, Chiron, Peptech, Pharacia, Serono
Autoanticuerpos antinucleares -- Procyon	AcM de oveja anti-TNF -- KS Biomedix Holdings
Anticuerpos monoclonales anti-cáncer de ovario - Dompe	AcM anti-TNF-alfa -- Genzyme
Anticuerpos monoclonales anti-p185	AcM anti-TNF-alfa B-C7 -- Diaclone
AcM anti-p43	AcM contra caries dental -- Planet BioTech.
Vacunas antiparasitarias	AcM anti-receptor TRAIL-1 -- Takeda
AcM de oveja anti-PDGF/bFGF -- KS Biomedix	ARNasas antitumorales -- NIH

FIGURA 7F

AcM anti-VCAM 2A2 -- Alexion	Ácido aurintricarboxílico de alto peso molecular
AcM anti-VCAM 3F4 -- Alexion	Trastornos autoinmunitarios -- GPC
AcM anti-VCAM-1	Biotech/MorphoSys
AcM anti-VEC -- ImClone	Trastornos autoinmunitarios y rechazo de trasplantes -- Bristol-Myers Squibb/Genzyme
AcM anti-VEGF -- Genentech	Tra
AcM anti-VEGF 2C3	Trastornos autoinmunitarios/cáncer --
AcM de oveja anti-VEGF- KS Biomedix Holdings	Abgenix/Chiron, CuraGen
AcM anti-VLA-4 HP1/2 -- Biogen	Autotaxina
AcM anti-VLA-4 PS/2	Avicidina -- NeoRx
AcM anti-VLA-4 R1-2	factor de oxogénesis-1 -- Boston Life Sciences
AcM anti-VLA-4 TA-2	Axokine -- Regeneron
AcM humano anti-VAP-1	Vacuna contra linfoma de células B -- Biomira
AcM de oveja anti-VRE- KS Biomedix Holdings	Terapia génica con B7-1 --
ANUP -- TranXenoGen	Proteínas BABS -- Chiron
ANUP-1 -- Pharis	BAM-002 -- Novelos Therapeutics
AOP-RANTES -- Senetek	Basiliximab (AcM anti-CD25) -- Novartis
Apan-CH -- Praecis Pharmaceuticals	Bay-16-9996 -- Bayer
APC-8024 -- Demegen	Bay-39-9437 -- Bayer
ApoA-1 -- Milano, Pharmacia	Bay-50-4798 -- Bayer
Apogen -- Alexion	BB-10153 -- British Biotech
apolipoproteína A1-- Avanir	BBT-001 -- Bolder BioTech.
apolipoproteína E -- Bio-Tech. General	BBT-002 -- Bolder BioTech.
Aplagina -- Biogen	BBT-003 -- Bolder BioTech.
Aprotinina -- ProdiGene	BBT-004 -- Bolder BioTech.
APT-070C -- AdProTech	BBT-005 -- Bolder BioTech.
AR 177 -- Aronex Pharmaceuticals	BBT-006 -- Bolder BioTech.
AR 209 -- Aronex Pharmaceuticals,	BBT-007 -- Bolder BioTech.
Antigenics	BCH-2763 -- Shire
AR545C	BCSF -- Millenium Biologix
Sistemas de inserción génica ARGENT -- ARIAD	BDNF -- Regeneron -- Amgen
Arresten	Becaplermina --Johnson & Johnson, Chiron
ART-123 -- Asahi Kasei	Bectumomab -- Immunomedics
arilsulfatasa B -- BioMarin	Beriplast -- Aventis
Arilsulfatasa B, humana recombinante -- BioMarin	Terapia génica con receptor beta-adrenérgico
AS 1051 -- Ajinomoto	University of Arkansas
ASI-BCL -- Intracell	bFGF -- Scios
Asparaginasa - Merck	BI 51013 -- Behringwerke AG
ATL-101 -- Alizyme	BIBH 1 -- Boehringer Ingelheim
Péptido natriurético auricular -- Pharis	BIM-23190 -- Beaufour-Ipsen
	inmunoterapia con polen de abedul-- Pharmacia
	proteínas de fusión biespecíficas -- NIH

FIGURA 7G

AcM 2B1 biespecifico -- Chiron	calcitonina-- oral -- Nobex, Emisphere, Pharmaceutical Discovery
Bitistatina	
BIWA 4 -- Boehringer Ingelheim	péptido relacionado con gen de calcitonina-- Asahi Kasei -- Unigene
sucedáneo de la sangre -- Northfield, Baxter Intl.	
BLP-25 -- Biomira	calcitonina, humana -- Suntory
BLS-0597 -- Boston Life Sciences	calcitonina, nasal -- Novartis, Unigene
BLYS -- Human Genome Sciences	calcitonina, Panoderm -- Elan
BLys radiomarcado -- Human Genome Sciences	calcitonina, Peptitrol -- 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/ Collagenesis, Genetics Institute/Yamanouch	Campath-1G
terapia génica de BMP 2	Campath-1M
BMP 52 -- Aventis Pasteur, Biopharm	terapia contra cáncer-- Cangene
BMP-2 -- Genetics Institute	vacuna contra cáncer-- Aixlie, Aventis Pasteur, Center of Molecular Immunology ,YM BioSciences, Cytos, Genzyme, Transgenics, Globelimmune, Igeneon, ImClone, Virogenetics, InterCell, Iomai, Jenner Biotherapies, Memorial Sloan- Kettering Cancer Center, Sydney Kimmel Cancer Center, Novavax, Protein Sciences, Argonex, SIGA
BMS 182248 -- Bristol-Myers Squibb	vacuna contra cáncer ALVAC-CEA B7.1 -- Aventis Pasteur/Therion Biologics
BMS 202448 -- Bristol-Myers Squibb	vacuna contra cáncer CEA-TRICOM -- Aventis Pasteur/Therion Biologics
factores de crecimiento óseo -- IsoTis	terapia génica de vacuna contra cáncer-- Cantab Pharmaceuticals
BPC-15 -- Pfizer	vacuna contra cáncer HER-2/neu -- Corixa
péptido natriurético cerebral --	vacuna contra cáncer THERATOPE -- Biomira
cáncer de mama-- Oxford	vacuna contra cáncer, poliMASC -- Valentis
GlycoSciences/Medarex	vacuna contra Candida-- Corixa, Inhibitex
vacuna contra cáncer de mama -- Therion Biologics, Oregon	Canstatina-- ILEX
BSSL -- PPL Therapeutics	CAP-18 -- Panorama
BST-2001 -- BioStratum	terapia génica cardiovascular -- Collateral Therapeutics
BST-3002 -- BioStratum	carperitida -- Suntory
BTI 322 --	Casocidina 1 -- Pharis
butirilcolinesterasa -- Shire	CAT 152 -- Cambridge Antibody Tech.
C 6822 -- COR Therapeutics	CAT 192 -- Cambridge Antibody Tech.
inhibidor de esterasa C1- Pharming	
adyuvante C3d -- AdProTech	
CAB-2.1 -- Millennium	
calcitonina -- Inhale Therapeutics Systems, Aventis, Genetronics, TranXenoGen, Unigene, Rhone Poulenc Rohrer	

FIGURA 7H

CAT 213 -- Cambridge Antibody Tech. Catalasa -- Enzon	vacuna contra Chlamydia pneumoniae -- Antex Biologics
Cat-PAD -- Circassia	vacuna contra Chlamydia trachomatis -- Antex Biologics
CB 0006 -- Celltech	vacuna contra Chlamydia -- GlaxoSmithKline
CCK(27-32)-- Akzo Nobel	vacuna contra cólera CVD 103-HgR -- Swiss Serum and Vaccine Institute Berne
CCR2-64I -- NIH	vacuna contra cólera CVD 112 -- Swiss Serum and Vaccine Institute Berne
CD, Procept -- Paligent	vacuna contra cólera inactivada oral -- SBL Vaccin
terapia génica de CD154	Chrysalin -- Chrysalis BioTech.
CD39 -- Immunex	CI-782 -- Hitachi Kase
CD39-L2 -- Hyseq	factor neurotrófico ciliar -- Fidia, Roche
CD39-L4 -- Hyseq	proyecto CIM -- Active Biotech
toxina de fusión de CD4 -- Senetek	CL 329753 -- Wyeth-Ayerst
CD4 IgG -- Genentech	CL22, Cobra -- ML Laboratories
antagonistas de receptor de CD4 -- Pharmacopeia/Progenics	Clenoliximab -- IDEC
CD4 soluble -- Progenics	anticuerpos contra Clostridium difficile-- Epicyte
CD4, soluble -- Genzyme Transgenics	factores de coagulación-- Octagene
ligando de CD40 -- Immunex	CMB 401 -- Celltech
CD4-cadena A de ricina -- Genentech	CNTF -- Sigma-Tau
terapia génica de CD59-- Alexion	vacuna contra cocaínomanía-- Cantab, ImmuLogic, Scripps
terapia de células TIL de CD8 -- Aventis Pasteur	vacuna contra coccidiomicosis-- Arizo
CD8, soluble -- Avidex	colágeno -- tipo I -- Pharming
ligando de CD95 -- Roche	inhibidores de formación de colágeno -- FibroGen
CDP 571 -- Celltech	colágeno/hidroxiapatita/factor de crecimiento óseo -- Aventis Pasteur, Biopharm, Orquest
CDP 850 -- Celltech	colagenasa-- BioSpecifics
CDP-860 (PEG-AcM PDGF) -- Celltech	vacuna contra cáncer colorrectal-- Wistar Institute
CDP 870 -- Celltech	componente B, recombinante -- Serono
CDS-1 -- Ernest Orlando	inhibidores de factor de crecimiento de tejido conjuntivo -- FibroGen/Taisho
Cedelizumab -- Ortho-McNeil	Contortostatina
Cetermina-- Insmed	vacuna anticonceptiva -- Zonagen
vacuna de CETP-- Avant	hCG de vacuna anticonceptiva
Cetrorelix	vacuna anticonceptiva masculina reversible -- IMMUCON
Cetuximab	vacuna anticonceptiva, zona pelúcida -- Zonagen
CGH 400 -- Novartis	AcM TETA-1A3 marcado con cobre 64 -- NCI
CGP 42934 -- Novartis	Coralina
CGP 51901 -- Tanox	
CGRP -- Unigene	
CGS 27913 -- Novartis	
CGS 32359 -- Novartis	
vacuna contra enfermedad de Chagas -- Corixa	
quimiocinas -- Immune Response	
CHH 380 -- Novartis	
quitinasa -- Genzyme, ICOS	

