

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 801**

51 Int. Cl.:

C07K 14/565 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2014 PCT/JP2014/058127**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14157107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2014 E 14776069 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2982686**

54 Título: **Polipéptido presentando cadenas de azúcares sialiladas unidas al mismo**

30 Prioridad:

29.03.2013 JP 2013073703

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

29.10.2018

73 Titular/es:

**GLYTECH, INC. (100.0%)
134 Chudoji-minamimachi Shimogyo-ku
Kyoto-shi, Kyoto 600-8813, JP**

72 Inventor/es:

**OHUCHI, MASAKI;
NISHIHARA, MIKA;
TEZUKA, KATSUNARI;
MAEDA, MASATOSHI;
KAJIHARA, YASUHIRO y
SAKAMOTO, IZUMI**

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 687 801 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

Polipéptido presentando cadenas de azúcares sialiladas unidas al mismo

Campo técnico

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un polipéptido glicosilado con una cadena de azúcares sialilada. Más específicamente, la presente invención se refiere a un polipéptido presentando una actividad glicosilada del interferón β con cadenas de azúcares sialiladas altamente uniformes.

Antecedentes de la técnica

10 **[0002]** El interferón β (IFN- β) natural humano es una glicoproteína que consiste en 166 residuos de aminoácidos. El interferón β pertenece a la familia de la citocina, y se sabe que interviene en la acción inmunorreguladora, la actividad antiviral, y la acción inhibitoria del crecimiento celular. El interferón β humano también tiene tres Cys en las posiciones 17, 31 y 141 en la secuencia de aminoácidos natural, y tiene un oligosacárido complejo unido a N en Asn en la posición 80. También se sabe que tiene un enlace disulfuro en Cys en las posiciones 31 y 141.

15 **[0003]** El interferón β como medicamento se elabora utilizando un sistema de expresión celular, y se clasifica en INF- β -1a o IFN- β -1b dependiendo de la diferencia en el huésped para su expresión. El IFN- β -1a es un sistema de expresión que emplea células derivadas de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), y es una glicoproteína que presenta cadenas de azúcares de forma similar a un interferón β natural. Por otro lado, el IFN- β -1b se expresa en la E. coli, y es una proteína sin cadenas de azúcares.

20 **[0004]** El IFN- β -1a se sabe que tiene un efecto más potente comparado con el IFN- β -1b en cuanto a la inmunogenicidad, actividad antiviral, y propiedades antitumorales. Además, la estructura de la cadena de azúcares contenida en una glicoproteína se sabe que tiene una fuerte influencia en la farmacocinética.

25 **[0005]** También se sabe que efectos como la mejora en la estabilidad física, la termoestabilidad y la estabilidad plasmática de la proteína se proporcionan enlazando un polímero soluble en agua, como el polietilenglicol (PEG), a la proteína. Existen informes en relación con el IFN- β PEGilado que esperan dichos efectos. Por ejemplo, hay informes en relación con un complejo de IFN- β que se ha PEGilado en el extremo N-terminal del IFN- β -1b (Literaturas de patente 1 y 2). También hay un informe en relación con un complejo de IFN- β que se ha PEGilado en el extremo N-terminal del IFN- β -1a (Literatura de patente 3). De hecho, dichas modificaciones pueden contribuir a las estabilidades anteriores de la proteína, pero mientras tanto causa preocupación que reduzcan la actividad del IFN- β como un medicamento. Por ejemplo, se informa que la actividad se reduce drásticamente en casos, por ejemplo, en los que el peso molecular del PEG es de 20 000 o más (Literatura no patente 1).

35 **[0006]** Teniendo en cuenta las preocupaciones sobre la PEGilación descritas anteriormente, también hay un informe sobre la selección de una posición que pueda mantener la actividad del IFN- β incluso cuando se enlaza un PEG con un alto peso molecular para la PEGilación en lugares específicos. No obstante, como el PEG es un compuesto que no existe *in vivo*, no se ha establecido una investigación suficiente en cuanto a la acumulabilidad, la seguridad y la efectividad de la administración de IFN- β PEGilado a largo plazo.

40 **[0007]** Mientras tanto, también existe un informe en relación a los complejos de IFN- β glicosilados en lugares específicos (Literatura de patente 5). En la Literatura de patente 5, se introduce una mutación de aminoácido en la secuencia de aminoácidos del IFN- β natural, de manera que tendrá una secuencia de consenso (Asn-X-Ser/Thr) que será el sitio de reconocimiento para una cadena de azúcares unida a N, y esto se expresa con células CHO. No obstante, con este método, las mutaciones de aminoácidos distintas de las del aminoácido a glicosilar se producirán a fin de introducir la secuencia de consenso. También se conoce en general que la uniformidad de las cadenas de azúcares ocurrirá cuando se expresen con células CHO. Asimismo, la Literatura de patente 6 da a conocer una variante del IFN- β , que, a fin de obtener un aumento suficiente de la vida media funcional *in vivo*, comprende al menos dos sitios de glicosilación introducidos, como 2-6 o 2-4 sitios de glicosilación introducidos. La fracción de azúcar unida a un sitio de glicosilación normalmente está sialilada.

Lista de referencias

[0008]

50 [Literatura de patente 1] Solicitud de patente estadounidense publicada U.S. 2009/0214472
 [Literatura de patente 2] Patente estadounidense U.S. 7829659
 [Literatura de patente 3] Patente estadounidense U.S. 7446173
 [Literatura de patente 4] Publicación internacional WO 2005/019260
 [Literatura de patente 5] Publicación internacional WO 02/074806

[Literatura de patente 6] Publicación internacional WO 2004/020468

[0009] [Literatura no patente 1]J. Control. Rel. Vol. 88, pp. 35-42 (2003)

Resumen de la invención

5 Problemas que se han de solucionar mediante la invención

[0010] Existe un ejemplo para modificar el polipéptido interferón β con PEG a fin de mejorar la estabilidad física, la termoestabilidad, la estabilidad de plasma y similares del interferón β , tal como se ha descrito anteriormente. No obstante, tal como se ha descrito anteriormente, la actividad del interferón β como un medicamento puede reducirse cuando se modifica con PEG. Además, como el PEG no es una sustancia que existe *in vivo*, existe una preocupación por el dolor inducido por fármacos debido a la acumulación *in vivo*.

[0011] Por otro lado, también existe un ejemplo de modificación de un polipéptido interferón β con una cadena de azúcares. Sin embargo, tal como se ha descrito anteriormente, se sabe que la uniformidad está causada en el tipo de cadena de azúcares añadida o la posición añadida cuando el interferón β glicosilado debe fabricarse por expresión en células CHO. Cuando las cadenas de azúcares no son uniformes, existe la posibilidad de que se cause una diferencia entre lotes en el efecto del fármaco como una medicina, y también se presenta la desventaja de que un interferón β glicosilado natural tiene un tiempo de retención en sangre corto.

Medios para solucionar el problema

[0012] Como resultado de una investigación exhaustiva por parte de los presentes inventores para resolver los problemas anteriores, encontramos que se obtiene un polipéptido glicosilado presentando una capacidad de retención en sangre superior y una actividad antitumoral superior que un interferón β humano natural al sustituir aminoácidos en de 4 a 6 ubicaciones con aminoácidos glicosilados en los que todos los extremos no reductores de la cadena de azúcares están sialilados en el polipéptido interferón β .

[0013] Dicho de otro modo, la presente invención, en un aspecto, se refiere a un polipéptido glicosilado presentando actividad de interferón β , caracterizado porque dicho polipéptido glicosilado es cualquier polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (1) a (3);

(1) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1,

(2) un polipéptido presentando de uno a diez aminoácidos delecionados, sustituidos o añadidos en el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1,

(3) un polipéptido presentando una homología del 80 % o más con el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1,

en los que se sustituyen los aminoácidos en de 4 a 6 ubicaciones con aminoácidos glicosilados, y donde todos los todos los extremos no reductores de dicha cadena de azúcares están sililados, y

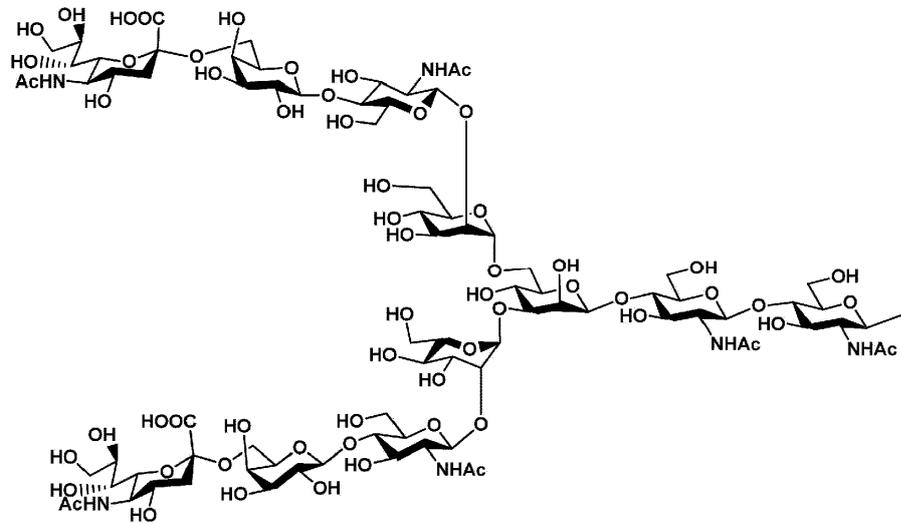
donde al menos tres de dichos respectivos aminoácidos glicosilados están presentes en la posición que corresponde a una posición del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 41, 48, 75, 79, 107, 112, 123, y 136 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.

[0014] En un aspecto de la presente invención, dicho respectivo aminoácido glicosilado puede ser cada uno independientemente una Cys glicosilada o una Asn glicosilada.

[0015] En un aspecto de la presente invención, las cadenas de azúcares en dicho respectivo aminoácido glicosilado pueden seleccionarse todos independientemente del grupo que consiste en una cadena de azúcares disialo, una cadena de azúcares trisialo, y una cadena de azúcares tetrasialo.

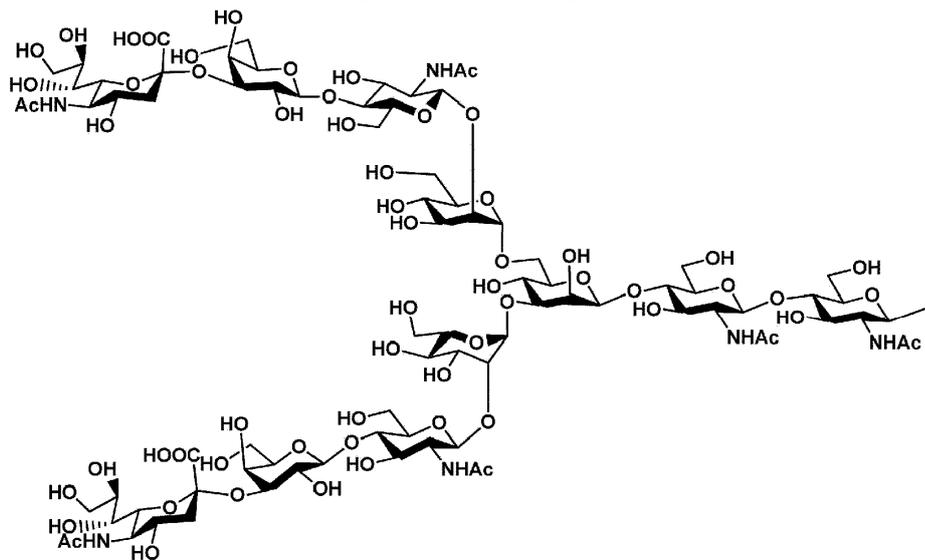
[0016] En un aspecto de la presente invención, las cadenas de azúcares en dichos respectivos aminoácidos glicosilados pueden seleccionarse todos independientemente del grupo que consiste en las siguientes Fórmula (1), Fórmula (2), Fórmula (3) y Fórmula (4).

[Fórmula química 1]



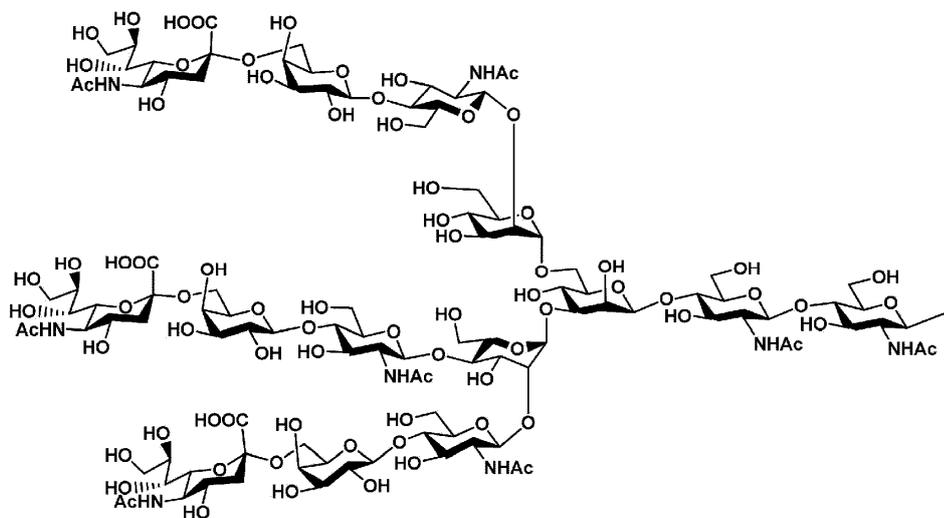
Fórmula (1)

[Fórmula química 2]



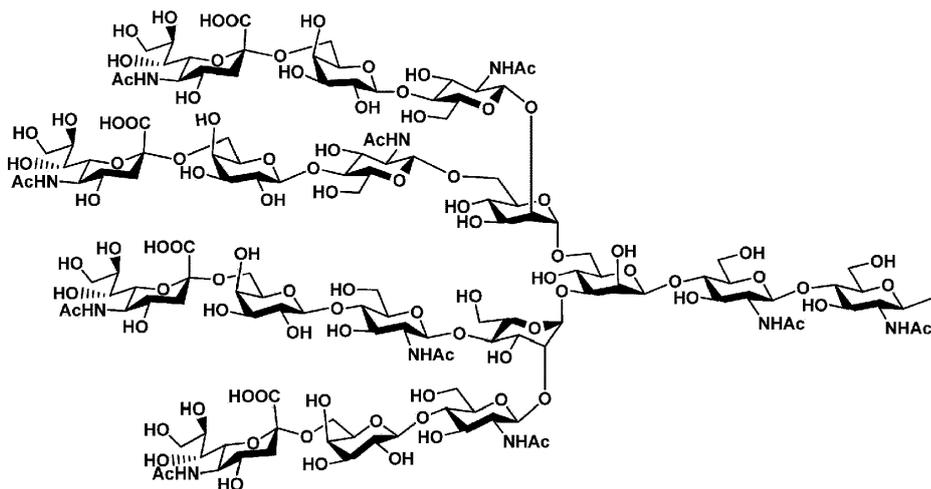
Fórmula (2)

[Fórmula química 3]



Fórmula (3)

[Fórmula química 4]



Fórmula (4)

5 **[0017]** En un aspecto de la presente invención, las cadenas de azúcares en dicho respectivo aminoácido glicosilado pueden ser todas idénticas.

10 **[0018]** En un aspecto de la presente invención, todos de dichos respectivos aminoácidos glicosilados pueden ser aquellos que no existan en la posición que corresponde a las posiciones 2, 5, 6, 9, 12, 13, 16, 19, 20, 23, 27, 33, 37, 39, 40, 43, 53, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 73, 78, 83, 86, 87, 90, 93, 94, 100, 124, 125, 128, 131, 132, 138, 141, 142, 145, 148, 149, 152, 153, 156, 159, 160, o 163 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.

[0019] En un aspecto de la presente invención, dichos respectivos aminoácidos glicosilados pueden estar presentes en la posición que corresponde a una posición seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 7, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 38, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 70, 75, 79, 99, 103, 106, 107, 109, 112, 115, 123, 130, 136, 139, y 164 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.

15 **[0020]** En un aspecto de la presente invención, dicho polipéptido glicosilado puede sintetizarse químicamente.

[0021] Asimismo, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

(1) dicho polipéptido glicosilado y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y

(2) un portador farmacéuticamente aceptable.

[0022] En un aspecto de la presente invención, dicha composición farmacéutica puede emplearse para la terapia o la prevención de una enfermedad relacionada con el interferón β . Aquí, dicha enfermedad puede seleccionarse del grupo que consiste en tumor cerebral, melanoma maligno cutáneo, hepatitis B crónica activa, hepatitis C crónica, panencefalitis esclerosante subaguda, cirrosis C compensada, y esclerosis múltiple.

[0023] Asimismo, en un aspecto de la presente invención, la secuencia del polipéptido glicosilado, el aminoácido en el aminoácido glicosilado, el tipo y la estructura de la cadena de azúcares en el aminoácido glicosilado, la posición de la sustitución de aminoácidos por el aminoácido glicosilado, el método para sintetizar el polipéptido glicosilado, y la enfermedad diana como una composición farmacéutica tal como se ha descrito previamente pueden ser cualquier combinación seleccionada del grupo anterior, respectivamente.

Efectos de la invención

[0024] El polipéptido glicosilado de la presente invención tiene una estructura uniforme de cadenas de azúcares porque puede sintetizarse químicamente. De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse por consiguiente un polipéptido glicosilado presentando una actividad de interferón β con una calidad estable y menos variabilidad entre lotes, además de una composición farmacéutica que comprende el polipéptido glicosilado mencionado anteriormente.

[0025] Además, el polipéptido glicosilado de la presente invención puede ser un polipéptido presentando una cadena de azúcares que existe *in vivo* añadida al mismo. De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse, por tanto, un polipéptido glicosilado que sea seguro para el cuerpo humano incluso cuando se administra a largo plazo, además de una composición farmacéutica que comprende el polipéptido glicosilado mencionado anteriormente.

[0026] Asimismo, de acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse un polipéptido glicosilado presentando una capacidad de retención en la sangre más alta y una actividad antitumoral más alta comparada con un interferón β natural, además de una composición farmacéutica que comprende el polipéptido glicosilado mencionado anteriormente.

[0027] Se ha mostrado que el polipéptido glicosilado de la presente invención tiene una capacidad de retención en la sangre más alta y una actividad antitumoral más alta comparado con un interferón β natural.

[0028] Aunque el interferón β PEGilado conocido como la tecnología convencional se ha mejorado en la capacidad de retención en la sangre comparado con un interferón β humano natural, no se observó ninguna mejora en la actividad antitumoral. Es sorprendente que, en virtud de la presente invención, la mejora de la capacidad de retención en la sangre, que era similar o mayor que la de la forma PEGilada, podría realizarse empleando una cadena de azúcares que tenga un peso molecular menor que el PEG, y además esa actividad antitumoral se mejoró significativamente en la forma glicosilada de la presente invención incluso cuando no se mejoró en la forma PEGilada. En consecuencia, se piensa que el polipéptido glicosilado de acuerdo con la presente invención tiene una actividad de interferón β alta y puede ser muy útil para tratar una enfermedad relacionada con el interferón β .

Breve descripción de los dibujos

[0029]

La Figura 1 son los espectros de masa que muestran los resultados de una espectrometría de masas (método de ionización por ESI) en el 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) obtenido en el (Ejemplo 3-1) y en el 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) obtenido en el (Ejemplo 4-1).

La Figura 2 es una fotografía que muestra los resultados de realizar una SDS-PAGE en el 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107CR112C-R123C) obtenido en el (Ejemplo 3-1) y el monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) obtenido en el (Ejemplo 4-1).

La Figura 3 son los espectros de masa que muestran los resultados de un análisis por HPLC en fase normal de los componentes de la cadena de azúcares del 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) obtenido en el (Ejemplo 3-1) y el 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) obtenido en el (Ejemplo 4-1).

La Figura 4 es un gráfico que muestra la transición de la concentración plasmática para cada polipéptido glicosilado cuando se administró 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C), 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C), y 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) por vía subcutánea.

La Figura 5 es una tabla que muestra los parámetros farmacocinéticos para cada polipéptido glicosilado cuando se administró 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C), 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C), y 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) por vía subcutánea.

5 La Figura 6 son representaciones gráficas que muestran la transición de la concentración plasmática para cada polipéptido glicosilado cuando se administró 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) y 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) por vía intravenosa y subcutánea. El gráfico de la izquierda es una representación gráfica de la transición de la concentración plasmática para cada polipéptido glicosilado cuando se administra por vía intravenosa, y el gráfico de la derecha es un gráfico que muestra la transición de la concentración plasmática para cada polipéptido glicosilado cuando se administra de manera
10 subcutánea.

La Figura 7 es una tabla que muestra los parámetros farmacocinéticos para cada polipéptido glicosilado cuando se administró 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) y 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) por vía intravenosa y subcutánea.

15 La Figura 8 es un gráfico que muestra la transición de la concentración plasmática para cada polipéptido glicosilado cuando se administró 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) y 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) por vía intravenosa.

La Figura 9 es una tabla que muestra los parámetros farmacocinéticos para cada polipéptido glicosilado cuando se administró 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) y 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) de forma subcutánea.

20 La Figura 10 es un gráfico que muestra la transición de la concentración plasmática para cada polipéptido glicosilado cuando se administró 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) e IFN- β modificado con PEG20K por vía subcutánea.

25 La Figura 11 es una tabla que muestra los parámetros farmacocinéticos para cada polipéptido glicosilado cuando se administró 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) y IFN- β modificado con PEG20K de forma subcutánea.

La Figura 12 es un gráfico que muestra los resultados de una evaluación de la actividad antitumoral en ratones con cáncer biliar a los que se les administró por vía subcutánea 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C), 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C), 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C), y 2-6 diSialo(S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C).

30 La Figura 13 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de actividad antitumoral en ratones con cáncer biliar a los que se les administró por vía subcutánea 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) y 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C).

35 La Figura 14 es un gráfico que muestra los resultados de una evaluación de la actividad antitumoral en ratones con cáncer biliar a los que se le administró por vía subcutánea 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C), 2-6 triSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C), y 2-6 tetraSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C).

La Figura 15 es un gráfico que muestra los resultados de una evaluación de la actividad antitumoral en ratones con cáncer biliar a los que se le administró por vía subcutánea 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) e IFN- β modificado con PEG20K.

40 La Figura 16 muestra la secuencia de aminoácidos del interferón β -1b (SEQ ID NO. 1) como un ejemplo de la secuencia de aminoácidos del interferón β en el presente documento.

Descripción de los modos de realización

45 **[0030]** La presente invención se refiere a un polipéptido glicosilado con una cadena de azúcares sialilada. Específicamente, la presente invención se refiere a un polipéptido glicosilado presentando una actividad glicosilada del interferón β con cadenas de azúcares sialiladas altamente uniformes.

50 **[0031]** En el presente documento, una "cadena de azúcares" se refiere a un compuesto hecho de uno o más azúcares unitarios (un monosacárido y/o un derivado del mismo) conectados entre sí. Cuando dos o más azúcares unitarios están conectados entre sí, cada azúcar unitario está ligado por una condensación por deshidratación por un enlace glucósido entre ellas. Dichas cadenas de azúcares incluyen, pero sin carácter limitativo, por ejemplo, una gran variedad, como monosacáridos y polisacáridos contenidos *in vivo* (glucosa, galactosa, manosa, fucosa, xilosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico, y complejos y derivados de los mismos), además de cadenas de azúcares que se han degradado o pueden ser producto de materiales biológicos complejos como polisacáridos degradados, glicoproteínas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, y glicolípidos.

5 **[0032]** La cadena de azúcares preferida en el presente documento es una cadena de azúcares que no disipe la actividad del interferón β del complejo de interferón. Tal cadena de azúcares no está limitada de manera particular, y puede ser una cadena de azúcares que existe como un glicoconjugado *in vivo* (como un glicopéptido o una glicoproteína, un proteoglicano, y un glicolípido), o puede ser un carbohidrato que no exista como un glicoconjugado *in vivo*.

10 **[0033]** Se prefiere una cadena de azúcares que exista como un glicoconjugado *in vivo* en relación con el hecho de que el complejo de interferón de la presente invención se administra *in vivo*. Ejemplos de una cadena de azúcares que existe como un glicoconjugado *in vivo* incluyen cadenas de azúcares unidas a N o a O y similares, que son cadenas de azúcares unidas a un péptido o a una proteína *in vivo* como un glicopéptido o una glicoproteína.

[0034] En un aspecto de la presente invención, se emplea preferiblemente una cadena de azúcares unida a N. Las cadenas de azúcares unidas a N pueden incluir, por ejemplo, una forma de alta manosa, una forma compleja, o una forma híbrida, en particular preferiblemente una forma compleja.

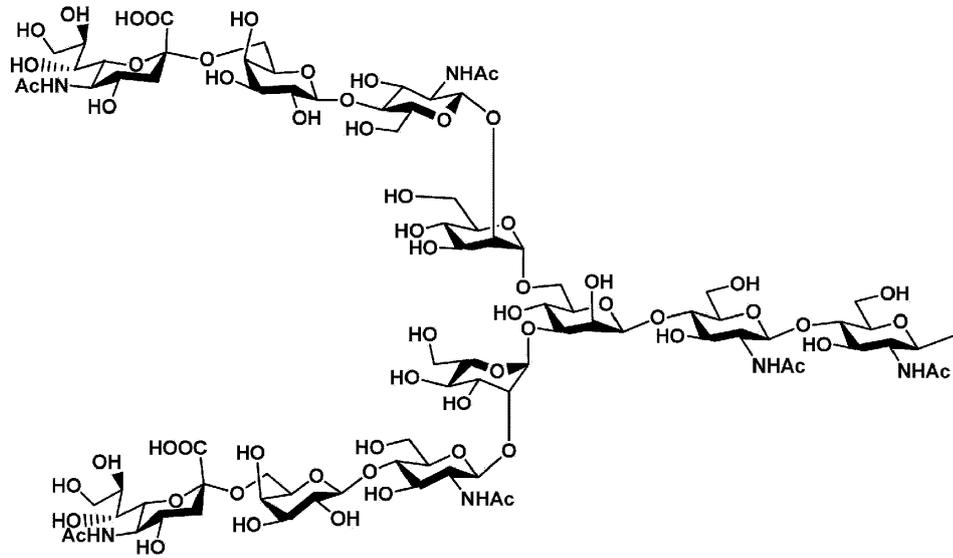
15 **[0035]** Las cadenas de azúcares del presente documento se caracterizan porque todos los extremos no reductores de la cadena de azúcares están sialilados. En el presente documento, "todos de los extremos no reductores de las cadenas de azúcares están sialilados", significa, por ejemplo, que ambos extremos no reductores están sialilados en el caso de una cadena de azúcares complejos biantenaria, que los tres extremos no reductores están sialilados en el caso de una cadena de azúcares complejos triantenaria, y que los cuatro extremos no reductores están sialilados en el caso de una cadena de azúcares complejos tetraantenaria.

20 **[0036]** En el presente documento, sialilación significa que un ácido siálico se enlaza al extremo no reductor de la cadena de azúcares. "Ácido siálico" es un término genérico para un ácido neuramínico presentando el grupo amino o el grupo hidroxilo sustituido. En la presente invención, el ácido siálico presente en el extremo no reductor de la cadena de azúcares puede incluir cualquiera y todas las formas sustituidas de un ácido neuramínico, siempre que no disipe o reduzca de manera significativa la actividad del interferón de los polipéptidos glicosilados de la presente invención. Entre estos, la sialilación de la cadena de azúcares en el polipéptido glicosilado de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un ácido siálico de origen natural en relación con el hecho de que el polipéptido glicosilado de la presente invención se administra *in vivo*. Por ejemplo, el ácido N-Acetilneuramínico (Neu5Ac) acetilado en la posición 5 o el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) modificado con ácido glicólico en la posición 5 y similares se conocen como ácidos siálicos de origen natural.

30 **[0037]** Como un aspecto de la presente invención, ejemplos específicos de cadenas de azúcares que presentan todos los extremos no reductores sialilados incluyen, por ejemplo, una cadena de azúcares conocida por existir *in vivo*, una cadena de azúcares compleja de una cadena de azúcares unida a N. Como la cadena de azúcares complejos de una cadena de azúcares unida a N, las que se diferencian en su modo de unión, la presencia o ausencia de fucosa, la presencia o ausencia de modificaciones en el sustituyente de la cadena lateral, y similares también están incluidas, siempre que tenga el esqueleto básico de una cadena de azúcares conocida generalmente como una cadena de azúcares complejos de una cadena de azúcares unida a N. Ejemplos de una cadena de azúcares complejos unidos a N pueden incluir, dependiendo de la diferencia en la estructura de ramificación de la cadena de azúcares, por ejemplo, una cadena de azúcares disialo, una cadena de azúcares trisialo, y una cadena de azúcares tetrasialo. En otras palabras, en el presente documento, una "cadena de azúcares disialo" hace referencia a una cadena de azúcares complejos unida a N que tiene una estructura biantenaria y tiene todos los extremos no reductores sialilados. De forma similar, en el presente documento, una "cadena de azúcares trisialo" hace referencia a una cadena de azúcares complejos unida a N que tiene una estructura triantenaria y tiene todos los extremos no reductores sialilados. De forma similar, en el presente documento, una "cadena de azúcares tetrasialo" hace referencia a una cadena de azúcares complejos unida a N que tiene una estructura tetraantenaria y tiene todos los extremos no reductores sialilados.

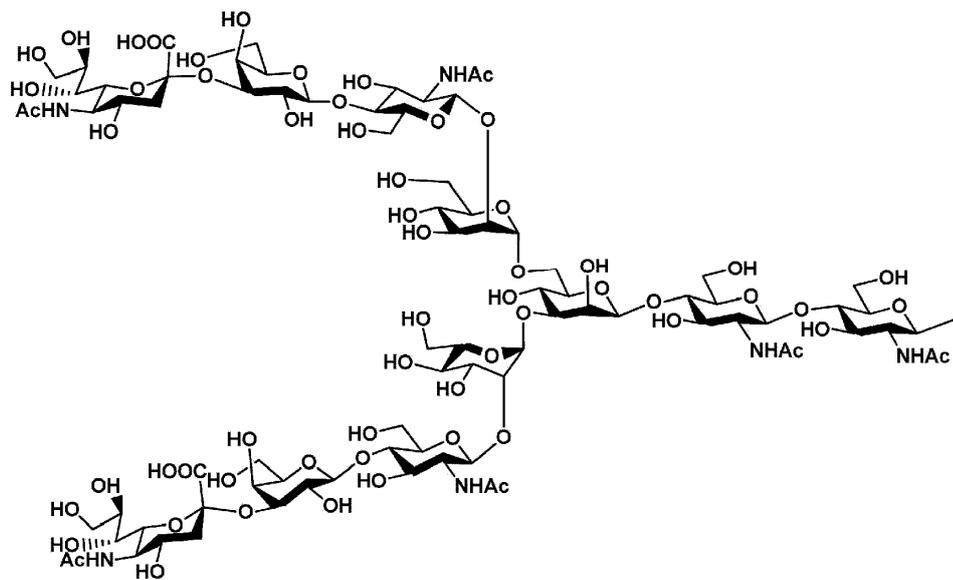
45 **[0038]** Más específicamente, estas cadenas de azúcares pueden incluir la cadena de azúcares α 2-6 disialo representada por la siguiente Fórmula (1), la cadena de azúcares α 2-3 disialo representada por la Fórmula (2), la cadena de azúcares α 2-6 trisialo representada por la Fórmula (3), la cadena de azúcares α 2-6 tetrasialo representada por la Fórmula (4), y similares.

[Fórmula química 5]



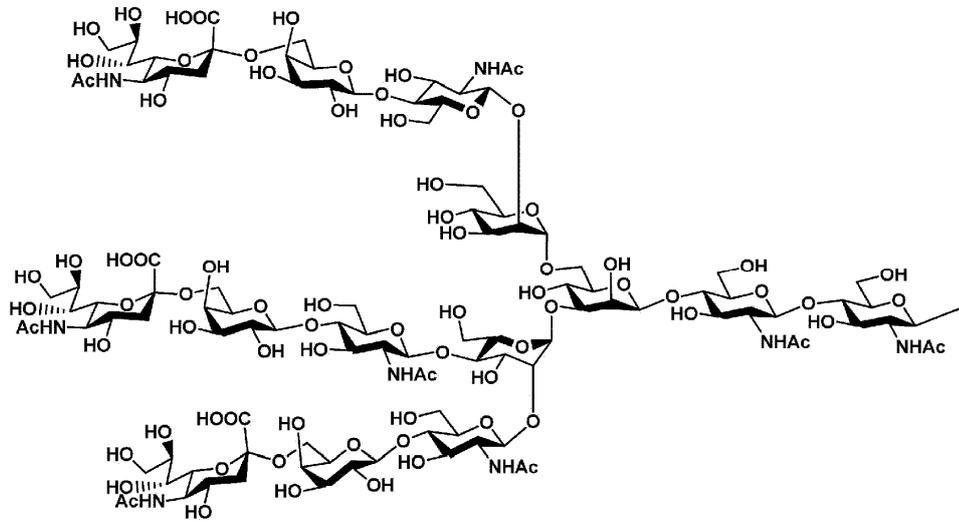
Fórmula (1)

[Fórmula química 6]



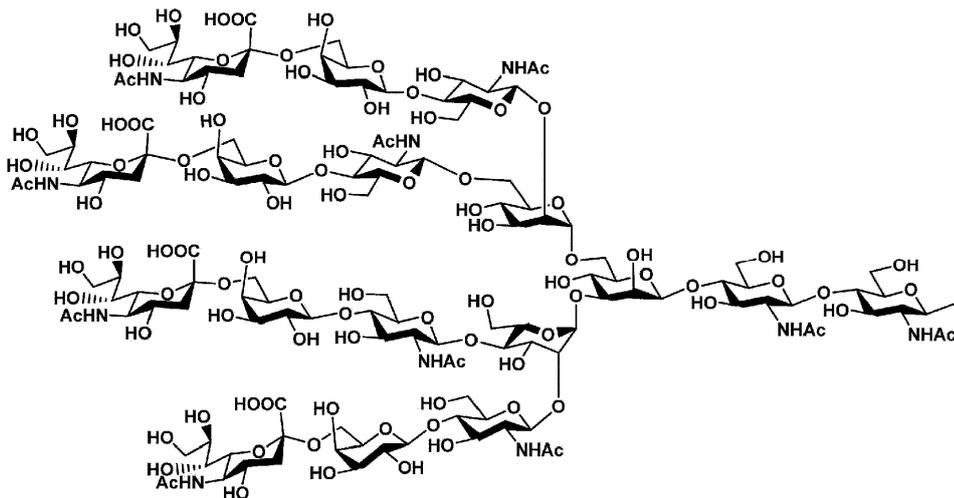
Fórmula (2)

[Fórmula química 7]



Fórmula (3)

[Fórmula química 8]

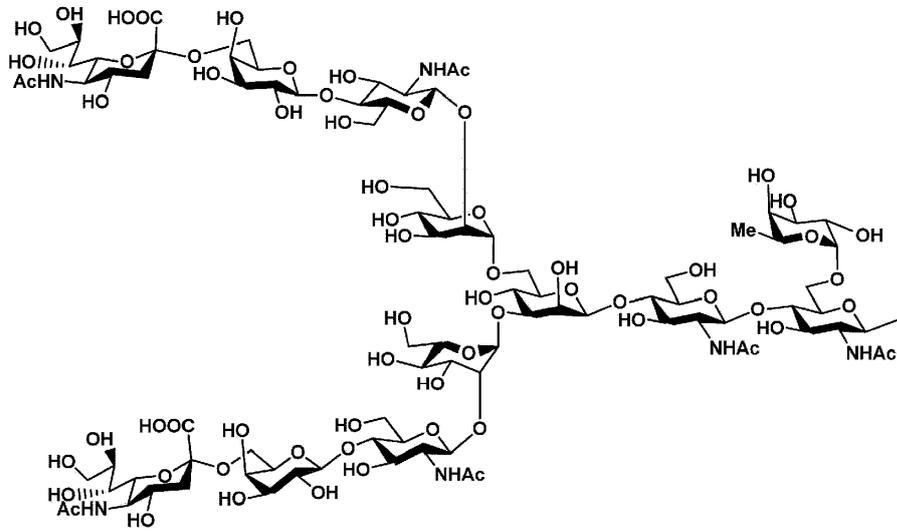


Fórmula (4)

[0039] Las cadenas de azúcares sialiladas del presente documento no se limitan a los ejemplos anteriores específicos, e incluyen aquellos donde el modo de unión entre la cadena de azúcares y el ácido siálico es diferente, como, por ejemplo, cadenas de azúcares α 2-3 trisialo y α 2-3 tetrasialo. En lo que respecta al modo de unión, todas las cadenas ramificadas en la cadena de azúcares sialilada pueden tener un modo de unión idéntico, o pueden incluir diferentes modos de unión.