FIGURA 71

Corsevin M	Daclizumab (AcM anti-IL2R) – Protein Design Labs
Análogos de péptido C-- Schwarz	DAMP^ -- Incyte Genomics
CPI-1500 -- Consensus	Daniplestim -- Pharmacia
CRF -- Neurobiological Tech.	darbepoyetina alfa -- Amgen
pentapéptido cRGDFV –	DBI-3019 -- Diabetogen
CRL 1095 -- CytRx	DCC -- Genzyme
CRL 1336 -- CytRx	DDF -- Hyseq
CRL 1605 -- CytRx	decorina– Integra, Telios
CS-560 -- Sankyo	defensinas -- Large Scale Biology
CSF -- ZymoGenetics	DEGR-VIIa
CSF-G – Hangzhou, Dong-A, Hanmi	Anticuerpo desinmunizado 3B6/22 AGEN
CSF-GM – Cangene, Hunan, LG Chem	Anticuerpos anticancerígenos desinmunizados -- Biovation/Viragen
CSF-M -- Zarix	Dendroamida A
CT 1579 – Merck Frosst	Vacuna contra el Dengue -- Bavarian Nordic, Merck
CT 1786 – Merck Frosst	denileucina diftotox -- Ligand
CT-112^ -- BTG	DES-1101 -- Desmos
CTB-134L -- Xenova	desirudina -- Novartis
CTC-111 -- Kaketsuken	desmopresina -- Unigene
CTGF -- FibroGen	Desmoteplasa– Merck, Schering AG
CTLA4-Ig -- Bristol-Myers Squibb	Destabilasa
Terapia génica con CTLA4-Ig–	Terapia génica contra diabetes– DeveloGen, Pfizer
CTP-37 -- AVI BioPharma	Terapia contra la diabetes-- Crucell
Péptido natriurético tipo C-- Suntory	Vacuna contra la diabetes tipo 1-- Diamyd Therapeutics
CVS 995 – Corvas Intl.	DiaCIM -- YM BioSciences
CX 397 – Nikko Kyodo	oligopéptidos dialíticos -- Research Corp
CY 1747 -- Epimmune	Diamyd -- Diamyd Therapeutics
CY 1748 -- Epimmune	DiaPep227-- Pepgen
Cianovirina-N	DiavaX -- Corixa
Terapia para fibrosis quística-- CBR/IVAX	AcM contra digoxina-- Glaxo
CYT 351	Vacuna contra difteria, tétanos, tosferina - hepatitis B-- GlaxoSmithKline
Citocina Traps -- Regeneron	Terapia DIR -- Solis Therapeutics –
Citocinas – Enzon, Cytoclonal	ADNasa-- Genentech
Vacuna de glicoproteína de citomegalovirus	Dornasa alfa-- Genentech
-- Chiron, Aquila Biopharmaceuticals, Aventis Pasteur, Virogenetics	Dornasa alfa, inhalación -- Genentech
Vacuna de citomegalovirus viva - Aventis Pasteur	Conjugado doxorubicina-anticuerpo anti-CEA – Immunomedics
Terapia génica con citosina desaminasa -- GlaxoSmithKline	DP-107 -- Trimeris
DA-3003 -- Dong-A	drotrecogina alfa-- Eli Lilly
DAB389 interleucina 6 -- Senetek	DTctGMCSF
DAB389 interleucina 7	

FIGURA 7J

Vacuna contra DTP-polio -- Aventis Pasteur	terapia de agotamiento de nutrientes con anticuerpos ligados a enzimas -- KS Biomedix Holdings
Conjugado DU 257-anticuerpo KM231 -- Kyowa	agente de neutralización derivado de eosinófilos-- EP-51216 -- Asta Medica
Matriz de injerto dural-- Integra	EP-51389 -- Asta Medica
Duteplasa -- Baxter Intl.	ligandos de la familia de EPH-- Regeneron
DWP-401 -- Daewoong	Factor de crecimiento epidérmico-- Hitachi Kasei, Johnson & Johnson
DWP-404 -- Daewoong	
DWP-408 -- Daewoong	
Dx 88 (Epi-KAL2) -- Dyax	Toxina de fusión de factor de crecimiento epidérmico-- Senetek
Dx 890 (inhibidores de elastina)-- Dyax	
Vacuna de E. coli O157-- NIH	Factor de crecimiento epidérmico-genisteína - EPI-HNE-4 -- Dyax
E21-R -- BresaGen	EPI-KAL2 -- Dyax
Vacuna contra virus de encefalitis equina oriental - Echinetina--	Epoietina-alfa-- Amgen, Dragon Pharmaceuticals, Nanjing Huaxin
Echinhibina 1--	Epratuzumab -- Immunomedics
Echistatina -- Merck	Vacuna contra virus de Epstein-Barr -- Aviron/SmithKline Beecham, Bioresearch
Echitamina --	Eptacog alfa -- Novo Nordisk
Ecromeximab -- Kyowa Hakko	Eptifibatida-- COR Therapeutics
EC-SOD -- PPL Therapeutics	erb-38 --
Eculizumab (5G1.1) -- Alexion	Erlizumab -- Genentech
EDF -- Ajinomoto	eritropoietina -- Alkermes, ProLease, Dong-A, Elanex, Genetics Institute, LG Chem, Protein Sciences, Serono, Snow Brand, SRC VB VECTOR, Transkaryotic Therapies
Derivado de EDN-- NIH	
EDNA -- NIH	Eritropoietina beta-- Hoffman La Roche
Edobacomab -- XOMA	Eritropoietina/epoietina alfa-- Chugai
Edrecolomab -- Centocor	Vacuna contra Escherichia coli-- North American Vaccine, SBL Vaccin, Swiss Serum and Vaccine Institute Berne
EF 5077	etanercept -- Immunex
Efalizumab -- Genentech	examorelina -- Mediolanum
Toxina de fusión de EGF -- Seragen, Ligand	Exendina 4 -- Amylin
Vacuna EGF-P64k -- Center of Molecular Immunology	exonucleasa VII
EL 246 -- LigoCyte	F 105 -- Centocor
inhibidor de elastasa-- Synergen	F-992 -- Fornix
elcatonina-- Therapicon	Factor IX -- Alpha Therapeutics, Welfide Corp., CSL, enetics Institute/AHP, Pharmacia, PPL Therapeutics
EMD 72000 -- Merck KGaA	Terapia génica con factor IX-- Cell Genesys
Emdogain -- BIORA	
emfilermina-- AMRAD	
Emoctakin -- Novartis	
Proteína de matriz del esmalte-- BIORA	
Endo III -- NYU	
endostatina-- EntreMed, Pharis	
Enhancinas-- Micrologix	
Enlimomab -- Isis Pharm.	
Enoxaparina sódica-- Pharmuka	

FIGURA 7K

Factor VII -- Novo Nordisk, Bayer, Baxter Intl.	folitropina alfa-- Alkermes, ProLease, PowderJect, Serono, Akzo Nobel
Factor VIIa -- PPL Therapeutics, ZymoGenetics	folitropina beta -- Bayer, Organon FP 59
Factor VIII -- Bayer Genentech, Beaufour-Ipsen, CLB, Inex, Octagen, Pharmacia, Pharming	FSH -- Ferring FSH + LH -- Ferring F-espondina-- CeNeS
Factor VIII pegilado -- Bayer	sistema de suministro de proteínas de fusión - UAB Research Foundation
Fragmentos de factor VIII -- Pharmacia	toxinas de fusión-- Boston Life Sciences
Terapia génica con factor VIII-- Targeted Genetics	G 5598 -- Genentech
Formulación con sacarosa de factor VIII - Bayer, Genentech	GA-II -- Transkaryotic Therapies
Factor VIII-2 -- Bayer	análogos de interferón gamma-- SRC VB VECTOR
Factor VIII-3 -- Bayer	Ganirelix -- Roche
Inhibidores de factor Xa -- Merck, Novo Nordisk, Mochida	lipasa gástrica-- Meristem Gavilimomab --
Factor XIII -- ZymoGenetics	G-CSF -- Amgen, SRC VB VECTOR
Terapia génica con factores VIII y IX -- Genetics Institute / Targeted Genetics	GDF-1 -- CeNeS GDF-5 -- Biopharm
Famoxina-- Genset	GDNF (factor neurotrófico derivado de la glia)-- Amgen
Proteína Fas(delta) TM-- LXR BioTech.	gelsolina-- Biogen
Fas TR -- Human Genome Sciences	Gemtuzumab ozogamicina-- Celltech
Felvizumab -- Scotgen	epoyetina-alfa activada por genes-- Aventis Pharma -- Transkaryotic Therapies
FFR-VIIa -- Novo Nordisk	terapia génica para trombostenia de Glanzmann -- acetato de glatiramero-- Yeda
FG-001 -- F-Gene	factor de crecimiento de la glia 2-- CeNeS
FG-002 -- F-Gene	GLP-1 -- Amylin, Suntory, TheraTech, Watson
FG-004 -- F-Gene	análogos de péptido GLP-1 -- Zealand Pharmaceuticals
FG-005 -- F-Gene	glucagón-- Eli Lilly, ZymoGenetics
FGF + fibrina-- Repair	7-36 amida del péptido similar a glucagón 1 -- Suntory
Fibrinogeno -- Bio-Tech. General	péptido similar a glucógeno -- Amylin
péptidos de unión a fibrina- ISIS Innovation	glucocerebrosidasa-- Genzyme
fibrinógeno-- PPL Therapeutics, Pharming	glutamato descarboxilasa-- Genzyme Transgenics
factor de crecimiento de fibroblastos - Chiron, NYU, Ramot, ZymoGenetics	glicoproteína S3-- Kureha
conjugado de fibrolasa-- Schering AG	GM-CSF -- Immunex
Filgrastim -- Amgen	
filgrastim -- modificado con PDA -- Xencor	
Ligando de FLT-3-- Immunex	
FN18 CRM9 --	
folistatina-- Biotech Australia, Human Therapeutics	
	vacuna contra tumores de GM-CSF-- PowderJect