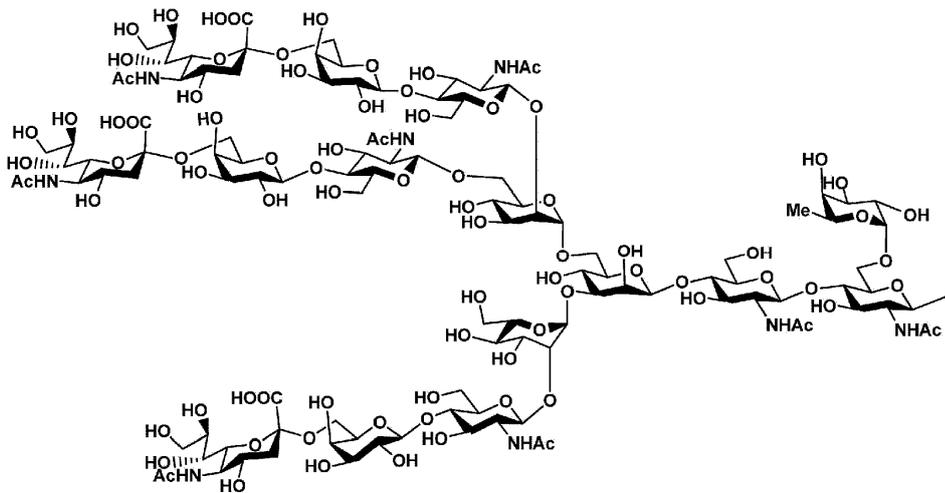
[0040] Asimismo, la cadena de azúcares sialilada del presente documento también incluye las que tienen una fucosa añadida a esta. Ejemplos específicos de una cadena de azúcares complejos presentando una fucosa añadida pueden incluir, las siguiente Fórmula (13) en el caso de una cadena de azúcares disialo, las siguientes Fórmula (15) y Fórmula (16) en el caso de una cadena de azúcares trisialo, y la siguiente Fórmula (17) en el caso de una cadena de azúcares tetrasialo.

[Fórmula química 9]



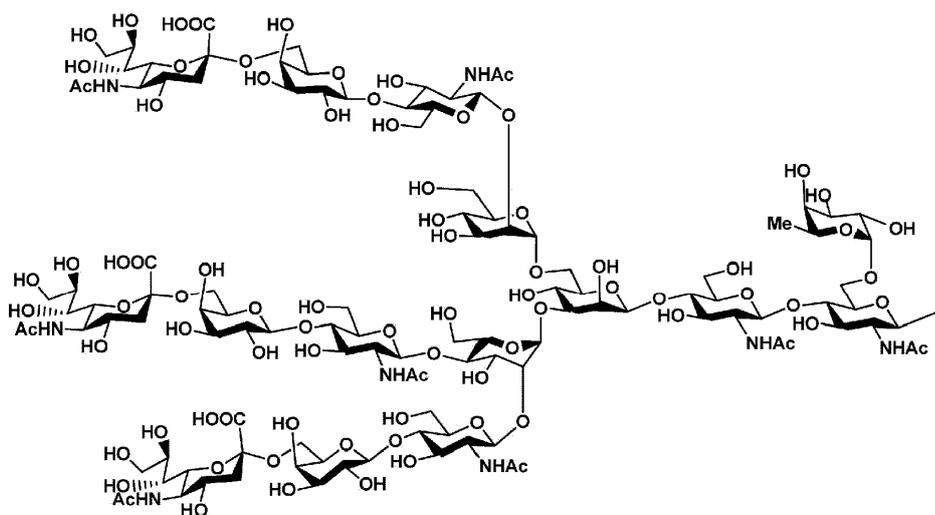
Fórmula (13)

[Fórmula química 10]



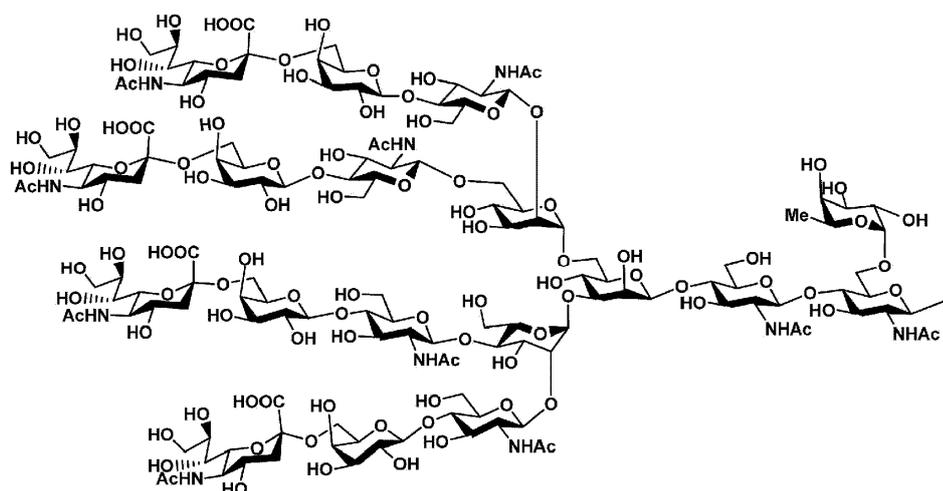
Fórmula (14)

[Fórmula química 11]



Fórmula (16)

[Fórmula química 12]



Fórmula (17)

[0041] En un aspecto de la presente invención, las cadenas de azúcares del respectivo aminoácido glicosilado en el polipéptido glicosilado de la presente invención pueden ser idénticas, o pueden comprender también diferentes cadenas de azúcares. Según se utiliza en el presente documento, "las cadenas de azúcares del respectivo aminoácido glicosilado en el polipéptido glicosilado son idénticas" hace referencia al hecho de que cuando los aminoácidos en de 4 a 6 ubicaciones se sustituyen con aminoácidos glicosilados en la presente invención, el tipo de azúcar que configura la cadena de azúcares, el orden de unión, y el modo de unión son idénticos dentro del polipéptido glicosilado cuando las cadenas de azúcares en los aminoácidos glicosilados en las 4 a 6 ubicaciones se comparan entre sí.

[0042] Asimismo, en un aspecto de la presente invención, en una composición que contiene el polipéptido glicosilado de la presente invención, cada cadena de azúcares en el polipéptido glicosilado es preferiblemente sustancialmente uniforme. Tal como se entiende en el presente documento, "cada cadena de azúcares en el polipéptido glicosilado es cada una sustancialmente uniforme" hace referencia al hecho de que cuando cada cadena de azúcares se compara entre polipéptidos glicosilados para cada posición de glicosilación, las posiciones en el polipéptido son idénticas, y el tipo de azúcar que configura la cadena de azúcares en cada posición, el orden de unión, y el modo de unión entre azúcares son cada uno sustancialmente idénticos en cada cadena de azúcares. En la presente invención, cada cadena de azúcares en el polipéptido glicosilado es al menos 90 % o más, preferiblemente 95 % o más, y más preferiblemente un 99 % o más uniforme.

- 5 **[0043]** Una composición que comprende un polipéptido glicosilado donde cada cadena de azúcares en el polipéptido glicosilado es sustancialmente uniforme tiene calidad constante, y se prefiere particularmente en áreas como la producción o los ensayos medicinales. La proporción de cadenas de azúcares uniformes puede medirse por ejemplo mediante un método que emplea HPLC, electroforesis capilar, espectrometría de masas, y similares.
- [0044]** En el presente documento, la "secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1" es la secuencia de aminoácidos del interferón β -1b (véase la Figura 16). Se sabe que el interferón β -1b tiene Met en la posición 1 delecionado y Cys en la posición 17 sustituido por Ser en un interferón β natural humano.
- 10 **[0045]** En el presente documento, un "polipéptido glicosilado" se refiere a, por ejemplo, un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 que presenta aminoácidos en 4 a 6 ubicaciones sustituidos con "aminoácidos glicosilados".
- [0046]** En el presente documento, un "aminoácido glicosilado" es un aminoácido que presenta una cadena de azúcares unida a este, donde la cadena de azúcares y el aminoácido pueden estar unidos mediante un enlazador.
- 15 **[0047]** El tipo de aminoácido a glicosilar no está limitado particularmente, y puede emplearse cualquiera de los aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales.
- [0048]** Cuando la cadena de azúcares y el aminoácido están enlazados mediante un enlazador, el aminoácido preferido del aminoácido glicosilado, en lo que respecta a una unión fácil con el enlazador, es un aminoácido que tiene dos o más grupos carboxi en una molécula, como ácido aspártico y ácido glutámico, un aminoácido con dos o más grupos amino en una molécula, como lisina, arginina, histidina y triptófano, un aminoácido que presenta un grupo hidroxilo en la molécula, tal como serina, treonina y tirosina, un aminoácido que presenta un grupo tiol en la molécula, como cisteína, y un aminoácido con un grupo amida en la molécula, tal como asparagina y glutamina. En particular, se prefiere la cisteína, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, serina, treonina y glutamina en lo relativo a la reactividad.
- 20 **[0049]** Para cualquier polipéptido glicosilado de la presente invención, si la estructura de la cadena de azúcares, la estructura aparte de la cadena de azúcares, el sitio de glicosilación, y el número de cadenas de azúcares añadidos son idénticos, se cree que no existe una gran diferencia en la vida media en sangre del polipéptido glicosilado de la presente invención entre cuando el aminoácido glicosilado es una Asn glicosilada y cuando es una Cys glicosilada.
- 30 **[0050]** Cuando la cadena de azúcares y el aminoácido están unidos mediante un enlazador, los que se emplean en los ámbitos correspondientes pueden utilizarse generalmente como el enlazador, algunos ejemplos de estos pueden incluir-NH-(CO)-(CH₂)_a-CH₂- (en el que a indica un número entero que no está limitado siempre que no inhiba la función del enlazador diana, pero es preferiblemente un número entero de 0 a 4), C₁₋₁₀ polimetileno, -CH₂-R- (en el que R es un grupo producido al separar un átomo de hidrógeno de un grupo seleccionado del grupo que consiste en un alquilo, un alquilo sustituido, un alquenilo, un alquenilo sustituido, un alquinilo, un alquinilo sustituido, un arilo, un arilo sustituido, un grupo carbocíclico, un grupo carbocíclico sustituido, un grupo heterocíclico, y un grupo heterocíclico sustituido), -(CO)-(CH₂)_a-(CO)- (en el que a indica un número entero que no está limitado siempre que no inhiba la función del enlazador diana, pero es preferiblemente un número entero de 0 a 4), y similares.
- 35 **[0051]** El método de fabricación del polipéptido glicosilado de la presente invención no pretende estar limitado en modo alguno por la descripción del mismo (como la descripción "polipéptido glicosilado que presenta un aminoácido se sustituye con un aminoácido glicosilado"), y se incluye un polipéptido glicosilado fabricado por cualquiera de los métodos A o B descritos a continuación en el "polipéptido glicosilado que presenta un aminoácido se sustituye con un aminoácido glicosilado". Asimismo, por ejemplo, un polipéptido glicosilado en el que una cadena de azúcares sin ningún aminoácido unido a la misma está unida directamente o mediante un enlazador a un aminoácido de un péptido; un polipéptido glicosilado en el que un azúcar o una cadena de azúcares se añade de manera adicional a la cadena de azúcares añadida en el polipéptido glicosilado a fin de alargar la cadena de azúcares añadida previamente; un polipéptido glicosilado en el que uno o unos pocos aminoácidos están unidos al grupo amino y/o carboxi de un aminoácido glicosilado, y enlazado además a uno o más fragmentos de interferón β ; y un polipéptido glicosilado en el que una cadena de azúcares presentando un aminoácido unido a la misma está unido mediante un enlazador a un aminoácido de un péptido, y similares también se incluyen en el polipéptido glicosilado de la presente invención, siempre y cuando la estructura final coincida.
- 40 **[0052]** En un aspecto de la presente invención, las posiciones para sustituir los "aminoácidos en de 4 a 6 ubicaciones" descritos anteriormente con aminoácidos glicosilados deberían seleccionarse en función de diversos aspectos de modo que la actividad del interferón β no se reduzca por la sustitución del aminoácido glicosilado. Por ejemplo, en el presente documento se prefiere la Asn en la posición 80 (correspondiente a la
- 45
- 50
- 55

posición 79 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1) donde está unida la cadena de azúcares en un interferón β natural como una posición a sustituirse por un aminoácido glicosilado.

[0053] En un aspecto de la presente invención, la posición de sustitución para el aminoácido glicosilado se selecciona preferiblemente de manera que no altere la formación de la configuración del interferón β en el plegamiento de polipéptidos. A fin de evitar la alteración de la formación de la configuración del interferón β , la posición de sustitución para el aminoácido glicosilado puede ser la posición de los aminoácidos presentes en la superficie de la estructura conformacional cuando el interferón β haya formado una conformación similar a esta en la naturaleza. En otras palabras, la posición puede ser posiciones de aminoácidos que no configuren los alrededores de la estructura conformacional cuando el interferón β haya formado una conformación similar a la que existe en la naturaleza (a la que también se hace referencia en el presente documento como "las posiciones de aminoácidos no superficiales"). Asimismo, en un aspecto de la presente invención, la posición de sustitución para el aminoácido glicosilado preferiblemente no es el sitio de unión del receptor de interferón β . Los presentes inventores llevaron a cabo exhaustivas investigaciones con datos como análisis conformacionales de interferón β para estimar las posiciones de aminoácidos no superficiales de interferón β , y posiciones estimadas que puedan alterar otras posiciones o formaciones conformacionales que puedan alterar la unión con el receptor. Desde esta perspectiva, en un aspecto de la presente invención, el aminoácido glicosilado preferiblemente no está presente en la posición que corresponde a las posiciones 2, 5, 6, 9, 12, 13, 16, 19, 20, 23, 27, 33, 37, 39, 40, 43, 53, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 73, 78, 83, 86, 87, 90, 93, 94, 100, 124, 125, 128, 131, 132, 138, 141, 142, 145, 148, 149, 152, 153, 156, 159, 160, o 163 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1. Asimismo, los expertos en la materia tras ver la presente memoria serán capaces de investigar de forma apropiada las posiciones de sustitución similares que no se prefieran para el aminoácido glicosilado según estas posiciones.

[0054] En un aspecto de la presente invención, la posición de sustitución para el aminoácido glicosilado preferiblemente no es la Cys en las posiciones 31 y 141 que forma un enlace disulfuro en un interferón β natural (correspondiente a las posiciones 30 y 140 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1).

[0055] Los presentes inventores llevaron a cabo exhaustivas investigaciones desde la perspectiva descrita anteriormente para sintetizar numerosos polipéptidos glicosilados presentando varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos sustituida con aminoácidos glicosilados, y midieron sus actividades de interferón β . Como resultado, se observó que al menos las posiciones 1, 3, 7, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 38, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 70, 75, 79, 99, 103, 106, 107, 109, 112, 115, 123, 130, 136, 139, y 164 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 son posiciones que contribuyen al mantenimiento o mejora de la actividad de interferón β por la glicosilación.

[0056] Por las razones expuestas anteriormente, en un aspecto de la presente invención, al menos uno de los respectivos aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a una posición seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 7, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 38, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 70, 75, 79, 99, 103, 106, 107, 109, 112, 115, 123, 130, 136, 139, y 164 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.

[0057] Asimismo, en un aspecto de la presente invención, al menos dos de los respectivos aminoácidos glicosilados están presentes preferiblemente en la posición que corresponde a una posición seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 7, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 38, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 70, 75, 79, 99, 103, 106, 107, 109, 112, 115, 123, 130, 136, 139, y 164 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.

[0058] Asimismo, en un aspecto de la presente invención, al menos tres de los respectivos aminoácidos glicosilados están presentes preferiblemente en la posición que corresponde a una posición seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 7, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 38, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 70, 75, 79, 99, 103, 106, 107, 109, 112, 115, 123, 130, 136, 139, y 164 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.

[0059] Asimismo, en un aspecto de la presente invención, al menos cuatro de los respectivos aminoácidos glicosilados están presentes preferiblemente en la posición que corresponde a una posición seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 7, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 38, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 70, 75, 79, 99, 103, 106, 107, 109, 112, 115, 123, 130, 136, 139, y 164 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.

[0060] Asimismo, en un aspecto de la presente invención, cuando 5 o más ubicaciones están sustituidas por aminoácidos glicosilados, al menos cinco de los respectivos aminoácidos glicosilados están presentes preferiblemente en la posición que corresponde a una posición seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 7, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 38, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 70, 75, 79, 99, 103, 106, 107, 109, 112, 115, 123, 130, 136, 139, y 164 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.

- 5 **[0061]** En un aspecto de la presente invención, es más preferible que cada uno de los aminoácidos glicosilados descritos anteriormente estén todos presentes en la posición que corresponde a una posición seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 7, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 38, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 70, 75, 79, 99, 103, 106, 107, 109, 112, 115, 123, 130, 136, 139, y 164 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- [0062]** En un aspecto de la presente invención, es más preferible que uno de los aminoácidos glicosilados esté presente en la posición que corresponde a la posición 79 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 10 **[0063]** Asimismo, en un aspecto de la presente invención, es más preferible que uno o más de cada uno de los otros aminoácidos glicosilados (en una posición diferente a la 79) estén presentes en la posición que corresponde a una posición seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 7, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 38, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 70, 75, 99, 103, 106, 107, 109, 112, 115, 123, 130, 136, 139, y 164 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 15 **[0064]** Asimismo, estas posiciones son ejemplos específicos preferidos, y no pretenden limitar las posiciones enumeradas en el presente documento. Los expertos en la materia, tras haber visto la presente invención, serán capaces de seleccionar las posiciones a sustituir con aminoácidos glicosilados de forma similar a la presente invención.
- 20 **[0065]** En un aspecto de la presente invención, uno de los aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a la posición 1 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- [0066]** En un aspecto de la presente invención, uno de los respectivos aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a la posición 3 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 25 **[0067]** En un aspecto de la presente invención, uno de los respectivos aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a la posición 41 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- [0068]** En un aspecto de la presente invención, uno de los respectivos aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a la posición 48 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 30 **[0069]** En un aspecto de la presente invención, uno de los respectivos aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a la posición 75 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 35 **[0070]** En un aspecto de la presente invención, uno de los respectivos aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a la posición 79 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- [0071]** En un aspecto de la presente invención, uno de los respectivos aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a la posición 107 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 40 **[0072]** En un aspecto de la presente invención, uno de los respectivos aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a la posición 112 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- [0073]** En un aspecto de la presente invención, uno de los respectivos aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a la posición 123 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 45 **[0074]** En un aspecto de la presente invención, uno de los respectivos aminoácidos glicosilados está presente preferiblemente en la posición que corresponde a la posición 136 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 50 **[0075]** Asimismo, en un aspecto de la presente invención, cuando se sustituye un aminoácido con un aminoácido glicosilado, la posición puede ser cualquier combinación de posiciones seleccionadas de las posiciones de sustitución anteriores.
- [0076]** Ejemplos específicos de una combinación preferible de posiciones en las que los respectivos aminoácidos glicosilados están presentes descritos anteriormente en el presente documento pueden

ejemplificarse por las posiciones que corresponden a las siguientes posiciones en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1, pero sin carácter limitativo.

- 5 posiciones 1, 48, 79, 107, 112, y 123;
- posiciones 1, 3, 48, 79, 107, y 112;
- posiciones 1, 48, 79, 99, 107, y 112;
- posiciones 1, 48, 79, 107, 112, y 130;
- posiciones 1, 48, 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 1, 48, 79, 107, 112, y 139;
- 10 posiciones 1, 48, 79, 107, 112, y 164;
- posiciones 1, 29, 48, 79, 107, y 136;
- posiciones 1, 35, 48, 79, 107, y 136;
- posiciones 1, 41, 48, 79, 107, y 136;
- posiciones 1, 48, 75, 79, 107, y 136;
- 15 posiciones 48, 75, 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 41, 75, 79, 103, 107, y 136;
- posiciones 41, 75, 79, 106, 107, y 136;
- posiciones 41, 75, 79, 107, 109, y 136;
- posiciones 41, 75, 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 41, 75, 79, 107, 115, y 136;
- 20 posiciones 41, 75, 79, 107, 119, y 136;
- posiciones 1, 28, 48, 70, y 79;
- posiciones 1, 48, 79, 107, y 112;
- posiciones 24, 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 25, 79, 107, 112, y 136;
- 25 posiciones 32, 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 35, 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 38, 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 41, 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 7, 79, 107, 112, y 136;
- 30 posiciones 48, 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 75, 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 41, 75, 79, 107, y 136;
- posiciones 42, 75, 79, 107, y 136;
- posiciones 45, 75, 79, 107, y 136;
- 35 posiciones 46, 75, 79, 107, y 136;
- posiciones 47, 75, 79, 107, y 136;
- posiciones 48, 75, 79, 107, y 136;
- posiciones 49, 75, 79, 107, y 136;
- posiciones 50, 75, 79, 107, y 136;
- 40 posiciones 1, 48, 79, y 107;
- posiciones 1, 3, 48, y 79;
- posiciones 79, 107, 112, y 136;
- posiciones 1, 79, 107, y 136;
- posiciones 28, 79, 107, y 136;
- 45 posiciones 35, 79, 107, y 136;
- posiciones 70, 79, 107, y 136; y
- posiciones 75, 79, 107, y 136.

[0077] La posición que corresponde a la posición en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 en el presente documento hace referencia al aminoácido en la posición que corresponde a la posición del aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1, siempre que no haya una adición, delección, etc. de aminoácidos. Además, cuando esté presente una adición o delección de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1, el término hace referencia al aminoácido en la posición que tiene en cuenta el cambio en la secuencia de aminoácidos debido a la adición o delección de

aminoácidos. Por ejemplo, en un interferón β -1b glicosilado que presenta la secuencia Ser₁-Tyr₂-Asn₃-Leu₄- en las posiciones 1 a 4, cuando se añade un aminoácido (Trp) entre los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 (Ser-Trp-Tyr-Asn-Leu-), "la posición correspondiente a la posición 2 (Tyr)" se refiere a la posición del aminoácido (Tyr) que se desplaza una hacia el extremo C-terminal debido a la adición de Trp.

5 **[0078]** Un "aminoácido" en el presente documento se utiliza en su significado más amplio, y puede incluir no solo aminoácidos naturales, sino también aminoácidos no naturales, como variantes y derivados de aminoácidos. Los expertos en la materia reconocerán que en vista de esta definición amplia, los aminoácidos en el presente documento incluyen, por ejemplo, L-aminoácidos proteinógenos naturales, D-aminoácidos; aminoácidos modificados químicamente como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteinógenos naturales
10 como norleucina, β -alanina, y ornitina; compuestos sintetizados químicamente que presentan propiedades conocidas en la materia que son características de los aminoácidos, y similares. Algunos ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen α -metil-aminoácidos (como α -metilalanina), D-aminoácidos, aminoácidos similares a la histidina, (como 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina y α -metil-histidina), aminoácidos que presentan un exceso de metilenos en la cadena lateral ("homo" aminoácidos), y
15 aminoácidos en los que el aminoácido del grupo funcional carboxilado en la cadena lateral se sustituye con un grupo sulfonato (como ácido cisteico). En un aspecto preferido, los aminoácidos contenidos en el compuesto de la presente invención consisten solo en aminoácidos naturales.

[0079] "La secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1" en el presente documento indica la secuencia de aminoácidos del interferón β -1b (véase la Figura 16). Se sabe que el interferón β -1b tiene Met en la
20 posición 1 delecionado y Cys en la posición 17 sustituido por Ser en un interferón β natural humano.

[0080] Cuando se hace referencia a "presentando uno o unos pocos aminoácidos delecionados, sustituidos, o añadidos en la secuencia de aminoácidos" en el presente documento, el número de aminoácidos a sustituir etc. no está limitado particularmente siempre que se retenga la actividad del interferón β , y por ejemplo significa que
25 aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos son diferentes. De forma alternativa, también puede incluir casos en los que el 20 % o menos, preferiblemente el 10 % o menos de los aminoácidos de toda la longitud de la secuencia de aminoácidos son diferentes. El aminoácido a sustituir o añadir puede ser un aminoácido natural, un aminoácido no natural, o un análogo de aminoácido, preferiblemente un aminoácido natural. Como un aspecto de la presente invención, un polipéptido "presentando uno o unos pocos aminoácidos delecionados, sustituidos o añadidos en la secuencia de aminoácidos" incluye un interferón β natural humano.
30 Tal como se ha descrito anteriormente, el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1, es decir, interferón β -1b, tiene Met en la posición 1 delecionado y Cys en la posición 17 sustituido por Ser en un interferón β natural humano. Dicho de otro modo, el interferón β natural humano tiene un aminoácido añadido y un aminoácido sustituido en un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1. Los expertos en la materia, tras haber visto los expertos en la materia tras ver
35 la presente memoria pueden utilizar la secuencia de aminoácidos del interferón natural humano (interferón β -1a) en lugar de la secuencia de aminoácidos del interferón β -b humano empleado en los presentes Ejemplos, e incluso fabricar y utilizar el presente péptido glicosilado de forma similar a la presente invención haciendo referencia a lo expuesto en el presente documento. La secuencia de aminoácidos del interferón β -1a natural humano se muestra como la SEQ ID NO. 2. En un aspecto de la presente invención, cuando se utiliza la
40 secuencia de aminoácidos del interferón β -1a natural humano en lugar de la secuencia de aminoácidos del interferón β -1b humano empleada en los presentes Ejemplos, se prefiere emplear una secuencia de aminoácidos que no tenga cadenas de azúcares no uniformes unidas a la posición 80 natural.

[0081] En el presente documento, un "análogo de interferón β " incluye un polipéptido estructuralmente similar al interferón β y/o un polipéptido que presente una estructura que se superpone al interferón β , por ejemplo un
45 polipéptido que presenta uno o unos pocos aminoácidos entre los aminoácidos del interferón β sustituido de manera conservadora, un interferón β modificado, un fragmento de interferón β presentando actividad de interferón β , y un interferón β alargado presentando actividad del interferón β .

[0082] En el presente documento, "que presenta uno o unos pocos aminoácidos entre los aminoácidos sustituidos de manera conservadora" hace referencia a una sustitución de un aminoácido en la que el índice
50 hidrófilo y/o índice hidrófobo entre el aminoácido original y el aminoácido a sustituir son similares, donde la sustitución no causa una reducción o disipación aparente de la actividad del interferón β entre el antes y después de dicha sustitución.

[0083] En el presente documento, un "interferón β modificado" es una forma modificada del interferón β que incluye variantes del interferón β de origen natural o compuestos modificados de manera artificial del interferón β ,
55 y dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, alquilación, acilación (por ejemplo, acetilación), amidación, carboxilación, esterificación, formación de un enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, fosforilación, hidroxilación, unión de un componente marcador, y similares de uno o más residuos de aminoácidos del interferón β .

[0084] En el presente documento, "un fragmento de interferón β que presenta actividad del interferón β " es un péptido que tiene uno o más aminoácidos delecionados del N- y/o el C-terminal del interferón β y que mantiene la actividad del interferón β .

[0085] En el presente documento, "un interferón β alargado que presenta una actividad del interferón β " es un péptido que tiene uno o más aminoácidos añadidos al N- y/o el C-terminal del interferón β y que mantiene la actividad del interferón β .

[0086] El polipéptido glicosilado de la presente invención puede incluir un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una homología del 80 % o más con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1, en la que los aminoácidos en de 4 a 6 ubicaciones se sustituyen con aminoácidos glicosilados.

[0087] El polipéptido glicosilado de la presente invención puede fabricarse integrando una etapa de glicosilación en el método de síntesis de un péptido conocido por los expertos en la materia Aunque también puede emplearse un método que utiliza enzimas representado por la transglutaminasa para la glicosilación, existen problemas en este caso como la necesidad de una gran cantidad de la cadena de azúcares a añadir, la complicación de la purificación tras la etapa final, y la restricción de las posiciones de glicosilación y las cadenas de azúcares que pueden añadirse. Como resultado, aunque es posible emplear esto en una síntesis a pequeña escala, como para los análisis, no puede decirse que sea un método práctico para la fabricación a gran escala como para la fabricación de medicamentos.

[0088] Algunos ejemplos específicos de métodos que son métodos de fácil fabricación para el polipéptido glicosilado de la presente invención, además de métodos de fabricación estable para el polipéptido glicosilado que presentan una estructura de la cadena de azúcares uniforme se ejemplifican tal como se indica a continuación: un método para utilizar Asn glicosilada como el aminoácido glicosilado, y aplicar un método conocido para sintetizar un péptido como la síntesis de fase sólida y de fase líquida para fabricar por tanto un polipéptido glicosilado (método A); y un método para fabricar un polipéptido que presenta cualquier aminoácido del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 y similares sustituido con Cys según un método conocido para sintetizar un péptido, y luego glicosilar la Cys mediante una síntesis química para fabricar un polipéptido glicosilado (método B). Los expertos en la materia serán capaces de fabricar varios polipéptidos glicosilados haciendo referencia a estos métodos de fabricación, y los polipéptidos glicosilados obtenidos además del método de fabricación de los mismos son extremadamente útiles en especial en el campo de la fabricación de medicamentos.

[0089] Asimismo, estos métodos A y B pueden llevarse a cabo en una combinación de dos o más. En el caso de la síntesis a pequeña escala empleada para análisis, etc., el método mencionado anteriormente puede combinarse de forma adicional con una reacción de elongación de la cadena de azúcares por una transferasa. El método A se describe en la Publicación Internacional N.º 2004/005330 (US2005222382 (A1)) y el método B se describe en la Publicación Internacional N.º 2005/010053 (US2007060543 (A1)). Asimismo, la fabricación de una cadena de azúcares presentando una estructura de la cadena de azúcares uniforme empleada en los métodos A y B se describe, por ejemplo, en la Publicación Internacional N.º 03/008431 (US2004181054 (A1)), en la Publicación Internacional N.º 2004/058984 (US2006228784 (A1)), en la Publicación Internacional N.º 2004/058824 (US2006009421 (A1)), en la Publicación Internacional N.º 2004/070046 (US2006205039 (A1)), y en la Publicación Internacional N.º. 2007/011055.

Método para fabricar un polipéptido glicosilado (Método A)

[0090] El polipéptido glicosilado puede fabricarse, por ejemplo, por síntesis en fase sólida empleando Asn glicosilada tal como se detallará a continuación.

(1) El grupo carboxi de un aminoácido presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo se une a una resina. En este caso, como el nitrógeno del grupo amino del aminoácido está protegido con un grupo protector lipófilo, se evita la autocondensación de aminoácidos entre sí, y la resina y el aminoácido reaccionan para producir un enlace.

(2) El grupo protector lipófilo del reactivo obtenido se separa para formar un grupo amino libre.

(3) Este grupo amino libre y el grupo carboxi de cualquier aminoácido, presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo, se someten a una reacción por amidación.

(4) El grupo protector liposoluble se separa para formar un grupo amino libre.

(5) Las etapas anteriores (3) y (4) se repiten una o más veces para producir un péptido de cualquier número de cualquier aminoácido enlazados entre sí, presentando una resina unida a un extremo y un grupo amino libre en el otro extremo.

(6) Finalmente, la resina se escinde con un ácido y puede obtenerse un péptido presentando una secuencia de aminoácidos deseada.