FIGURA 7L

Producto inmunoterapéutico de GnRH -- Protherics	Hemolink -- Hemosol
Goserelina (antagonista de LhRH) -AstraZeneca	hepapoyetina-- Snow Brand
antígeno gp75 -- ImClone	heparanasa -- InSight
gp96 -- Antigenics	heparinasa I -- Ibex
GPI 0100 -- Galenica	heparinasa III -- Ibex
GR 4991W93 -- GlaxoSmithKline	vacuna contra hepatitis A -- American Biogenetic Sciences
Factor estimulante de colonias de granulocitos -- Dong-A	vacuna contra hepatitis A inactivada
Conjugado de factor estimulante de colonias de granulocitos	vacuna contra hepatitis A Nothav-- Chiron
Terapia contra alergia al césped -- Dynavax	vacuna contra hepatitis A-hepatitis B -- GlaxoSmithKline
GRF1-44 -- ICN	terapia contra hepatitis B-- Tripep
Factor de crecimiento -- Chiron, Atrigel, Atrix Innogenetics, ZymoGenetics, Novo	vacuna contra hepatitis B-- Amgen, Chiron SpA, Meiji Milk, NIS, Prodeva, PowderJect, Rhein Biotech
péptidos de factor de crecimiento -- Biotherapeutics	vacuna contra hepatitis B recombinante-- Evans Vaccines, Epitec Combiotech, Genentech, MedImmune, Merck Sharp & Dohme, Rhein Biotech, Shantha Biotechnics, Vector, Yeda
hormona de crecimiento -- LG Chem	vacuna contra hepatitis B recombinante TGP 943-- Takeda
hormona de crecimiento, recombinante humana -- Serono	vacuna contra hepatitis C -- Bavarian Nordic, Chiron, Innogenetics Acambis,
GT 4086 -- Gliatech	vacuna contra hepatitis D-- Chiron Vaccines
GW 353430 -- GlaxoSmithKline	vacuna contra hepatitis E recombinante -- Genelabs/GlaxoSmithKline, Novavax
GW-278884 -- GlaxoSmithKline	factor de crecimiento de hepatocitos -- Panorama, Sosei
H 11 -- Viventia Biotech	fragmentos de Kringle de factor de crecimiento de hepatocitos -- EntreMed
Vacuna contra el virus H5N1 influenza A -- Protein Sciences	péptidos de Her-2/Neu -- Corixa
hemoglobina -- Biopure	Vacuna de ADN de glicoproteína contra herpes simple -- Merck, Wyeth-Lederle Vaccines-Malvern, Genentech, GlaxoSmithKline, Chiron, Takeda
hemoglobina 3011, recombinante -- Baxter Healthcare	Vacuna contra herpes simple-- Cantab Pharmaceuticals, CEL-SCI, Henderson Morley
hemoglobina crosfumarilo -- Baxter Intl.	Vacuna contra herpes simple viva -- ImClone Systems/Wyeth-Lederle, Aventis Pasteur
hemoglobina estabilizada-- Ajinomoto	Derivados de HGF-- Dompe
hemoglobina, recombinante -- Apex	Vacuna de hIAPP-- Crucell
HAF -- Immune Response	
Vacuna contra hantavirus	
HB 19	
HBNF -- Regeneron	
HCC-1 -- Pharis	
hCG -- Milkhaus	
Vacuna de hCG-- Zonagen	
HE-317 -- Hollis-Eden Pharmaceuticals	
Vacunas contra influenza y cáncer de proteína de choque térmico -- StressGen	
Vacuna de Helicobacter pylori-- Acambis, AstraZeneca/CSL, Chiron, Provalis	
Helistat-G -- GalaGen	

FIGURA 7M

Vacuna contra Hib-hepatitis B -- Aventis Pasteur	Vacunas huésped-vector	Henogen
HIC 1	HPM 1 -- Chugai	
HIP-- Altachem	Vacuna contra VPH-- MediGene	
Hirudinas-- Biopharma, Cangene, Dongkook, Japan Energy Corporation, Pharmacia Corporation, SIR International, Sanofi-Synthelabo, Sotragene, Rhein Biotech	HSA -- Meristem	
Vacuna comestible contra VIH -- ProdiGene	HSF -- StressGen	
Vacuna de gp120 de VIH -- Chiron, Ajinomoto, GlaxoSmithKline, ID Vaccine, Progenics, VaxGen	Portadores de HSP--Weizmann, Yeda, Peptor	
Terapia génica con vacuna de gp120 de VIH --	HSPPC-70 -- Antigenics	
Vacuna de ADN de gp160 de VIH -- PowderJect, Aventis Pasteur, Oncogen, Hyland Immuno, Protein Sciences	HSPPC-96, derivado de patógeno -- Antigenics	
Vacuna de gp41 de VIH -- Panacos	HSV 863 -- Novartis	
Vacuna de HGP-30W de VIH -- CEL-SCI	Vacuna de ADN de HTLV-I	
Immunoglobulina contra VIH - Abbott, Chiron	Vacuna de HTLV-II -- Access	
Péptidos de VIH -American Home Products	HU 901 -- Tanox	
Vacuna contra 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 Serum Institute, GeneCure, Immune Response, Progenics, Therion Biologics, United Biomedical, Chiron	Hu23F2G -- ICOS	
Vacuna contra VIH vCP1433 -- Aventis Pasteur	HuHMFG1	
Vacuna contra VIH vCP1452 -- Aventis Pasteur	HumaLYM -- Intracell	
Vacuna contra VIH vCP205 -- Aventis Pasteur	estática de Krebs humana-- Yamanouchi	
HL-9 -- American BioScience	anticuerpos monoclonales humanos --	
HM-9239 -- Cytran	Abgenix/Biogen, Abgenix/ Corixa, Abgenix/ImmuneX, Abgenix/Lexicon, Abgenix/ Pfizer, Athersys/Medarex, Biogen/MorphoSys, CAT/Searle, Centocor/Medarex, Corixa/Kirin Brewery, Corixa/Medarex, Eos BioTech./Medarex, Eos/Xenerex, Exelixis/Protein Design Labs, ImmunoGen/ Raven, Medarex/ B.Twelve, MorphoSys/ImmunoGen, XTL	
HML-103 -- Hemosol	Biopharmaceuticals/Dyax,	
HML-104 -- Hemosol	anticuerpos monoclonales humanos --	
HML-105 -- Hemosol	Medarex/Northwest Biotherapeutics,	
HML-109 -- Hemosol	Medarex/Seattle Genetics	
HML-110 -- Hemosol	netrina 1 humana-- Exelixis	
HML-121 -- Hemosol	anticuerpos contra virus del papiloma humano -- Epicyte	
hNLP -- Pharis	Vacuna contra virus del papiloma humano -- Biotech	
Vacuna contra anquilostoma	Australia, IDEC, StressGen	
	Vacuna contra virus del papiloma humano MEDI 501 --	
	MedImmune/GlaxoSmithKline	
	Vacuna contra virus del papiloma humano	
	MEDI 503/MEDI 504 --	
	MedImmune/GlaxoSmithKline	
	Vacuna contra virus del papiloma humano TA-CIN --	
	Cantab Pharmaceuticals	