- 5 **[0091]** Aquí, si se emplea una Asn glicosilada presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo en lugar del aminoácido presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo, y el grupo carboxi de la fracción de asparagina mencionada anteriormente y el grupo hidroxilo de la resina se someten a reacción en (1); puede obtenerse un péptido presentando Asn glicosilada en el extremo C-terminal.
- [0092]** Asimismo, después de (2), o tras repetir (3) y (4) para cualquier número de veces que sea una vez o más, si se emplea el Asn glicosilado presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo en lugar de un aminoácido presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo en (3), puede añadirse una cadena de azúcares en cualquier ubicación.
- 10 **[0093]** De este modo, al emplear una Asn glicosilada presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo en lugar del aminoácido presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo dos o más veces en cualquiera de las etapas (1) y (3), puede obtenerse un péptido presentando cadenas de azúcares añadidas en cualquiera de las dos o más ubicaciones.
- 15 **[0094]** Si, tras unir el aminoácido glicosilado, el grupo protector lipófilo se separa y se forma el grupo amino libre, y la etapa (6) se lleva a cabo inmediatamente después de esto, puede obtenerse un péptido presentando una Asn glicosilada en el extremo N-terminal.
- 20 **[0095]** La resina puede ser resinas utilizadas de manera ordinaria para la síntesis de la fase sólida, y, por ejemplo, puede emplearse resina de cloruro de 2-clorotritilo funcionalizada con cloro (de Merck & Co., Inc.), resina Amino-PEGA funcionalizada con un grupo amino (de Merck & Co., Inc.), resina de alcohol NovaSyn TGT presentando un grupo hidroxilo (de Merck & Co., Inc.), resina Wang (de Merck & Co., Inc.), y resina HMPA-PEGA (de Merck & Co., Inc.). Además, puede haber un enlace presente entre la resina Amino-PEGA y el aminoácido, y entre los ejemplos de dichos enlaces, se incluyen el ácido 4-hidroxiacetilfenoxiacético (HMPA), el ácido 4-(hidroximetil-3-metoxifenoxi)-butilacético (HMPB), y similares.
- 25 **[0096]** Además, cuando se amida el extremo C-terminal, se prefiere emplear, por ejemplo, resina Rink-Amida-PEGA funcionalizada con un grupo amino (de Merck & Co., Inc.). Al escindir esta resina y el péptido con un ácido, el aminoácido C-terminal del péptido puede amidarse.
- 30 **[0097]** Para la unión entre una resina y un aminoácido presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo, por ejemplo, a fin de utilizar una resina presentando un grupo hidroxilo o una resina funcionalizada con cloro, el grupo carboxi del aminoácido se somete a una unión de éster con la resina. Además, cuando se utiliza una resina funcionalizada con un grupo amino, el grupo carboxi del aminoácido se une a la resina por un enlace amida.
- 35 **[0098]** Cualquier aminoácido puede utilizarse como el aminoácido, algunos ejemplos pueden incluir los aminoácidos naturales serina (Ser), asparagina (Asn), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), alanina (Ala), tirosina (Tyr), glicina (Gly), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y prolina (Pro).
- [0099]** También puede utilizarse la forma-D de los aminoácidos naturales anteriores.
- 40 **[0100]** Algunos ejemplos de un grupo protector lipófilo pueden incluir, por ejemplo, un grupo protector basado en carbonato o en amida, como un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), un grupo t-butiloxycarbonilo (Boc), un grupo bencilo, un grupo alilo, un grupo aliloxicarbonilo, y un grupo acetilo. A fin de introducir un grupo protector lipófilo en un aminoácido, por ejemplo, cuando se introduce un grupo Fmoc, la introducción puede llevarse a cabo añadiendo carbonato de 9-fluorenilmetil-N-succinimidilo e hidrogenocarbonato de sodio, y sometiéndolo a reacción. La reacción puede realizarse entre 0 y 50 °C, preferiblemente a temperatura ambiente durante aproximadamente entre una y cinco horas.
- 45 **[0101]** Los que están disponibles en el mercado también pueden utilizarse como un aminoácido protegido con un grupo protector lipófilo. Entre los ejemplos se incluye: Fmoc-Ser-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Tyr-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys-OH, Fmoc-Arg-OH, Fmoc-His-OH, Fmoc-Asp-OH, Fmoc-Glu-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Thr-OH, Fmoc-Cys-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp-OH, y Fmoc-Pro-OH.
- 50 **[0102]** Además, entre los ejemplos de un aminoácido protegido con un grupo protector lipófilo presentando un grupo protector introducido en la cadena lateral se puede incluir: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH, Fmoc-Cys(StBu)-OH, Fmoc-Cys(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, y Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

[0103] Además, cuando un enlazador se añada en la secuencia de aminoácidos del polipéptido glicosilado, puede insertarse un enlazador en la posición preferida utilizando un enlazador protegido con un grupo protector lipófilo en lugar del aminoácido anterior protegido con un grupo protector lipófilo durante el proceso de síntesis en fase sólida.

5 **[0104]** Cuando se emplea resina de cloruro de 2-cloronitrilo, puede llevarse a cabo la esterificación empleando una base como diisopropiletilamina (DIPEA), trietilamina, piridina, y 2,4,6-colidina. Además, cuando se emplea una resina presentando un grupo hidroxilo, por ejemplo, puede emplearse un agente de condensación por deshidratación conocido, tales como 1-mesitileno-sulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT), diciclohexilcarbodiimida (DCC), y diisopropilcarbodiimida (DIC), como el catalizador de la esterificación. La proporción de uso entre el
10 aminoácido y el agente de condensación por deshidratación es 1 parte en peso del primero hasta normalmente de 1 a 10 partes en peso, preferiblemente de 2 a 5 partes en peso, del segundo.

[0105] La reacción de esterificación se lleva a cabo preferiblemente, por ejemplo, colocando una resina en una columna en fase sólida y lavando esta resina con un disolvente, seguido de la adición de una solución de aminoácido. Ejemplos del disolvente de lavado pueden incluir dimetilformamida (DMF), 2-propanol, diclorometano, y similares. Ejemplos del disolvente para disolver el aminoácido pueden incluir dimetil sulfóxido (DMSO), DMF, diclorometano y similares. La reacción de esterificación puede llevarse a cabo entre 0 y 50 °C, preferiblemente a temperatura ambiente, durante aproximadamente de 10 minutos hasta 30 horas, preferiblemente durante aproximadamente 15 minutos hasta 24 horas.

15 **[0106]** En este momento, también se prefiere limitar el grupo hidroxilo sin reaccionar en la fase sólida mediante acetilación con anhídrido acético y similares.

[0107] La separación del grupo protector lipófilo puede llevarse a cabo, por ejemplo, tratándolo con una base. Ejemplos de la base pueden incluir piperidina, morfolina, y similares. Se prefiere llevarlo a cabo en presencia de un disolvente. Ejemplos del disolvente pueden incluir DMSO, DMF, metanol, y similares.

20 **[0108]** La reacción de amidación entre el grupo amino libre y el grupo carboxilo de cualquier aminoácido, presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo, se lleva a cabo preferiblemente en presencia de un activador y un disolvente.

[0109] Entre los ejemplos del activador se encuentran: diciclohexilcarbodiimida (DCC), sal de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (WSC/HCl), difenilfosforilacida (DPPA), carbonildiimidazol (CDI), dietilcianofosfonato (DEPC), benzotriazol-1-iloxi-trispirrolidino-fosfonio (DIPCI), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-trispirrolidino-fosfonio (PyBOP), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), hidroxisuccinimida (HOSu), dimetilaminopiridina (DMAP), 1-hidroxil-7-azabenzotriazol (HOAt), hidroxiftalimida (HOPht), pentafluorofenol (Pfp-OH), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de 3-oxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-cloro-1H-benzotriazol (HCTU), hexafluorofosfonato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), 3,4-dihidro-3-hidrodi-4-oxa-1,2,3-benzotriacina (Dhbt) y similares.

30 **[0110]** Se prefiere que la cantidad del activador utilizado sea de 1 a 20 equivalentes, preferiblemente de 1 a 10 equivalentes, y más preferiblemente 1 a 5 equivalentes al cualquier aminoácido presentando el grupo amino nitrógeno protegido con un grupo protector lipófilo.

40 **[0111]** Ejemplos del disolvente pueden incluir DMSO, DMF, diclorometano, y similares. La reacción puede llevarse a cabo entre 0 y 50 °C, preferiblemente a temperatura ambiente, durante aproximadamente 10 minutos hasta 30 horas, preferiblemente durante aproximadamente 15 minutos hasta 24 horas. La separación del grupo protector lipófilo puede llevarse a cabo de manera similar a la anterior.

[0112] El tratamiento con un ácido se prefiere para escindir la cadena peptídica de la resina. Ejemplos del ácido pueden incluir ácido trifluoroacético (TFA), fluoruro de hidrógeno (HF), y similares.

45 **[0113]** De este modo, puede obtenerse un polipéptido glicosilado presentando la posición deseada sustituido por una Asn glicosilada.

[0114] En un modo de realización de la presente invención, cuando el extremo no reductor de la cadena de azúcares en la Asn glicosilada empleada para la síntesis en fase sólida comprende un ácido siálico, se prefiere proteger el grupo carboxi del ácido siálico mencionado anteriormente mediante un grupo protector a fin de evitar
50 que el ácido siálico se escinda por el tratamiento ácido. Ejemplos del grupo protector pueden incluir un grupo bencilo, un grupo alilo, un grupo difenilmetilo, y similares. Métodos para introducir el grupo protector y separar el grupo protector pueden llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos.

Método para fabricar un polipéptido glicosilado (Método B)

[0115] El polipéptido glicosilado también puede fabricarse mediante un método para sintetizar una cadena peptídica, y luego glicosilando la cadena peptídica sintetizada. De manera específica, se fabrica un péptido que comprende Cys en la posición a glicosilar mediante un método de síntesis en fase sólida, un método de síntesis en fase líquida, un método de síntesis por una célula, un método de separación y extracción de las que están presentes en la naturaleza, y similares. La Cys que no se debe glicosilar, como la Cys en la posición predeterminada para formar un enlace disulfuro, se protege aquí, por ejemplo, con un grupo acetoamidometilo (Acm). Además, cuando se introduce Cys que no se debe glicosilar y que no se utiliza para formar un enlace disulfuro en el polipéptido glicosilado, puede introducirse protegiendo la Cys con el grupo protector durante la etapa de glicosilación y la etapa de formación del enlace disulfuro, y luego desprotegiéndolo. Ejemplos de tal grupo protector pueden incluir terc-butilo (tBu) y 4-metoxibencilo.

[0116] Además, al añadir una cadena de azúcares diferente a la Cys en el polipéptido glicosilado, puede introducirse una cadena de azúcares diferente haciendo primero la Cys para introducir una cadena de azúcares para que esté en un estado desprotegido, y luego protegiendo la Cys para introducir una cadena de azúcares diferente mediante StBu y similares. Específicamente, al sintetizar el péptido por síntesis en fase sólida etc., la Cys para introducir una primera cadena de azúcares se deja desprotegida, y la Cys para introducir una segunda cadena de azúcares se hace que sea una Cys presentando un grupo protector con Fmoc-Cys(StBu)-OH etc. Entonces, se introduce una cadena de azúcares en la Cys desprotegida mientras aún se conserva el grupo protegido, como el StBu. Después, puede introducirse una cadena de azúcares diferente en la Cys que se ha dejado desprotegida al desproteger el grupo StBu, etc. La Cys para introducir la primera cadena de azúcares y la Cys para introducir la segunda cadena de azúcares pueden ser una o más.

[0117] La desprotección del grupo StBu puede llevarse a cabo sometiendo a reacción con un agente reductor como sal de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfano (TCEP), ditiotreitolo (DTT), y tributilfosfano. La reacción anterior normalmente puede llevarse a cabo por lo general entre 0 y 80 °C, preferiblemente entre 5 y 60 °C, y más preferiblemente entre 10 y 35 °C. Preferiblemente, el tiempo de reacción normalmente es de aproximadamente 30 minutos hasta 5 horas. Después de que se complete la reacción, esta puede purificarse con un método conocido (como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)) según sea apropiado.

[0118] Cuando se tenga que añadir un enlazador en la secuencia de aminoácidos del polipéptido glicosilado, puede insertarse un enlazador en la posición preferida del polipéptido sintetizado utilizando, por ejemplo, un enlazador protegido con un grupo protector lipófilo en lugar del aminoácido protegido con un grupo protector lipófilo durante el proceso de síntesis en fase sólida.

[0119] A continuación, al someter a reacción un derivado de una cadena de azúcares compleja haloacetilada con el péptido que comprende una Cys desprotegida obtenida anteriormente, la cadena de azúcares se somete a reacción con el grupo tiol de la Cys desprotegida y se enlaza al péptido. La reacción anterior puede llevarse a cabo en un tampón fosfato, un tampón tris-clorhidrato, un tampón citrato, o una solución mezclada de los mismos, normalmente de 0 a 80 °C, preferiblemente de 10 a 60 °C, y aún más preferiblemente de 15 a 35 °C. Preferiblemente, el tiempo de reacción suele ser de 10 minutos a 24 horas, y preferiblemente, por lo general aproximadamente de 30 minutos a 5 horas. Después de que se complete la reacción, esta puede purificarse con un método conocido (tal como HPLC) según sea apropiado.

[0120] El derivado de la cadena de azúcares compleja haloacetilada es, por ejemplo, un compuesto que presenta el grupo hidroxilo enlazado al carbono en la posición 1 de una cadena de azúcares compleja unida a asparagina sustituida con $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_a\text{-(CO)-CH}_2\text{X}$ (donde X indica un átomo de halógeno, y a indica un número entero que no está limitado siempre que no inhiba la función del enlazador diana, pero es preferiblemente un número entero de 0 a 4).

[0121] En concreto, el derivado de la cadena de azúcares compleja haloacetilada y el péptido que contiene Cys se someten a reacción en un tampón fosfato a temperatura ambiente. Después de que se complete la reacción, el polipéptido glicosilado sustituido con una Cys glicosilada puede obtenerse mediante purificación con HPLC.

[0122] La reacción también puede llevarse a cabo en una solución mixta de un disolvente orgánico como DMSO, DMF, metanol, y acetonitrilo con el tampón anterior. En este caso, el disolvente orgánico puede añadirse al tampón anterior a una proporción en el intervalo de 0 a 99 % (v/v). Como la adición de dicho disolvente orgánico puede mejorar la solubilidad frente a la disolución de la reacción, esto se prefiere para un péptido que comprenda Cys desprotegida con baja solubilidad frente al tampón.

[0123] La reacción también puede llevarse a cabo en un disolvente orgánico como DMSO, DMF, metanol, y acetonitrilo o una solución mixta de los mismos. En este caso, se prefiere que se lleve a cabo en presencia de una base. Ejemplos de la base pueden incluir DIPEA, trietilamina, piridina, 2,4,6-colidina, y similares.

[0124] La reacción también puede llevarse a cabo en una solución mixta de clorhidrato de guanidina o urea añadida a la solución tampón. Puede añadirse la urea o el clorhidrato de guanidina al tampón anterior de manera

que la concentración final sea de 1 M a 8 M. Esto se prefiere porque la adición de urea o clorhidrato de guanidina también puede mejorar la solubilidad del péptido con baja solubilidad frente al tampón.

[0125] Además, la reacción también puede llevarse a cabo añadiendo sal de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfano (TCEP) o ditiotreitól (DTT) al tampón a fin de evitar la formación de un dímero de péptidos comprendiendo Cys desprotegida a través del enlace disulfuro. Puede añadirse TCEP o DDT al tampón de manera que la concentración final sea de 10 μ M a 10 mM.

[0126] Asimismo, después de que la cadena de azúcares se una a la Cys diana, el grupo protector de la Cys protegida con Acm y similares se desprotege. Cuando el grupo protector es un grupo Acm, la desprotección puede llevarse a cabo permitiendo la reacción con yodo, acetato de mercurio (II), nitrato de plata (I), o acetato de plata (I) y similares en agua, metanol, ácido acético o una solución mixta de los mismos.

[0127] La reacción anterior normalmente puede llevarse a cabo entre 0 y 80 °C, preferiblemente entre 5 y 60 °C, y más preferiblemente entre 10 y 35 °C. Preferiblemente, el tiempo de reacción normalmente es de aproximadamente 5 minutos hasta 24 horas. Después de que se complete la reacción, esta puede purificarse con un método conocido (tal como HPLC) según sea apropiado después del tratamiento con DTT o ácido clorhídrico y similares.

[0128] De este modo, puede obtenerse un polipéptido glicosilado presentando la posición deseada sustituido con una Cys glicosilada. Asimismo, tal como se describirá a continuación, el polipéptido glicosilado purificado como tal formará un enlace disulfuro entre Cys desprotegidas.

[0129] Asimismo, cuando se fabrique un polipéptido glicosilado presentando múltiples cadenas de azúcares que contienen ácido siálico, como cadenas de azúcares disialo o monosialo, en la secuencia peptídica, puede emplearse una cadena de azúcares que contienen ácido siálico presentando el grupo carboxi del ácido siálico en la cadena de azúcares a introducir protegido con un grupo bencilo (Bn), un grupo alilo, un grupo difenilmetilo, un grupo fenacilo y similares.

[0130] Cuando se introduce una cadena de azúcares presentando el grupo carboxi del ácido siálico protegido, puede llevarse a cabo una etapa de desprotección del grupo protector del ácido siálico después de la etapa de formación de un enlace disulfuro en el polipéptido glicosilado.

[0131] De este modo, al proteger el grupo carboxi del ácido siálico con un grupo bencilo y similares, se facilitará la etapa de separación/purificación mediante HPLC, etc. en la etapa de fabricación. La protección del grupo carboxi del ácido siálico también permitirá que se evite la separación del ácido siálico lábil al ácido.

[0132] La reacción de protección del grupo carboxi del ácido siálico en la cadena de azúcares puede llevarse a cabo mediante un método que conocen bien los expertos en la materia. Asimismo, en el polipéptido glicosilado que ha formado un enlace disulfuro, el grupo protector del grupo carboxi del ácido siálico puede desprotegerse mediante hidrólisis en condiciones básicas. La reacción anterior normalmente puede llevarse a cabo entre 0 y 50 °C, preferiblemente entre 0 y 40 °C, y más preferiblemente entre 0 y 30 °C. Preferiblemente, el tiempo de reacción normalmente es de aproximadamente 5 minutos hasta 5 horas. Después de que se complete la reacción, esta puede purificarse con un método conocido (tal como HPLC) según sea apropiado después de la neutralización mediante un ácido débil como ácido fosfórico o ácido acético.

[0133] Asimismo, el polipéptido glicosilado creado por los métodos anteriores A y B, pueden formar un enlace disulfuro entre Cys con un método conocido por los expertos en la materia empleando aire y/o oxígeno, yodo, DMSO, una mezcla de glutatión reducido y oxidado, ferrocianuro de potasio, reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)), trifluoroacetato de talio (III), sulfóxido de alquiltriclorosilano, y similares.

[0134] Cuando se forma un enlace disulfuro entre Cys-Cys, la Cys en un polipéptido glicosilado que no es deseable que forme un enlace disulfuro se protege con un grupo protector. Un grupo protector estable en condiciones de oxidación, como Acm, tBu, 4-metoxibencilo, 4-metilbencilo, y similares, puede emplearse como dicho grupo protector.

[0135] En el método B, la formación de un enlace disulfuro también puede llevarse a cabo antes de la introducción de la cadena de azúcares. Sin embargo, cuando se introduce un grupo protector en la Cys para formar un enlace disulfuro, la etapa de desprotección precederá a la etapa de formación del enlace disulfuro.

(Actividad)

[0136] El polipéptido glicosilado de la presente invención tiene actividad de interferón β . En la presente memoria, "actividad de interferón β " significa que presenta al menos una actividad entre actividades conocidas, tales como acción inmunorregulatoria, actividad antiviral, y actividad antitumoral.

[0137] Por ejemplo, la actividad del interferón β del polipéptido glicosilado puede medirse con el ensayo de medición de la actividad antitumoral descrito en los Ejemplos 11 a 14 y similares.

5 **[0138]** El ensayo de medición de la actividad antitumoral puede examinarse, por ejemplo, administrando de forma subcutánea el polipéptido glicosilado en cuestión a ratones que poseen un tumor, y midiendo el volumen del tumor a lo largo del tiempo.

(Composición farmacéutica)

10 **[0139]** Una composición farmacéutica que contiene el polipéptido glicosilado de la presente invención como el ingrediente activo es efectiva para la terapia o prevención de una enfermedad relacionada con el interferón β . Ejemplos de una enfermedad relacionada con el interferón β incluyen: tumor cerebral, melanoma maligno cutáneo, hepatitis B crónica activa, hepatitis C crónica, panencefalitis esclerosante subaguda, cirrosis C compensada, esclerosis múltiple, y similares. El tumor cerebral anterior incluye glioblastomas, meduloblastomas, astrocitomas, y similares. La composición farmacéutica que contiene el polipéptido glicosilado de la presente invención como el ingrediente activo es efectiva para la terapia o prevención de la enfermedad anterior.

15 **[0140]** Asimismo, el sujeto de la administración de la composición farmacéutica que contiene el polipéptido glicosilado de la presente invención como el ingrediente activo significa cualquier individuo biológico, preferiblemente un animal, más preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un individuo humano.

[0141] La composición farmacéutica anterior es la formulada en una forma corriente de composición farmacéutica con un diluyente o un excipiente como rellenos utilizados habitualmente, expansores, ligadores, agentes humectantes, desintegrantes, surfactantes, lubricantes, y similares.

20 **[0142]** Ejemplos de tales composiciones farmacéuticas incluyen comprimidos, pastillas, polvos, líquidos, suspensiones, emulsiones, gránulos, cápsulas, supositorios, sustancias inhalantes, soluciones oftálmicas, inyecciones, y similares.

25 **[0143]** La cantidad de polipéptido glicosilado de la presente invención contenido en la composición farmacéutica no está limitada particularmente y puede seleccionarse según sea apropiado de entre una amplia gama. Se prefiere habitualmente que contenga un 1 a un 90 % en peso, que contenga más preferiblemente un 1 a un 70 % en peso del polipéptido glicosilado de la presente invención en la composición farmacéutica.

30 **[0144]** La composición farmacéutica que contiene el polipéptido glicosilado de la presente invención como el ingrediente activo puede contener además otros ingredientes activos, o también puede emplearse en combinación con una composición farmacéutica que contenga otros ingredientes activos. Asimismo, la composición farmacéutica que contiene el polipéptido glicosilado de la presente invención como el ingrediente activo puede comprender el polipéptido glicosilado como una sal farmacéuticamente aceptable, o también puede comprender uno o más polipéptidos glicosilados diferentes adicionales de la presente invención como el ingrediente activo. También puede emplearse en combinación con uno o más composiciones farmacéuticas diferentes que contienen el polipéptido glicosilado de la presente invención como el ingrediente activo. Asimismo, otros ingredientes que puede contener la composición farmacéutica pueden incluir un portador farmacéuticamente aceptable y similares conocidos por los expertos en la materia.

35 **[0145]** El método de administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención no está particularmente restringido, y se administra en un método que se ajuste con las varias formulaciones de fármacos, el sexo, la edad del paciente, el estado de la enfermedad, y otras condiciones. Un ejemplo del método de administración en el caso de los comprimidos, pastillas, líquidos, suspensiones, emulsiones, gránulos, y cápsulas incluye la administración por vía oral. Además, en el caso de las inyecciones, puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, o intraperitoneal, sola o en una mezcla con reposiciones de fluidos habituales como glucosa y aminoácidos. En el caso de los supositorios, se administra por vía rectal. En el caso de las soluciones oftálmicas, se aplica al tejido ocular, como los sacos conjuntivales. En el caso de las sustancias inhalantes, se aplica en el tubo bronquial o en el pulmón.

40 **[0146]** La dosis de la composición farmacéutica anterior puede seleccionarse según sea apropiado en función del uso, del sexo y la edad del paciente, la magnitud de la enfermedad, y otras condiciones. Por ejemplo, la dosis puede ser de 0,001 a 100 nmol, preferiblemente de 0,01 a 10 nmol, y más preferiblemente de 0,01 a 1 nmol del polipéptido glicosilado de la presente invención por 1 kg de peso corporal.

45 **[0147]** La frecuencia de administración de la composición farmacéutica anterior puede seleccionarse según sea apropiado en función del uso, del sexo y la edad del paciente, la magnitud de la enfermedad, y otras condiciones. Por ejemplo, también puede seleccionarse una frecuencia de administración que sea de tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, o además incluso menor, dependiendo de su estabilidad en la sangre (como una vez a la semana o una vez al mes). La frecuencia de administración de la composición farmacéutica mencionada anteriormente es preferiblemente de una vez al día o menos.

5 **[0148]** La cadena de azúcares añadida al polipéptido glicosilado de la presente invención puede degradarse fácilmente por el sistema metabólico del cuerpo. Asimismo, en un aspecto de la presente invención, dicha cadena de azúcares tiene una estructura que existe como un enlace a un glicopéptido (o una glicoproteína) *in vivo*. Por consiguiente, una composición farmacéutica que comprende el polipéptido glicosilado de la presente invención y el polipéptido glicosilado mencionado anteriormente como ingredientes activos tiene ventajas, como que no muestra efectos secundarios o antigenicidad incluso cuando se administra *in vivo*, y causa menos preocupaciones de pérdida del efecto del fármaco debido a reacciones alérgicas o a la producción de anticuerpos.

10 **[0149]** Además, el polipéptido glicosilado de la presente invención también es muy útil con respecto a permitir un suministro estable y fácil a gran escala, y a proporcionar medicamentos de alta calidad con una calidad estable.

[0150] Los términos utilizados en el presente documento pueden emplearse para describir modos de realización particulares, y no pretenden limitar la invención.

15 **[0151]** El término "que comprende", tal como se entiende en el presente documento, a menos que el contenido indique claramente que se entienda de otra manera, indica la presencia de los elementos descritos (como componentes, etapas, elementos y números), y no excluye la presencia de otros elementos (como componentes, etapas, elementos y números).

20 **[0152]** A menos que se defina de otro modo, todos los términos utilizados en el presente documento (incluidos los términos técnicos y científicos) tienen los mismos significados que los que reconocen ampliamente los expertos en la materia de la tecnología a la que pertenece la presente invención. Los términos utilizados en el presente documento, a menos que se definan de otro modo, deben interpretarse como teniendo los significados coherentes con los significados del presente documento y en los campos técnicos relacionados, y no deben interpretarse como teniendo significados idealizados o excesivamente formales.

25 **[0153]** Términos como primero y segundo se emplean a menudo para expresar varios elementos, y debe reconocerse que estos elementos no deben limitarse por estos términos. Estos términos se emplean únicamente para distinguir un elemento de otro y, por ejemplo, es posible describir un primer elemento como un segundo elemento y, de manera similar, describir un segundo elemento como un primer elemento sin desviarse del alcance de la presente invención.

30 **[0154]** La presente invención se describirá más específicamente a continuación mediante Ejemplos. No obstante, la presente invención puede representarse de varias maneras, y no debe interpretarse como estando limitada a los Ejemplos descritos en la presente memoria.

Ejemplos

[0155] A continuación, se describirá el sistema de notación de los fragmentos de polipéptido.

35 **[0156]** Por ejemplo, IFN 1-78(S1Thi-C30Acm)MESNA indica un fragmento de péptido que tiene una secuencia peptídica equivalente a la 1^a - 78^a secuencia de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1, en la que la 1^a serina se sustituye por cisteína presentando una estructura tiazolidina, la cadena lateral de la 30^a cisteína está protegida por Acm, y el extremo C-terminal está alquiloésterificado mediante 2-mercaptoetanesulfonato (MESNA) en su secuencia peptídica.

40 **[0157]** Asimismo, IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-M35C-Q48C)MESNA indica un fragmento de péptido que tiene una secuencia peptídica equivalente a la 1^a - 78^a secuencia de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1, en la que la 1^a serina se sustituye por cisteína presentando una estructura tiazolidina, la cadena lateral de la 30^a cisteína está protegida por Acm, la 35^a metionina se sustituye por cisteína, la 48^a glutamina se sustituye por cisteína, y el extremo C-terminal está alquiloésterificado mediante 2-mercaptoetanesulfonato (MESNA) en su secuencia peptídica.

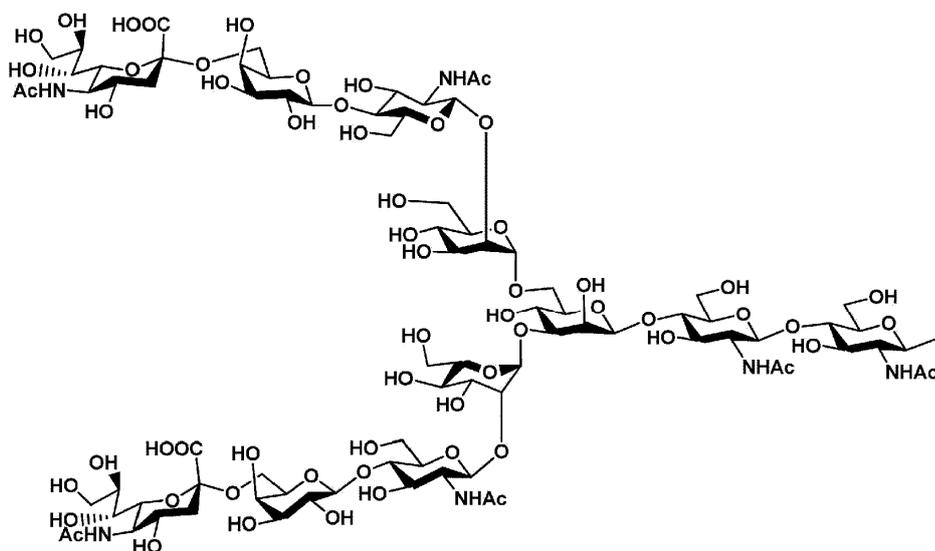
45 **[0158]** De forma similar, IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-Q48C)Ethan indica un fragmento de péptido que tiene una secuencia peptídica equivalente a la 1^a - 78^a secuencia de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1, en la que la 1^a serina se sustituye por cisteína presentando una estructura tiazolidina, la cadena lateral de la 30^a cisteína está protegida por Acm, la 48^a glutamina se sustituye por cisteína, y el extremo C-terminal está alquiloésterificado mediante etanotiol en su secuencia peptídica.

50 **[0159]** Asimismo, IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-R123C-C140Acm) indica un fragmento de péptido que tiene una secuencia peptídica equivalente a la 79^a - 165^a secuencia de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1, en la que la 79^a asparagina se sustituye por cisteína, la 107^a lisina se sustituye por cisteína, la 112^a lisina se sustituye por cisteína, la 123^a arginina se sustituye por cisteína, y la 140^a cisteína se protege con un grupo Asm en su secuencia peptídica.

[0160] El sistema de anotación de los polipéptidos glicosilados se describirá a continuación.

[0161] Por ejemplo, 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) indica que cada aminoácido de serina en la posición 1, glutamina en la posición 48, asparagina en la posición 79, lisina en la posición 107, arginina en la posición 112, y arginina en la posición 123 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 se sustituye por Cys, y que la estructura de la cadena de azúcares α 2-6 disialo mostrada en la siguiente Fórmula (1) se une a la Cys en cada sustitución.

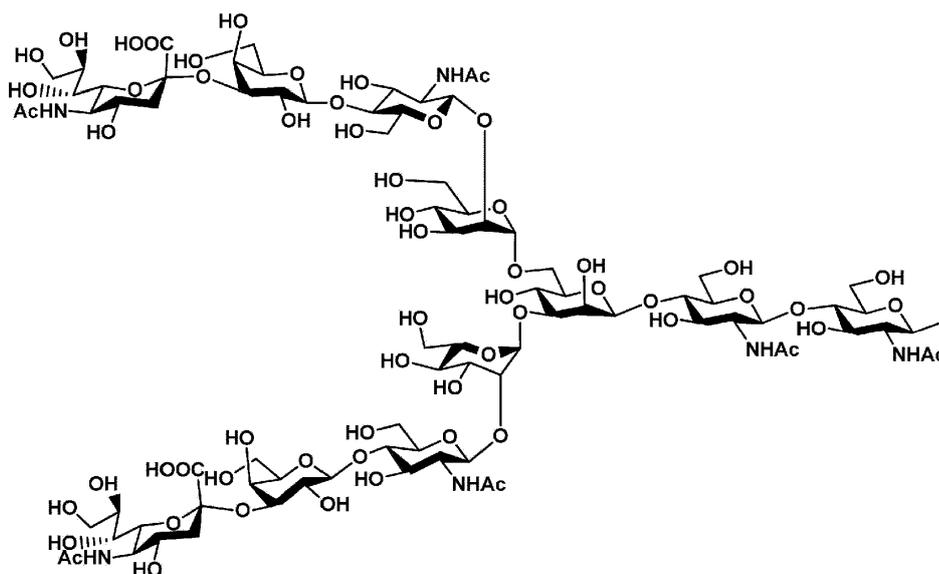
[Fórmula química 13]



Fórmula (1)

[0162] Asimismo, 2-3diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) indica que cada aminoácido de serina en la posición 1, glutamina en la posición 48, asparagina en la posición 79, lisina en la posición 107, arginina en la posición 112, y arginina en la posición 123 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 se sustituye por Cys, y que la estructura de la cadena de azúcares α 2-3disialo mostrada en la siguiente Fórmula (2) se une a la Cys en cada sustitución.

[Fórmula química 14]

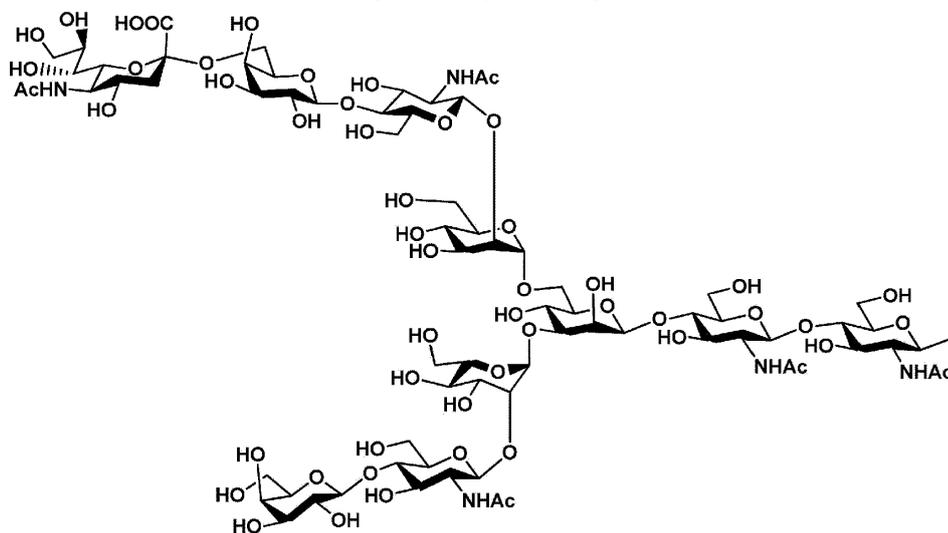


Fórmula (2)

[0163] Asimismo, 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) indica que cada aminoácido de serina en la posición 1, glutamina en la posición 48, asparagina en la posición 79, lisina en la posición 107, arginina en la posición 112, y arginina en la posición 123 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 se sustituye por Cys, y que la estructura de la cadena de azúcares α 2-6 monosialo mostrada en la siguiente Fórmula (5) o (6) se une a la Cys en cada sustitución.