FIGURA 7N

Vacuna contra virus del papiloma humano TA-HPV-- Cantab Pharmaceuticals	toxina de fusión IL-7-Dap 389 -- Ligand
Vacuna contra virus del papiloma humano, TA-GW -- Cantab/GlaxoSmithKline	IM-862 -- Cytran
anticuerpos policlonales humanos -- Biosite/Eos	IMC-1C11 -- ImClone
BioTech./ Medarex	imiglucerasa -- Genzyme
anticuerpos monoclonales anti-factor VIII tipo II humanos -- ThromboGenics	Inmunoglobulina intravenosa (humana) -- Hoffman La Roche
anticuerpos monoclonales murinos anti-glicoproteína Ib humanizados -- ThromboGenics	Factor de privilegio inmunitario-- Proneuron
HumaRAD -- Intracell	Immunocal -- Immunotec
HuMax EGFR -- Genmab	Terapia inmunogénica -- Briana Bio-Tech
HuMax-CD4 -- Medarex	Dipalmitato de 5-fluorodesoxiuridina inmunoliposomal --
HuMax-IL15 -- Genmab	vacuna inmunosupresora -- Aixlie
HYB 190 -- Hybridon	inmunotoxina -- Antisoma, NIH
HYB 676 -- Hybridon	ImmuRAIT-Re-188 -- Immunomedics
I-125 MAb A33 -- Celltech	imreg-1 -- Imreg
Ibritumomab tiuxetan -- IDEC	esterilidad-- Johnson & Johnson, E-TRANS
IBT-9401 -- Ibex	Infliximab -- Centocor
IBT-9402 -- Ibex	Vacuna contra virus influenza-- Aventis Pasteur,
IC 14 -- ICOS	Protein Sciences
Idarubicina anti-Ly-2.1 --	inhibina-- Biotech Australia, Human
IDEC 114 -- IDEC	Therapeutics
IDEC 131 -- IDEC	Terapia génica de proteína G inhibidora
IDEC 152 -- IDEC	INKP-2001 -- InKine
IDM 1 -- IDM	Inolimomab -- Diaclone
IDPS -- Hollis-Eden Pharmaceuticals	insulina-- AutoImmune, Altea, Biobras,
iduronato-2-sulfatasa -- Transkaryotic Therapies	BioSante, Bio-Tech. General, Chong Kun
IGF/IBP-2-13 -- Pharis	Dang, Emisphere, Flamel, Provalis, Rhein
IGN-101 -- Igeneon	Biotech, TranXenoGen
IK HIR02 -- Iketon	insulina (bovina) -- Novartis
IL-11 -- Genetics Institute/AHP	análogo de insulina-- Eli Lilly
IL-13-PE38 -- NeoPharm	insulina aspart -- Novo Nordisk
receptor de IL-17 -- Immunex	insulina detemir-- Novo Nordisk
IL-18BP -- Yeda	insulina glargina -- Aventis
IL-1Hy1 -- Hyseq	insulina inhalada-- Inhale Therapeutics
IL-1β -- Celltech	Systems, Alkermes
Adyuvante de IL-1 β -- Celltech	insulina oral-- Inovax
IL-2 -- Chiron	insulina, AeroDose -- AeroGen
IL-2 + IL-12 -- Hoffman La-Roche	insulina, AERx -- Aradigm
fusión IL-6/sIL-6R -- Hadasit	insulina, BEODAS -- Elan
derivado de IL-6R-- Tosoh	insulina, Biphasix -- Helix
	insulina, bucal-- Generex
	insulina, I2R-- Flemington
	insulina, intranasal -- Bentley

FIGURA 70

insulina, oral-- Nobex, Unigene	interferón gamma -- Boehringer Ingelheim, Sheffield, Rentschler, Hayashibara
insulina, Orasome -- Endorex	receptor de interferón, tipo I -- Serono
insulina, ProMaxx -- Epic	interferón (gamma 1B)-- Genentech
insulina, Quadrant-- Elan	interferón alfa 2b + ribavirina -- Biogen, ICN
insulina, recombinante-- Aventis	terapia génica de interferón alfa 2b -- Schering-Plough
insulina, Spiros -- Elan	terapia génica de interferón con1
insulina, Transfersome -- IDEA	antagonistas de interleucina 1-- Dompe
insulina, Zymo, recombinante -- Novo Nordisk	antagonista de receptor de interleucina 1-- Abbott
insulinotropina -- Scios	Bioresearch, Pharmacia
Terapia génica de insulinsina --	receptor de interleucina 1 tipo I-- Immunex
antagonistas de integrina -- Merck	receptor de interleucina 1 tipo II-- Immunex
interferón (alfa 2) -- SRC VB VECTOR, Viragen, Dong-A, Hoffman La-Roche, Genentech	interleucina 1 trampa-- Regeneron
interferón -- BioMedicines, Human Genome Sciences	interleucina 1 alfa -- Immunex/Roche
interferón (alfa-n3) —Interferon Sciences Intl.	interleucina 2 -- SRC VB VECTOR, Ajinomoto, Biomira, Chiron
interferón (alfa), Biphasix -- Helix	IL-2/toxina diftérica -- Ligand
interferón (alfa) —Amgen, BioNative, Novartis, Genzyme Transgenics, Hayashibara, Inhale Therapeutics Systems, Medusa, Flamel, Dong-A, GeneTrol, Nastech, Shantha, Wassermann, LG Chem, Sumitomo, Aventis, Behring EGIS, Pepgen, Servier, Rhein Biotech,	interleucina 3-- Cangene
interferón (alfa 2A)	interleucina 4-- Immunology Ventures, Sanofi Winthrop, Schering-Plough, Immunex/ Sanofi Winthrop, Bayer, Ono
interferón (alfa 2B) -- Enzon, Schering-Plough, Biogen, IDEA	interleucina 4 + TNF-alfa -- NIH
interferón (alfa N1) -- GlaxoSmithKline	agonista de interleucina 4-- Bayer
interferón (beta)-- Rentschler, GeneTrol, Meristem, Rhein Biotech, Toray, Yeda, Daiichi, Mochida	toxina de fusión de interleucina 4 -- Ligand
interferón (beta 1A)-- Serono, Biogen	receptor de interleucina 4 -- Immunex, Immun
interferón (beta 1A), inhalado-- Biogen	interleucina 6 -- Ajinomoto, Cangene, Yeda, Genetics Institute, Novartis
interferón (β1b) -- Chiron	proteína de fusión de interleucina 6
interferón (tau)-- Pepgen	toxina de fusión de interleucina 6 -- Ligand, Serono
interferón alfacón-1 -- Amgen	interleucina 7-- IC Innovations
vacuna de interferón alfa 2a	receptor de interleucina 7-- Immunex
interferón beta 1b -- Schering/Chiron, InterMune	antagonistas de interleucina 8-- Kyowa Hakko/Millennium/Pfizer
	antagonistas de interleucina 9-- Genaera
	interleucina 10 -- DNAX, Schering-Plough
	terapia génica de interleucina 10
	interleucina 12 -- Genetics Institute, Hoffman La-Roche
	interleucina 13 -- Sanofi
	antagonistas de interleucina 13-- AMRAD
	interleucina 13-PE38QQR

FIGURA 7P

interleucina 15 -- Immunex
 interleucina 16 -- Research Corp
 interleucina 18 -- GlaxoSmithKline
 proteína de unión a interleucina 18 -Serono
 Ior-P3 -- Center of Molecular Immunology
 IP-10 -- NIH
 IPF -- Metabolex
 IR-501 -- Immune Response
 ISIS 9125 -- Isis Pharmaceuticals
 ISURF n.º 1554 -- Millennium
 ISURF n.º 1866 -- Iowa State Univer.
 ITF-1697 -- Italfarmaco
 IxC 162 -- Ixion
 J 695 -- Cambridge Antibody Tech.,
 Genetics Inst., Knoll
 Jagged + FGF -- Repair
 JKC-362 -- Phoenix Pharmaceuticals
 JTP-2942 -- Japan Tobacco
 Anticuerpos monoclonales humanos --
 Medarex/Raven
 K02 -- Axys Pharmaceuticals
 Keliximab -- IDEC
 Hemocianina de lapa californiana
 KGF -- Amgen
 KM 871 -- Kyowa
 KPI 135 -- Scios
 KPI-022 -- Scios
 Kringle 5
 KSB 304
 KSB-201 -- KS Biomedix
 L 696418 -- Merck
 L 703801 -- Merck
 L1 -- Acorda
 L-761191 -- Merck
 lactoferrina -- Meristem, Pharming, Agennix
 lactoferrina cardio -- Pharming
 LAG-3 -- Serono
 LAIT -- GEMMA
 citotoxina de células LAK -- Arizona
 lamelarinas -- PharmaMar/University of
 Malaga
 péptidos de laminina A -- NIH
 lanotepasa -- Genetics Institute
 Iaronidasa -- BioMarin
 vacuna contra fiebre de Lassa
 LCAT -- NIH
 LDP 01 -- Millennium
 LDP 02 -- Millennium
 superóxido dismutasa lecitinizada
 Seikagaku
 Adyuvante de LelF -- Corixa
 vacuna contra la leishmaniosis -- Corixa
 Ienercept -- Hoffman La-Roche
 Lenograstim -- Aventis, Chugai
 lepirudina -- Aventis
 leptina -- Amgen, IC Innovations
 terapia génica de leptina -- Chiron Corporation
 leptina, 2ª generación -- Amgen
 Ieridistim -- Pharmacia
 Ieuprolida, ProMaxx -- Epic
 Ieuprorelina, oral -- Unigene
 LeuTech -- Papatin
 LEX 032 -- SuperGen
 LIDEPT -- Novartis
 Lintuzumab (AcM anti-CD33) -- Protein
 Design Labs
 lipasa -- Altus Biologics
 vacuna de lípido A -- EntreMed
 anclaje unido a lípidos Tech. -- ICRT, ID
 Biomedical
 liposoma-CD4 Tech. -- Sheffield
 Vacuna de Listeria monocytogenes
 LMB 1
 LMB 7
 LMB 9 -- Battelle Memorial Institute, NIH
 LM-CD45 -- Cantab Pharmaceuticals
 Iovastatina -- Merck
 LSA-3
 recetor de LT-β -- Biogen
 vacuna contra cáncer de pulmón -- Corixa
 Iusupultida -- Scios
 L-Vax -- AVAX
 LY 355455 -- Eli Lilly
 LY 366405 -- Eli Lilly
 LY-355101 -- Eli Lilly