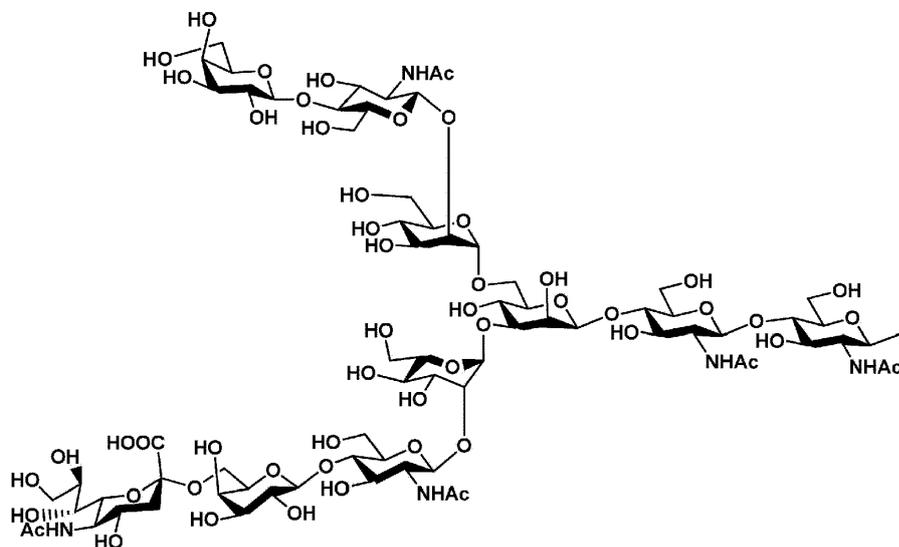
5

[Fórmula química 15]



Fórmula (5)

[Fórmula química 16]

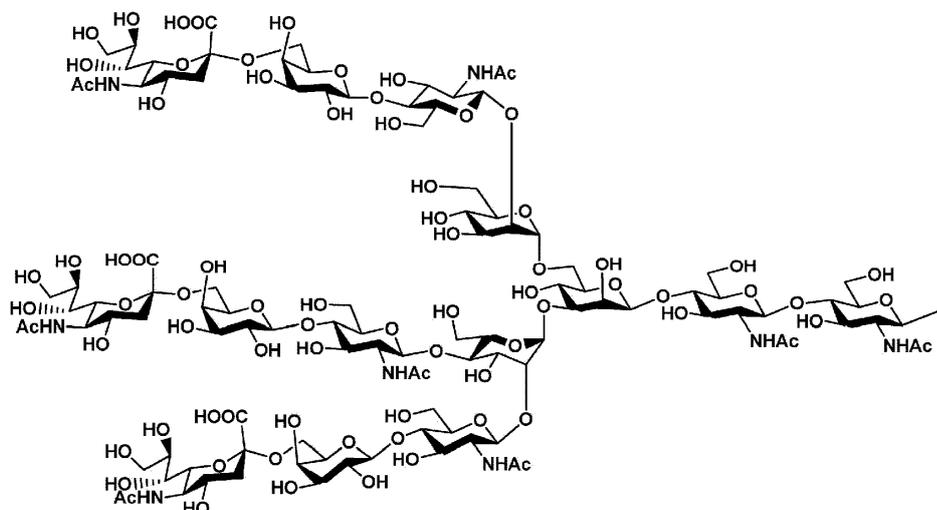


Fórmula (6)

[0164] Asimismo, 2-6 triSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) indica que cada aminoácido de serina en la posición 1, glutamina en la posición 48, asparagina en la posición 79, lisina en la posición 107, arginina en la posición 112, y arginina en la posición 123 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 se sustituye por Cys, y que la estructura de la cadena de azúcares α 2-6 trisialo sialo mostrada en la siguiente Fórmula (3) se une a la Cys en cada sustitución.

10

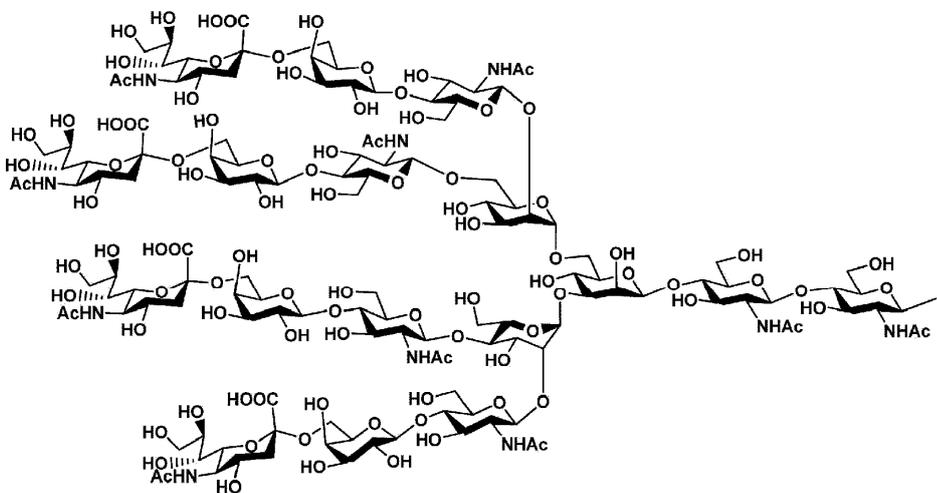
[Fórmula química 17]



Fórmula (3)

[0165] Asimismo, 2-6 tetraSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) indica que cada aminoácido de serina en la posición 1, glutamina en la posición 48, asparagina en la posición 79, lisina en la posición 107, arginina en la posición 112, y arginina en la posición 123 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 se sustituye por Cys, y que la estructura de la cadena de azúcares α 2-6 tetrasialo mostrada en la siguiente Fórmula (4) se une a la Cys en cada sustitución.

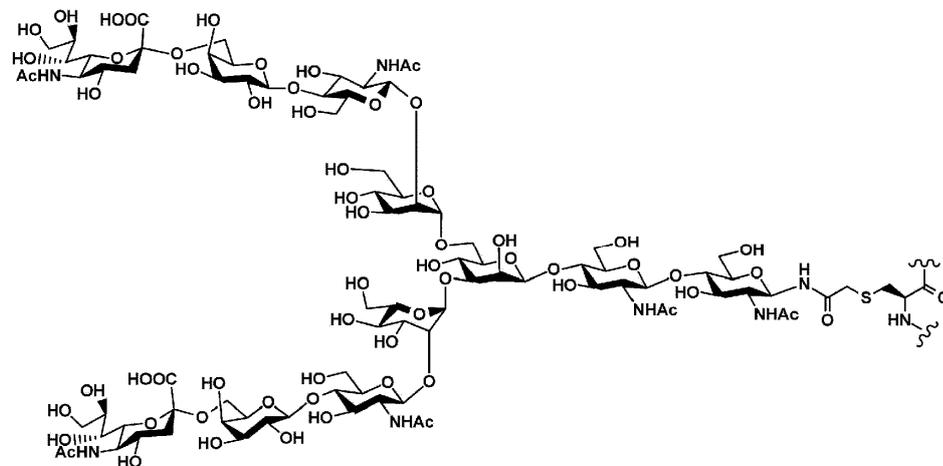
[Fórmula química 18]



Fórmula (4)

[0166] La estructura de una estructura de cadena de azúcares enlazada a Cys se muestra en la siguiente Fórmula (14) con una cadena de azúcares α 2-6 disialo como ejemplo. En la siguiente fórmula, las líneas onduladas indican que se omiten los dibujos de los aminoácidos adyacentes enlazados mediante enlaces peptídicos a la cisteína dibujada en el borde derecho de la siguiente fórmula.

[Fórmula química 19]

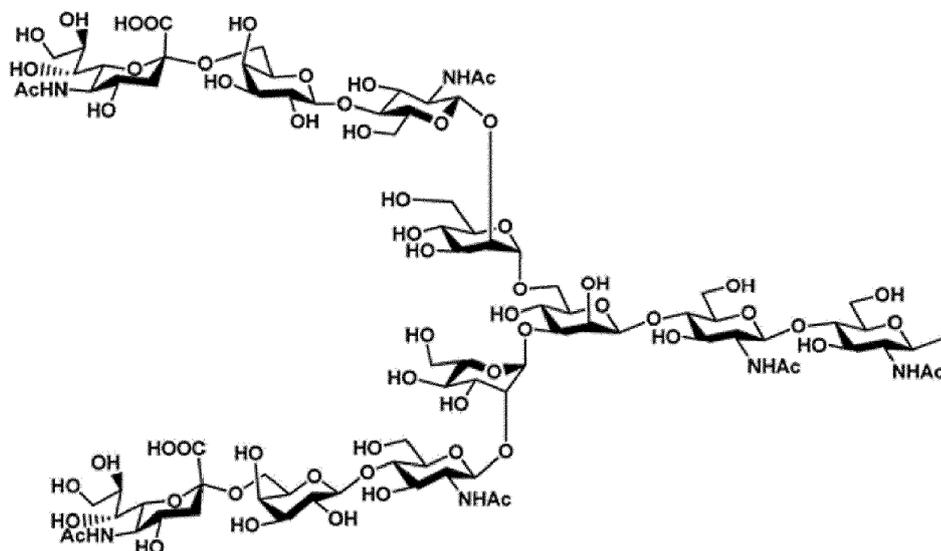


Fórmula (14)

[0167] "DiSialo" significa una cadena de azúcares disialo, "monoSialo" significa una cadena de azúcares monosialo, "triSialo" significa una cadena de azúcares trisialo, y "tetraSialo" significa una cadena de azúcares tetrasialo.

- 5 [0168] Asimismo, 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79-K107C-R112C-R123C) indica que cada aminoácido de serina en la posición 1, glutamina en la posición 48, lisina en la posición 107, arginina en la posición 112, arginina en la posición 123 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 se sustituye por Cys, y que la estructura de la cadena de azúcares α -6 disialo mostrada en la siguiente Fórmula (1) se une a Cys en cada sustitución de las anteriores y a asparagina en la posición 79.

[Fórmula química 20]



Fórmula (1)

10

[0169] Asimismo, en los siguientes ejemplos, el IFN- β presentando aminoácidos en 4, 5 y 6 ubicaciones sustituidos con aminoácidos glicosilados puede representarse como "IFN- β glicosilado cuádruple, quíntuple, y séxtuple", respectivamente. En la presente invención, un "polipéptido glicosilado presentando aminoácidos en 4 ubicaciones sustituidos con aminoácidos glicosilados" y "un IFN- β glicosilado cuádruple" son sinónimos, y de forma similar, "un polipéptido glicosilado presentando aminoácidos en 5 ubicaciones sustituidos con aminoácidos glicosilados" y "un IFN- β glicosilado quíntuple" son sinónimos, y de forma similar, "un polipéptido glicosilado presentando aminoácidos en 6 ubicaciones sustituidos con aminoácidos glicosilados" y "un IFN- β glicosilado séxtuple" son sinónimos.

15

(Ejemplo 1) Síntesis de fragmentos de tioéster(Ejemplo 1-1) Síntesis de IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-Q48C)Ethan (SEQ ID NO. 3)

5 **[0170]** Se añadió resina Amino-PEGA (de Merck & Co., Inc.) (50 μ mol) a una columna para la síntesis en fase sólida, se disolvió ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxi butírico (HMPB) (125 μ mol), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) (125 μ mol), y N-etilmorfolina (125 μ mol) en dimetilformamida (DMF) (1,25 ml), y se removió a temperatura ambiente durante 4 horas. La resina se lavó suficientemente con DMF y diclorometano (DCM). Posteriormente, se disolvió Fmoc-Trp(Boc)-OH (0,25 mmol), 1-mesitilenesulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) (0,25 mmol), y N-metilimidazol (0,187 mmol) en DCM (1,25 ml) y se añadió a la columna para síntesis en fase sólida, y luego se removió durante 4 horas.

10 **[0171]** La resina se lavó con DCM y DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 15 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) para permitir la desprotección. Esto se lavó con DMF, la posterior elongación la cadena peptídica empleó el método mostrado a continuación para condensar de manera secuencial los aminoácidos.

15 **[0172]** El aminoácido protegido con un grupo Fmoc o Boc se disolvió en DMF, y la solución se añadió a la columna de síntesis en fase sólida (0,25 mmol). Se añadió hexafluorofosfato de 3-oxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-cloro-1H-benzotriazol (HCTU) 0,2 M/DMF (0,25 mmol) a la columna de síntesis en fase sólida, y se añadió N-metil morfolina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) o 2,6,4-trimetilpiridina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) a la columna para la síntesis en fase sólida. Después de remover a temperatura ambiente durante 15 o 30 minutos, se lavó la resina con DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 10 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 ml) para permitir la desprotección. Se repitió esta operación, y los aminoácidos se condensaron de manera secuencial por el método de síntesis en fase sólida Fmoc.

20 **[0173]** Después de lavar la resina obtenida con DCM y DMF, se añadió una solución mixta de trifluoroetanol y ácido acético (1:1), y el péptido protegido se separó de la resina al removerlo durante 18 horas a temperatura ambiente. La solución de reacción que comprende el péptido protegido se concentró a presión reducida, y luego se secó a presión reducida. El péptido protegido seco se disolvió en DMF (3,0 mL), y luego se enfrió bajo una atmósfera de nitrógeno de -15 °C a -20 °C. A esto se añadió etantol (5,0 mmol), y después se añadió hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-trispirrolidinofosfonio (PyBOP) (0,50 mmol), luego diisopropiletamina (DIPEA) (0,5 mmol). Después de remover de -15 °C a -20 °C durante 2 horas, se añadió ácido acético (0,8 mL), y se permitió que volviera de forma gradual a temperatura ambiente. Cuando la temperatura volvió a temperatura ambiente, la solución de reacción se concentró a presión reducida. Al residuo obtenido se le añadió ácido trifluoroacético:agua:fenol:tioanisol:triisopropilsilano (= 95:2.5:2.5:2.5:5), y esto se removió a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la solución se volvió a añadir a un éter dietílico y se dejó que precipitase, luego se sometió a separación centrífuga, y la porción de la solución se removió para obtener un residuo que comprende la forma tioéster del péptido diana. Este residuo obtenido se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO Proteonavi], y como resultado de un análisis de masas por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido correspondía con la masa del IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-Q48C)Ethan diana (valor calculado = 9445,8 Da, valor real = 9455,5 Da),

(Ejemplo 1-2) Síntesis de IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-Q48C-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 4)

40 **[0174]** Se añadió resina Amino-PEGA (de Merck & Co., Inc.) (50 μ mol) a una columna para la síntesis en fase sólida, se disolvió ácido 3-Fmoc-4-diaminobenzoico (150 μ mol), hexafluorofosfato de 3-oxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-cloro-1H-benzotriazol (HCTU) (150 μ mol), y diisopropiletamina (300 μ mol) en DMF (1,25 ml), y se removió a temperatura ambiente durante 2 horas.

45 **[0175]** Después de remover, se lavó la resina con DMF, el grupo Fmoc se trató durante 15 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) para permitir la desprotección, y luego la resina se lavó suficientemente con DMF. Los aminoácidos se condensaron de manera secuencial en la posterior elongación la cadena peptídica empleando el método que se muestra a continuación.

50 **[0176]** El aminoácido protegido con un grupo Fmoc o Boc se disolvió en DMF, y la solución se añadió a la columna de síntesis en fase sólida (0,25 mmol). Se añadió hexafluorofosfato de 3-oxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-cloro-1H-benzotriazol (HCTU) 0,2 M/DMF (0,25 mmol) a la columna de síntesis en fase sólida, y se añadió N-metil morfolina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) o 2,6,4-trimetilpiridina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) a la columna para la síntesis en fase sólida. Después de remover a temperatura ambiente durante 15 o 30 minutos, se lavó la resina con DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 10 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 ml) para permitir la desprotección. Se repitió esta operación, y los aminoácidos se condensaron de manera secuencial por el método de síntesis en fase sólida Fmoc.

- 5 **[0177]** Después de lavar la resina obtenida con DMF y DCM, se disolvió cloroformiato de 4-nitrofenilo (0.25 mmol) en DCM, se añadió a la columna de síntesis en fase sólida, y luego se removió a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de remover, la resina se lavó con DCM y DMF, se añadió diisopropiletamina (2,5 mmol), y se removió a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de lavar la resina obtenida con DMF y DCM, se le añadió ácido trifluoroacético:agua:fenol:tioanisol:triisopropilsilano (= 95:2,5:2,5:2,5:5), y esto se removió a temperatura ambiente. Después de 5 horas, la resina estaba suficientemente lavada con una solución tampón a pH 7,2 que comprende 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (solución de ácido clorhídrico de guanidina 8 M, de solución de ácido fosfórico 0,1 M, y de 2-mercaptoetanosulfonato de sodio 300m M). El tampón anterior se añadió a la resina, y se removió a temperatura ambiente durante 12 horas.
- 10 **[0178]** Después de remover, la solución obtenida se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO Proteonavi], y como resultado de un análisis de masas por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-Q48C-N75C)MESNA diana (valor calculado = 9540,9 Da, valor real = 9541,6 Da),

(Ejemplo 1-3) Síntesis de otros fragmentos de tioéster

- 15 **[0179]** Los fragmentos de tioéster que se muestran a continuación se sintetizaron de forma similar al (Ejemplo 1-1).

IFN 1-78(S1Thi-N3C-C30Acm-Q48C)Ethan (SEQ ID NO. 5)
 IFN 1-78(S1Thi-E28C-C30Acm-Q48C-R70C)Ethan (SEQ ID NO. 6)

- [0180]** Los siguientes fragmentos de tioéster se sintetizaron de forma similar al (Ejemplo 1-2).

- 20 IFN 1-78(C30Acm)MESNA (SEQ ID NO. 7)
 IFN 1-78(S1Thi-C30Acm)MESNA (SEQ ID NO. 8)
 IFN 1-78(F7C-C30Acm)MESNA (SEQ ID NO. 9)
 IFN 1-78(N24C-C30Acm)MESNA (SEQ ID NO. 10)
 IFN 1-78(G25C-C30Acm)MESNA (SEQ ID NO. 11)
 25 IFN 1-78(E28C-C30Acm)MESNA (SEQ ID NO. 12)
 IFN 1-78(C30Acm-K32C)MESNA (SEQ ID NO. 13)
 IFN 1-78(C30Acm-M35C)MESNA (SEQ ID NO. 14)
 IFN 1-78(C30Acm-D38C)MESNA (SEQ ID NO. 15)
 IFN 1-78(C30Acm-E41C)MESNA (SEQ ID NO. 16)
 30 IFN 1-78(C30Acm-Q48C)MESNA (SEQ ID NO. 17)
 IFN 1-78(C30Acm-R70C)MESNA (SEQ ID NO. 18)
 IFN 1-78(C30Acm-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 19)
 IFN 1-78(C30Acm-E41C-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 20)
 IFN 1-78(C30Acm-E42C-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 21)
 35 IFN 1-78(C30Acm-Q45C-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 22)
 IFN 1-78(C30Acm-L46C-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 23)
 IFN 1-78(C30Acm-Q47C-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 24)
 IFN 1-78(C30Acm-Q48C-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 25)
 IFN 1-78(C30Acm-F49C-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 26)
 40 IFN 1-78(C30Acm-Q50C-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 27)
 IFN 1-78(S1Thi-Y29C-C30Acm-Q48C)MESNA (SEQ ID NO. 28)
 IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-M35C-Q48C)MESNA (SEQ ID NO. 29)
 IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-E41C-Q48C)MESNA (SEQ ID NO. 30)

- 45 **[0181]** Los resultados de la espectrometría de masas de los compuestos obtenidos en el (Ejemplo 1-1), el (Ejemplo 1-2) y el (Ejemplo 1-3) se muestran a continuación en la (Tabla 1).

[Tabla 1]

[0182]

(Tabla 1)

Compuesto de ejemplo	Valor teórico (MW)	Valor real (MW)	Método de ionización
----------------------	--------------------	-----------------	----------------------

1-1	IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-Q48C)Ethan	9445,8	9445,5	ESI
1-2	IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-Q48C-S75C)MESNA	9540,9	9541,6	ESI
1-3	IFN 1-78(S1Thi-N3C-C30Acm-Q48C)Ethan	9434,8	9434,8	ESI
1-3	IFN 1-78(S1Thi-E28C-C30Acm-Q48C-R70C)Ethan	9366,7	9365,8	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm)MESNA	9521,7	9522,0	ESI
1-3	IFN 1-78(S1Thi-030Acm)MESNA	9549,8	9551,1	ESI
1-3	IFN 1-78(F7C-C30Acm)MESNA	9477,7	9479,3	ESI
1-3	IFN 1-78(N24C-C30Acm)MESNA	9510,8	9510,3	ESI
1-3	IFN 1-78(G25C-C30Acm)MESNA	9567,8	9567,3	ESI
1-3	IFN 1-78(E28C-C30Acm)MESNA	9495,7	9496,4	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-K32C)MESNA	9496,7	9496,3	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-M35C)MESNA	9493,7	9493,3	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-D38C)MESNA	9509,8	9509,4	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-E41C)MESNA	9495,7	9495,3	ESI
1-3	IFN 1-78(C310Acm-Q48C)MESNA	9496,7	9496,4	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-R70C)MESNA	9468,7	9468,3	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-S75C)MESNA	9537,8	9538,4	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-E41C-S75C)MESNA	9511,8	9511,3	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-E42C-S75C)MESNA	9511,8	9510,7	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-Q45C-S75C)MESNA	9512,8	9512,7	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-L46C-S75C)MESNA	9527,8	9527,7	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-Q47C-S75C)MESNA	9512,8	9512,7	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-Q48C-S75C)MESNA	9512,8	9513,9	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-F49C-S75C)MESNA	9493,8	9493,7	ESI
1-3	IFN 1-78(C30Acm-Q50C-S75C)MESNA	9512,8	9513,7	ESI
1-3	IFN 1-78(S1Thi-Y29C-C30Acm-Q48C)MESNA	9464,8	9465,6	ESI
1-3	IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-M35C-Q48C)MESNA	9496,8	9496,6	ESI
1-3	IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-E41C-Q48C)MESNA	9498,8	9499,6	ESI

(Ejemplo 2) Síntesis de fragmentos de péptido(Ejemplo 2-1) Síntesis de IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-R123C-C140Acm) (SEQ ID NO. 31)

- 5 **[0183]** Se añadió resina Amino-PEGA (de Merck & Co., Inc.) (50 µmol) a una columna para la síntesis en fase sólida, ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxi butírico (HMPB) (125 µmol), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) (125 µmol), y N-etilmorfolina (125 µmol) se disolvieron en DMF (1,25 ml), y se removieron a temperatura ambiente durante 4 horas. La resina se lavó suficientemente con DMF y DCM. Posteriormente, se disolvió Fmoc-Asn(Trt)-OH (0,25 mmol), 1-mesitilenesulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) (0,25 mmol), y N-metilimidazol (0,187 mmol) en DCM (1,25 ml) y se colocó en la columna para síntesis en fase sólida, y luego se removió durante 4 horas.
- 10 **[0184]** Después de remover, se lavó la resina con DCM y DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 15 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) para permitir la desprotección. Después de lavarlo con DMF, la elongación la cadena peptídica posterior empleó el método mostrado a continuación para condensar de manera secuencial los aminoácidos.
- 15 **[0185]** El aminoácido protegido con un grupo Fmoc o Boc se disolvió en DMF, y la solución se añadió a la columna de síntesis en fase sólida (0,25 mmol). Se añadió hexafluorofosfato de 3-oxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-5-cloro-1H-benzotriazolío (HCTU) 0,2 M/DMF (0,25 mmol) a la columna de síntesis en fase sólida, y se añadió N-metil morfolina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) o 2,6,4-trimetilpiridina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) a la columna para la síntesis en fase sólida. Después de remover a temperatura ambiente durante 15 o 30

minutos, se lavó la resina con DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 10 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 ml) para permitir la desprotección. Se repitió esta operación, y los aminoácidos se condensaron de manera secuencial por el método de síntesis en fase sólida Fmoc.

- 5 **[0186]** A la resina obtenida se le añadió ácido trifluoroacético:agua:fenol:tioanisol:triisopropilsilano (= 95:2,5:2,5:2,5:5), y esto se removió a temperatura ambiente. Después de 3 horas, la solución se volvió a añadir a un éter dietílico y se dejó que precipitase, luego se sometió a separación centrífuga, y la porción de la solución se removió para obtener un residuo que comprende el péptido diana. Este residuo obtenido se purificó con HPLC con inversión de fase [columna: SHISEIDO Proteonavi], y como resultado de un análisis de masas por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido correspondía con la masa del IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-R123C-C140Acm) (valor calculado = 10499,1 Da, valor real = 10498,1 Da),
- 10

(Ejemplo 2-2) Síntesis de otros fragmentos de péptido

[0187] Los siguientes fragmentos de péptido se sintetizaron de forma similar al (Ejemplo 2-1). IFN 79-165(N79C-C140Acm) (SEQ ID NO. 32)

- IFN 79-165(N79C-K107C-C140Acm) (SEQ ID NO. 33)
- 15 IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-C140Acm) (SEQ ID NO. 34)
- IFN 79-165(N79C-K107C-E136C-C140Acm) (SEQ ID NO. 35)
- IFN 79-165(N79C-T99C-K107C-R112C-C140Acm) (SEQ ID NO. 36)
- IFN 79-165(N79C-E103C-K107C-E136C-C140Acm) (SEQ ID NO. 37)
- IFN 79-165(N79C-E106C-K107C-E136C-C140Acm) (SEQ ID NO. 38)
- 20 IFN 79-165(N79C-K107C-D109C-E136C-C140Acm) (SEQ ID NO. 39)
- IFN 79-165(N79C-K107C-L115C-E136C-C140Acm) (SEQ ID NO. 40)
- IFN 79-165(N79C-K107C-L119C-E136C-C140Acm) (SEQ ID NO. 41)
- IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-H130C-C140Acm) (SEQ ID NO. 42)
- IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-E136C-C140Acm) (SEQ ID NO. 43)
- 25 IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-H139C-C140Acm) (SEQ ID NO. 44)
- IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-C140Acm-R164C) (SEQ ID NO. 45)

[0188] Los resultados de la espectrometría de masas de los compuestos obtenidos en el (Ejemplo 2-1) y el (Ejemplo 2-2) se muestran a continuación en la (Tabla 2).

[Tabla 2]

- 30 **[0189]**

(Tabla 2)

Ejemplo	Compuesto	Valor teórico (MW)	Valor real (MW)	Método de ionización
2-1	IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-R123C-C140Acm)	10499,1	10498,1	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-C140Acm)	10630,3	10630,1	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-K107C-C140Acm)	10605,2	10605,6	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-C140Acm)	10552,2	10552,4	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-K107C-E136C-C140Acm)	10579,3	10578,5	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-T99C-K107C-R112C-C140Acm)	10554,2	10554,3	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-E103C-K107C-E136C-C140Acm)	10553,3	10554,0	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-E106C-K107C-E136C-C140Acm)	10553,3	10553,0	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-K107C-D109C-E136C-C140Acm)	10567,3	10568,0	ESI

2-2	IFN 79-165(N79C-K107C-L115C-E136C-C140Acm)	10569,2	10568,9	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-K107C-L119C-E136C-C140Acm)	10569,2	10568,8	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-H130C-C140Acm)	10518,2	10517,3	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-E136C-C140Acm)	10526,2	10525,4	ESI
2-2	IFN 79 165(N79C K107C R112C H139C C140Acm)	10518,2	10517,3	ESI
2-2	IFN 79-165(N79C-K107C-P112C-C140Acm-R164C)	10499,1	10498,3	ESI

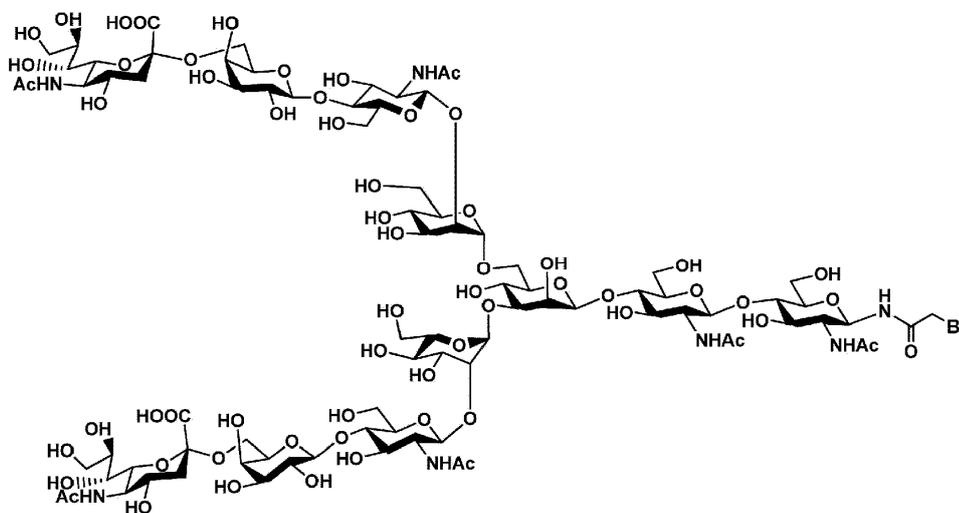
(Ejemplo 3) Síntesis de IFN-β glicosilado disialo

(Ejemplo 3-1) Síntesis de 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 46)

5 **[0190]** Se disolvió IFN 1-78(S1Thi-N3C-C30Acm-Q48C)Ethan (SEQ ID NO. 3) e IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-R123C-C140Acm) (SEQ ID NO. 31) en una solución tampón a pH 7,2 que comprende ácido 4-mercaptofenilacético (solución de ácido clorhídrico de guanidina 8 M, solución de ácido fosfórico 0,1 M, y ácido 4-mercaptofenilacético 125 mM), y se dejó a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se añadió una solución de ditiotreitol (ditiotreitol 2 M) a la solución de reacción, y se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de que se complete la reacción, se añadió una solución de metoxiamina (clorhidrato de metoxiamina 1 M) y una solución de ácido clorhídrico (ácido clorhídrico 1 M y clorhidrato de guanidina 8 M) a la solución, el pH se ajustó a 4.0 y luego se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de que se completase la reacción, la solución se desmineralizó mediante HPLC en fase inversa [columna: SHISEIDO Proteonavi] y se liofilizó.

15 **[0191]** El producto purificado en bruto obtenido se disolvió en una solución tampón a pH 8,5 (solución de ácido clorhídrico de guanidina 8 M y trishidroximetilaminometano 0,1 M), se añadió la cadena de azúcares disialo bromoacetilado representado por la siguiente Fórmula (7) (5 equivalentes), y se dejó durante 1 hora.

[Fórmula química 21]



Fórmula (7)

20 **[0192]** Después de que se completase la reacción, se añadió una solución de mercaptoetanosulfonato de sodio (mercaptoetanosulfonato de sodio 200 mM). Después de que se completase la reacción, la solución se desmineralizó mediante HPLC en fase inversa [columna: SHISEIDO Proteonavi] y se liofilizó.

25 **[0193]** El producto purificado en bruto obtenido mediante la etapa anterior se disolvió en una solución de acetato de plata (acetato de plata 60 mM, urea 7,5 mM, y ácido acético 875 mM), y se dejó a temperatura ambiente durante 4 horas. Tras la reacción, se añadió una solución de ditiotreitol (ditiotreitol 2 M). Se añadió una solución tampón a pH 8.5 (clorhidrato de guanidina 8 M y trishidroximetilaminometano 0,1 M) al reactivo, y se desmineralizó mediante HPLC [columna: SHISEIDO Proteonavi] y se liofilizó.

[0194] El liofilizado obtenido se disolvió en una solución tampón a pH 8.5 (solución de ácido clorhídrico guanidina 8 M y trishidroximetilaminometano 0,1 M), y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La

solución se sustituyó en condiciones de enfriamiento (4 °C) por una solución de clorhidrato de guanidina (clorhidrato de guanidina 4,5 M y trishidroximetilaminometano 0,1 M). Se añadió a la solución sustituida una solución de sulfato de cobre (sulfato de cobre (II) pentahidratado 300 mM), y se dejó durante 4 horas en condiciones de enfriamiento (4 °C). Tras la reacción, se añadió ácido etilendiaminotetracético (ácido etilendiaminotetracético 400 mM), y se dejó durante 1 hora en condiciones de enfriamiento (4 °C). Después de la reacción, la solución se sometió durante toda la noche a una sustitución por una solución de ácido acético (solución de ácido acético 10 mM) en condiciones de enfriamiento (4 °C) para retirar el agente desnaturalizante. La solución después del plegamiento se purificó por HPLC [columna: SHISEIDO Proteonavi], y como resultado de una espectrometría de masas (método de ionización ESI), la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) diana (valor calculado = 33304,8 Da, valor real = 33303,6 Da),

(Ejemplo 3-2) Síntesis de 2-6 diSialo(Q48C-S75C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 47)

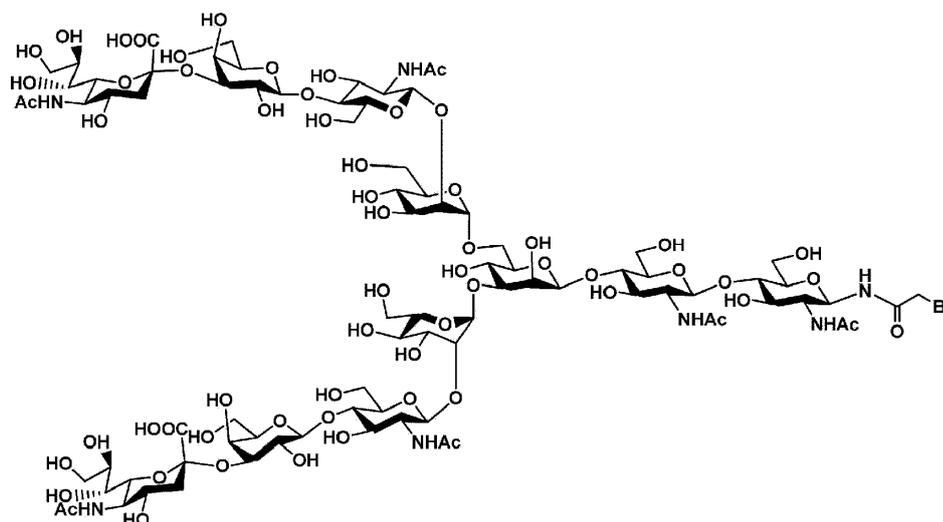
[0195] Se disolvió IFN 1-78(C30Acm-Q48C-S75C)MESNA (SEQ ID NO. 25) e IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-E136C-C140Acm) (SEQ ID NO. 43) en una solución tampón a pH 7,2 que comprende ácido 4-mercaptofenilacético (solución de ácido clorhídrico guanidina 8 M, solución de ácido fosfórico 0,1 M, y 125 mM de ácido 4-mercaptofenilacético), y se dejó a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se añadió una solución de ditiotreitol (ditiotreitol 2 M) a la solución de reacción, y se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de que se completase la reacción, la solución se desmineralizó mediante HPLC en fase inversa [columna: SHISEIDO Proteonavi] y se liofilizó.

[0196] Se llevó a cabo una espectrometría de masas (método de ionización ESI) con el producto purificado en bruto obtenido de forma similar al (Ejemplo 3-1). Como resultado, la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del 2-6 diSialo(Q48C-S75C-N79C-K107C-R112C-E136C) diana (valor calculado = 33331,8 Da, valor real = 33331,2 Da),

(Ejemplo 3-3) Síntesis de 2-3diSialo(S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C) (SEQ ID NO. 48)

[0197] Con IFN 1-78(S1Thi-N3C-C30Acm-Q48C)Ethan (SEQ ID NO. 5) e IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-C140Acm) (SEQ ID NO. 34), se sintetizó IFN-β glicosilado disialo de forma similar al (Ejemplo 3-1), salvo que la cadena de azúcares disialo bromoacetilada representada por la siguiente Fórmula (8) se utilizó de forma alternativa. Como resultado de llevar a cabo una espectrometría de masas (método de ionización ESI), la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del 2-6 diSialo(S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C) diana (valor calculado = 33346,9 Da, valor real = 33346,6 Da).

[Fórmula química 22]



Fórmula (8)

(Ejemplo 3) Síntesis de otros IFN-β glicosilado disialo

[0198] La síntesis de los compuestos mostrados a continuación se llevó a cabo con un método similar al del (Ejemplo 3-1).

2-6 diSialo(S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C) (SEQ ID NO. 49)

- 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-T99C-K107C-R112C) (SEQ ID NO. 50)
 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-H130C) (SEQ ID NO. 51)
 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 52)
 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-H139C) (SEQ ID NO. 53)
 5 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R164C) (SEQ ID NO. 54)
 2-6 diSialo(S1C-Y29C-Q48C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 55)
 2-6 diSialo(S1C-M35C-Q48C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 56)
 2-6 diSialo(S1C-E41C-Q48C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 57)
 2-6 diSialo(S1C-Q48C-S75C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 58)
 10 2-6 diSialo(S1C-E28C-Q48C-R70C-N79C) (SEQ ID NO. 59)
 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C) (SEQ ID NO. 60)
 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) (SEQ ID NO. 61)
 2-6 diSialo(S1C-N3C-Q48C-N79C) (SEQ ID NO. 62)
 2-6 diSialo(S1C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 63)
- 15 **[0199]** La síntesis de los compuestos mostrados a continuación se llevó a cabo con un método similar al del (Ejemplo 3-2).
- 2-6 diSialo(E41C-S75C-N79C-E103C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 64)
 2-6 diSialo(E41C-S75C-N79C-E106C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 65)
 2-6 diSialo(E41C-S75C-N79C-K107C-D109C-E136C) (SEQ ID NO. 66)
 20 2-6 diSialo(E41C-S75C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 67)
 2-6 diSialo(E41C-S75C-N79C-K107C-L115C-E136C) (SEQ ID NO. 68)
 2-6 diSialo(E41C-S75C-N79C-K107C-L119C-E136C) (SEQ ID NO. 69)
 2-6 diSialo(N24C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 70)
 2-6 diSialo(G25C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 71)
 25 2-6 diSialo(K32C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 72)
 2-6 diSialo(M35C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 73)
 2-6 diSialo(D38C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 74)
 2-6 diSialo(E41C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 75)
 2-6 diSialo(F7C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 76)
 30 2-6 diSialo(Q48C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 77)
 2-6 diSialo(S75C-N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 78)
 2-6 diSialo(E41C-S75C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 79)
 2-6 diSialo(E42C-S75C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 80)
 2-6 diSialo(Q45C-S75C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 81)
 35 2-6 diSialo(L46C-S75C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 82)
 2-6 diSialo(Q47C-S75C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 83)
 2-6 diSialo(Q48C-S75C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 84)
 2-6 diSialo(F49C-S75C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 85)
 2-6 diSialo(Q50C-S75C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 86)
 40 2-6 diSialo(N79C-K107C-R112C-E136C) (SEQ ID NO. 87)
 2-6 diSialo(E28C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 88)
 2-6 diSialo(M35C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 89)
 2-6 diSialo(R70C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 90)
 2-6 diSialo(S75C-N79C-K107C-E136C) (SEQ ID NO. 91)

[0200] La síntesis del compuesto mostrado a continuación se llevó a cabo con un método similar al del (Ejemplo 3-3).

2-3 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) (SEQ ID NO. 92)

Ejemplo 3-5) Síntesis de 2-6 diSialo(S1C-R26C-Q48C-A67C-N79-A88C) (SEQ ID NO. 100)

5 (Ejemplo 3-5-A) Síntesis de IFN 1-25(S1Thi)tiofenilo (SEQ ID NO. 101)

[0201] Se añadió resina Amino-PEGA (de Merck & Co., Inc.) (50 µmol) a una columna para la síntesis en fase sólida, se disolvió ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxi butírico (HMPB) (125 µmol), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) (125 µmol), y N-etilmorfolina (125 µmol) en dimetilformamida (DMF) (1,25 ml), y se removió a temperatura ambiente durante 4 horas. La resina se lavó suficientemente con DMF y diclorometano (DCM). Posteriormente, se disolvió Fmoc-Trp(Boc)-OH (0,25 mmol), 1-mesitilenesulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) (0,25 mmol), y N-metilimidazol (0,187 mmol) en DCM (1,25 ml) y se añadió a la columna para síntesis en fase sólida, y luego se removió durante 4 horas.

[0202] La resina se lavó con DCM y DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 15 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) para permitir la desprotección. Esto se lavó con DMF, la posterior elongación la cadena peptídica empleó el método mostrado a continuación para condensar de manera secuencial los aminoácidos.

[0203] El aminoácido protegido con un grupo Fmoc o Boc se disolvió en DMF, y la solución se añadió a la columna de síntesis en fase sólida (0,25 mmol). Se añadió hexafluorofosfato de 3-oxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-5-cloro-1H-benzotriazolio (HCTU) 0,2 M/DMF (0,25 mmol) a la columna de síntesis en fase sólida, y se añadió N-metil morfolina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) o 2,6,4-trimetilpiridina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) a la columna para la síntesis en fase sólida. Después de remover a temperatura ambiente durante 15 o 30 minutos, se lavó la resina con DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 10 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 ml) para permitir la desprotección. Se repitió esta operación, y los aminoácidos se condensaron de manera secuencial por el método de síntesis en fase sólida Fmoc.

[0204] Después de lavar la resina obtenida con DCM y DMF, se añadió una solución mixta de trifluoroetanol y ácido acético (1:1), y el péptido protegido se separó de la resina al removerlo durante 18 horas a temperatura ambiente. La solución de reacción que comprende el péptido protegido se concentró a presión reducida, y luego se secó a presión reducida. El péptido protegido seco se disolvió en DMF (2,1 mL), y luego se enfrió bajo una atmósfera de nitrógeno de -15 °C a -20 °C. A esto se añadió tiofenol como la fuente de tior (0,2 mmol), y después se añadió hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-trispirrolidinofosfonio (PyBOP) (1,4 mmol), y luego diisopropiletilamina (DIPEA) (0,2 mmol). Después de remover de -15 °C a -20 °C durante 2 horas, se añadió ácido trifluoroacético (0,2 mL), y se permitió que volviera de forma gradual a temperatura ambiente. Cuando la temperatura volvió a temperatura ambiente, la solución de reacción se concentró a presión reducida. Al residuo obtenido se le añadió ácido trifluoroacético:agua:fenol:triisopropilsilano (= 92,5:2,5:5), y esto se removió a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la solución se volvió a añadir a un éter dietílico y se dejó que precipitase, luego se sometió a separación centrífuga, y la porción de la solución se retiró para obtener un residuo que comprende la forma tioéster del péptido diana. Este residuo obtenido se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO Proteonavi], y como resultado de un análisis de masas por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del IFN 1-25(S1Thi)tiofenilo diana (SEQ ID NO. 101) (valor calculado = 3062,6 Da, valor real = 3062,5 Da).

(Ejemplo 3-5-B) Síntesis de IFN 26-47(R26C-C30Acm)Ethanhiol (SEQ ID NO. 102)

[0205] Un fragmento de péptido se sintetizó de manera similar a las operaciones del (Ejemplo 3-5-A). Se utilizó etantiol como la fuente de tior para el IFN 26-47(R26C-C30Acm)Ethanhiol.

[0206] Como resultado del análisis de masas por ESI-MS, el compuesto sintetizado correspondía con la masa del IFN 26-47(R26C-C30Acm)Ethanhiol diana 102) (valor calculado = 2844,4 Da, valor real = 2844,5 Da).

(Ejemplo 3-5-C) Síntesis de IFN 48-66(Q48Thi)MESNA (SEQ ID NO. 103)

[0207] Se añadió resina Amino-PEGA (de Merck & Co., Inc.) (50 µmol) a una columna para la síntesis en fase sólida, se disolvió ácido 3-Fmoc-4-diaminobenzoico (150 µmol), hexafluorofosfato de 3-oxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-5-cloro-1H-benzotriazolio (HCTU) (150 µmol), y diisopropiletilamina (300 µmol) en DMF (1,25 ml), y se removió a temperatura ambiente durante 1 hora.

[0208] Después de remover, se lavó la resina con DMF, el grupo Fmoc se trató durante 15 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) para permitir la desprotección, y luego la resina se lavó

suficientemente con DMF. Los aminoácidos se condensaron de manera secuencial en la posterior elongación la cadena peptídica empleando el método que se muestra a continuación.

5 **[0209]** El aminoácido protegido con un grupo Fmoc o Boc se disolvió en DMF, y la solución se añadió a la columna de síntesis en fase sólida (0,25 mmol). Se añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-cloro-1H-benzotriazolío (HCTU) 0,2 M/DMF (0,25 mmol) a la columna de síntesis en fase sólida, y se añadió N-metil morfolina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) o 2,6,4-trimetilpiridina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) a la columna para la síntesis en fase sólida. Después de remover a temperatura ambiente durante 15 o 30 minutos, se lavó la resina con DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 10 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 ml) para permitir la desprotección. Se repitió esta operación, y los aminoácidos se condensaron de manera secuencial por el método de síntesis en fase sólida Fmoc.

15 **[0210]** Después de lavar la resina obtenida con DMF y DCM, se disolvió cloroformiato de 4-nitrofenilo (1,4 mmol) en DCM, se añadió a la columna de síntesis en fase sólida, y luego se removió a temperatura ambiente durante 40 minutos. Después de remover, la resina se lavó con DCM y DMF, se añadió diisopropiletilamina (5,0 mmol) disuelta en una solución de DMF, y se removió a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de lavar la resina obtenida con DMF y DCM, se le añadió ácido trifluoroacético:agua:triisopropilsilano (= 92,5:2,5:5), y esto se removió a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la resina se lavó suficientemente con DMF y DCM, y luego la resina estaba suficientemente lavada con una solución tampón a pH 8,5 que comprende 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (solución de ácido clorhídrico de guanidina 6 M, solución de ácido fosfórico 0,2 M, y 2-mercaptoetanosulfonato de sodio 1 M). El tampón anterior se añadió a la resina, y se removió a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de remover, la solución obtenida se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO Proteonavi], y como resultado de un análisis de masas por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del IFN 48-66(Q48Thi)MESNA diana (SEQ ID NO. 103) (valor calculado = 2413,8 Da, valor real = 2413,9 Da).

(Ejemplo 3-5-D) Síntesis de IFN 67-87(A67Thi.N79)tiofenilo glicosilado disialo (SEQ ID NO. 104)

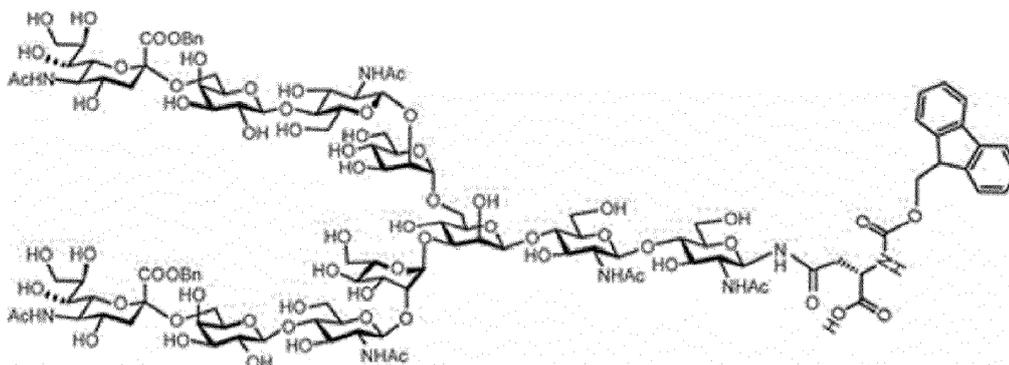
25 **[0211]** La resina Amino-PEGA (de Merck & Co., Inc.) (50 µmol) se añadió a una columna para la síntesis en fase sólida, se disolvió ácido 3-Fmoc-4-diaminobenzoico (150 µmol), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-cloro-1H-benzotriazolío (HCTU) (150 µmol), y diisopropiletilamina (300 µmol) en DMF (1,25 ml), y se removió a temperatura ambiente durante 1 hora.

30 **[0212]** Después de remover, se lavó la resina con DMF, el grupo Fmoc se trató durante 15 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) para permitir la desprotección, y luego la resina se lavó suficientemente con DMF. Los aminoácidos se condensaron de manera secuencial en la posterior elongación la cadena peptídica empleando el método que se muestra a continuación.

35 **[0213]** El aminoácido protegido con un grupo Fmoc o Boc se disolvió en DMF, y la solución se añadió a la columna de síntesis en fase sólida (0,25 mmol). Se añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-cloro-1H-benzotriazolío (HCTU) 0,2 M/DMF (0,25 mmol) a la columna de síntesis en fase sólida, y se añadió N-metil morfolina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) o 2,6,4-trimetilpiridina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) a la columna para la síntesis en fase sólida. Después de remover a temperatura ambiente durante 15 o 30 minutos, se lavó la resina con DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 10 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 ml) para permitir la desprotección. Se repitió esta operación, y los aminoácidos se condensaron de manera secuencial por el método de síntesis en fase sólida Fmoc.

45 **[0214]** En el péptido de 8 residuos obtenido, el grupo Fmoc se desprotegió al tratarlo con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 ml) durante 15 minutos. Después de lavarlo con DMF, se disolvió asparagina dibencilo con una cadena de azúcares disialo (0,2 mmol) y DEPBT (0,2 mmol) en DMF/DMSO (solución mixta 1:1, 2,2 ml) en un tubo centrífugo preparado por separado, se situó en la columna para la síntesis en fase sólida, se añadió DIPEA (0,15 mmol) y se removió a temperatura ambiente durante 18 horas. Después de lavarlo con DMF y DCM, en la fase sólida se obtuvo un péptido con una cadena de azúcares de 9 residuos unido a una asparagina dibencilo con una cadena de azúcares disialo representada por la siguiente Fórmula (18).

[Fórmula química 23]



Fórmula (18)

[0215] En el alargamiento de la cadena del glicopéptido posterior, los aminoácidos se condensaron de manera secuencial con el método que se muestra a continuación.

5 **[0216]** Se disolvió un aminoácido, estando el aminoácido protegido con un grupo Fmoc, HOBt (0,50 mmol), y DPCI (0,475 mmol) en DMF (6,3 ml), se activó durante 15 minutos, y luego se situó en la columna para la síntesis en fase sólida. Después de removerlo a temperatura ambiente durante 1 hora, el grupo Fmoc se trató durante 20 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) para permitir la desprotección. Se repitió esta operación, y los aminoácidos se condensaron de manera secuencial.

10 **[0217]** Después de lavar la resina obtenida con DCM y DMF, se añadió una solución mixta de trifluoroetanol y ácido acético (1:1), de manera que la resina se empapase lo suficiente, y la resina y el fragmento de péptido glicosilado se escindieron por agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. La resina escindida se eliminó por filtración, y la solución de reacción se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se concentró para obtener un péptido con una cadena de azúcares presentando la cadena lateral del aminoácido péptido.

15 **[0218]** El fragmento de péptido glicosilado obtenido (50 mmol) se transfirió a un matraz de recuperación, se disolvió en DMF, y luego se enfrió bajo una atmósfera de nitrógeno de -15 °C a -20 °C. A esto se le añadió tiofenol (0,15 mmol) y luego PyBOP (2,5 mmol), después se añadió DIPEA (0,15 mmol). Después de remover de -15 °C a -20 °C durante 2 horas, se añadió ácido trifluoroacético, y se permitió que volviera de forma gradual a temperatura ambiente. Cuando la temperatura volvió a temperatura ambiente, la solución de reacción se concentró a presión reducida. Al residuo obtenido se le añadió ácido trifluoroacético:agua:TIPS (= 95:2,5:2,5), y esto se removió a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la solución se volvió a añadir a un éter dietílico y se dejó que precipitase, luego se sometió a separación centrífuga, y la porción de la solución se retiró para obtener un residuo que comprende la forma tioéster del péptido diana. Este residuo obtenido se purificó con HPLC [columna: SHISEIDO proteonavi], y como resultado de un análisis de masas por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del IFN 67-87(A67Thi,N79)tiofenilo disialo glicosilado diana (SEQ ID NO. 104) (valor calculado = 4903,1 Da, valor real = 4903,1 Da).

25

(Ejemplo 3-5-E) Síntesis de IFN 88-165(C140Acm) (SEQ ID NO. 105)

30 **[0219]** Se añadió resina Amino-PEGA (de Merck & Co., Inc.) (50 µmol) a una columna para la síntesis en fase sólida, ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxi butírico (HMPB) (125 µmol), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) (125 µmol), y N-etilmorfolina (125 µmol) se disolvieron en DMF (1,25 ml), y se removieron a temperatura ambiente durante 4 horas. La resina se lavó suficientemente con DMF y DCM. Posteriormente, se disolvió Fmoc-Asn(Trt)-OH (0,25 mmol), 1-mesitilenesulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) (0,25 mmol), y N-metilimidazol (0,187 mmol) en DCM (1,25 ml) y se colocó en la columna para síntesis en fase sólida, y luego se removió durante 4 horas.

35 **[0220]** Después de remover, se lavó la resina con DCM y DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 15 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 mL) para permitir la desprotección. Después de lavarlo con DMF, la elongación la cadena peptídica posterior empleó el método mostrado a continuación para condensar de manera secuencial los aminoácidos.

40 **[0221]** El aminoácido protegido con un grupo Fmoc o Boc se disolvió en DMF, y la solución se añadió a la columna de síntesis en fase sólida (0,25 mmol). Se añadió hexafluorofosfato de 3-oxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-cloro-1H-benzotriazol (HCTU) 0,2 M/DMF (0,25 mmol) a la columna de síntesis en fase sólida, y se añadió N-metil morfolina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) o 2,6,4-trimetilpiridina 0,8 M/DMF (0,50 mmol) a la columna para la síntesis en fase sólida. Después de remover a temperatura ambiente durante 15 o 30

minutos, se lavó la resina con DMF, y el grupo Fmoc se trató durante 10 minutos con una solución de piperidina/DMF al 20 % (2 ml) para permitir la desprotección. Se repitió esta operación, y los aminoácidos se condensaron de manera secuencial por el método de síntesis en fase sólida Fmoc.

5 **[0222]** A la resina obtenida se le añadió ácido trifluoroacético:agua:fenol:tioanisol:triisopropilsilano (= 95:2,5:2,5:2,5:5), y esto se removió a temperatura ambiente. Después de 3 horas, la solución se volvió a añadir a un éter dietílico y se dejó que precipitase, luego se sometió a separación centrífuga, y la porción de la solución se removió para obtener un residuo que comprende el péptido diana. Este residuo obtenido se purificó con HPLC con inversión de fase [columna: SHISEIDO Proteonavi], y como resultado de un análisis de masas por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido correspondía con la masa del IFN 88-165(C140Acm) (SEQ ID NO. 105) (valor calculado = 9647,3 Da, valor real = 9647,2 Da).

(Ejemplo 3-5-F) Unión de cada fragmento

(Etapa 1. Etapa de ligación cinética)

15 **[0223]** Se disolvió IFN 1-25(S1Thi)tiofenilo (SEQ ID NO. 101) e IFN 26-47(R26C-C30Acm) (SEQ ID NO. 102) en una solución tampón a pH 6,8 (solución de ácido clorhídrico guanidina 8 M, solución de ácido fosfórico 0,2 M, y TCEP 20 mM), y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de que se completase la reacción, la solución se purificó mediante HPLC en fase inversa [columna: SHISEIDO Proteonavi] y se liofilizó. Como resultado del análisis de masas de este producto liofilizado obtenido por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del IFN 1-47(S1Thi-R26C-C30Acm)Ethanthiol (SEQ ID NO. 106) (valor calculado = 5796,8 Da, valor real = 5796,7 Da).

20 (Etapa 2. Etapa de ligación química nativa A)

25 **[0224]** Se disolvió IFN 67-87(A67Thi,N79)tiofenilo glicosilado disialo (SEQ ID NO. 104) e IFN 88-165(C140Acm) (SEQ ID NO. 105) en una solución tampón a pH 7.2 (solución de ácido clorhídrico guanidina 8 M, solución de ácido fosfórico 0,2 M, y TCEP 20 mM), se añadió tiofenol (3 % V/V), y se dejó reaccionar a temperatura ambiente. Tras 23 horas, se añadió una solución de metoxiamina (clorhidrato de guanidina 6 M, clorhidrato de metoxiamina 0,2 M, y TCEP 20 mM) a la solución de reacción, el pH se ajustó a 4.0, y luego se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas. A la solución de reacción se añadió una solución acuosa de NaOH 50 mM para hacer básica la solución de reacción, y luego se dejó reaccionar sobre hielo durante 0,5 horas. Después de que se completase la reacción, la solución se purificó mediante HPLC en fase inversa [columna: SHISEIDO Proteonavi] para obtener un producto liofilizado. Como resultado del análisis de masas de este producto liofilizado obtenido por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del IFN 67-165(A67C-N79-A88C-C140Acm) glicosilado disialo (SEQ ID NO. 107) (valor calculado = 14247,9 Da, valor real = 14247,2 Da).

(Etapa 3. Etapa de ligación química nativa B)

35 **[0225]** El IFN 67-165(A67C-N79-A88C-C140Acm) disialo glicosilado (SEQ ID NO. 107) obtenido en el Paso 2 e IFN 48-66(Q48Thi)MESNA (SEQ ID NO. 103) se disolvieron en una solución tampón a pH 7,2 (solución de ácido clorhídrico guanidina 8 M, solución de ácido fosfórico 0,2 M, y TCEP 20 mM, y MPAA 30 mM), y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas. Tras 18 horas, se añadió una solución de metoxiamina (clorhidrato de guanidina 6 M, clorhidrato de metoxiamina 0,2 M, y TCEP 20 mM) a la solución de reacción, el pH se ajustó a 4.0, y luego se dejó reaccionar a temperatura ambiente. Después de 5 horas, se añadió 2-mercaptoetanosulfonato de sodio a la solución de reacción, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que se completase la reacción, la solución se purificó mediante HPLC en fase inversa [columna: SHISEIDO Proteonavi] para obtener un producto liofilizado. Como resultado del análisis de masas de este producto liofilizado obtenido por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del IFN 48-165(Q48C-A67C-N79-A88C-C140Acm) glicosilado disialo (SEQ ID NO. 108) (valor calculado = 16507,6 Da, valor real = 16507,9 Da).

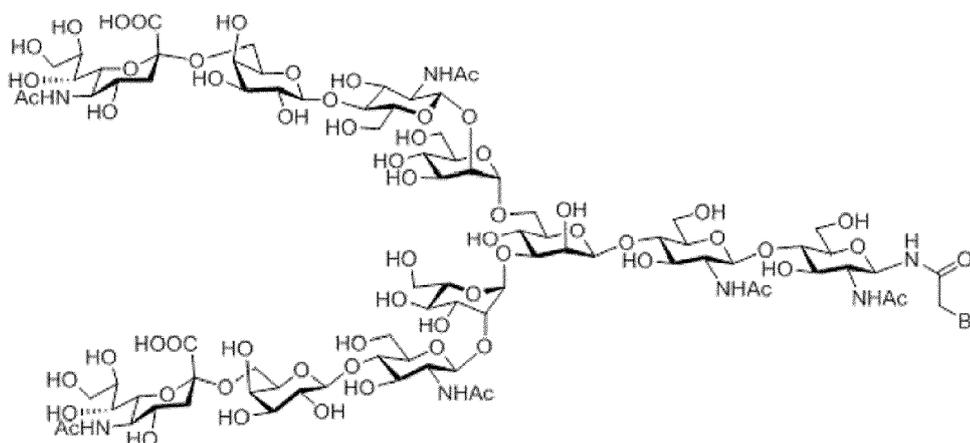
(Etapa 4. Etapa de ligación química nativa C)

50 **[0226]** De forma similar a la etapa 3, el IFN 1-47(S1Thi-R26C-C30Acm)Ethanthiol (SEQ ID NO. 106) obtenido en la etapa 1 y el IFN 48-165(Q48C,A67C,N79,A88C,C140Acm) glicosilado disialo (SEQ ID NO. 108) se dejaron reaccionar. Como resultado del análisis de masas por ESI-MS, el compuesto obtenido a partir de la reacción se correspondía con la masa del IFN 1-165(S1C-R26C-C30Acm-Q48C-A67C-N79-A88C-C140Acm) glicosilado disialo diana (SEQ ID NO. 109) (valor calculado = 22230,2 Da, valor real = 22230,3 Da).

(Etapa 5. Etapa de glicosilación)

[0227] El IFN 1-165(S1C-R26C-C30Acm-Q48C-A67C-N79-A88C-C140Acm) glicosilado disialo (SEQ ID NO. 109) obtenido en la etapa 4 se disolvió en una solución tampón a pH 8,5 (solución de ácido clorhídrico guanidina 8 M y solución tris 0,1 M), se añadió la cadena de azúcares disialo bromoacetilado representada por la siguiente Fórmula (19) (25 equivalentes). v se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas.

[Fórmula química 24]



Fórmula (19)

5

[0228] Después de que se completase la reacción, la solución de reacción se purificó mediante HPLC en fase inversa [columna: SHISEIDO Proteonavi] para obtener un producto liofilizado. Como resultado del análisis de masas de este producto liofilizado obtenido por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa de 2-6 diSialo(S1C-R26C-C30Acm-Q48C-A67C-N79-A88C-C140Acm) presentando cadenas de azúcares disialo añadidas en las posiciones 1, 26, 48, 67, y 88 mediante los átomos de azufre de la cadena lateral de la cisteína y presentando una cadena de azúcares añadida en la posición 79 mediante la cadena lateral de la asparagina (SEQ ID NO. 110) (valor calculado = 33545,4 Da, valor real = 33545,5 Da).

10

(Etapa 6. Desprotección del grupo Acm)

[0229] El liofilizado obtenido por la etapa 5 anterior se disolvió en una solución de acetato de plata (acetato de plata 100 mM y solución acuosa de ácido acético al 90 %), y se dejó reaccionar a temperatura ambiente. Después de 4 horas, la producción del producto diana se confirmó con HPLC y ESI-MS. Se añadió ditioneitol a la solución de reacción, se removió a temperatura ambiente durante 15 minutos, y luego se sometió a separación centrífuga, y se recogió el sobrenadante excluyendo el precipitado. El sobrenadante recogido se filtró con un filtro de membrana, la porción de filtrado que comprende el producto diana se purificó por HPLC en fase inversa [columna: SHISEIDO Proteonavi] para obtener un producto liofilizado. Como resultado del análisis de masas de este producto liofilizado obtenido por ESI-MS, la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa de 2-6 diSialo(S1C-R26C-Q48C-A67C-N79-A88C) presentando cadenas de azúcares disialo añadidas en las posiciones 1, 26, 48, 67, y 88 mediante los átomos de azufre de la cadena lateral de la cisteína y presentando una cadena de azúcares añadida en la posición 79 mediante la cadena lateral de la asparagina (SEQ ID NO. 111) (valor calculado = 33403,3 Da, valor real = 33403,2 Da).

15

20

25

(Etapa 7. Etapa de plegado)

[0230] El liofilizado obtenido por la etapa 6 anterior se disolvió en una solución tampón a pH 8,5 (solución de ácido clorhídrico guanidina 8 M y trishidroximetilaminometano 0,1 M), y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución se sustituyó en condiciones de enfriamiento (4 °C) por una solución de clorhidrato de guanidina (clorhidrato de guanidina 4,5 M y trishidroximetilaminometano 0,1 M). Se añadió a la solución sustituida una solución de sulfato de cobre (sulfato de cobre (II) pentahidratado 300 mM), y se dejó durante 3 horas en condiciones de enfriamiento (4 °C). Tras la reacción, se añadió ácido etilendiaminotetracético (ácido etilendiaminotetracético 400 mM), y se dejó en condiciones de enfriamiento (4 °C) durante 0,5 horas. Después de la reacción, la solución se sometió durante toda la noche a una sustitución por una solución de ácido acético (solución de ácido acético 10 mM) en condiciones de enfriamiento (4 °C) para retirar el agente desnaturante. La solución después del plegamiento se purificó por HPLC [columna: SHISEIDO Proteonavi], y como resultado de una espectrometría de masas (método de ionización ESI), la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del 2-6 diSialo(S1C-R26C-Q48C-A67C-N79-A88C) (SEQ ID NO. 100) (valor calculado = 33401,2 Da, valor real = 33401,2 Da).

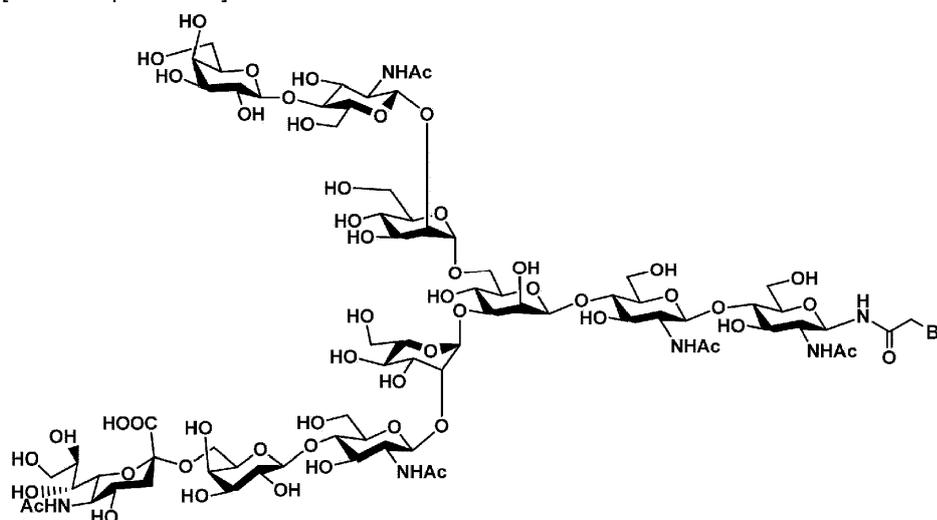
30

35

(Ejemplo 4) Síntesis del IFN-β glicosilado monosialo(Ejemplo 4-1) Síntesis de 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 93)

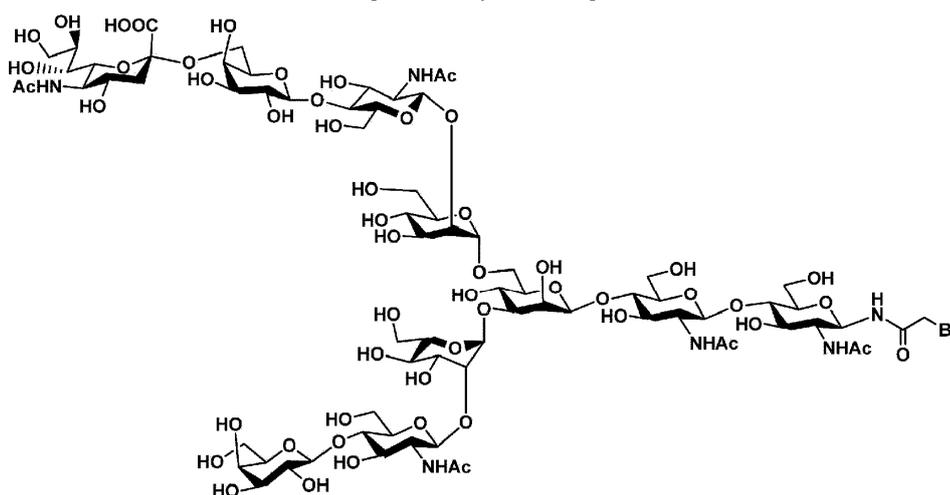
[0231] Se sintetizó IFN-β glicosilado monosialo con IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-Q48C)Ethan (SEQ ID NO. 3) e IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-R123C-C140Acm) (SEQ ID NO. 31) por un método similar al (Ejemplo 3-1) salvo que la mezcla de cadenas de azúcares monosialo bromoacetilada representada por las siguientes Fórmulas (9) y (10) (proporción de compuesto 1:1) (5 equivalentes) se utilizaran de forma alternativa. Como resultado de llevar a cabo una espectrometría de masas (método de ionización ESI), la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) diana (valor calculado = 31557,2 Da, valor real = 31556,6 Da). Los resultados de la espectrometría de masas para el (Ejemplo 3-1) y el (Ejemplo 4-1) se muestran en la Figura 1.

[Fórmula química 25]



Fórmula (9)

[Fórmula química 26]



Fórmula (10)

[0232] Los compuestos obtenidos en el (Ejemplo 3-1) y en el (Ejemplo 4-1) se analizaron por SDS-PAGE y HPLC en fase inversa [columna: Waters BEH300]. El resultado del SDS-PAGE se muestra en la Figura 2.

[0233] Mirando los resultados del SDS-PAGE, se propuso que ambos compuestos se glicosilasen de forma uniforme ya que se detectaron bandas claras. De manera similar, el análisis por HPLC en fase inversa también produjo datos que sugerían una glicosilación uniforme (los datos no se muestran).

5 **[0234]** Asimismo, la parte de la cadena de azúcares se escindió de los compuestos obtenidos en el (Ejemplo 3-1) y (Ejemplo 4-1) añadiendo Endo- β -N-acetilglucosamina (Endo-M) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) bajo una solución de tampón fosfato (ácido fosfórico 0,1 M) a pH 6.0. El resultado del análisis por HPLC en fase normal [columna: Shodex NH2P-50] después de etiquetar el extremo reductor de la cadena de azúcares libre obtenida con ácido 2-Aminobenzoico (Sigma Aldrich) se muestra en la Figura 3. Como resultado del análisis de la estructura de la cadena de azúcares, se confirmó un pico en el tiempo de retención similar a la cadena de azúcares disialo diana, y se confirmó la adición de la cadena de azúcares diana.

(Ejemplo 4-2) Síntesis de otros IFN- β glicosilados monosialos

[0235] La síntesis de los compuestos mostrados a continuación se llevó a cabo con un método similar al del (Ejemplo 4-1).

2-6 monoSialo(S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R12C) (SEQ ID NO. 94)

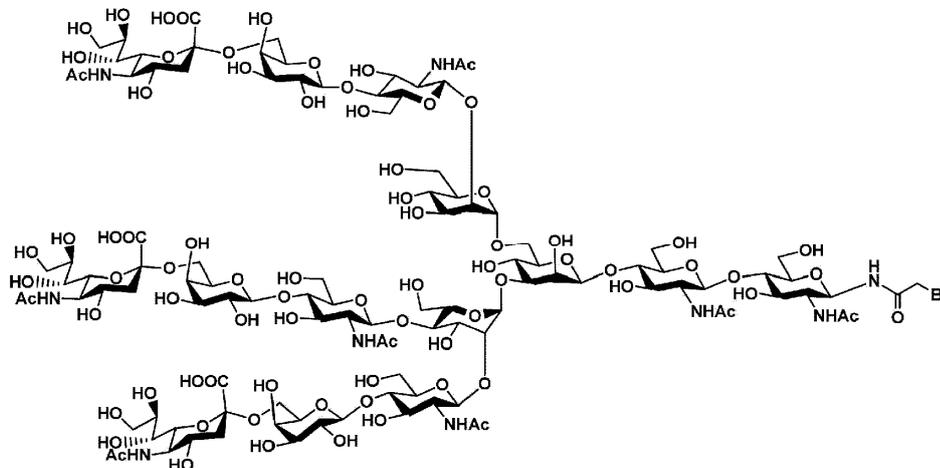
15 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) (SEQ ID NO. 95)

(Ejemplo 5) Síntesis de IFN- β glicosilado trisialo

(Ejemplo 5-1) Síntesis de 2-6 triSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 96)

20 **[0236]** Se sintetizó IFN- β glicosilado monosialo con IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-Q48C)Ethan (SEQ ID NO. 3) e IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-R123C-C140Acm) (SEQ ID NO. 31) por un método similar al (Ejemplo 3-1) salvo que se añadió la cadena de azúcares trisialo bromoacetilada representada por la Fórmula (11) (5 equivalentes). Como resultado de llevar a cabo una espectrometría de masas (método de ionización ESI), la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del 2-6 triSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) diana (valor calculado = 37244,3 Da, valor real = 37243,2 Da),

[Fórmula química 27]



Fórmula (11)

25 (Ejemplo 5-2) Síntesis de otros IFN- β glicosilados trisialos

[0237] La síntesis del compuesto mostrado a continuación se llevó a cabo con un método similar al del (Ejemplo 5-1).