FIGURA 7Q

Vacuna de ADN contra enfermedad de Lyme -- Vical/Aventis Pasteur	MDX 240 -- Medarex MDX 33
Vacuna contra enfermedad de Lyme -- Aquila Biopharmaceuticals, Aventis, Pasteur, Symbicom, GlaxoSmithKline, Hyland Immuno, MedImmune	MDX 44 -- Medarex MDX 447 -- Medarex MDX H210 -- Medarex MDX RA -- Houston BioTech., Medarex
Vacuna contra virus de coriomeningitis linfocítico	ME-104 -- Pharmexa
Vacuna contra linfoma-- Biomira, Genitope LYP18 lys-plasminógeno, recombinante terapia génica contra enfermedad de almacenamiento lisosomal -- Avigen lisostafina -- Nutrition 21 M 23 -- Gruenenthal	Vacuna contra el sarampión Mecasermina -- Cephalon/Chiron, Chiron MEDI 488 -- MedImmune MEDI 500 MEDI 507 -- BioTransplant hormona de concentración de melamina -- Neurocrine Biosciences melanocortinas -- OMRF
Anticuerpos monoclonales M1-- Acorda Therapeutics MA 16N7C2 -- Corvas Intl.	Anticuerpos monoclonales contra melanoma-- Viragen vacuna contra melanoma-- GlaxoSmithKline, Akzo Nobel, Avant, Aventis Pasteur, Bavarian Nordic, Biovector, CancerVax, Genzyme Molecular Oncology, Humbolt, ImClone Systems, Memorial, NYU, Oxxon
vacuna contra malaria -- GlaxoSmithKline, AdProTech, Antigenics, Apovia, Aventis Pasteur, Axis Genetics, Behringwerke, CDCP, Chiron Vaccines, Genzyme Transgenics, Hawaii, MedImmune, NIH, NYU, Oxxon, Roche/Saramane, Biotech Australia, Rx Tech	Vacuna contra melanoma Magevac-- Therion potenciadores de memoria -- Scios vacuna contra meningococos B-- Chiron vacuna contra meningococos-- CAMR
Vacuna contra malaria CDC/NIIMALVAC-1 vacuna contra malaria, multicomponentes mamoglobina -- Corixa mamostatina -- Biotherapeutics lectina de unión a manano -- Natlmmu manano-MUC1 -- Psiron	Conjugado de vacuna contra meningococos de grupo B - North American Vaccine Vacuna contra meningococos de grupo B recombinante -- BioChem Vaccines, Microscience
MAP 30 Marinovir -- Phytera MARstem -- Maret MB-015 -- Mochida MBP -- ImmuLogic MCI-028 -- Mitsubishi-Tokyo MCIF -- Human Genome Sciences MDC -- Advanced BioScience -- Akzo Nobel, ICOS	Conjugado de vacuna contra meningococos de grupo Y - North American Vaccine Conjugado de vacuna contra meningococos de grupos A, B y C -- North American Vaccine Mepolizumab -- GlaxoSmithKline Metastatina -- EntreMed, Takeda Met-CkB7 -- Human Genome Sciences met-enkefalina -- TNI METH-1 -- Human Genome Sciences metioninasa -- AntiCancer Terapia génica de metionina liasa -- AntiCancer
MDX 11 -- Medarex MDX 210 -- Medarex MDX 22 -- Medarex MDX 22	

FIGURA 7R

Met-RANTES – Genexa Biomedical, Serono	AcM 323A3 – Centocor
Metreleptina	AcM 3C5
AcM inhibidor de microtúbulos	AcM 3F12
Immunogen/Abgenix	AcM 3F8
MGDF -- Kirin	AcM 42/6
MGV -- Progenics	AcM 425 -- Merck KGaA
micrina -- Endocrine	AcM 447-52D -- Merck Sharp & Dohme
microplasma -- ThromboGenics	conjugado de AcM 45-2D9 - hematopoyetina
MIF -- Genetics Institute	AcM 4B4
factor inhibidor de migración-- NIH	conjugado de AcM 4E3-CPA-- BCM Oncologia
Mim CD4.1 – Xycte Therapies	conjugado de AcM 4E3-daunorubicina
mirostipen -- Human Genome Sciences	AcM 50-6
Mitumomab (BEC-2) – ImClone Systems, Merck KGaA	AcM 50-61A – Institut Pasteur
MK 852 -- Merck	AcM 5A8 -- Biogen
MLN 1202 (anticuerpo monoclonal anti-CCR2) – Millenium Pharmaceuticals	conjugado de AcM 791T/36 - metotrexato
Mobenakina-- NIS	AcM 7c11.e8
molgramostim -- Genetics Institute, Novartis	conjugado de AcM 7E11 C5-selenocistamina
anticuerpos monoclonales-- Abgenix/Celltech, Immusol/ Medarex, Viragen/ Roslin Institute, Cambridge Antibody Tech./Elan	AcM 93KA9 -- Novartis
AcM 108 –	conjugado de AcM A5B7 - cisplatino -- Biodynamics Research, Pharmacia
AcM 10D5 --	AcMA5B7-I-131
AcM 14.18-interleucina 2 inmunocitocina --	AcMA7
Lexigen	AcMA717 -- Exocell
AcM 14G2a –	conjugado de AcM A7 - zinostatina
AcM 15A10 –	AcMABX-RB2 -- Abgenix
AcM 170 -- Biomira	AcMACA 11
AcM177Lu CC49 --	AcMAFP-I-131 – Immunomedics
AcM17F9	AcM AP1
AcM 1D7	AcM AZ1
AcM 1F7 – Immune Network	conjugado de AcM B3 - LysPE40
conjugado de AcM 1H10-doxorubicina	AcM B4 – United Biomedical
AcM 26-2F	conjugado de AcM B43 genisteína
AcM 2A11	AcM B43.13-Tc-99m -- Biomira
AcM 2E1 -- RW Johnson	conjugado de AcM B43-PAP
AcM 2F5	conjugado de AcM B4G7-gelonina
AcM 31.1 -- International BioImmune Systems	conjugado de AcM BCM 43-daunorubicina -- BCM Oncologia
AcM 32 -- Cambridge Antibody Tech., Peptech	AcM BIS-1
	AcM BMS 181170 -- Bristol-Myers Squibb
	AcM BR55-2
	AcM BW494
	conjugado de AcM C 242-DM1 -- ImmunoGen

FIGURA 7S

conjugado de AcM C242-PE	conjugado de AcM KS1-4-metotrexato
AcM c30-6	AcM L6 -- Bristol-Myers Squibb, Oncogen
conjugado de AcM CA208-citorrodina-S -- Hoechst Japan	AcM LiCO 16-88
AcM CC49 -- Enzon	AcM LL2-I-131 -- Immunomedics
AcM ch14.18 --	AcM LL2-Y-90
proteína de fusión de AcM CH14.18-GM-CSF -- Lexigen	AcM LS2D617 -- Hybritech
AcM chCE7	conjugado de AcM LYM-1-gelonina
AcM CI-137 -- AMRAD	AcM LYM-1-I-131
conjugado de AcM cisplatino	AcM LYM-1-Y-90
AcM CLB-CD19	AcM LYM-2 -- Peregrine
AcM CLB-CD19v	AcM M195
AcM CLL-1 -- Peregrine	conjugado de AcM M195-bismuto 213 -- Protein Design Labs
conjugado de AcM CLL-1-GM-CSF	conjugado de AcM M195-gelonina
conjugado de AcM CLL-1-IL-2 -- Peregrine	AcM M195-I-131
conjugados de AcM CLN IgG - doxorubicina	AcM M195-Y-90
conjugados de AcM- TanOX	AcM MA 33H1 -- Sanofi
AcM D612	AcM MAD11
AcM Dal B02	AcM MGb2
AcM DC101 -- ImClone	AcM MINT5
AcM EA 1 --	AcM MK2-23
AcM EC708 -- Biovation	conjugado de AcM MOC31 ETA(252-613)
AcM EP-5C7 -- Protein Design Labs	AcM MOC-31-In-111
AcM ERIC-1 -- ICRT	conjugado de AcM MOC-31-PE
terapia génica de AcM F105	AcM MR6 --
AcM FC 2.15	AcM MRK-16 -- Aventis Pasteur
AcM G250 -- Centocor	AcM MS11G6
AcM GA6	AcM MX-DTPA BrE-3
AcM GA733	AcM MY9
AcM Gliomab-H -- Viventia Biotech	AcM Nd2 -- Tosoh
conjugado de AcM HB2-saporina	AcM NG-1 -- Hygeia
AcM HD 37 --	AcM NM01 -- Nissin Food
conjugado de AcM HD37-cadena A de ricina	AcM OC 125
AcM HNK20 -- Acambis	conjugado de AcM OC 125-CMA
conjugado de AcM huN901-DM1 -- ImmunoGen	AcM OKI-1 -- Ortho-McNeil
AcM I-131 CC49 -- Corixa	AcM OX52 -- Bioproducts for Science
AcM ICO25	AcM PMA5
conjugado de AcM ICR12-CPG2	AcM PR1
AcM ICR-62	AcM prost 30
conjugado de AcM IRac-ricina A	AcM R-24
AcM K1	AcM R24 α GD3 humano -- Celltech
	conjugado de AcM RFB4-cadena A de ricina
	conjugado de AcM RFT5-cadena A de ricina

FIGURA 7T

AcMSC 1	tolerancia mucosa -- Aberdeen
AcMSM-3 -- ICRT	sust. inhibidora mulleriana
AcMSMART 1D10 -- Protein Design Labs	muplestim -- Genetics Institute, Novartis,
AcMSMART ABL 364 -- Novartis	Agentes anti-infección de DSM
AcMSN6f	AcM murino -- KS Biomedix
conjugado de AcM SN6f-cadena de	somatropina mutante -- JCR Pharmaceutical
ricina A desglucosilada	MV 833 -- Toagosei
AcM SN6j	vacuna contra Mycoplasma pulmonis
conjugado de AcM SN7-cadena A de ricina	Mycoprex -- XOMA
conjugado de AcM T101-Y90 -- Hybritech	mieloperoxidasa -- Henogen
AcMT-88 -- Chiron	miostatina -- Genetics Institute
AcMTB94 -- Cancer ImmunoBiology	Nacolomab tafenatox -- Pharmacia
AcMTEC 11	Nagrecor -- Scios
AcMTES-23 -- Chugai	nagrestipen -- British Biotech
AcMTM31 -- Avant	NAP-5 -- Corvas Intl.
AcMTNT-1 -- Cambridge Antibody Tech.,	NAPc2 -- Corvas Intl.
Peregrine	nartograstim -- Kyowa
AcMTNT-3	Natalizumab -- Protein Design Labs
proteína de fusión de AcM TNT-3 -- IL2 --	Nateplasa -- NIH, Nihon Schering
AcM TP3-At-211	nateplasa -- Schering AG
conjugado de AcM TP3-PAP --	NBI-3001 -- Neurocrine Biosci.
AcMUJ13A -- ICRT	NBI-5788 -- Neurocrine Biosci.
AcMUN3	NBI-6024 -- Neurocrine Biosci.
conjugado de AcM ZME-018-gelonina	Inhibidores de Nef-- BRI
AcM-BC2 -- GlaxoSmithKline	Vacuna contra Neisseria gonorrhoea-- Antex
conjugado de AcM-DM1-- ImmunoGen	Biologics
conjugado de AcM-cadena A de ricina -- XOMA	conjugado de neomicina B-arginina
conjugados de AcM -temoporfin	Nerelimomab -- Chiron
Monopharm C -- Viventia Biotech	Factor de crecimiento nervioso-- Amgen -- Chiron,
monteplasa -- Eisai	Genentech
hidrato de montirelina-- Gruenenthal	Terapia génica de factor de crecimiento nervioso
moroctocog alfa -- Genetics Institute	citrato de nesiritida -- Scios
Moroctocog-alfa -- Pharmacia	neuregulina 2 -- CeNeS
MP 4	neurocano-- NYU
MP-121 -- Biopharm	sistema de suministro neuronal - CAMR
MP-52 -- Biopharm	Factor inhibidor de neutrófilos -- Corvas
MRA -- Chugai	Vacuna neuroprotectora -- University of
MS 28168 -- Mitsui Chemicals, Nihon	Auckland
Schering	quimeras neurotróficas -- Regeneron
toxina de fusión de MSH -- Ligand	factor neurotrófico -- NsGene, CereMedix
MSI-99 -- Genaera	NeuroVax -- Immune Response
MT 201 -- Micromet	neurturina-- Genentech
Vacuna de Muc-1-- Corixa	endopeptidasa neutra -- Genentech

FIGURA 7U

potenciadores de NGF - NeuroSearch
 Vacuna de NHL-- Large Scale Biology
 NIP45 -- Boston Life Sciences
 NKI-B20
 NM 01 -- Nissin Food
 NMI-139 -- NitroMed
 NMMP -- Genetics Institute
 NN-2211 -- Novo Nordisk
 Nogina -- Regeneron
 Nonacog alfa
 Norelina -- Biostar
 Vacuna contra el virus Norwalk
 NRLU 10 -- NeoRx
 NRLU 10 PE -- NeoRx
 NT-3 -- Regeneron
 NT-4/5 -- Genentech
 NU 3056
 NU 3076
 NX 1838 -- Gilead Sciences
 Antígeno NY ESO-1/CAG-3 -- NIH
 NYVAC-7 -- Aventis Pasteur
 NZ-1002 -- Novazyme
 terapia contra obesidad - Nobex
 OC 10426 -- Ontogen
 OC 144093 -- Ontogen
 OCIF -- Sankyo
 Oct-43 -- Otsuka
 Odulimomab -- Immunotech
 OK PSA - liposomal
 OKT3-gamma-1-ala-ala
 OM 991
 OM 992
 Omalizumab -- Genentech
 Oncoimmunin-L -- NIH
 Oncolisina B -- ImmunoGen
 Oncolisina CD6 -- ImmunoGen
 Oncolisina M -- ImmunoGen
 Oncolisina S -- ImmunoGen
 Oncofago -- Antigenics
 Oncostatina M -- Bristol-Myers Squibb
 OncoVax-CL -- Jenner Biotherapies
 OncoVax-P -- Jenner Biotherapies
 onercept -- Yeda
 vacuna contra oncomicosis -- Boehringer
 Ingelheim
 opebecan -- XOMA
 opioides -- Arizona
 Oprelvekina -- Genetics Institute
 Oregovomab -- AltaRex
 Org-33408 b-- Akzo Nobel
 Orolip DP -- EpiCept
 orizacistatina
 péptidos de OSA -- GenSci Regeneration
 GF de cadherina de osteoblastos-- Pharis
 terapia génica de osteocalcina-timidina cinasa
 proteína osteogénica -- Curis
 osteopontina -- OraPharma
 péptidos de osteoporosis -- Integra, Telios
 osteoprotegerina -- Amgen, SnowBrand
 vacunas contra otitis media-- Antex Biologics
 cáncer de ovarios-- University of Alabama
 proteína de fusión OX40-IgG -- Cantab, Xenova
 P 246 -- Diatide
 P 30 -- Alfacell
 p1025 -- Active Biotech
 P-113^A -- Demegen
 péptido P-16 -- Transition Therapeutics
 p43 -- Ramot
 péptido P-50-- Transition Therapeutics
 vacuna de p56 + RAS -- NIH, NCI
 análogo de PACAP(1-27)
 vacunas pediátricas-- Chiron
 Pafase -- ICOS
 ADN de plásmido PAGE-4-- IDEC
 PAI-2 -- Biotech Australia, Human
 Therapeutics
 Palifermina (factor de crecimiento de queratinocitos) --
 Amgen
 Palivizumab -- MedImmune
 PAM 4 -- Merck
 pamiteplasa -- Yamanouchi
 pancreatina, Minitabs -- Eurand
 Pangen -- Fournier
 Pantarina -- Selective Genetics
 Vacuna contra virus parainfluenza -- Pharmacia,
 Pierre Fabre

FIGURA 7V

paraoxanasa -- Esperion	vacuna peptídica -- NIH ,NCI
hormona paratiroidea – Abiogen, Korea	Pexelizumab
Green Cross	acetato de pexiganano– Genaera
hormona paratiroidea (1-34) --	Pharmaprojects n.º 3179 -- NYU
Chugai/Suntory	Pharmaprojects n.º 3390 -- Ernest Orlando
terapia génica contra enfermedad de Parkinson	Pharmaprojects n.º 3417 -- Sumitomo
-- Cell Genesys /Ceregene	Pharmaprojects n.º 3777 -- Acambis
Vacuna contra parvovirus -- Medimmune	Pharmaprojects n.º 4209 -- XOMA
PCP-Scan – Immunomedics	Pharmaprojects n.º 4349 -- Baxter Intl.
PDGF -- Chiron	Pharmaprojects n.º 4651
Cóctel de PDGF -- Theratechnologies	Pharmaprojects n.º 4915 -- Avanir
terapia contra alergia a cacahuetes -- Dynavax	Pharmaprojects n.º 5156 -- Rhizogenics
PEG-AcM anti-ICAM -- Boehringer	Pharmaprojects n.º 5200 -- Pfizer
Ingelheim	Pharmaprojects n.º 5215 -- Origene
PEG-asparaginasa -- Enzon	Pharmaprojects n.º 5216 -- Origene
PEG-glucocerebrosidasa	Pharmaprojects n.º 5218 -- Origene
PEG-hirudina-- Knoll	Pharmaprojects n.º 5267 -- ML
PEG-interferón alfa 2a -- Roche	Laboratories
PEG-interferón alfa 2b + ribavirina --	Pharmaprojects n.º 5373 -- MorphoSys
Biogen, Enzon, ICN Pharmaceuticals,	Pharmaprojects n.º 5493 -- Metabolex
Schering-Plough	Pharmaprojects n.º 5707 -- Genentech
PEG-AcM A5B7	Pharmaprojects n.º 5728 -- Autogen
Pegacaristim – Amgen -- Kirin Brewery --	Pharmaprojects n.º 5733 -- BioMarin
ZymoGenetics	Pharmaprojects n.º 5757 -- NIH
Pegaldesleucina -- Research Corp	Pharmaprojects n.º 5765 -- Gryphon
pegaspargasa -- Enzon	Pharmaprojects n.º 5830 -- AntiCancer
pegfilgrastim -- Amgen	Pharmaprojects n.º 5839 -- Dyax
PEG-interferón alfa -- Viragen	Pharmaprojects n.º 5849 -- Johnson &
PEG-interferón alfa 2A -- Hoffman La-	Johnson
Roche	Pharmaprojects n.º 5860 -- Mitsubishi-
PEG-interferón alfa 2B -- Schering-	Tokyo
Plough	Pharmaprojects n.º 5869 -- Oxford
PEG-r-hirudina-- Abbott	GlycoSciences
PEG-rHuMGDF -- Amgen	Pharmaprojects n.º 5883 -- Asahi Brewery
PEG-uricasa -- Mountain View	Pharmaprojects n.º 5947 -- StressGen
Pegvisomant – Genentech	Pharmaprojects n.º 5961 --
proteínas pegiladas, poliMASC -- Valentis	Theratechnologies
leptina humana nativa recombinante pegilada	Pharmaprojects n.º 5962 -- NIH
-- Roche	Pharmaprojects n.º 5966 -- NIH
Pentumomab	Pharmaprojects n.º 5994 -- Pharming
Penetratina -- Cyclacel	Pharmaprojects n.º 5995 -- Pharming
Pepscan – Antisoma	Pharmaprojects n.º 6023 -- IMMUCON
péptido G – Peptech, ICRT	Pharmaprojects n.º 6063 -- Cytoclonal

FIGURA 7W

Pharmaprojects n.º 6073 -- SIDDCO	Vacuna contra pneumococos -- Antex Biologics,
Pharmaprojects n.º 6115 -- Genzyme	Aventis Pasteur
Pharmaprojects n.º 6227 -- NIH	Vacuna contra pneumococos intranasal --
Pharmaprojects n.º 6230 -- NIH	BioChem Vaccines/Biovector
Pharmaprojects n.º 6236 -- NIH	PR1A3
Pharmaprojects n.º 6243 -- NIH	PR-39
Pharmaprojects n.º 6244 -- NIH	pralmorelina -- Kaken
Pharmaprojects n.º 6281 -- Senetek	linfoma Pretarget -- NeoRx
Pharmaprojects n.º 6365 -- NIH	Priliximab -- Centocor
Pharmaprojects n.º 6368 -- NIH	PRO 140 -- Progenics
Pharmaprojects n.º 6373 -- NIH	PRO 2000 -- Procept
Pharmaprojects n.º 6408 -- Pan Pacific	PRO 367 -- Progenics
Pharmaprojects n.º 6410 -- Athersys	PRO 542 -- Progenics
Pharmaprojects n.º 6421 -- Oxford GlycoSciences	pro-Apo A-I -- Esperion
Pharmaprojects n.º 6522 -- Maxygen	prolactina -- Genzyme
Pharmaprojects n.º 6523 -- Pharis	Prosaptida TX14(A) -- Bio-Tech. General
Pharmaprojects n.º 6538 -- Maxygen	anticuerpos contra cáncer de próstata-- Immunex,
Pharmaprojects n.º 6554 -- APALEXO	UroCor
Pharmaprojects n.º 6560 -- Ardana	terapia con anticuerpos contra cáncer de próstata--
Pharmaprojects n.º 6562 -- Bayer	Genentech/UroGenesys,
Pharmaprojects n.º 6569 -- Eos	Productos de terapia génica
Fenoxacina	productos inmunotera. contra cáncer de próstata-- The
Fenilasa -- Ibex	PSMA Development Company
Factor derivado de epitelio pigmentario -- inhibidor 1 de activador de plasminógeno, recombinante -- DuPont Pharmaceuticals	vacuna contra cáncer de próstata-- Aventis Pasteur, Zonagen, Corixa, Dendreon, Jenner Biotherapies, Therion Biologics
Activadores de plasminógeno -- Abbott Laboratories, American Home Products, Boehringer Mannheim, Chiron Corporation, DuPont Pharmaceuticals, Eli Lilly, Shionogi, Genentech, Genetics Institute, GlaxoSmithKline, Hemispherx Biopharma, Merck & Co, Novartis, Pharmacia Corporation, Wakamoto, Yeda	antígeno específico de próstata -- EntreMed proteína A -- RepliGen adhesivos proteicos -- Enzon proteína C -- Baxter Intl., PPL Therapeutics, ZymoGenetics activador de proteína C -- Gilead Sciences antag. de proteína cinasa R -- NIH protirelina -- Takeda protocadherina 2 -- Caprion
péptidos relacionados con plasminógeno -- Bio.Tech. Pro-urocinasa-- Abbott, Bristol-Myers General/MGH	ligando 1 de glicoproteína de P-selectina-- Genetics Institute
factor plaquetario 4 -- RepliGen	infecciones por pseudomonas -- InterMune
factor de crecimiento derivado de plaquetas -- Amgen -- ZymoGenetics	vacuna contra pseudomonas -- Cytovax
plusonermina -- Hayashibara	PSGL-Ig -- American Home Products
PMD-2850 -- Protherics	PSP-94 -- Procyon

FIGURA 7X

PTH 1-34 -- Nobex
 Quilimmune-M -- Antigenics
 R 744 -- Roche
 R 101933
 R 125224 -- Sankyo
 Terapia RA -- Cardion
 Vacuna contra la rabia recombinante -- Aventis
 Pasteur, BioChem Vaccines, Kaketsuken
 Pharmaceuticals
 RadioTheraCIM -- YM BioSciences
 Proyecto Ramot n.º 1315 -- Ramot
 Proyecto Ramot n.º K-734A -- Ramot
 Proyecto Ramot n.º K-734B -- Ramot
 Ranibizumab (fragmento anti-VEGF) --
 Genentech
 RANK -- Immunex
 ranpirnasa -- Alfacell
 ranpirnasa-AcM anti-CD22 -- Alfacell
 inhibidor de RANTES-- Milan
 sistemas de administración de fármacos
 RAPID -- ARIAD
 rasburicasa -- Sanofi
 rBPI-21, tópico -- XOMA
 RC 529 -- Corixa
 rCFTR -- Genzyme Transgenics
 RD 62198
 rADNasa-- Genentech
 RDP-58 -- SangStat
 ReceptTox-Fce -- Keryx
 ReceptTox-GnRH -- Keryx, MTR
 Technologies
 ReceptTox-MBP -- Keryx, MTR
 Technologies
 recFSH -- Akzo Nobel, Organon
 REGA 3G12
 Regavirumab -- Teijin
 relaxina-- Connetics Corp
 vacuna contra cáncer renal -- Macropharm
 repifermina -- Human Genome Sciences
 vacuna de PFP-2 de virus sincitial respiratorio --
 Wyeth-Lederle
 vacuna contra virus sincitial respiratorio --
 GlaxoSmithKline, Pharmacia, Pierre Fabre
 vacuna contra virus sincitial respiratorio
 inactivada
 vacuna contra virus sincitial respiratorio-
 virus parainfluenza -- Aventis Pasteur,
 Pharmacia
 Reteplasa -- Boehringer Mannheim,
 Hoffman La-Roche
 Retropep -- Retroscreen
 RFB4 (dsFv) PE38
 RFI 641 -- American Home Products
 RFTS -- UAB Research Foundation
 RG 12986 -- Aventis Pasteur
 RG 83852 -- Aventis Pasteur
 RG-1059 -- RepliGen
 rGCR -- NIH
 rGLP-1 -- Restoragen
 rGRF -- Restoragen
 insulina rh -- Eli Lilly
 péptidos de direccionamiento a RHAMM
 -- Cangene
 rHb1.1 -- Baxter Intl.
 rhCC10 -- Claragen
 rhCG -- Serono
 terapia génica contra artritis reumatoide
 vacuna contra artritis reumatoide-- Veterans
 Affairs Medical Center
 rhLH -- Serono
 terapia génica de ribozimas-- Genset
 vacuna contra rikettsiosis recombinante
 RIGScan CR -- Neoprobe
 RIP-3 -- Rigel
 Rituximab -- Genentech
 RK-0202 -- RxKinetix
 péptido RLT -- Esperion
 rM/NEI -- IVAX
 rmCRP -- Immtech
 RN-1001 -- Renovo
 RN-3 -- Renovo
 conjugado de ADNasa -- Immunomedics
 RO 631908 -- Roche
 vacuna contra rotavirus-- Merck
 RP 431 -- DuPont Pharmaceuticals
 RP-128 -- Resolution
 Terapia génica de RPE65 --

FIGURA 7Y

RPR 110173 -- Aventis Pasteur	SERP-1 -- Viron
RPR 115135 -- Aventis Pasteur	sertenef -- Dainippon
RPR 116258A -- Aventis Pasteur	albúmina sérica, recombinante humana --
rPSGL-Ig -- American Home Products	Aventis Behring
tensioactivo r-SPC -- Byk Gulden	factor derivado de suero-- Hadasit
anticuerpo contra VSR -- Medimmune	Sevirumab -- Novartis
Ruplizumab -- Biogen	SGN 14 -- Seattle Genetics
rV-HER-2/neu -- Therion Biologics	SGN 15 -- Seattle Genetics
SA 1042 -- Sankyo	SGN 17/19 -- Seattle Genetics
sacrosidasa -- Orphan Medical	SGN 30 -- Seattle Genetics
Sant 7	SGN-10 -- Seattle Genetics
Sargramostim -- Immunex	SGN-11 -- Seattle Genetics
saruplasa -- Gruenenthal	SH 306 -- DuPont Pharmaceuticals
Satumomab -- Cytogen	Shanvac-B -- Shantha
SB 1 -- COR Therapeutics	vacuna contra Shigella flexneri-- Avant, Acambis,
SB 207448 -- GlaxoSmithKline	Novavax
SB 208651 -- GlaxoSmithKline	vacuna contra Shigella sonnei --
SB 240683 -- GlaxoSmithKline	sICAM-1 -- Boehringer Ingelheim
SB 249415 -- GlaxoSmithKline	Silteplasa -- Genzyme
SB 249417 -- GlaxoSmithKline	vacuna contra VIS -- Endocon, Institut Pasteur
SB 6 -- COR Therapeutics	SK 896 -- Sanwa Kagaku Kenkyusho
SB RA 31012 --	SK-827 -- Sanwa Kagaku Kenkyusho
SC 56929 -- Pharmacia	Skeletex -- CellFactors
proteínas de unión a SCA--Curis, Enzon	SKF 106160 -- GlaxoSmithKline
scFv(14E1)-ETA Berlex Laboratories,	S-nitroso-AR545C --
Schering AG	SNTP -- Active Biotech
ScFv(FRP5)-ETA --	somatomedina 1 -- GroPep, Mitsubishi-
ScFv6C6-PE40 --	Tokyo, NIH
SCH 55700 -- Celltech	proteína portadora de somatomedina 1-- Insmed
vacuna contra esquistosomiasis -- Glaxo	somatostatina-- Ferring
Wellcome/Medeva, Brazil	somatotropina /
SCPF -- Advanced Tissue Sciences	hormona del crecimiento humana-- Bio-Tech.
complejo scuPA-suPAR -- Hadasit	General, Eli Lilly
SD-9427 -- Pharmacia	somatropina -- Bio-Tech. General, Alkermes,
SDF-1 -- Ono	ProLease, Aventis Behring, Biovector,
SDZ 215918 -- Novartis	Cangene, Dong-A, Eli Lilly, Emisphere,
SDZ 280125 -- Novartis	Enact, Genentech, Genzyme Transgenics,
SDZ 89104 -- Novartis	Grandis/InfiMed, CSL, InfiMed, MacroMed,
SDZ ABL 364 -- Novartis	Novartis, Novo Nordisk, Pharmacia
SDZ MMA 383 -- Novartis	Serono, TranXenoGen
Secretina-- Ferring, Repligen	derivado de somatropina -- Schering AG
inhib. de serina proteasa-- Pharis	somatropina, AIR -- Eli Lilly
acetato de sermorelina -- Serono	somatropina, inhalada -- Eli Lilly/Alkermes

FIGURA 7Z

somatropina, Kabi -- Pharmacia
 somatropina, Orasome -- Novo Nordisk
 sonermina -- Dainippon Pharmaceutical
 SP(V5.2)C -- Supertek
 SPf66
 esfingomielinasa -- Genzyme
 SR 29001 -- Sanofi
 SR 41476 -- Sanofi
 SR-29001 -- Sanofi
 SS1(dsFV)-PE38 -- NeoPharm
 microglobulina β 2-- Avidex
 proteínas de fusión de microglobulina β 2 -- NIH
 péptidos β -amiloides -- CeNeS
 β -defensina -- Pharis
 infecciones por Staphylococcus aureus --
 Inhibitex/ZLB
 conjugado de vacuna contra
 Staphylococcus aureus -- Nabi
 Terapia contra Staphylococcus -- Tripep
 Estafilocinasa -- Biovation, Prothera,
 Thrombogenetics
 Vacuna contra estreptococos A -- M6
 Pharmaceuticals, North American Vaccine
 Vacuna contra estreptococos B -- Microscience
 Vacuna contra estreptococos B recombinante --
 Biochem Vaccines
 Vacuna contra Streptococcus pyogenes
 STRL-33 -- NIH
 Subalina -- SRC VB VECTOR
 SUIS -- United Biomedical
 SUIS-LHRH -- United Biomedical
 SUN-E3001 -- Suntory
 anticuerpos monoclonales de super-alta afinidad --
 YM BioSciences
 Superóxido dismutasa -- Chiron, Enzon,
 Ube Industries, Bio-Tech, Yeda
 superóxido dismutasa 2 -- OXIS
 supresina -- UAB Research Foundation
 SY-161-P5 -- ThromboGenics
 SY-162 -- ThromboGenics
 vacuna contra lupus eritematoso sistémico --
 MedClone/VivoRx
 péptidos de receptor de células T -- Xoma
 vacuna de péptidos de receptor de células T
 liposomas T4N5 -- AGI Dermatics
 TACI, soluble -- ZymoGenetics
 apoptosis dirigida -- Antisoma
 tasonermina -- Boehringer Ingelheim
 TASP
 TASP-V
 análogos de péptido Tat -- NIH
 TBP I -- Yeda
 TBP II
 TBV25H -- NIH
 Tc 99m ior cea1 -- Center of Molecular
 Immunology
 Tc 99m P 748 -- Diatide
 Tc 99m votumumab -- Intracell
 Tc-99m rh-Anexina V -- Theseus Imaging
 Teceleucina -- Biogen
 tenecteplasa -- Genentech
 Teriparatida -- Armour Pharmaceuticals,
 Asahi Kasei, Eli Lilly
 terlipresina -- Ferring
 testisina -- AMRAD
 tetrafabricina -- Roche
 TFPI -- EntreMed
 tgD-IL-2 -- Takeda
 TGF-alfa -- ZymoGenetics
 TGF- β -- Kolon
 TGF- β 2 -- Insmed
 TGF- β 3 -- OSI
 terapia génica contra talasemia -- Crucell
 TheraCIM-h-R3 -- Center of Molecular
 Immunology, YM BioSciences
 Theradigm-HBV -- Epimmune
 Theradigm-HPV -- Epimmune
 Theradigm-malaria -- Epimmune
 Theradigm-melanoma -- Epimmune
 TheraFab -- Antisoma
 ThGRF 1-29 -- Theratechnologies
 ThGRF 1-44 -- Theratechnologies
 Péptido activador de receptor de trombina --
 Abbott
 trombomodulina -- Iowa, Novocastra

FIGURA 7AA

Trombopoyetina -- Dragon Pharmaceuticals, Genentech	Factor de crecimiento transformante beta 1 -- Genentech
trombopoyetina, Pliva -- Receptron	proteína de transporte-- Genesis
Trombospondina 2 --	Trastuzumab -- Genetech
trombostatina -- Thromgen	TRH -- Ferring
timalfasina -- SciClone	Triabina-- Schering AG
timocartina -- Gedeon Richter	Triconal
timosina alfa 1 -- NIH	Triflavina
hormona estimulante del tiroides-- Genzyme	troponina I -- Boston Life Sciences
tICAM-1 -- Bayer	TRP-2^ -- NIH
péptido anticoagulante de garrapata -- Merck	inhibidor de tripsina-- Mochida
TIF -- Xoma	terapia génica de TSP-1 --
Tifacogina -- Chiron, NIS, Pharmacia	TT-232
Factor tisular -- Genentech	TTS-CD2 -- Active Biotech
Inhibidor de la ruta de factor tisular	vacuna contra tuberculosis-- Aventis Pasteur,
TJN-135 -- Tsumura	Genesis
TM 27 -- Avant	superantígenos dirigidos a tumor -- Active
TM 29 -- Avant	Biotech -- Pharmacia
TMC-151 -- Tanabe Seiyaku	vacunas contra tumor -- PhotoCure
TNF, factor de necrosis tumoral -- Asahi Kasei	conjugados de anticuerpo de profármaco activado
TNF alfa -- Cytlimmune	por tumor -- Millennium/ImmunoGen
Anticuerpo contra TNF -- Johnson & Johnson	tumstatina-- ILEX
Proteína de unión a TNF -- Amgen	Tuvirumab -- Novartis
Producto de degradación de TNF -- Oncotech	TV-4710 -- Teva
Receptor de TNF-- Immunex	receptor TWEAK -- Immunex
Receptor de TNF 1, soluble-- Amgen	TXU-PAP
TNF, factor de necrosis tumoral alfa -- Asahi	TY-10721 -- TOA Eiyo
Kasei, Genetech, Mochida	vacuna contra diabetes tipo I-- Research Corp
Inhibidor de TNF-alfa -- Tripep	vacuna tifoidea CVD 908
Terapia génica de TNFR:Fc -- Targeted Genetics	U 143677 -- Pharmacia
TNF-SAM2	U 81749 -- Pharmacia
TolerIMab -- Innogenetics	UA 1248 -- Arizona
vacuna contra <i>Toxoplasma gondii</i> --	UGIF -- Sheffield
GlaxoSmithKline	UIC 2
TP 9201 -- Telios	UK 101
TP10 -- Avant	UK-279276 -- Corvas Intl.
TP20 -- Avant	urodilatina -- Pharis
tPA -- Centocor	urofolitropina -- Serono
trafermina -- Scios	urocinasa -- Abbott
TRAIL/Apo2L -- Immunex	uteroferrina-- Pepgen
AcM TRAIL-R1 -- Cambridge Antibody	V 20 -- GLYCODESIGN
Technologies	vacunas de terapia génica de receptor de
proteínas de unión a transferrina -- CAMR	vasopresina V2 -- Active Biotech

FIGURA 7AB

vacuna de glicoproteína de varicela-zoster Research Corporation Technologies	vacuna de WT1 -- Corixa
vacuna contra virus varicela-zoster viva -- Cantab Pharmaceuticals	WX-293 -- Wilex BioTech.
factor de crecimiento endotelial vascular -- Genentech, University of California	WX-360 -- Wilex BioTech.
factores de crecimiento endoteliales vasculares -- R&D Systems	WX-UK1 -- Wilex BioTech.
agentes de direccionamiento vascular -- Peregrine	XMP-500 -- XOMA
agentes de potenciación de la vasopermeación -- Peregrine	XomaZyme-791 -- XOMA
vasostatina -- NIH	XTL 001 -- XTL Biopharmaceuticals
VCL -- Bio-Tech. General	XTL 002 -- XTL Biopharmaceuticals
VEGF -- Genentech, Scios	sistema de suministro de levaduras -- GlobelImmune
inhibidor de VEGF-- Chugai	Vacuna contra <i>Yersinia pestis</i>
VEGF-2 -- Human Genome Sciences	YIGSR-Stealth -- Johnson & Johnson
VEGF-Trampa -- Regeneron	Proyecto de Yissum n.º D-0460 -- Yissum
viscumina, recombinante -- Madaus	YM 207 -- Yamanouchi
Vitaxin	YM 337 -- Protein Design Labs
Vitrasa -- ISTA Pharmaceuticals	biotina marcada con itrio-90
Vacuna contra virus del Nilo Occidental -- Bavarian Nordic	AcM T84.66 anti-CEA marcado con itrio-90 --
WP 652	ZD 0490 -- AstraZeneca
	ziconotida -- Elan
	ZK 157138 -- Berlex Laboratories
	Zolimomab aritox
	Zorcell -- Immune Response
	Péptidos de ZRXL -- Novartis