2-6 triSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) (SEQ ID NO. 97)

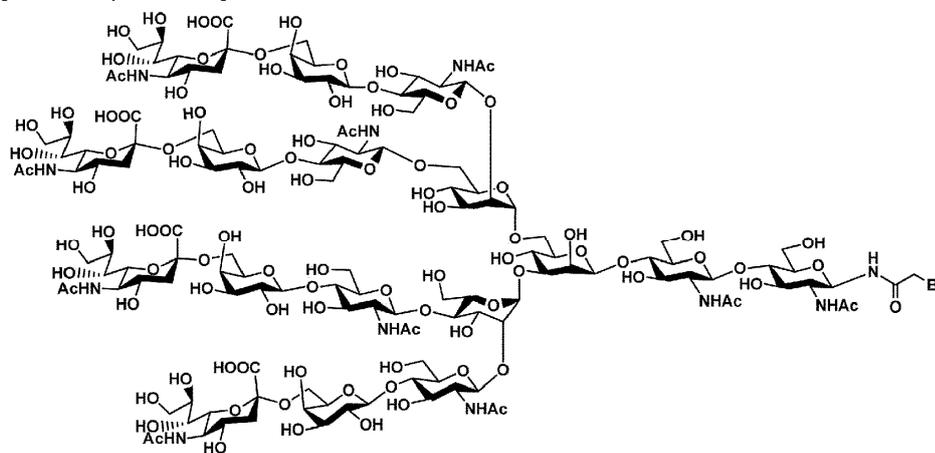
(Ejemplo 6) Síntesis de IFN- β glicosilado tetrasialo

30 (Ejemplo 6-1) Síntesis de 2-6 tetraSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 98)

[0238] Se sintetizó IFN- β glicosilado monosialo con IFN 1-78(S1Thi-C30Acm-Q48C)Ethan (SEQ ID NO. 3) e IFN 79-165(N79C-K107C-R112C-R123C-C140Acm) (SEQ ID NO. 31) por un método similar al (Ejemplo 3-1)

salvo que se utilizó de forma alternativa la cadena de azúcares tetrasialo bromoacetilada representada por la Fórmula (12) (5 equivalentes). Como resultado de la espectrometría de masas (método de ionización ESI), la masa del compuesto obtenido se correspondía con la masa del 2-6 tetraSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) dianión (valor calculado = 41183,8 Da, valor real = 41182,6 Da),

[Fórmula química 28]



Fórmula (12)

5

(Ejemplo 6-2) Síntesis de otros IFN-β glicosilados tetrasialos

[0239] La síntesis del compuesto mostrado a continuación se llevó a cabo con un método similar al del (Ejemplo 6-1).

2-6 tetraSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) (SEQ ID NO. 99)

10

[0240] Los resultados de la espectrometría de masas de los compuestos obtenidos en los Ejemplo 3-1, Ejemplo 3-2, Ejemplo 3-3, Ejemplo 3-4, Ejemplo 4-1, Ejemplo 4-2, Ejemplo 5-1, Ejemplo 5-2, Ejemplo 6-1, y Ejemplo 6-2 se muestran en la (Tabla 3) a continuación.

(Tabla 3)

Ejemplo	Compuesto	Valor teórico (MW)	Valor real (MW)	Método de ionización
3-1	2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)	33304,8	33303,6	ESI
3-2	2-6 diSialo (Q48C-S75C-N79C-K107C-R112C-E136C)	33331,8	33331,2	ESI
3-3	2-3 diSialo (S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C)	33346,9	33346,6	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C)	33346,9	33346,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-T99C-K107C-R112C)	33359,9	33361,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-H130C)	33323,8	33325,0	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-E136C)	33331,8	33333,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-H139C)	33323,8	33325,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R164C)	33304,8	33306,4	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-Y29C-Q48C-N79C-K107C-E136C)	33324,9	33325,4	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-M35C-Q48C-N79C-K107C-E136C)	33356,8	33356,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-E41C-Q48C-N79C-K107C-E136C)	33358,9	33358,8	ESI

ES 2 687 801 T3

3-4	2-6 diSialo (S1C-Q48C-S75C-N79C-K107C-E136C)	33401,0	33400,4	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-E26C-Q48C-R70C-N79C)	31093,8	31093,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C)	31094,8	31094,0	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)	28884,8	28883,6	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-N79C-K107C-E136C)	28883,8	28882,6	ESI
3-4	2-6 diSialo (S1C-N3C-Q48C-N79C)	28898,9	28898,6	ESI
3-4	2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-E103C-K107C-E136C)	33357,9	33356,9	ESI
3-4	2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-E106C-K107C-E136C)	33357,9	33356,6	ESI
3-4	2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-K107C-D109C-E136C)	33372,0	33370,5	ESI
3-4	2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-K107C-R112C-E136C)	33330,9	33329,6	ESI
3-4	2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-K107C-L115C-E136C)	33373,9	33372,7	ESI
3-4	2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-K107C-L119C-E136C)	33373,9	33372,6	ESI
3-4	2-6 diSialo (N24C-N79C-K107C-R112C-E136C)	31066,8	31066,0	ESI
3-4	2-6 diSialo (G25C-N79C-K107C-R112C-E136C)	31123,8	31123,4	ESI
3-4	2-6 diSialo (K32C-N79C-K107C-R112C-E136C)	31052,7	31052,4	ESI
3-4	2-6 diSialo (M35C-N79C-K107C-R112C-E136C)	31049,7	31049,8	ESI
3-4	2-6 diSialo (D38C-N79C-K107C-R112C-E136C)	31065,8	31065,4	ESI
3-4	2-6 diSialo (E41C-N79C-K107C-R112C-E136C)	31051,8	31051,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (F7C-N79C-K107C-R112C-E136C)	31033,7	31033,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (Q46C-N79C-K107C-R112C-E136C)	31052,7	31052,4	ESI
3-4	2-6 diSialo (S75C-N79C-K107C-R112C-E136C)	31093,8	31093,4	ESI
3-4	2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-K107C-E136C)	31120,9	31119,5	ESI
3-4	2-6 diSialo (C42C-S75C-N79C-K107C-E136C)	31120,9	31119,7	ESI
3-4	2-6 diSialo (Q45C-S75C-N79C-K107C-E136C)	31121,9	31120,4	ESI
3-4	2-6 diSialo (L46C-S75C-N79C-K107C-E136C)	31136,8	31135,6	ESI
3-4	2-6 diSialo (Q47C-S75C-N79C-K107C-E136C)	31121,9	31120,7	ESI
3-4	2-6 diSialo (Q48C-S75C-N79C-K107C-E136C)	31121,9	31120,5	ESI
3-4	2-6 diSialo (F49C-S75C-N79C-K107C-E136C)	31102,8	31101,4	ESI
3-4	2-6 diSialo (Q50C-S75C-N79C-K107C-E136C)	31121,9	31120,7	ESI
3-4	2-6 diSialo (N79C-K107C-R112C-E136C)	28814,7	28814,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (E28C-N79C-K107C-E136C)	28841,8	28841,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (M35C-N79C-K107C-E136C)	28839,7	28839,0	ESI
3-4	2-6 diSialo (R70C-N79C-K107C-E136C)	28814,7	28814,2	ESI
3-4	2-6 diSialo (S75C-N79C-K107C-E136C)	28883,8	28882,6	ESI
3-4	2-3 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)	28884,8	28884,4	ESI
4-1	2-6 monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)	31557,2	31556,6	ESI
4-2	2-6 monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)	27719,8	27719,4	ESI
4-2	2-6 monoSialo (S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C)	31599,3	31598,8	ESI
5-1	2-6 triSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-	37244,3	37243,2	ESI

	R123C)			
5-2	2-6 triSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)	31511,1	31512,8	ESI
6-1	2-6 tetraSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)	41183,8	41182,6	ESI
6-2	2-6 tetraSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)	34137,5	34139,0	ESI

(Ejemplo 7) Farmacocinética del IFN- β modificado con cadenas de azúcares disialo cuádruples, quintuples y séxtuples en ratones

(Ejemplo 7-1) Preparación de agentes de administración y reactivos

5 **[0241]** Se preparó 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) (SEQ ID NO. 61), 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C) (SEQ ID NO. 60), 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 46) y Avonex (Biogen Idec) a 588 nM con un tampón acetato que comprende L-Arginina y polisorbato. Avonex es un IFN- β natural (IFN- β -1a) que se empleó como agente de control. Avonex se fabrica con una línea celular CHO, tiene una cadena de azúcares en la posición que es la posición 80 del interferón β natural humano (la posición que corresponde a la posición 79 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 del presente documento), y la estructura de su cadena de azúcares puede ser varias cadenas de azúcares de cadenas de azúcares complejas unidas a N para cada polipéptido.

(Ejemplo 7-2) Administración y extracción de sangre

15 **[0242]** Se administró a ratones (ratones Balb/c, machos, de 8 semanas, peso corporal 21-23 g) una dosis de 2352 pmol/kg bajo alimentación completa desde la subcutánea dorsal con una jeringa para insulina Myjector 29G x 1/2 (Terumo Corporation) a un volumen de 4 mL/kg. Se recogieron 75 μ L de sangre de la vena caudal con un tubo capilar hematócrito (HIRSHMANN LABORGERATE) tratado con heparina antes de la administración subcutánea, además de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, y 30 horas después de la administración. Esto se mezcló rápidamente con EDTA-PBS 6 mM al mismo volumen que la sangre recogida y se sometió a separación centrífuga (15 000 rpm, 4 grados, 10 minutos). Se recogieron 90 μ L de sobrenadante como una muestra de plasma sanguíneo. La muestra de plasma sanguíneo se almacenó congelada hasta su uso para la medición.

(Ejemplo 7-3) Medición de la concentración sanguínea

25 **[0243]** Se empleó un kit de ELISA para interferón β humano (Kamakura Techno-Science) para medir la concentración de IFN- β en sangre. Se empleó IFN- β modificado con cadenas de azúcares disialo cuádruples-séxtuples y Avonex del mismo lote que los que se administraron como estándares para crear una curva patrón, y se preparó para 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 12,5 pM, 6,25 pM, y 3,125 pM con el diluyente unido al kit. Se añadió plasma sanguíneo virgen a la curva patrón según la proporción de dilución de la muestra de plasma sanguíneo de manera que la cantidad introducida sea la misma. En la Figura 4 se muestra una representación gráfica de la transición de la concentración de plasma del IFN- β obtenida.

35 **[0244]** Tal como se muestra en la Figura 4, cuando se compara la concentración de IFN- β en el plasma sanguíneo, el IFN- β modificado con cadenas de azúcares disialo cuádruples, quintuples y séxtuples se mantuvo a una concentración de plasma mucho mayor que el agente de control Avonex en cualquier punto de la medición, confirmando la mejora o capacidad de retención en la sangre. Además, como el Tmax se ralentiza según aumenta el número de diSialoglicosilación, se pensaba que la transferencia del compuesto desde debajo de la piel hasta la sangre se había retrasado. La Cmax o la concentración sanguínea en la fase de disipación aumentó según se incrementaba el número de diSialoglicosilación. De ahí, se mostró que al añadir cadenas de azúcares diSialo, la estabilidad del IFN- β *in vivo* se mejora según el número de cadenas de azúcares diSialo.

(Ejemplo 7-4) Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

40 **[0245]** A partir de la transición de la concentración plasmática del IFN- β obtenida, utilizando un análisis de momentos, el área de concentración sanguínea bajo la curva (AUC $_{\infty}$) se calculó mediante la regla del trapecio. Asimismo, la concentración máxima en sangre (Cmax) y el tiempo hasta la concentración máxima en sangre (Tmax) se determinaron a partir de la vida media en sangre (t1/2), el tiempo medio de retención (MRT), y el valor real de la administración por vía subcutánea. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos se muestran en la Figura 5.

[0246] Tal como se muestra en la Figura 5, también se mostró a partir de los resultados del análisis de momentos que el efecto del IFN- β diSialoglicosilado para mejorar la $t_{1/2}$, el AUC y el MRT aumentará según el número de modificaciones.

(Ejemplo 8) Farmacocinética del IFN- β glicosilado cuádruple con cadenas de azúcares monoSialo y cadenas de azúcares diSialo en ratones

(Ejemplo 8-1) Preparación de reactivos y agentes de administración

[0247] Se preparó 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) (SEQ ID NO. 61), 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) (SEQ ID NO. 95) y Avonex a 112 nM con un tampón acetato que comprende L-Arginina y polisorbato.

(Ejemplo 8-2) Administración y extracción de sangre

10 **[0248]** Se administró a ratones (ratones Balb/c, machos, de 8 semanas, peso corporal 21-23 g) una dosis de 448 pmol/kg bajo alimentación completa desde la vena caudal o la subcutánea dorsal con una jeringa para insulina Myjector 29G x 1/2 (Terumo Corporation) a un volumen de 4 mL/kg. Se recogieron 75 μ L de sangre de la vena caudal con un tubo capilar hematocrito (HIRSHMANN LABORGERATE) tratado con heparina antes de la administración subcutánea, además de 2 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 8 horas, y 24 horas después de la administración para la administración intravenosa; y antes de la administración, así como 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, y 30 horas después de la administración para la administración por vía subcutánea. Esto se mezcló rápidamente con EDTA-PBS al mismo volumen que la sangre recogida y se sometió a separación centrífuga (15 000 rpm, 4 grados, 10 minutos). Se recogieron 90 μ L de sobrenadante como una muestra de plasma sanguíneo. La muestra de plasma sanguíneo se almacenó congelada hasta su uso para la medición.

(Ejemplo 8-3) Medición de la concentración sanguínea

25 **[0249]** Se empleó un kit de ELISA para interferón β humano (Kamakura Techno-Science) para medir la concentración de IFN- β en sangre. Se empleó IFN- β glicosilado con una cadena de azúcares diSialo cuádruple, IFN- β glicosilado con una cadena de azúcares monoSialo cuádruple y Avonex del mismo lote que los que se administraron, como estándares para crear una curva patrón, y se preparó para 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 12,5 pM, 6,25 pM, y 3,125 pM con el diluyente unido al kit. Se añadió plasma sanguíneo virgen a la curva patrón según la proporción de dilución de la muestra de plasma sanguíneo de manera que la cantidad introducida sea la misma. En la Figura 6 se muestra una representación gráfica de la transición de la concentración de plasma del IFN- β obtenida.

30 **[0250]** Tal como se muestra en la Figura 6, cuando se compara la concentración plasmática de IFN- β , se confirmó que el 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) mejoraba drásticamente en la $t_{1/2}$, el AUC y el MRT que el agente de control Avonex en cualquier punto de la medición. En cambio, en la administración por vía subcutánea y la administración por vía intravenosa en la cola, el 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) en el que la sialilación estaba incompleta mostró una transición drásticamente baja de concentración en sangre que el agente de control Avonex. A partir de este resultado, se mostró que todos los terminales de las cadenas de azúcares que están sialilados contribuyen en gran medida a la mejora de capacidad de retención del IFN- β en sangre.

(Ejemplo 8-4) Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

40 **[0251]** A partir de la transición de la concentración plasmática de IFN- β , utilizando un análisis de momento, el área de concentración plasmática bajo la curva (AUC) se calculó mediante la regla del trapecio. Asimismo, se determinó la concentración inicial predicha (C_0) para la administración intravenosa mediante el método de extrapolación, y además, la concentración máxima en sangre (C_{max}) y el tiempo hasta la concentración máxima en sangre (T_{max}) se determinaron a partir de la vida media en sangre ($t_{1/2}$), el tiempo medio de retención (MRT), y el valor real de la administración por vía subcutánea. El resultado se muestra en la Figura 7.

45 **[0252]** Tal como se muestra en la Figura 7, también se confirmó a partir de los resultados del análisis de momento que el IFN- β modificado con una cadena de azúcares diSialo cuádruple tenía un efecto de mejora de la $t_{1/2}$, el AUC_{∞} y el MRT mejor que el agente de control Avonex. Por otro lado, el IFN- β modificado con una cadena de azúcares monoSialo cuádruple mostró valores más bajos para cualquiera de la $t_{1/2}$, el AUC_{∞} y el MRT que el agente de control Avonex, confirmando que se disipa más rápido de la sangre.

50 (Ejemplo 9) Farmacocinética del IFN- β glicosilado con cadenas de azúcares monodiSialo y cadenas de azúcares diSialo séxtuples en ratones

(Ejemplo 9-1) Preparación de reactivos y agentes de administración

[0253] Se preparó 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 46), 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 93) y Avonex a 588 nM con un tampón acetato que comprende L-Arginina y polisorbato.

(Ejemplo 9-2) Administración y extracción de sangre

5 **[0254]** Se administró a ratones (ratones Balb/c, machos, peso corporal 21-23 g) una dosis de 2352 pmol/kg bajo alimentación completa desde la vena caudal con una jeringa para insulina Myjector 29G x 1/2 (Terumo Corporation) a un volumen de 4 mL/kg. Se recogieron 75 μ L de sangre de la vena caudal con un tubo capilar hematocrito (HIRSHMANN LABORGERATE) tratado con heparina antes de la administración por vía intravenosa, además de 2 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 8 horas y 24 horas después
10 de la administración. Esto se mezcló rápidamente con EDTA-PBS al mismo volumen que la sangre recogida y se sometió a separación centrífuga (15 000 rpm, 4 grados, 10 minutos). Se recogieron 90 μ L de sobrenadante como una muestra de plasma sanguíneo. La muestra de plasma sanguíneo se almacenó congelada hasta su uso para la medición.

(Ejemplo 9-3) Medición de la concentración sanguínea

15 **[0255]** Se empleó un kit de ELISA para interferón β humano (Kamakura Techno-Science) para medir la concentración de IFN- β en sangre. Se empleó IFN- β glicosilado con una cadena de azúcares disialo séxtuple, IFN- β glicosilado con una cadena de azúcares monosialo séxtuple y Avonex del mismo lote que los que se administraron como estándares para crear una curva patrón, y se preparó para 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM,
20 12,5 pM, 6,25 pM, y 3,125 pM con el diluyente unido al kit. Se añadió plasma sanguíneo virgen a la curva patrón según la proporción de dilución de la muestra de plasma sanguíneo de manera que la cantidad introducida sea la misma. En la Figura 8 se muestra una representación gráfica de la transición de la concentración de plasma del IFN- β obtenida.

[0256] También se obtuvieron resultados similares a los del IFN- β modificado cuádruple descrito anteriormente para el IFN- β modificado séxtuple. Dicho de otro modo, se confirmó que el 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) se mejoró drásticamente en la $t_{1/2}$, el AUC^{∞} y el MRT que el agente de control Avonex. Por otro
25 lado, el 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) mostró una transición drásticamente baja de concentración en sangre que el agente de control Avonex para la administración por vía intravenosa en la cola. A partir de esto, también se confirmó que para el IFN- β glicosilado séxtuple, de forma similar al IFN- β glicosilado cuádruple, todos los terminales de las cadenas de azúcares que están sialilados son extremadamente
30 importantes para la mejora de la capacidad de retención del IFN- β en la sangre.

(Ejemplo 9-4) Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

[0257] A partir de la transición de la concentración plasmática de IFN- β , utilizando un análisis de momento, el área de concentración plasmática bajo la curva (AUC) se calculó mediante la regla del trapecio. Asimismo, la
35 concentración inicial predicha (C_0) para la administración por vía intravenosa se determinó por el método de extrapolación, y además, se determinaron la vida media en sangre ($t_{1/2}$) y el tiempo medio de retención (MRT). El resultado se muestra en la Figura 9.

[0258] Tal como se muestra en la Figura 9, también se confirmó a partir de los resultados del análisis de momento que el 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) mejora drásticamente la $t_{1/2}$, el AUC^{∞} y el
40 MRT mejor que el agente de control Avonex. Por otro lado, el 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) mostró valores más bajos para cualquiera de la $t_{1/2}$, el AUC^{∞} y el MRT que el agente de control Avonex, indicando que se disipa más rápido de la sangre.

(Ejemplo 10) Farmacocinética del IFN- β modificado con una cadena de azúcares diSialo séxtuple e IFN- β modificado con PEG20K en ratones

(Ejemplo 10-1) Preparación de reactivos y agentes de administración

45 **[0259]** Se preparó 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 46), IFN- β modificado con PEG20K y Avonex a 588 nM con un tampón acetato que comprende L-Arginina y polisorbato.

(Ejemplo 10-2) Administración y extracción de sangre

50 **[0260]** Se administró a ratones (ratones Balb/c, machos, de 8 semanas, peso corporal 21-23 g) una dosis de 2352 pmol/kg bajo alimentación completa desde la subcutánea dorsal con una jeringa para insulina Myjector 29G x 1/2 (Terumo Corporation) a un volumen de 4 mL/kg. Se recogieron 75 μ L de sangre de la vena caudal con un tubo capilar hematocrito (HIRSHMANN LABORGERATE) tratado con heparina antes de la administración

subcutánea, además de 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, y 30 horas después de la administración. Esto se mezcló rápidamente con EDTA-PBS al mismo volumen que la sangre recogida y se sometió a separación centrífuga (15 000 rpm, 4 grados, 10 minutos). Se recogieron 90µL de sobrenadante como una muestra de plasma sanguíneo. La muestra de plasma sanguíneo se almacenó congelada hasta su uso para la medición.

(Ejemplo 10-3) Medición de la concentración sanguínea

[0261] Se empleó un kit de ELISA para interferón β humano (Kamakura Techno-Science) para medir la concentración de IFN- β en sangre. Se empleó IFN- β modificado con una cadena de azúcares disialo séxtuple, IFN- β modificado con PEG20K y Avonex del mismo lote que los que se administraron, como estándares para crear una curva patrón, y se preparó a 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 12,5 pM, 6,25 pM, y 3,125 pM con el diluyente unido al kit. Se añadió plasma sanguíneo virgen a la curva patrón según la proporción de dilución de la muestra de plasma sanguíneo de manera que la cantidad introducida sea la misma. En la Figura 10 se muestra una representación gráfica de la transición de la concentración de plasma del IFN- β obtenida.

(Ejemplo 10-4) Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

[0262] A partir de la transición de la concentración plasmática de IFN- β , utilizando un análisis de momento, el área de concentración sanguínea bajo la curva (AUC) se calculó mediante la regla del trapecio. Asimismo, la concentración inicial predicha (C0) para la administración por vía intravenosa se determinó por el método de extrapolación, y además, se determinaron la vida media en sangre ($t_{1/2}$) y el tiempo medio de retención (MRT). El resultado se muestra en la Figura 11.

[0263] Tal como se muestra en las Figuras 10 y 11, a partir de los resultados de la transición de la concentración plasmática y el análisis de momento, el IFN- β modificado con una cadena de azúcares disialo séxtuple y el IFN- β modificado con PEG20K mejoraron drásticamente la $t_{1/2}$, el AUC $^{\infty}$, y el MRT que le Avonex. Asimismo, se vio que el IFN- β modificado con una cadena de azúcares disialo séxtuple supera al IFN- β modificado con PEG20K en lo que se refiere al AUC $^{\infty}$ y a la Cmax.

[0264] Para la $t_{1/2}$ y el MRT, la comparación entre IFN- β modificado con una cadena de azúcares disialo séxtuple y el IFN- β modificado con PEG20K dieron resultados comparables.

[0265] A partir de estos resultados, se mostró que el IFN- β modificado con una cadena de azúcares disialo séxtuple mejora la estabilidad del Avonex *in vivo* a un nivel comparable al IFN- β modificado con PEG20K.

(Ejemplo 11) Actividad antitumoral *in vivo* del IFN- β modificado con cadenas de azúcares disialo cuádruples, quíntuples y séxtuples

[0266] La actividad antitumoral de un IFN- β modificado con cadenas de azúcares disialo cuádruples, quíntuples y séxtuples *in vivo* se evaluó con ratones portadores de cáncer.

(Ejemplo 11-1) Cultivo celular

[0267] Se utilizaron ratones portadores de cáncer preparados inoculando células Daudi, que son linfomas de Burkitt humanos, para la prueba de actividad antitumoral. El medio empleado fue RPMI1640 (Invitrogen) complementado con Suero fetal bovino (GIBCO) al 10 % sometido a un tratamiento de inactivación a 56 °C durante 30 minutos y penicilina/estreptomina (SIGMA). La placa de cultivo empleada fue una placa sin tratamiento (IWAKI). El cultivo se llevó a cabo a 37 °C bajo una condición de concentración de CO₂ al 5 %, y el pase se lleva a cabo una vez cada 2-3 días.

(Ejemplo 11-2) Preparación de ratones portadores de cáncer

[0268] Se recogieron células Daudi cultivadas en un tubo y se sometieron a una separación centrífuga (1300 rpm, 4 grados, 3 minutos). El sobrenadante se retiró con un aspirador, se añadió HBSS (Nacalai), y se suspendieron las células. Esto se volvió a someter a separación centrífuga, y se retiró el sobrenadante. Este tratamiento de lavado celular se llevó a cabo un total de tres veces. Además, el número de células se calculó con un hemocitómetro, y se preparó una suspensión celular con HBSS a 2×10^8 células/mL. Justo antes de la inoculación de células Daudi, se añadió Matrigel (BD) al mismo volumen que la suspensión celular para permitir una doble dilución, y se preparó una suspensión de células para inoculación. La suspensión celular para la inoculación se almacenó en hielo hasta justo antes de la inoculación. Se utilizó Somnopentyl (Kyoritsu Seiyaku) como el fármaco anestésico diluido a 5 mg/mL con PBS. Se administraron 300 µL del fármaco anestésico por vía intraperitoneal a ratones SCID (ratón C.B-17/lcr-scld/scldJcl, macho, 6 semanas) (CLEA Japón) con una jeringa para insulina Myjector 29G x 1/2 (Terumo Corporation). Tras confirmar que se había introducido la anestesia, se utilizó una máquina de afeitar para rasurar el costado derecho de los ratones. Se empleó una aguja de inyección

de 26G 1/2 (Terumo) y una jeringa de vidrio de 1 mL (Terumo) para inocular por vía subcutánea 100 µL de la suspensión de células para la inoculación.

[0269] Aproximadamente 30 días después del tratamiento de inoculación celular, el eje mayor (mm) y el eje menor (mm) del tejido tumoral formado se midieron con un calibrador (Mitsutoyo). El volumen tumoral (mm³) se determinó con los valores numéricos obtenidos. El volumen tumoral se calculó con la fórmula: volumen tumoral (mm³) = eje mayor (mm) x eje menor (mm) x eje menor (mm) x 0,5, y los ratones portadores de cáncer se agruparon en 4 grupos (n=4/grupo). El volumen del tumor en el momento del agrupamiento era aproximadamente de 800 mm³.

(Ejemplo 11-3) Preparación del fluido de administración

[0270] Se preparó 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C) (SEQ ID NO. 61), 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C) (SEQ ID NO. 60), 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 46), y 2-6 diSialo(S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C) (SEQ ID NO. 49), además del agente de control Avonex a 588 nM con un tampón acetato que comprende L-Arginina y polisorbato. La preparación del fluido de administración se llevó a cabo justo antes de la administración.

(Ejemplo 11-4) Método de administración

[0271] El fluido de la administración preparado se empleó para administrar a la subcutánea dorsal de manera que la dosis sea de 2352 pmol/kg a un volumen de 4 mL/kg con una jeringa para insulina Myjector 29G x 1/2. Al grupo de administración del Vehículo se le administró un tampón acetato que comprendía L-arginina y polisorbato empleado para la preparación del fluido de administración a un volumen de 4 mL/kg. El día del agrupamiento y la administración inicial se estableció en el día 0, y la administración subcutánea dorsal se llevó a cabo en días alternos 5 veces hasta el 9º día.

(Ejemplo 11-5) Evaluación de la intensidad de la actividad antitumoral

[0272] Se extirpó tejido tumoral de los ratones el 24º día después del comienzo de la administración, y se midió el peso del tejido húmedo. Como un indicador de la actividad antitumoral, se calculó el valor relativo del peso del tejido húmedo del grupo de administración de IFN-β modificado con una cadena de azúcares diSialo cuádruple-séxtuple y de Avonex cuando el peso del tejido húmedo del grupo de administración del Vehículo se estableció como el 100 % (% T/C: test/control). El resultado se muestra en la Figura 12.

[0273] Tal como se muestra en la Figura 12, el valor relativo del peso del tejido húmedo del tejido tumoral (% T/C) era del 44,5 % para el grupo de administración de Avonex, mientras que los valores eran del 0,3 % para el grupo de administración de 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C), 0,4 % para el grupo de administración de 2-6 diSialo(S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C), 18,9 % para el grupo de administración de 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C), y 28,1 % para el grupo de administración de 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C), y el IFN-β modificado con cadenas de azúcares diSialo cuádruples, quintuples y séxtuples de la presente invención erradicó casi por completo el tejido tumoral, o mostró una actividad antitumoral superior hasta el punto de que redujo el tejido tumoral en gran medida.

[0274] De los resultados anteriores, cuando se llevó a cabo la administración por vía subcutánea una vez al día, en días alternos x 5 días, y a 2352 pmol/kg, se observó una tendencia de fuerte actividad antitumoral según aumentaba el número de diSialoglicosilación.

(Ejemplo 12) Actividad antitumoral *in vivo* del IFN-β modificado con cadenas de azúcares monosialo/disialo séxtuples

[0275] Se cultivaron células con un método similar al del (Ejemplo 11-1), y los ratones portadores de cáncer se prepararon con un método similar al del (Ejemplo 11-2).

[0276] El fluido de administración se preparó con un método similar al (Ejemplo 11-3), salvo que el fluido de administración del (Ejemplo 11-3) era 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 46), 2-6 monoSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 93), y el agente de control Avonex, y se administró a ratones portadores de cáncer con un método similar al (Ejemplo 11-4).

[0277] El tejido tumoral se reseccionó de los ratones en el 22º día después de que comenzase la administración, y se midió el peso del tejido húmedo. Como un indicador de la actividad antitumoral, se calculó el valor relativo del peso del tejido húmedo del grupo de administración de Avonex cuando el peso del tejido húmedo del grupo de administración del Vehículo se estableció al 100 % (% T/C: test/control). El resultado se muestra en la Figura 13.

[0278] Tal como se muestra en la Figura 13, el valor relativo del peso del tejido húmedo del tejido tumoral (% T/C) era del 63.0 % para el grupo de administración de Avonex, mientras que el valor era del 1,3 % para el grupo de administración del IFN-β modificado con una cadena de azúcares diSialo séxtuple, y se confirmó la fuerte actividad antitumoral. Por otro lado, el valor era del 79,3 % para el grupo de administración IFN-β modificado con una cadena de azúcares monoSialo séxtuple.

[0279] De los resultados anteriores, cuando se llevó a cabo la administración subcutánea una vez al día, en días alternos x 5 veces, y a 2352 pmol/kg, con IFN-β modificado con una cadena de azúcares diSialo séxtuple, se mostró una fuerte actividad antitumoral hasta tal punto que erradicó casi por completo el tejido tumoral, y que era muy superior a la del grupo de administración de Avonex. Por otro lado, con el IFN-β modificado con una cadena de azúcares monoSialo séxtuple en el que solo uno de los extremos no reductores está sialilado, no se observó una actividad antitumoral superior a la del grupo de administración de Avonex. A partir de ahí, se observó que es importante que todos los extremos no reductores estén sialilados para la actividad antitumoral.

(Ejemplo 13) Actividad antitumoral *in vivo* de

IFN-β modificado con cadenas de azúcares diSialo/tetraSialo/tetraSialo

[0280] Se cultivaron células con un método similar al del (Ejemplo 11-1), y los ratones portadores de cáncer se prepararon con un método similar al del (Ejemplo 11-2).

[0281] El fluido de administración se preparó con un método similar al (Ejemplo 11-3), salvo que el fluido de administración del (Ejemplo 11-3) era 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 46), 2-6 triSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 96), 2-6 tetraSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 98), y el agente de control Avonex, y se administró a ratones portadores de cáncer con un método similar al (Ejemplo 11-4).

[0282] El tejido tumoral se reseccionó de los ratones en el 22º día después de que comenzase la administración, y se midió el peso del tejido húmedo. Como un indicador de la actividad antitumoral, se calculó el valor relativo del peso del tejido húmedo del grupo de administración de Avonex cuando el peso del tejido húmedo del grupo de administración del Vehículo se estableció al 100 % (% T/C: test/control). El resultado se muestra en la Figura 14.

[0283] Tal como se muestra en la Figura 14, el valor relativo del peso de los tejidos húmedos del tejido tumoral (% T/C) era del 55,5 % para el grupo de administración de Avonex, mientras que los valores eran del 3,6 % para el grupo de administración del IFN-β modificado con una cadena de azúcares diSialo séxtuple, 9,1 % para el grupo de administración del IFN-β modificado con una cadena de azúcares tetraSialo séxtuple, y 28,7 % para el grupo de administración del IFN-β modificado con una cadena de azúcares triSialo séxtuple, y se mostró que cualquiera de los IFN-β modificados con una cadena de azúcares séxtuple tiene una fuerte actividad antitumoral.

[0284] En lo que se refiere a la estructura de la cadena de azúcares, al centrarse en la diferencia en el número de ramas de la cadena de azúcares, aunque la forma modificada con una cadena de azúcares diSialo biantenaria séxtuple muestra una fuerte actividad antitumoral, la forma modificada con una cadena de azúcares triSialo triantenaria séxtuple y la forma modificada con una cadena de azúcares tetraSialo tetraantenaria séxtuple mostraron una actividad antitumoral que era más débil que la forma modificada con una cadena de azúcares diSialo séxtuple. Se cree que la diferencia en la actividad inhibidora del crecimiento celular *in vitro* como la que se mostró en el resultado del Ejemplo 16 descrito a continuación (Tabla 4) o la diferencia en la cinética de la sangre *in vivo* y similares posiblemente estén relacionadas con esto.

(Ejemplo 14) Actividad antitumoral *in vivo* IFN-β modificado con una cadena de azúcares diSialo séxtuple e IFN-β modificado con PEG20K

[0285] Se cultivaron células con un método similar al del (Ejemplo 11-1), y los ratones portadores de cáncer se prepararon con un método similar al del (Ejemplo 11-2).

[0286] El fluido de administración se preparó con un método similar al (Ejemplo 11-3), salvo que el fluido de administración del (Ejemplo 11-3) era 2-6 diSialo(S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C) (SEQ ID NO. 46), IFN-β modificado con PEG20K, y el agente de control Avonex, y se administró a ratones portadores de cáncer con un método similar al (Ejemplo 11-4).

[0287] El tejido tumoral se reseccionó de los ratones en el 22º día después de que comenzase la administración, y se midió el peso del tejido húmedo. Como un indicador de la actividad antitumoral, se calculó el valor relativo del peso del tejido húmedo del grupo de administración de Avonex cuando el peso del tejido húmedo del grupo de administración del Vehículo se estableció al 100 % (% T/C: test/control). El resultado se muestra en la Figura 15.

[0288] Tal como se muestra en la Figura 15, el valor relativo del peso del tejido húmedo del tejido tumoral (% T/C) era del 62.6% para el grupo de administración de Avonex, mientras que el valor era del 0,3% para el grupo de administración del IFN-β modificado con una cadena de azúcares diSialo séxtuple, y se mostró una actividad antitumoral extremadamente alta hasta tal punto que erradicó el tejido tumoral casi por completo. Por otro lado, el % T/C del grupo de administración del IFN-β modificado por PEG20K fue del 58,5 %, lo que simplemente era un nivel comparable al grupo de administración del agente de control Avonex. A partir de ahí, quedó claro que el IFN-β modificado con una cadena de azúcares diSialo séxtuple tiene una actividad del IFN-β extremadamente superior comparada con el agente de control Avonex y el IFN-β modificado por PEG20K se conoce como tecnología convencional.

[0289] En general, como la tecnología convencional, se ha llevado a cabo una adición de PEG a los polipéptidos a fin de mejorar la estabilidad física o la estabilidad plasmática de las proteínas. También en el (Ejemplo 10) de la presente invención, el IFN-β PEGilado mostró una mejora significativa de la transición de la concentración en sangre comparada con el Avonex. No obstante, en el (Ejemplo 14), el IFN-β PEGilado solo mostró una actividad antitumoral cuyo nivel apenas se podía comparar al Avonex. Dicho de otro modo, no se observó ninguna mejora en lo que respecta a la actividad antitumoral del IFN-β con PEGilación que en general se sabe que tiene un efecto de mejora en la capacidad de retención en sangre, mientras que el IFN-β glicosilado de la presente invención sorprendentemente tiene una capacidad de retención en sangre significativamente más alta que el Avonex, tal como se muestra en el (Ejemplo 10), y también se mejoró de forma significativa en lo que se refiere a la actividad antitumoral. A partir de ahí, se mostró que el IFN-β glicosilado de la presente invención es extremadamente útil como medicamento comparado con el IFN-β natural o PEGilado.

(Ejemplo 15) Actividad inhibidora del crecimiento celular *in vitro* de IFN-β glicosilado cuádruple, quintuple y séxtuple

[0290] La actividad inhibidora del crecimiento celular del IFN-β glicosilado cuádruple, quintuple y séxtuple *in vitro* se evaluó mediante el siguiente método.

[0291] La cepa de células Daudi del linfoma de Burkitt humano se suspendió en suero fetal bovino al 10 %, 100 U/mL de penicilina, y 100 µg/mL de medio RPMI 1640 con estreptomycin (FCS-RPMI1640 al 10 %) a 1,25 x 10⁵ células/mL. La suspensión celular se sembró en una placa de fondo plano con 96 pocillos, cada uno con 1 x 10⁴ células/80 µL/pocillo. Además, se añadieron a cada uno 20 µL/pocillo del IFN-β glicosilado múltiple diluido en serie con FCS-RPMI1640 al 10 %, y esto se cultivó en una incubadora de CO₂ ajustada a una concentración de CO₂ al 5 % a 37 grados durante 3 días. La actividad inhibidora del crecimiento celular se midió con la actividad de la deshidrogenasa de las mitocondrias en el 3^{er} día de cultivo a medida que el indicador con el kit para contar células 8 (DOJINDO) según el manual se unía al kit.

[0292] Asimismo, se utilizó Avonex como el control. El valor CI50 se calculó con GraphPad Prism. Los resultados se muestran a continuación en la (Tabla 4).

[Tabla 4]

[0293]

(Tabla 4)

Compuesto	CI(50)
Avonex	4,34±1,01
PEG20K (N-terminal)	26,58±2,31
2-6 monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)	1,33±0,35
2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)	1,56±0,20
2-6 monoSialo (S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C)	1,50±0,75
2-6 diSialo (S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C)	1,98±0,54
2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-T99C-K107C-R112C)	2,16±0,95
2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-H130C)	1,29±0,41
2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-E136C)	2,39±0,85
2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-H139C)	2,81±0,74
2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R164C)	2,74±0,50
2-6 diSialo (S1C-Y29C-Q48C-N79C-K107C-E136C)	2,05±0,77

ES 2 687 801 T3

2-6 diSialo (S1C-M35C-Q48C-N79C-K107C-E136C)	1,75±0,45
2-6 diSialo (S1C-E41C-Q48C-N79C-K107C-E136C)	2,06±0,39
2-6 diSialo (S1C-Q48C-S75C-N79C-K107C-E136C)	1,95±0,36
2-6 diSialo (Q48C-S75C-N79C-K107C-R112C-E136C)	1,16±0,12
2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-E103C-K107C-E136C)	0,88±0,25
2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-E106C-K107C-E136C)	1,11±0,47
2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-K107C-D109C-E136C)	1,14±0,47
2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-K107C-R112C-E136C)	1,26±0,60
2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-K107C-L115C-E136C)	1,24±0,60
2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-K107C-L119C-E136C)	0,98±0,46
2-3 diSialo (S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C)	1,65±1,09
2-6 triSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)	5,71±1,06
2-6 tetraSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)	25,2±4,18
2-6 diSialo (S1C-E28C-Q48C-R70C-N79C)	1,53±0,53
2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C)	1,97±0,80
2-6 diSialo (N24C-N79C-K107C-R112C-E136C)	1,03±0,37
2-6 diSialo (G25C-N79C-K107C-R112C-E136C)	2,20±0,77
2-6 diSialo (K32C-N79C-K107C-R112C-E136C)	1,14±0,27
2-6 diSialo (M35C-N79C-K107C-R112C-E136C)	1,18±0,40
2-6 diSialo (D38C-N79C-K107C-R112C-E136C)	1,19±0,39
2-6 diSialo (E41C-N79C-K107C-R112C-E136C)	0,96±0,23
2-6 diSialo (F7C-N79C-K107C-R112C-E136C)	1,08±0,13
2-6 diSialo (Q48C-N79C-K107C-R112C-E136C)	0,99±0,16
2-6 diSialo (S75C-N79C-K107C-R112C-E136C)	1,13±0,20
2-6 diSialo (E41C-S75C-N79C-K107C-E136C)	1,04±0,14
2-6 diSialo (E42C-S75C-N79C-K107C-E136C)	1,17±0,07
2-6 diSialo (Q45C-S75C-N79C-K107C-E136C)	0,88±0,15
2-6 diSialo (L46C-S75C-N79C-K107C-E136C)	1,26±0,14
2-6 diSialo (Q47C-S75C-N79C-K107C-E136C)	0,98±0,09
2-6 diSialo (Q48C-S75C-N79C-K107C-E136C)	3,05±0,31
2-6 diSialo (F49C-S75C-N79C-K107C-E136C)	1,04±0,12
2-6 diSialo (Q50C-S75C-N79C-K107C-E136C)	1,12±0,08
2-6 monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)	1,75±0,46
2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)	1,07±0,43
2-3 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)	1,45±0,58
2-6 diSialo (S1C-N3C-Q48C-N79C)	1,96±0,63
2-6 diSialo (N79C-K107C-R112C-E136C)	2,89±0,84
2-6 diSialo (S1C-N79C-K107C-E136C)	1,52±0,65
2-6 diSialo (E28C-N79C-K107C-E136C)	1,93±0,77
2-6 diSialo (M35C-N79C-K107C-E136C)	2,19±0,82
2-6 diSialo (R70C-N79C-K107C-E136C)	1,44±0,46
2-6 diSialo (S75C-N79C-K107C-E136C)	2,11±0,67
2-6 triSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)	2,01±0,57
2-6 tetraSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)	2,17±0,85

[0294] Tal como se muestra en la (Tabla 4), la mejora en la actividad inhibidora del crecimiento celular *in vitro* también se observó con varios polipéptidos glicosilados que se glicosilaron en una posición diferente desde el IFN- β glicosilado en el que se observó un efecto de mejora en la actividad en la presente memoria. En lo que se refiere a los polipéptidos glicosilados mostrados en la (Tabla 4), de forma similar a los polipéptidos glicosilados mencionados anteriormente, se cree que el polipéptido glicosilado de la presente invención en el que todos los extremos no reductores están sialilados también puede utilizarse como un medicamento que presenta actividad del interferón β y como un medicamento superior en la actividad del interferón como la actividad antitumoral.

[0295] A partir de lo anterior, se mostró que el IFN- β glicosilado cuádruple-séxtuple de la presente invención tiene una capacidad de retención en sangre más alta y una actividad antitumoral más alta que el IFN- β natural (Avonex).

[0296] Tal como se muestra en las Figuras 4, 5 y 12, se mostró que el IFN- β disialo glicosilado tendrá una capacidad de retención en sangre más alta además de una actividad antitumoral más alta según aumente el número de cadenas de azúcares de cuádruple a quíntuple, de quíntuple a séxtuple, etc.

[0297] Asimismo, en la presente invención, se mostró que todos los extremos no reductores de la cadena de azúcares que están sialilados son importantes para la mejora de la capacidad de retención del IFN- β en sangre y la mejora de la actividad antitumoral *in vivo*.

[0298] Asimismo, en todos los casos en los que se emplean varias cadenas de azúcares como cadenas de azúcares disialo además de cadenas de azúcares trisialo y cadenas de azúcares tetrasialo como una cadena de azúcares presentando todos los extremos no reductores de la cadena de azúcares sialilados, se mostró que tenía una capacidad de retención en sangre más alta y una actividad antitumoral más alta que el IFN- β natural.

(Avonex).

[0299] En consecuencia, se cree que el polipéptido glicosilado de la presente invención es útil como medicamento presentando una actividad del interferón β superior.

Lista de secuencias

Tabla de secuencias.TXT

LISTA DE SECUENCIAS

[0300]

<110> GLYTECH, INC.

<120> polipéptido glicosilado sialilado

<130> OCKP1301F

<150> JP2013-073703

<151> 2013.03.29

<160> 111

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> expresado en *Escherichia coli*

<220>

ES 2 687 801 T3

<221> DISULFID

<222> (30)..(140)

<400> 1

5

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

10

ES 2 687 801 T3

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

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

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

5 <210> 3
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 1C tiene grupo Tiazolidina

20 <220>
 <221> BINDING
 <222> (30)..(30)
 <223> Acm

<220>
 <221> BINDING

ES 2 687 801 T3

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con Etanotiol

<400> 3

5

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
65 70 75

<210> 4

<211> 78

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 1C tiene grupo Tiazolidina

20

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

25

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

30

<400> 4

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp
65 70 75

<210> 5

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 1C tiene grupo Tiazolidina

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acn

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con Etanotiol

<400> 5

Cys Tyr Cys Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
65 70 75

<210> 6
 <211> 78
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 1C tiene grupo Tiazolidina

 15 <220>
 <221> BINDING
 <222> (30)..(30)
 <223> Acm

 20 <220>
 <221> BINDING
 <222> (78)..(78)
 <223> alquilioester-modificado con Etanotiol

 25 <400> 6

Cys	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe	Gln	Ser
1				5					10					15	
Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Cys	Tyr	Cys	Leu	Lys
		20						25					30		
Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Cys
		35					40					45			
Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	Asn
	50					55					60				
Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Cys	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp		
65					70					75					

 <210> 7
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 35 <220>
 <221> BINDING
 <222> (30)..(30)
 <223> Acm

 40 <220>
 <221> BINDING
 <222> (30)..(30)
 <223> Acm

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

5 <223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 7

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
65 70 75

10

<210> 8

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

20

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 1C tiene grupo Tiazolidina

<220>

25

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

<220>

30

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 8

35

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

ES 2 687 801 T3

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 9
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintetizado químicamente

<220>
 <221> BINDING
 <222> (30)..(30)
 <223> Acn

<220>
 <221> BINDING
 <222> (78)..(78)
 <223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 9

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Cys Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 10
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintetizado químicamente

<220>
 <221> BINDING

ES 2 687 801 T3

<222> (30)..(30)

<223> Acm

<220>

5 <221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 10

10

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
65 70 75

<210> 11

<211> 78

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

20

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

25

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

30

<400> 11

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Cys Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
65 70 75

- 5 <210> 12
- <211> 78
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente

- 15 <220>
- <221> BINDING
- <222> (30)..(30)
- <223> Acm

- 20 <220>
- <221> BINDING
- <222> (78)..(78)
- <223> alquiltioester-modificado con MESNA

- <400> 12

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Cys Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
65 70 75

- 25 <210> 13
- <211> 78
- <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

5

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

10

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

15

<400> 13

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Cys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
65 70 75

20

<210> 14

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

30

<222> (30)..(30)

<223> Acm

<220>

<221> BINDING

35

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 14

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Cys Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 15

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 15

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Cys Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 16

<211> 78

<212> PRT

ES 2 687 801 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

5

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

10

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

15

<400> 16

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

20

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
65 70 75

<210> 17

<211> 78

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

30

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

35

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

40

<400> 17

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 18

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificia

I

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 18

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Cys Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 19

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

5

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

10

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

15

<400> 19

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp
65 70 75

20

<210> 20

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> sintetizado químicamente

30

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

35

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

40

<400> 20

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 21

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 21

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Cys Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 22

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

5

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

10

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

15

<400> 22

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Cys Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp
65 70 75

20

<210> 23

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> sintetizado químicamente

30

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

35

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

40

<400> 23

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Cys Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 24

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 24

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Cys Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 25

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

5

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

10

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

15

<400> 25

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp
65 70 75

20

<210> 26

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

30

<222> (30)..(30)

<223> Acm

<220>

<221> BINDING

35

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 26

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

Cys Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn
50 55 60

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp
65 70 75

<210> 27

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

<222> (30)..(30)

<223> Acm

<220>

<221> BINDING

<222> (78)..(78)

<223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 27

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp
65 70 75

<210> 28

<211> 78

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintetizado químicamente

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 1C tiene grupo Tiazolidina

10 <220>
 <221> BINDING
 <222> (30)..(30)
 <223> Acn

15 <220>
 <221> BINDING
 <222> (78)..(78)
 <223> alquiltioester-modificado con MESNA

20 <400> 28

Cys	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe	Gln	Ser
1				5					10					15	
Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Cys	Cys	Leu	Lys
		20						25					30		
Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Cys
		35					40					45			
Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	Asn
	50					55					60				
Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp		
65					70					75					

<210> 29
 25 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> sintetizado químicamente

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 35 <223> 1C tiene grupo Tiazolidina

<220>
 <221> BINDING
 <222> (30)..(30)
 40 <223> Acn

<220>
 <221> BINDING
 <222> (78)..(78)
 5 <223> alquiltioester-modificado con MESNA

 <400> 29

 Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

 Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

 Asp Arg Cys Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

 Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
 65 70 75

 10 <210> 30
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 1C tiene grupo Tiazolidina

 <220>
 25 <221> BINDING
 <222> (30)..(30)
 <223> Acm

 <220>
 30 <221> BINDING
 <222> (78)..(78)
 <223> alquiltioester-modificado con MESNA

 <400> 30
 35

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
 65 70 75

<210> 31

<211> 87

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

10

<220>

<221> BINDING

<222> (62)..(62)

<223> Acm

15

<400> 31

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
 1 5 10 15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
 20 25 30

Thr Cys Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Cys Tyr Tyr Gly
 35 40 45

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
 50 55 60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 85

20

<210> 32

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

ES 2 687 801 T3

<223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

5 <222> (62)..(62)

<223> Acm

<400> 32

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
1 5 10 15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
20 25 30

Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
35 40 45

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
50 55 60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
65 70 75 80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
85

10

<210> 33

<211> 87

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

20

<220>

<221> BINDING

<222> (62)..(62)

<223> Acm

25

<400> 33

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
1 5 10 15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
20 25 30

ES 2 687 801 T3

Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
 35 40 45

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
 50 55 60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 85

<210> 34

<211> 87

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

<222> (62)..(62)

<223> Acm

15

<400> 34

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
 1 5 10 15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
 20 25 30

Thr Cys Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
 35 40 45

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
 50 55 60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 85

20 <210> 35

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

ES 2 687 801 T3

<221> BINDING

<222> (62)..(62)

<223> Acm

5 <400> 35

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
1 5 10 15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
20 25 30

Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
35 40 45

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp
50 55 60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
65 70 75 80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
85

<210> 36

10 <211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

<222> (62)..(62)

20 <223> Acm

<400> 36

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
1 5 10 15

Asn His Leu Lys Cys Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
20 25 30

Thr Cys Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
35 40 45

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
50 55 60

25

ES 2 687 801 T3

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
65 70 75 80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
85

5 <210> 37
<211> 87
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintetizado químicamente

<220>
<221> BINDING
<222> (62)..(62)
<223> Acm

15 <400> 37

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
1 5 10 15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Cys Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
20 25 30

Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
35 40 45

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp
50 55 60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
65 70 75 80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
85

20 <210> 38
<211> 87
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> sintetizado químicamente

<220>
<221> BINDING
<222> (62)..(62)
<223> Acm

30 <400> 38

ES 2 687 801 T3

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
 1 5 10 15
 Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Cys Cys Glu Asp Phe
 20 25 30
 Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp
 50 55 60
 Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
 65 70 75 80
 Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 85

5 <210> 39
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

15 <220>
 <221> BINDING
 <222> (62)..(62)
 <223> Acm

<400> 39

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
 1 5 10 15
 Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Cys Phe
 20 25 30
 Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp
 50 55 60
 Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
 65 70 75 80
 Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 85

20 <210> 40
 <211> 87

ES 2 687 801 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> sintetizado químicamente

<220>

<221> BINDING

<222> (62)..(62)

10 <223> Acm

<400> 40

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
1 5 10 15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
20 25 30

Thr Arg Gly Lys Cys Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
35 40 45

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp
50 55 60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
65 70 75 80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
85

15

<210> 41

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

25 <221> BINDING

<222> (62)..(62)

<223> Acm

<400> 41

30

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
1 5 10 15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
20 25 30

Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Cys His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
35 40 45

ES 2 687 801 T3

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp
 50 55 60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 85

5 <210> 42
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

<220>
 <221> BINDING
 <222> (62)..(62)
 15 <223> Acm

<400> 42

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
 1 5 10 15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
 20 25 30

Thr Cys Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
 35 40 45

Arg Ile Leu Cys Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
 50 55 60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 85

20 <210> 43
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintetizado químicamente

<220>
 <221> BINDING
 30 <222> (62)..(62)

ES 2 687 801 T3

<223> Acm

<400> 43

```

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
1          5          10          15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
20          25          30

Thr Cys Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
35          40          45

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp
50          55          60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
65          70          75          80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
85
    
```

5

<210> 44

<211> 87

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

15

<220>

<221> BINDING

<222> (62)..(62)

<223> Acm

20

<400> 44

```

Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
1          5          10          15

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
20          25          30

Thr Cys Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
35          40          45

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser Cys Cys Ala Trp
50          55          60

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
65          70          75          80

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
85
    
```

<210> 45
 <211> 87
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 10 <220>
 <221> BINDING
 <222> (62)..(62)
 <223> Acm

 15 <400> 45

 Cys Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
 1 5 10 15

 Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe
 20 25 30

 Thr Cys Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
 35 40 45

 Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
 50 55 60

 Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
 65 70 75 80

 Leu Thr Gly Tyr Leu Cys Asn
 85

 <210> 46
 20 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> sintetizado químicamente

 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 30 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (48)..(48)
 35 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD

<222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (123)..(123)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 46

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Cys Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

25 Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn 165

- 5 <210> 47
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> sintetizado químicamente
- 15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (48)..(48)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- 20 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (75)..(75)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- 25 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- 30 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- 35 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- 40 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- 45 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)
 <400> 47

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 48
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente
- 15 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (1)..(1)
- <223> oligosacárido disialo(alfa 2-3)
- 20 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (3)..(3)
- <223> oligosacárido disialo(alfa 2-3)
- <220>
- <221> CARBOHYD

<222> (48)..(48)
<223> oligosacárido disialo(alfa 2-3)

5 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (79)..(79)
<223> oligosacárido disialo(alfa 2-3)

10 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (107)..(107)
<223> oligosacárido disialo(alfa 2-3)

15 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (112)..(112)
<223> oligosacárido disialo(alfa 2-3)

20 <220>
<221> DISULFID
<222> (30)..(140)
<400> 48

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Cys Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 49

<211> 165

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

10

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (3)..(3)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (48)..(48)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 49

Cys Tyr Cys Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

25 Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

ES 2 687 801 T3

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- <210> 50
- <211> 165
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> sintetizado químicamente

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (1)..(1)
- 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (48)..(48)
- 20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- 25 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (99)..(99)
- 30 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (107)..(107)
- 35 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (112)..(112)
- 40 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> DISULFID
- <222> (30)..(140)

ES 2 687 801 T3

<400> 50

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Cys Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

5

<210> 51
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> sintetizado químicamente

15

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (48)..(48)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (79)..(79)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (107)..(107)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (112)..(112)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (130)..(130)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25 <220>
<221> DISULFID
<222> (30)..(140)

<400> 51

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu Cys Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 52
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (1)..(1)
- 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (48)..(48)
- 20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- 25 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 5 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 10 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)
 20
 <400> 52

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn
 50 55 60
 Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

25

<210> 53
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <220>
 10 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 15 <221> CARBOHYD
 <222> (48)..(48)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 20 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 25 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 30 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 35 <221> CARBOHYD
 <222> (139)..(139)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 40 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)
 <400> 53

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser Cys Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 54

<211> 165

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

10

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (48)..(48)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (79).. (79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (164)..(164)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 54

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

25 Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

ES 2 687 801 T3

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Cys Asn
 165

- <210> 55
- <211> 165
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> sintetizado químicamente

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (1)..(1)
- 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (29)..(29)
- 20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (48)..(48)
- 25 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- 30 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (107)..(107)
- 35 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (136)..(136)
- 40 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> DISULFID
- <222> (30)..(140)

ES 2 687 801 T3

<400> 55

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15
 Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Cys Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

5

<210> 56
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> sintetizado químicamente

15

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (35)..(35)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25

<220>
 <221> CARBOHYD

<222> (48)..(48)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 56

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Cys Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

25 Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

5 <210> 57
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (41)..(41)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (48)..(48)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

30 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

35 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

40 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

45 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 57

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn
 50 55 60
 Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 58
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (1)..(1)
- 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (48)..(48)
- 20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (75)..(75)
- 25 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (79)..(79)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (107)..(107)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (136)..(136)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
<221> DISULFID
<222> (30)..(140)

<400> 58

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 59

<211> 165

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

10

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (28)..(28)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (48)..(48)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (70)..(70)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 59

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Cys Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Cys Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

20 Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 60

<211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 10 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (48)..(48)
 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 25 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 30 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)
 35
 <400> 60

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn

ES 2 687 801 T3

	50		55		60														
	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Cys	Glu			
	65					70					75					80			
	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	His			
					85					90					95				
	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Glu	Cys	Glu	Asp	Phe	Thr	Cys			
				100					105					110					
	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg	Ile			
			115					120					125						
	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	Ile			
		130					135					140							
	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asn	Arg	Leu	Thr			
	145					150					155					160			
	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn														
					165														

- <210> 61
- <211> 165
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> sintetizado químicamente
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (1)..(1)
- 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (48)..(48)
- 20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- 25 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (107)..(107)
- 30 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- <220>
- <221> DISULFID

ES 2 687 801 T3

<222> (30)..(140)

<400> 61

Cys	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe	Gln	Ser	1	5	10	15
Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys	20	25	30	
Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Cys	35	40	45	
Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	Asn	50	55	60	
Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Cys	Glu	65	70	75	80
Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	His	85	90	95	
Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Glu	Cys	Glu	Asp	Phe	Thr	Arg	100	105	110	
Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg	Ile	115	120	125	
Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	Ile	130	135	140	
Val	Arg	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asn	Arg	Leu	Thr	145	150	155	160
Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn	165														

5

<210> 62

<211> 165

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (3)..(3)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

5 <222> (48)..(48)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

10 <222> (79).. (79)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> DISULFID

15 <222> (30)..(140)

<400> 62

Cys Tyr Cys Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

20

<210> 63

<211> 165

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> sintetizado químicamente

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

10 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (79)..(79)

15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (107)..(107)

20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (136)..(136)

25 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> DISULFID

<222> (30)..(140)

30

<400> 63

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 64
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 <220>
 <221> CARBOHYD
- 15 <222> (41)..(41)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
- 20 <222> (75)..(75)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
- 25 <222> (79)..(79)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

5 <222> (103)..(103)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

10 <222> (107)..(107)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

15 <222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> DISULFID

20 <222> (30)..(140)

<400> 64

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30
Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Cys Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

25

- <210> 65
 <211> 165
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (41)..(41)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (75)..(75)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 20 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 25 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (106)..(106)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 30 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 35 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 40 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

 <400> 65
 45

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Cys Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 66

<211> 165

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

10

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (41)..(41)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (75)..(75)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (109)..(109)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 66

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

25 Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

ES 2 687 801 T3

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Cys Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

5 <210> 67
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (41)..(41)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (75)..(75)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

30 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

35 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> DISULFID

5 <222> (30)..(140)

<400> 67

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

10

<210> 68

<211> 165

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

20

<221> CARBOHYD

<222> (41)..(41)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (75)..(75)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79).. (79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (115)..(115)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

30 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 68

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Cys Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 69
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente

- <220>
- <221> CARBOHYD
- 15 <222> (41)..(41)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (75)..(75)
- 20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- 25 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 5 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (119)..(119)
 10 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)
 20
 <400> 69

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30
 Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Cys His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

25

<210> 70
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <220>
 10 <221> CARBOHYD
 <222> (24)..(24)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 15 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 20 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 25 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 30 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 <220>
 35 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)
 <400> 70

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 71

<211> 165

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

10

<221> CARBOHYD

<222> (25)..(25)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (79)..(79)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (107)..(107)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

5 <222> (112)..(112)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

10 <222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> DISULFID

15 <222> (30)..(140)

<400> 71

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Cys Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

20 Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 72

<211> 165

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

5

<221> CARBOHYD

<222> (32)..(32)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (79)..(79)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (107)..(107)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (112)..(112)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

30

<220>

<221> DISULFID

<222> (30)..(140)

<400> 72

35

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Cys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

ES 2 687 801 T3

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 73
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente

- <221> CARBOHYD
- <222> (35)..(35)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- 15 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- 20 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (107)..(107)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- 25 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (112)..(112)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- 30 <220>
- <221> CARBOHYD

ES 2 687 801 T3

<222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

5

<221> DISULFID

<222> (30)..(140)

<400> 73

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Cys Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

10

<210> 74

<211> 165

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

20

<221> CARBOHYD

<222> (38)..(38)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (79)..(79)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (107)..(107)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (112)..(112)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (136)..(136)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25 <220>
<221> DISULFID
<222> (30)..(140)
<400> 74

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Cys Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 75
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente
- <221> CARBOHYD
- <222> (41)..(41)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- 15 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- 20 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (107)..(107)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

5 <222> (112)..(112)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

10 <222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> DISULFID

15 <222> (30)..(140)

<400> 75

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80
Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

20

<210> 76

<211> 165

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintetizado químicamente

5

<221> CARBOHYD
 <222> (7)..(7)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

30

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 76

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Cys Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 77

<211> 165

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

10

<221> CARBOHYD

<222> (48)..(48)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (79)..(79)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (107)..(107)

ES 2 687 801 T3

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

5 <222> (112)..(112)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

10 <222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> DISULFID

15 <222> (30)..(140)

<400> 77

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

20

<210> 78

ES 2 687 801 T3

<211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> sintetizado químicamente

<221> CARBOHYD
 <222> (75)..(75)
 10 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 25 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 30 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)
 35 <400> 78

Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe	Gln	Ser
1				5					10					15	
Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys
		20						25					30		
Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Gln
		35					40					45			
Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	Asn
		50				55					60				
Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Cys	Thr	Gly	Trp	Cys	Glu
65					70					75					80
Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	His
				85					90					95	

ES 2 687 801 T3

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 79
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente

- <221> CARBOHYD
- <222> (41)..(41)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- 15 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (75)..(75)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- 20 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- 25 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (107)..(107)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- 30 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (136)..(136)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

- 35 <220>
- <221> DISULFID
- <222> (30)..(140)

- 40 <400> 79

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Cys Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 80
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 <221> CARBOHYD
 <222> (42)..(42)
- 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (75)..(75)
- 20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD

<222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 80

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Cys Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

20 Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 81

<211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintetizado químicamente
 <221> CARBOHYD

10

<222> (45)..(45)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (75)..(75)

15

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)

20

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)

25

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)

30

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

35

<400> 81

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Cys Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 82
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 <221> CARBOHYD
 <222> (46)..(46)
- 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (75)..(75)
- 20 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
- 25 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

ES 2 687 801 T3

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 82

Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe	Gln	Ser
1				5					10					15	
Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys
		20						25					30		
Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Cys	Gln	Gln
		35					40					45			
Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	Asn
	50					55					60				
Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Cys	Thr	Gly	Trp	Cys	Glu
65					70					75					80
Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	His
				85					90					95	
Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Glu	Cys	Glu	Asp	Phe	Thr	Arg
			100					105					110		
Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Arg	Ile
		115					120					125			
Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Cys	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp	Thr	Ile
	130					135					140				
Val	Arg	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asn	Arg	Leu	Thr
145					150					155					160
Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn											
				165											

20 <210> 83
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> sintetizado químicamente

5

<221> CARBOHYD

<222> (47)..(47)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

10

<221> CARBOHYD

<222> (75)..(75)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

15

<221> CARBOHYD

<222> (79)..(79)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

20

<221> CARBOHYD

<222> (107)..(107)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

25

<221> CARBOHYD

<222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

30

<221> DISULFID

<222> (30)..(140)

<400> 83

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Cys Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 84

<211> 165

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

10

<221> CARBOHYD

<222> (48)..(48)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (75)..(75)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (79).. (79)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

5 <222> (107)..(107)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

10 <222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> DISULFID

15 <222> (30)..(140)

<400> 84

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

20

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 85

<211> 165

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

5

<221> CARBOHYD

<222> (49)..(49)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (75)..(75)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (79)..(79)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (107)..(107)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

30

<220>

<221> DISULFID

<222> (30)..(140)

<400> 85

35

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

Cys Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn
50 55 60

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu

ES 2 687 801 T3

<221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 86

5

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15
 Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30
 Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45
 Phe Cys Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn
 50 55 60
 Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80
 Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95
 Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110
 Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125
 Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140
 Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160
 Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 87
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> sintetizado químicamente

15

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79).. (79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>
 <221> CARBOHYD

<222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (136)..(136)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 87

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

20 Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 88

<211> 165
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> sintetizado químicamente

<220>
<221> CARBOHYD
10 <222> (28)..(28)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
<221> CARBOHYD
15 <222> (79)..(79)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
<221> CARBOHYD
20 <222> (107)..(107)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
<221> CARBOHYD
25 <222> (136)..(136)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
<221> DISULFID
30 <222> (30)..(140)

<400> 88

ES 2 687 801 T3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Cys Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 89
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 <220>
 <221> CARBOHYD
- 15 <222> (35)..(35)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
- 20 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

 <220>
 <221> CARBOHYD
- 25 <222> (107)..(107)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

5 <222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> DISULFID

10 <222> (30)..(140)

<400> 89

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Cys Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn
50 55 60
Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

15

<210> 90

<211> 165

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

25

<220>

ES 2 687 801 T3

<221> CARBOHYD
<222> (70)..(70)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (79)..(79)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (107)..(107)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (136)..(136)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
<221> DISULFID
<222> (30)..(140)

<400> 90
25

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

5 <222> (136)..(136)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> DISULFID

10 <222> (30)..(140)

<400> 91

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Cys Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Cys Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

15

<210> 92

<211> 165

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> sintetizado químicamente

ES 2 687 801 T3

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 5 <223> oligosacárido disialo(alfa 2-3)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (48)..(48)
 10 <223> oligosacárido disialo(alfa 2-3)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 15 <223> oligosacárido disialo(alfa 2-3)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 20 <223> oligosacárido disialo(alfa 2-3)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)
 25 <400> 92

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

ES 2 687 801 T3

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 93
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente

- 15 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (1)..(1)
- <223> oligosacárido monosialo

- 20 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (48)..(48)
- <223> oligosacárido monosialo

- 25 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- <223> oligosacárido monosialo

- 30 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (107)..(107)
- <223> oligosacárido monosialo

- 35 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (112)..(112)
- <223> oligosacárido monosialo

- 40 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (123)..(123)
- <223> oligosacárido monosialo

- 45 <220>
- <221> DISULFID
- <222> (30)..(140)

- <400> 93

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Cys Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 94
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (1)..(1)
- 15 <223> oligosacárido monosialo
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (3)..(3)
- 20 <223> oligosacárido monosialo
- <220>
- <221> CARBOHYD

<222> (48)..(48)
<223> oligosacárido monosialo

5
<220>
<221> CARBOHYD
<222> (79)..(79)
<223> oligosacárido monosialo

10
<220>
<221> CARBOHYD
<222> (107)..(107)
<223> oligosacárido monosialo

15
<220>
<221> CARBOHYD
<222> (112)..(112)
<223> oligosacárido monosialo

20
<220>
<221> DISULFID
<222> (30)..(140)

<400> 94

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Cys Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 95

<211> 165

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

10

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> oligosacárido monosialo

15

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (48)..(48)

<223> oligosacárido monosialo

20

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido monosialo

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido monosialo

10 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 95

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

15 Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

20 <210> 96
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintetizado químicamente

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> oligosacárido trisialo(alfa 2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (48)..(48)
 <223> oligosacárido trisialo(alfa 2-6)

15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido trisialo(alfa 2-6)

20 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido trisialo(alfa 2-6)

25 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido trisialo(alfa 2-6)

30 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (123)..(123)
 <223> oligosacárido trisialo(alfa 2-6)

35 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)
 <400> 96

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

ES 2 687 801 T3

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Cys Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 97
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente
- 15 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (1)..(1)
- <223> oligosacárido trisialo(alfa 2-6)
- 20 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (48)..(48)
- <223> oligosacárido trisialo(alfa 2-6)
- 25 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- <223> oligosacárido trisialo(alfa 2-6)
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (107)..(107)

ES 2 687 801 T3

<223> oligosacárido trisialo(alfa 2-6)

<220>

<221> DISULFID

5 <222> (30)..(140)

<400> 97

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

10

<210> 98

<211> 165

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> sintetizado químicamente

<220>

20

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> oligosacárido tetrasialo(alfa 2-6)

5 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (48)..(48)
 <223> oligosacárido tetrasialo(alfa 2-6)

10 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79).. (79)
 <223> oligosacárido tetrasialo(alfa 2-6)

15 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (107)..(107)
 <223> oligosacárido tetrasialo(alfa 2-6)

20 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (112)..(112)
 <223> oligosacárido tetrasialo(alfa 2-6)

25 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (123)..(123)
 <223> oligosacárido tetrasialo(alfa 2-6)

30 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 98

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Cys
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Cys Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 99
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente

- <220>
- <221> CARBOHYD
- 15 <222> (1)..(1)
- <223> oligosacárido tetrasialo(alfa 2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- 20 <222> (48)..(48)
- <223> oligosacárido tetrasialo(alfa 2-6)

- <220>
- <221> CARBOHYD
- 25 <222> (79)..(79)

ES 2 687 801 T3

<223> oligosacárido tetrasialo(alfa 2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

5 <222> (107)..(107)

<223> oligosacárido tetrasialo(alfa 2-6)

<220>

<221> DISULFID

10 <222> (30)..(140)

<400> 99

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
35 40 45

Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn
50 55 60
Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Cys Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Cys Glu Asp Phe Thr Arg
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

15

<210> 100

<211> 165

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintetizado químicamente

25

<220>

<221> CARBOHYD
 <222> (1)..(1)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

5

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (26)..(26)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

10

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (48)..(48)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

15

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (67)..(67)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (79)..(79)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (88)..(88)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

30

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (30)..(140)

<400> 100

35

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Cys Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Cys Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Cys Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- <210> 101
- <211> 25
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> sintetizado químicamente

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- 15 <223> 1C tiene grupo Tiazolidina

- <220>
- <221> BINDING
- <222> (25)..(25)
- 20 <223> alquiltioester-modificado con Tiofenol

- <400> 101

ES 2 687 801 T3

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly
 20 25

5 <210> 102
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

15 <220>
 <221> BINDING
 <222> (5)..(5)
 <223> Acm

20 <220>
 <221> BINDING
 <222> (22)..(22)
 <223> alquiltioester-modificado con MESNA

<400> 102

Cys Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu
 1 5 10 15

Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 20

25 <210> 103
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintetizado químicamente

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 1C tiene grupo Tiazolidina

40 <220>
 <221> BINDING
 <222> (19)..(19)
 <223> alquiltioester-modificado con Etanotiol

<400> 103

ES 2 687 801 T3

Cys Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 1 5 10 15

Asn Ile Phe

5 <210> 104
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintetizado químicamente

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 1C tiene grupo Tiazolidina

20 <220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (13)..(13)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25 <220>
 <221> BINDING
 <222> (21)..(21)
 <223> alquiltioester-modificado con Tiofenol

<400> 104

Cys Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile
 1 5 10 15

Val Glu Asn Leu Leu
 20

30 <210> 105
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintetizado químicamente

40 <220>
 <221> BINDING
 <222> (53)..(53)
 <223> Acm

<400> 105

45 Cys Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu
 1 5 10 15

ES 2 687 801 T3

Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu
 20 25 30

His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys
 35 40 45

Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg
 50 55 60

Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 65 70 75

- <210> 106
- <211> 47
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> sintetizado químicamente
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- 15 <223> 1C tiene grupo Tiazolidina
- <220>
- <221> BINDING
- <222> (30)..(30)
- 20 <223> Acm
- <220>
- <221> BINDING
- <222> (47)..(47)
- 25 <223> alquiltioester-modificado con Etanotiol
- <400> 106

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Cys Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

- 30 <210> 107
- <211> 99
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> sintetizado químicamente

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (13)..(13)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
 5

<220>
 <221> BINDING
 <222> (74)..(74)
 <223> Acm
 10

<400> 107

Cys Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile
 1 5 10 15

Val Glu Asn Leu Leu Cys Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys
 20 25 30

Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys
 35 40 45

Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His
 50 55 60

Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg
 65 70 75 80

Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr
 85 90 95

Leu Arg Asn

15 <210> 108
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintetizado químicamente

<220>
 <221> CARBOHYD
 25 <222> (32)..(32)
 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>
 <221> BINDING
 30 <222> (93)..(93)
 <223> Acm
 <400> 108

ES 2 687 801 T3

Cys Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 1 5 10 15
 Asn Ile Phe Cys Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 20 25 30
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Cys Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 35 40 45
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 50 55 60
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 65 70 75 80
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 85 90 95
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 100 105 110
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 115

- 5 <210> 109
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (79)..(79)
- 15 <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- <220>
- <221> BINDING
- <222> (30)..(30)
- 20 <223> Acm
- <220>
- <221> BINDING
- <222> (140)..(140)
- 25 <223> Acm
- <400> 109

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15
 Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Cys Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30

ES 2 687 801 T3

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45

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

Ile Phe Cys Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu
 65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Cys Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140

Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

- 5 <210> 110
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> sintetizado químicamente
- 15 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (1)..(1)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- 20 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (26)..(26)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- 25 <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (48)..(48)
- <223> oligosacárido disialo(alfa2-6)
- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (67)..(67)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

5 <222> (79)..(79)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> CARBOHYD

10 <222> (88)..(88)

<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<220>

<221> BINDING

15 <222> (30)..(30)

<223> Acm

<220>

<221> BINDING

20 <222> (140)..(140)

<223> Acm

<400> 110

Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Cys Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
35 40 45

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

Ile Phe Cys Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu
65 70 75 80

Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Cys Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
85 90 95

Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg
100 105 110

Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
115 120 125

Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
130 135 140

25 Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Arg Asn
165

5 <210> 111
<211> 165
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintetizado químicamente

15 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (1)..(1)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

20 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (26)..(26)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

25 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (48)..(48)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

30 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (67)..(67)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

35 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (79)..(79)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

40 <220>
<221> CARBOHYD
<222> (88)..(88)
<223> oligosacárido disialo(alfa2-6)

<400> 111

ES 2 687 801 T3

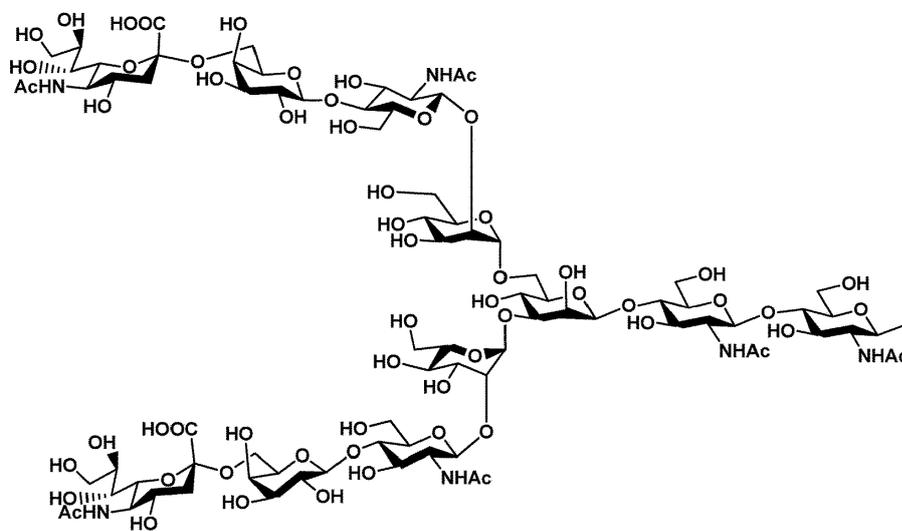
Cys Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser
 1 5 10 15
 Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Cys Leu Glu Tyr Cys Leu Lys
 20 25 30
 Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Cys
 35 40 45
 Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn
 50 55 60
 Ile Phe Cys Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu
 65 70 75 80
 Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Cys Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His
 85 90 95
 Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg
 100 105 110
 Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile
 115 120 125
 Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile
 130 135 140
 Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr
 145 150 155 160
 Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido glicosilado presentando actividad de interferón β , **caracterizado por que** dicho polipéptido glicosilado es cualquier polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (1) a (4);
- 5 (1) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1,
- (2) un polipéptido presentando de uno a diez aminoácidos delecionados, sustituidos o añadidos en el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1, y
- (3) un polipéptido presentando una homología del 80 % o más con el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1,
- 10 en que los aminoácidos en de 4 a 6 ubicaciones se sustituyen con aminoácidos glicosilados, y donde todos los extremos no reductores de dicha cadena de azúcares están sililados, y donde al menos tres de dichos aminoácidos glicosilados respectivos están presentes en la posición que corresponde a una posición seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 41, 48, 75, 79, 107, 112, 123, y 136 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 15 2. Un polipéptido glicosilado según la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho aminoácido glicosilado respectivo es cada uno independientemente una Cys glicosilada o una Asn glicosilada.
3. Un polipéptido glicosilado según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** las cadenas de azúcares en dichos respectivos aminoácidos glicosilados se seleccionan todas independientemente del grupo que consiste en una cadena de azúcares disialo, una cadena de azúcares trisialo, y una
- 20 cadena de azúcares tetrasialo.
4. Un polipéptido glicosilado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** las cadenas de azúcares en dichos respectivos aminoácidos glicosilados se seleccionan todos de manera independiente del grupo que consiste en las siguientes Fórmula (1), Fórmula (2), Fórmula (3) y Fórmula (4).

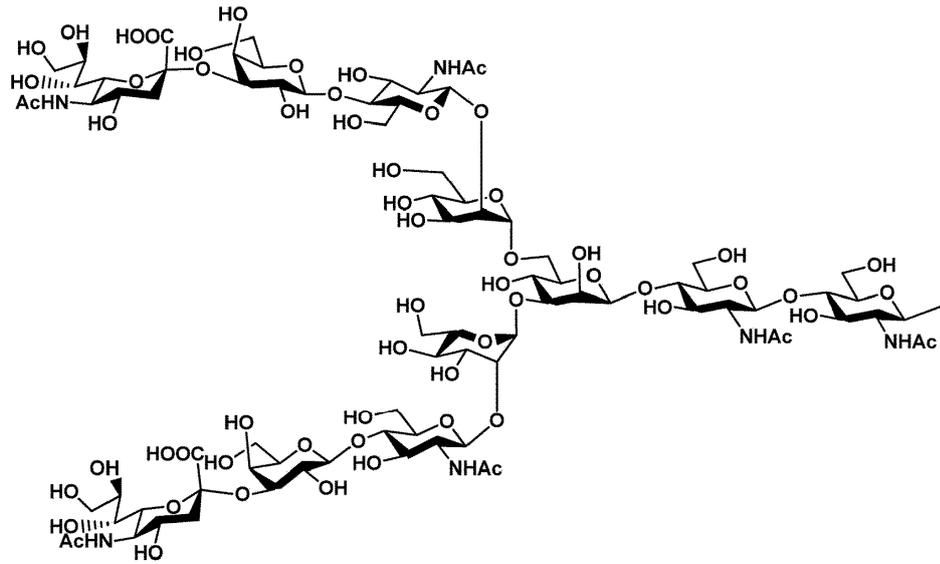
25

[Fórmula química 1]



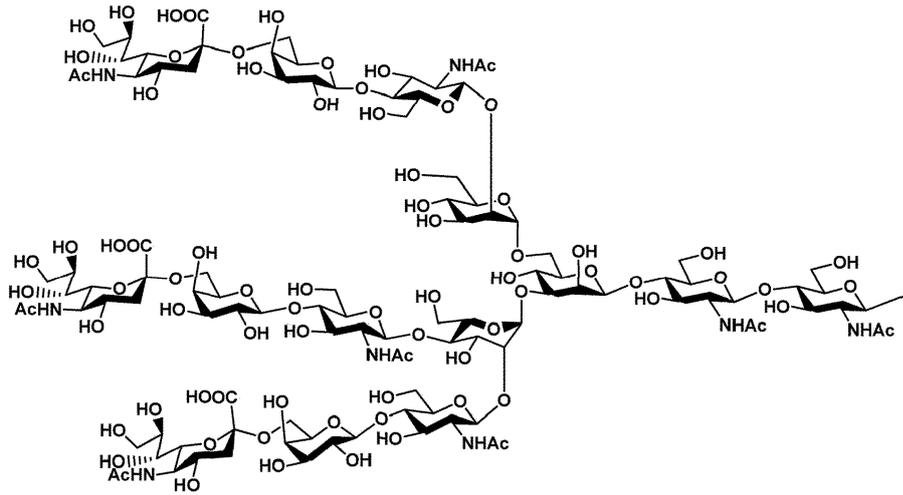
Fórmula (1)

[Fórmula química 2]



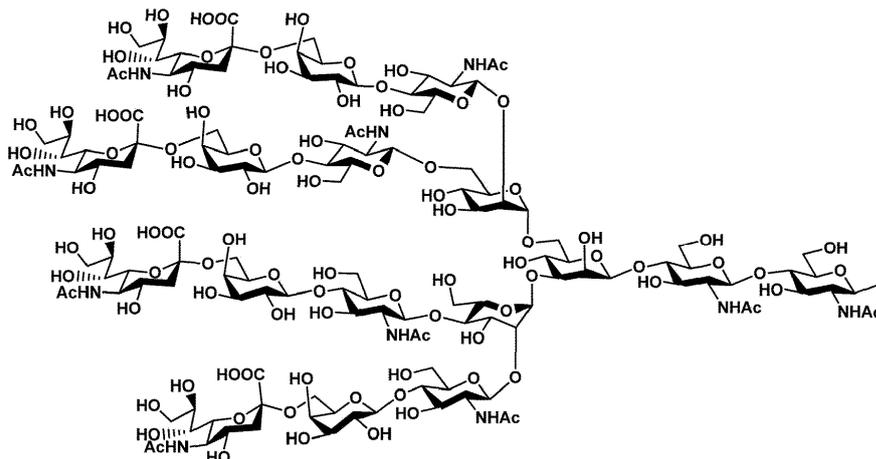
Fórmula (2)

[Fórmula química 3]



Fórmula (3)

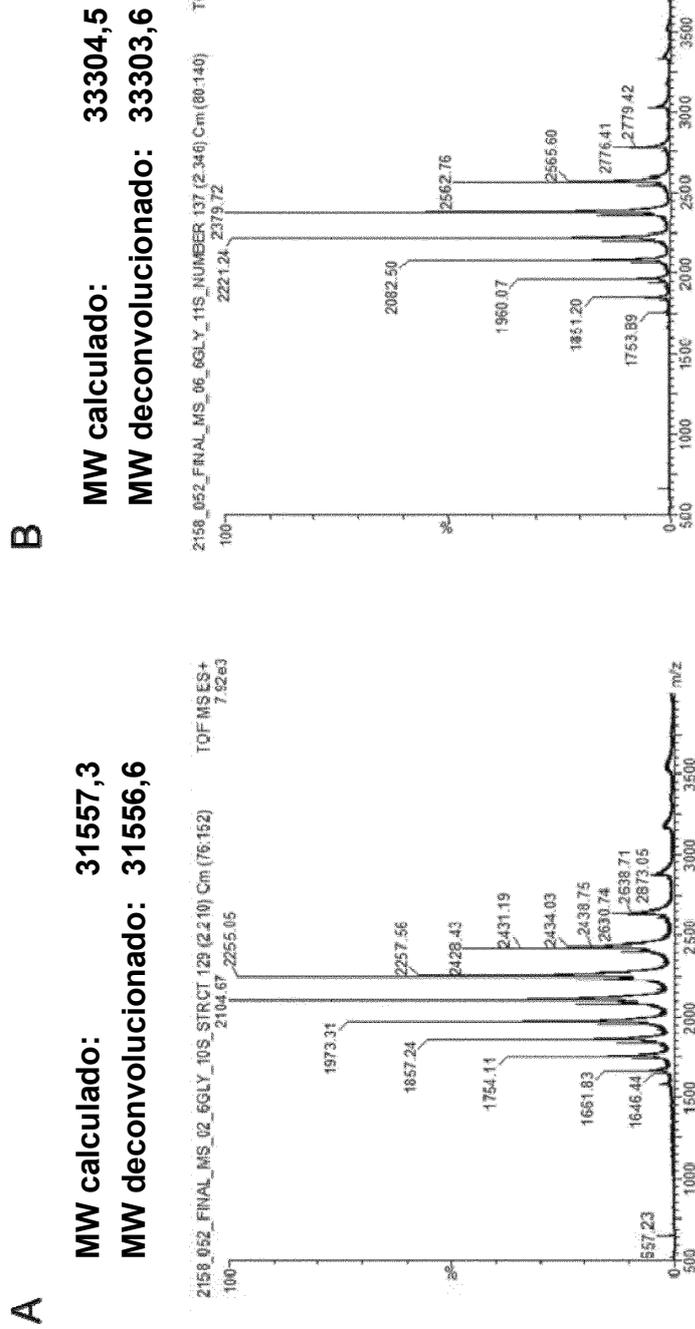
[Fórmula química 4]



Fórmula (4)

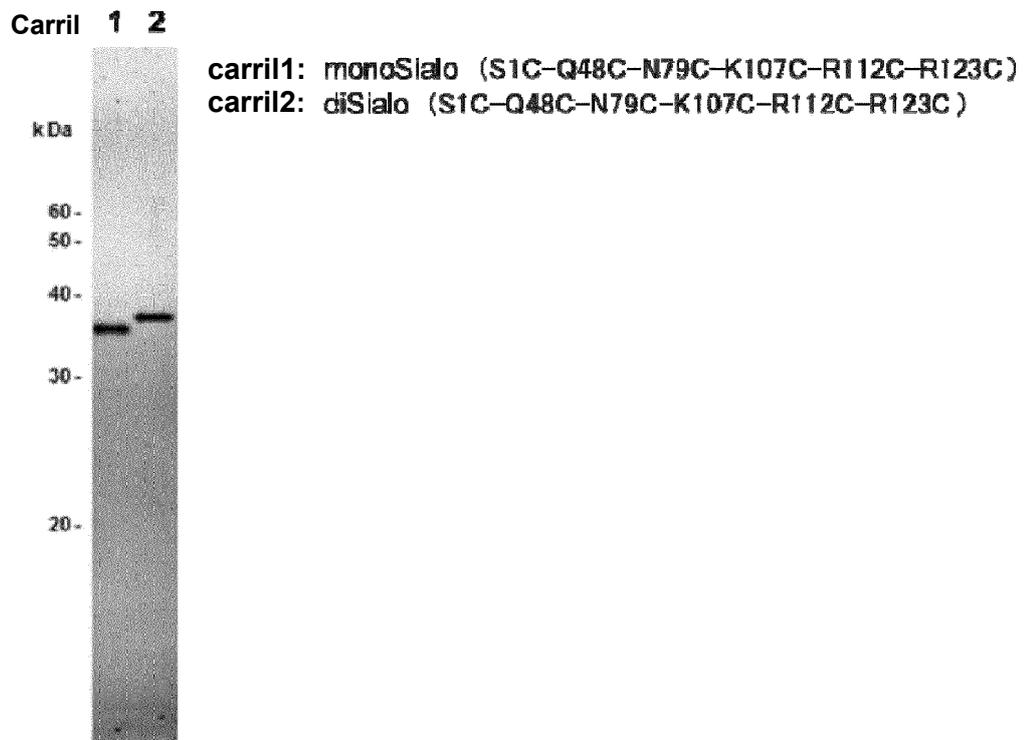
5. Un polipéptido glicosilado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** las cadenas de azúcares en dichos respectivos aminoácidos glicosilados son todas idénticas.
- 5 6. Un polipéptido glicosilado según la reivindicación 1, **caracterizado por que** ninguno de dichos respectivos aminoácidos glicosilados existen en la posición que corresponde a las posiciones 2, 5, 6, 9, 12, 13, 16, 19, 20, 23, 27, 33, 37, 39, 40, 43, 53, 54, 55, 57, 58, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 73, 78, 83, 86, 87, 90, 93, 94, 100, 124, 125, 128, 131, 132, 138, 141, 142, 145, 148, 149, 152, 153, 156, 159, 160, o 163 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 10 7. Un polipéptido glicosilado según la reivindicación 1, **caracterizado por que** todos de dichos respectivos aminoácidos glicosilados están presentes en la posición que corresponde a una posición seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1, 3, 7, 24, 25, 28, 29, 32, 35, 38, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 70, 75, 79, 99, 103, 106, 107, 109, 112, 115, 123, 130, 136, 139, y 164 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1.
- 15 8. Un polipéptido glicosilado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** dicho polipéptido glicosilado está sintetizado químicamente.
9. Una composición farmacéutica, **caracterizada por que** dicha composición farmacéutica comprende:
- (1) un polipéptido glicosilado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
- (2) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 9, para su uso en la terapia o prevención de una enfermedad relacionada con el interferón β .
- 25 11. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, **caracterizada por que** dicha enfermedad relacionada con el interferón β está seleccionada del grupo que consiste en tumor cerebral, melanoma cutáneo maligno, hepatitis B crónica activa, hepatitis C crónica, panencefalitis esclerosante subaguda, cirrosis C compensada, y esclerosis múltiple.

[Figura 1]

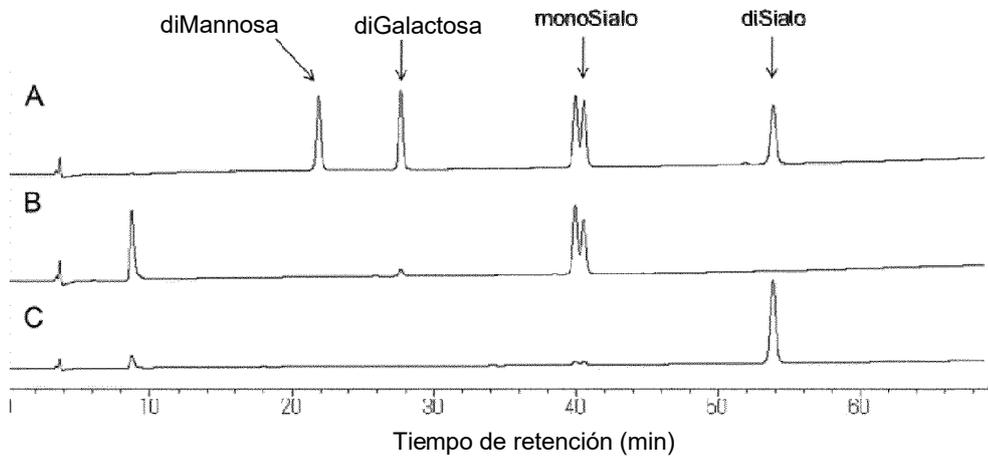


A: monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
 B: diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)

[Figura 2]

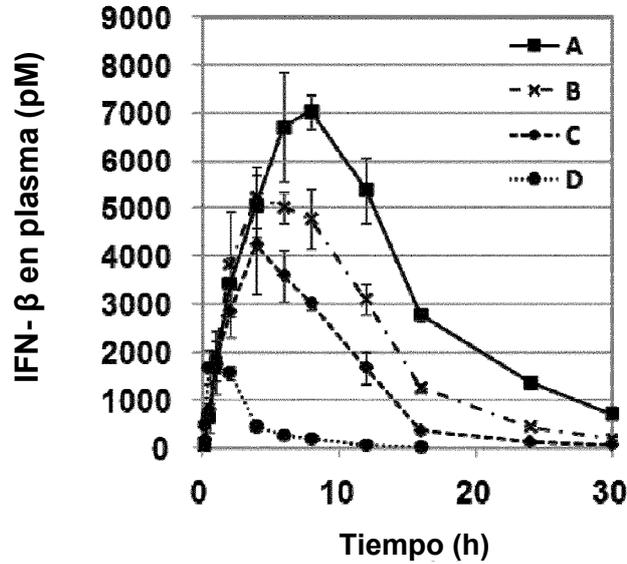


[Figura 3]



A: azúcares estándar
 B: monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
 C: diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)

[Figura 4]



A: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
 B: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C)
 C: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)
 D: Avonex

[Figura 5]

Forma modificada con múltiples cadenas de azúcares	S.C.				
	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{∞} (h·pM)	MRT (h)	C_{max} (pM)	T_{max} (h)
A	7.1	108351.3	13.0	7033.5	8.0
B	5.0	67000.1	9.5	5226.0	4.0
C	3.9	40608.2	7.5	4229.1	4.0
D	2.7	6876.8	3.3	1858.3	1.0

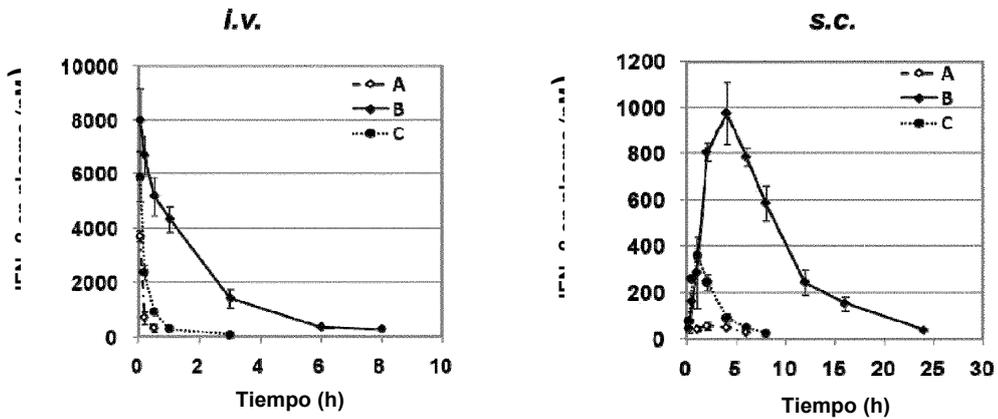
A: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)

B: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C)

C: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)

D: Avonex

[Figura 6]



A: 2-6 monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)

B: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)

C: Avonex

[Figura 7]

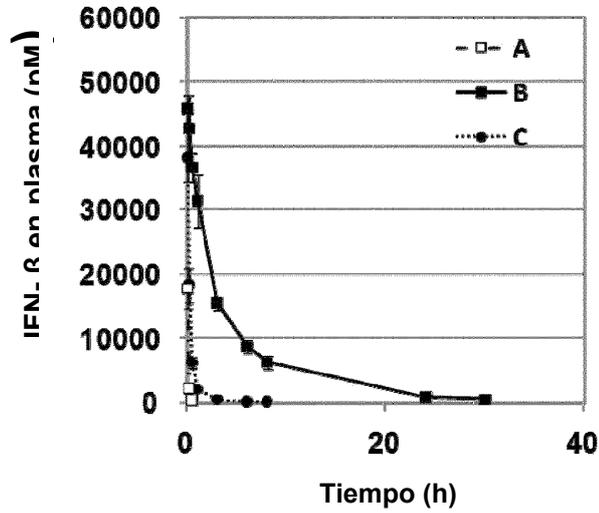
IFN- β sustituido con azúcares 4-gli.	i.v.					s.c.					Biodispo- nibilidad
	$t_{1/2}$ (h)	AUC $_{\infty}$ (h·pM)	MRT (h)	C $_0$ (pM)		$t_{1/2}$ (h)	AUC $_{\infty}$ (h·pM)	MRT (h)	C $_{max}$ (pM)	T $_{max}$ (h)	
A	0.11	458.0	0.13	4245.8		ND	458.9	ND	57.7	2	1
B	2.56	11998.9	2.33	7454.4		4.2	9066.9	7.9	975.0	4	0.76
C	1.07	1569.3	0.71	5111.8		2.19	1155.5	3.03	361.2	1	0.74

A: 2-6 monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107G)

B: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)

C: Avonex

[Figura 8]



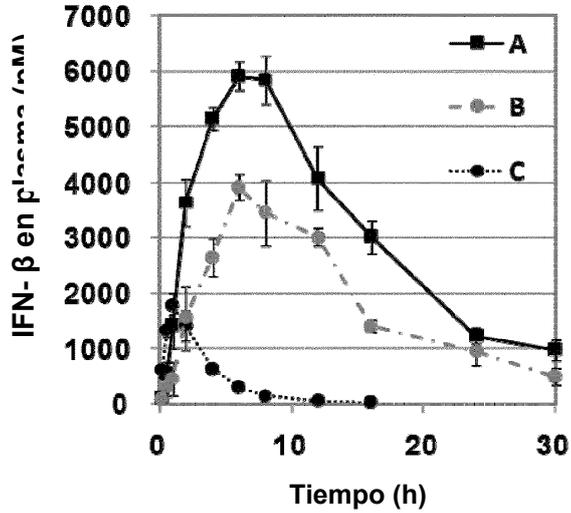
A: 2-6 monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
 B: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
 C: Avonex

[Figura 9]

IFN-β sustituido con azúcares 6-gli.	<i>i.v.</i>			
	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{∞} (h·pM)	MRT (h)	C_0 (pM)
A	0.1	2092.3	0.1	29773.9
B	5.7	199219.3	5.8	46547.0
C	2.1	14536.2	1.0	46049.0

A: 2-6 monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
 B: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
 C: Avonex

[Figura 10]



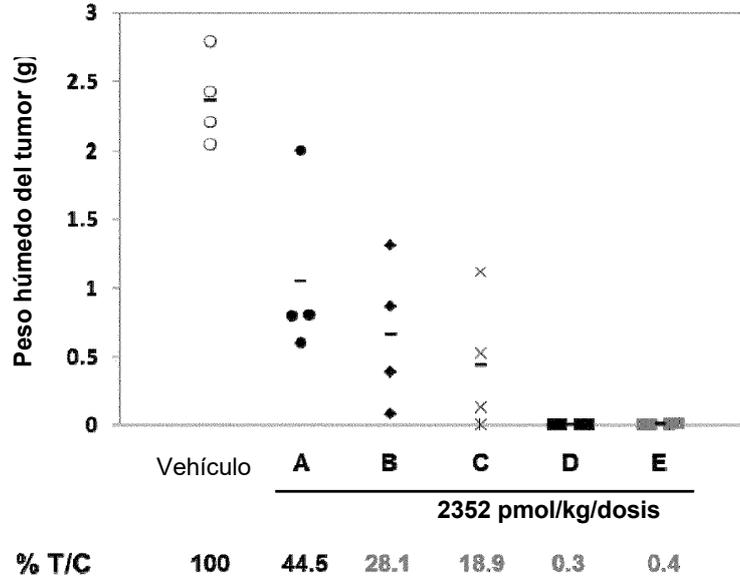
A: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
 B: PEG20K (extremo N terminal)
 C: Avonex

[Figura 11]

IFN β	s.c.			
	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{∞} (h·pM)	MRT (h)	C_0 (pM)
A	8.1	102479.3	14.3	5902.2
B	7.8	60421.7	14.4	3919.5
C	3.2	6816.8	3.5	1766.4

A: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
 B: PEG20K (extremo N terminal)
 C: Avonex

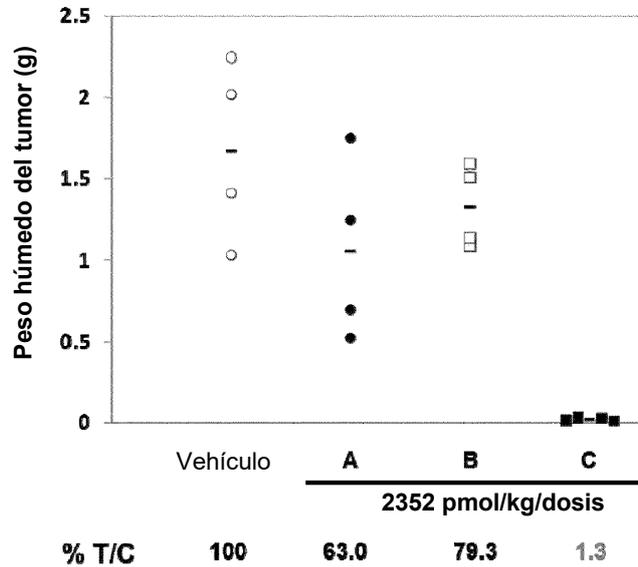
[Figura 12]



- A: Avonex
- B: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C)
- C: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C)
- D: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
- E: 2-6 diSialo (S1C-N3C-Q48C-N79C-K107C-R112C)

[Figura 13]

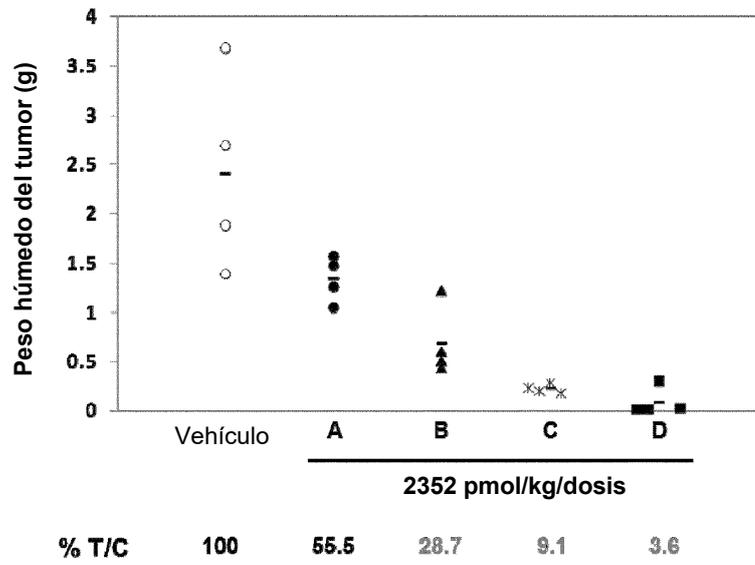
Día 22



- A: Avonex
- B: 2-6 monoSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)
- C: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)

[Figura 14]

Día 21



A: Avonex

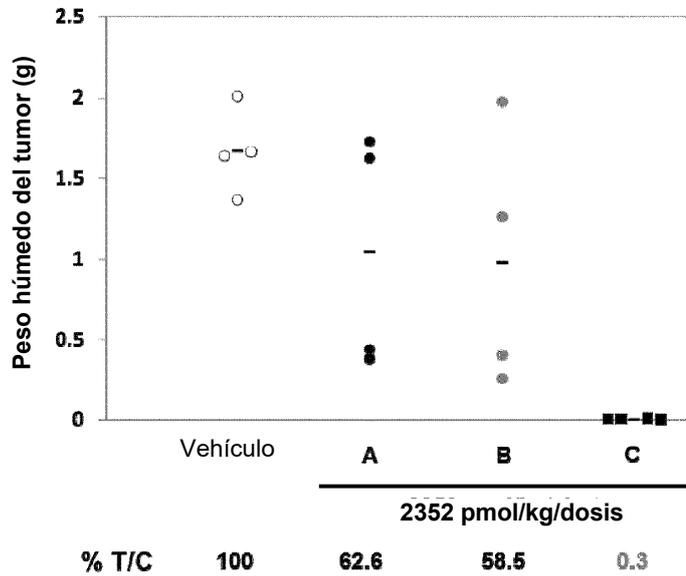
B: 2-6 triSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)

C: 2-6 tetraSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)

D: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)

[Figura 15]

Día 21



A: Avonex

B: PEG20K (extremo N terminal)

C: 2-6 diSialo (S1C-Q48C-N79C-K107C-R112C-R123C)

[Figura 16]

(SEQ.ID NO. 1)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Ser-Gln-Lys-Leu-Leu-

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
 Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
 Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-

61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
 Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-

81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
 Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Val-

101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
 Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-

121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140
 Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-

141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160
 Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-

161 162 163 164 165
 Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn