

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 024**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48	(2006.01)	A61K 38/43	(2006.01)	C07K 19/00	(2006.01)
C07K 1/00	(2006.01)	C07K 9/00	(2006.01)	C07K 14/79	(2006.01)
C07K 1/13	(2006.01)	C07K 14/475	(2006.01)	C07H 19/10	(2006.01)
A61K 38/14	(2006.01)	C07K 14/59	(2006.01)		
A61K 38/16	(2006.01)	C07K 14/61	(2006.01)		
A61K 38/24	(2006.01)	C07K 14/525	(2006.01)		
A61K 38/26	(2006.01)	C07K 14/56	(2006.01)		
A61K 38/28	(2006.01)	C07K 14/565	(2006.01)		
A61K 38/29	(2006.01)	C12N 9/64	(2006.01)		
A61K 38/30	(2006.01)	C12N 9/22	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2002 E 10012939 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2279755**

54 Título: **Remodelación y glicoconjugación de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)**

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 466 024 T3

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

DESCRIPCIÓN

Remodelación y glicoconjugación de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

Antecedentes de la invención

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

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

15 Las estructuras de glicano encontradas en los glicopéptidos que existen de forma natural se dividen normalmente en dos clases, glicanos ligados en N y ligados en O.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El documento US 5.405.753 A proporciona un procedimiento para la preparación de ácidos siálicos marcados con indicador de fluorescencia activado por citidina-5'-monofosfato. El documento WO 87/05330 se refiere a un procedimiento para modificar las proteínas eucariotas y procariotas para prolongar sus vidas circulatorias *in vivo*. Gross y col., Eur. J. Biochem. 177: 583 (1988), informan de la introducción enzimática de un ácido siálico fluorescente en cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas. Gross y col., Biochemistry 28: 7386 (1989), desvelan la transferencia de análogos de ácido siálico sintéticos a glicanos de glicoproteínas ligadas en N y O. Guo y col., Applied Biochemistry and Biotechnology 68 (1997), informan de la utilización de glicotransferasas para cambiar estructuras de oligosacáridos. El documento US 6.010.999 A se refiere a proteínas y polipéptidos de mamífero y humanos naturales y recombinantes derivatizados fisiológicamente activos.

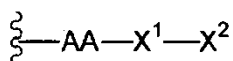
A pesar de los esfuerzos dirigidos hacia la elaboración enzimática de estructuras de sacárido, todavía sigue existiendo una necesidad de un procedimiento industrialmente práctico para la modificación de péptidos glicosilados y no glicosilados con grupos modificadores tales como polímeros solubles en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

Resumen de la invención

La invención incluye una multitud de procedimientos de remodelación de un péptido para tener una estructura de glicano específica unida al mismo.

La siguiente descripción desvela las realizaciones preferidas de la invención y proporciona una descripción escrita de las reivindicaciones adjuntas a la misma. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

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



en la que

- AA es un residuo de aminoácido terminal o interno del péptido;
- X¹-X² es un sacárido ligado covalentemente al AA, en la que
- X¹ es un primer residuo de glicosilo; y
- X² es un segundo residuo de glicosilo ligado covalentemente a X¹, en la que X¹ y X² están seleccionados de residuos de monosacárido y oligosacárido. El procedimiento comprende:

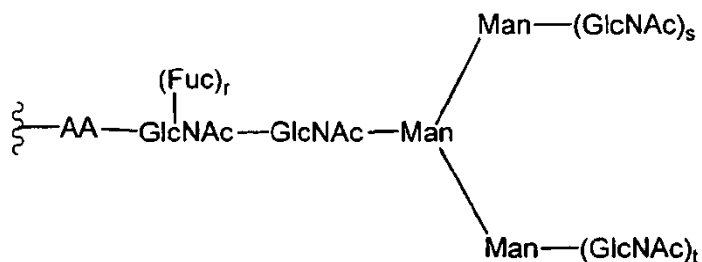
X^3 , X^5 y X^7 están seleccionados del grupo constituido por (manosa)_z y (manosa)_z(X^8)_y en la que

- 5 X^8 es un resto glicosilo seleccionado de mono- y oligo-sacáridos;
y es un número entero seleccionado de 0 y 1; y
z es un número entero entre 1 y 20, en la que
si z es 3 o mayor, (manosa)_z está seleccionada de estructuras lineales y ramificadas.

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

- 10 Al menos uno de los donantes de glicosilo comprende un grupo modificador, y el grupo modificador puede ser un miembro seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua, un resto terapéutico, una etiqueta detectable, un grupo de ligador reactivo y un resto dirigido. Preferiblemente, el grupo modificador es un polímero soluble en agua, y más preferiblemente, el polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol). Incluso más preferiblemente, el poli(etilenglicol) tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.
- 15 Además, el péptido puede seleccionarse del grupo constituido por factor estimulante de colonias de granulocitos, interferón-alfa, interferón-beta, factor VIIa, factor IX, hormona estimulante del folículo, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón-gamma, inhibidor de alfa-1-proteasa, beta-glucosidasa, proteína del activador tisular del plasminógeno, interleucina-2, factor VIII, receptor del factor de necrosis tumoral quimérico, urocinasa, anticuerpo quimérico anti-glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo quimérico anti-HER2,
- 20 anticuerpo quimérico anti-virus respiratorio sincitial, anticuerpo quimérico anti-CD20, DNasa, anticuerpo quimérico anti-factor de necrosis tumoral, insulina humana, sAg de la hepatitis B y hormona de crecimiento humana.

También está incluido un procedimiento *in vitro* sin células de remodelación de un péptido que comprende un glicano que tiene la fórmula:



- 25 en la que

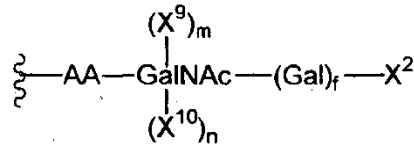
r, s y t son números enteros independientemente seleccionados de 0 y 1. El procedimiento comprende:

(a) poner en contacto el péptido con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al glicano, remodelándose así el péptido.

- 30 Se desvela que al menos uno de los donantes de glicosilo comprende un grupo modificador, y el grupo modificador puede ser un miembro seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua, un resto terapéutico, una etiqueta detectable, un grupo de ligador reactivo y un resto dirigido. Preferiblemente, el grupo modificador es un polímero soluble en agua, y más preferiblemente, el polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol). Incluso más preferiblemente, el poli(etilenglicol) tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.
- 35

- Además, el péptido puede seleccionarse del grupo constituido por factor estimulante de colonias de granulocitos, interferón-alfa, interferón-beta, factor VIIa, factor IX, hormona estimulante del folículo, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón-gamma, inhibidor de alfa-1-proteasa, beta-glucosidasa, proteína del activador tisular del plasminógeno, interleucina-2, factor VIII, receptor del factor de necrosis tumoral quimérico, urocinasa, anticuerpo quimérico anti-glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo quimérico anti-HER2,
- 40 anticuerpo quimérico anti-virus respiratorio sincitial, anticuerpo quimérico anti-CD20, DNasa, anticuerpo quimérico anti-factor de necrosis tumoral, insulina humana, sAg de la hepatitis B y hormona de crecimiento humana.

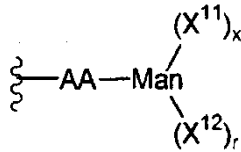
Se desvela además que el péptido puede tener la fórmula:



en la que

- 5 X^9 y X^{10} son residuos de monosacárido u oligosacárido independientemente seleccionados; y m, n y f son números enteros seleccionados de 0 y 1.

En otro aspecto, el péptido tiene la fórmula:



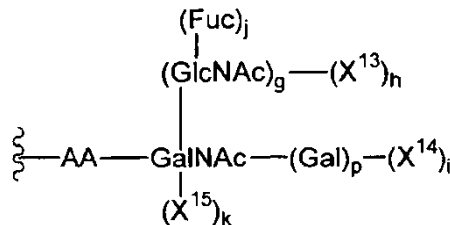
en la que

- 10 X^{11} y X^{12} son restos glicosilo independientemente seleccionados; y r y x son números enteros independientemente seleccionados de 0 y 1.

En una realización preferida, X^{11} y X^{12} son (manosa)_q en la que

q está seleccionado de los números enteros entre 1 y 20, y si q es tres o mayor, (manosa)_q está seleccionada de estructuras lineales y ramificadas.

El péptido puede tener la fórmula:



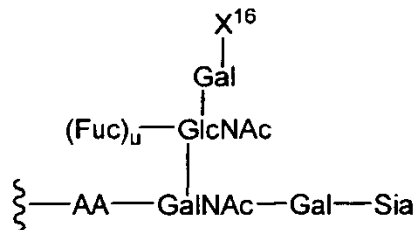
15

en la que

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

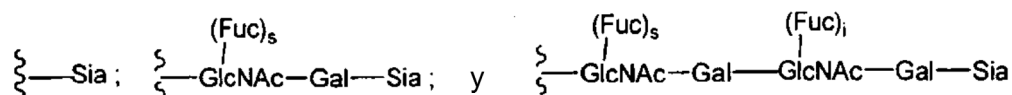
- 20 Se desvela que X^{14} y X^{15} son miembros independientemente seleccionados de GlcNAc y Sia; y i y k están seleccionados independientemente de los números enteros 0 y 1, con la condición de que al menos uno de i y k sea 1, y si k es 1, g, h y j son 0.

El péptido puede tener la fórmula:



25 en la que

X^{16} es un miembro seleccionado de:

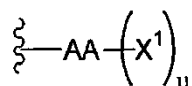


en la que

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

La eliminación puede utilizar una glicosidasa.

- 5 También está incluido en la invención un procedimiento *in vitro* sin células de remodelación de un péptido que tiene la fórmula:



en la que

- 10 AA es un residuo de aminoácido terminal o interno del péptido;
 X¹ es un residuo de glicosilo ligado covalentemente a AA, seleccionado de residuos de monosacárido y oligosacárido; y
 u es un número entero seleccionado de 0 y 1. El procedimiento comprende: poner en contacto el péptido con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al glicano truncado, en el que el donante de glicosilo comprende un grupo
 15 modificador, remodelándose así el péptido.

- Al menos uno de los donantes de glicosilo puede comprender un grupo modificador, y el grupo modificador puede ser un miembro seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua, un resto terapéutico, una etiqueta detectable, un grupo de ligador reactivo y un resto dirigido. Preferiblemente, el grupo modificador es un polímero soluble en agua, y más preferiblemente, el polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol). Incluso
 20 más preferiblemente, el poli(etilenglicol) tiene una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.

- La invención incluye un conjugado covalente entre un péptido de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y un grupo modificador que altera una propiedad del péptido, en el que el grupo modificador está covalentemente unido al péptido en un residuo de glicosilo o de aminoácido preseleccionado del péptido mediante un grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y ligado covalentemente a tanto el péptido como al grupo modificador; en el que el grupo modificador no es un azúcar que está presente en la naturaleza.

- En un aspecto, el grupo modificador es un miembro seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua, un resto terapéutico, una etiqueta detectable, un grupo de ligador reactivo y un resto dirigido.

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

El conjugado covalente de la invención comprende:

- 35 un primer grupo modificador covalentemente unido a un primer residuo del péptido mediante un primer grupo de enlace de glicosilo intacto, y
 un segundo grupo de enlace de glicosilo unido a un segundo residuo del péptido mediante un segundo grupo de enlace de glicosilo intacto.

- En una realización, el primer residuo y el segundo residuo son estructuralmente idénticos. En otra realización, el primer residuo y el segundo residuo tienen estructuras diferentes. En una realización adicional, el primer residuo y el segundo residuo son residuos de glicosilo. En otra realización, el primer residuo y el segundo residuo son residuos de aminoácidos.

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

En otra realización, el grupo modificador es un polímero soluble en agua que puede comprender poli(etilenglicol), que, en otra realización, puede tener una distribución de peso molecular que es esencialmente homodispersa.

- 45 El péptido puede seleccionarse del grupo constituido por factor estimulante de colonias de granulocitos, interferón-alfa, interferón-beta, factor VIIa, factor IX, hormona estimulante del folículo, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón-gamma, inhibidor de alfa-1-proteasa, beta-glicosidasa, proteína

del activador tisular del plasminógeno, interleucina-2, factor VIII, receptor del factor de necrosis tumoral quimérico, urocinas, anticuerpo quimérico anti-glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo quimérico anti-HER2, anticuerpo quimérico anti-virus respiratorio sincitial, anticuerpo quimérico anti-CD20, DNasa, anticuerpo quimérico anti-factor de necrosis tumoral, insulina humana, sAg de la hepatitis B y hormona de crecimiento humana.

- 5 En otra realización, la unidad de enlace de glicosilo intacta es un miembro seleccionado del grupo constituido por un residuo de ácido siálico, un residuo de Gal, un residuo de GlcNAc y un residuo de GalNAc.

También se proporciona en la invención un procedimiento *in vitro* sin células de formación de un conjugado covalente entre un polímero y un péptido de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) glicosilado o no glicosilado, en el que el polímero está conjugado con el péptido mediante un grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y ligado covalentemente a tanto el péptido como el polímero. El procedimiento comprende poner en contacto el péptido con una mezcla que comprende un azúcar de nucleótido ligado covalentemente al polímero y una glicosiltransferasa para la que el azúcar de nucleótido es un sustrato en condiciones suficientes para formar el conjugado; en el que el polímero no es un azúcar que está presente en la naturaleza.

15 En una realización preferida, el polímero es un polímero soluble en agua. En otra realización preferida, el grupo de enlace de glicosilo está covalentemente unido a un residuo de glicosilo covalentemente unido al péptido, y en otra realización, el grupo de enlace de glicosilo está covalentemente unido a un residuo de aminoácido del péptido.

En todavía otra realización, el polímero comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en un poli(óxido de alquileo) y un polipéptido. El poli(óxido de alquileo) puede ser poli(etilenglicol) en una realización de la invención. En otra realización, el poli(etilenglicol) tiene un grado de polimerización de aproximadamente 1 a aproximadamente 20.000, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.000, o también preferentemente, el polietilenglicol tiene un grado de polimerización de aproximadamente 1 a aproximadamente 1.000.

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

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

En otra realización, el péptido de FGF es un agente terapéutico.

En otra realización más, el péptido de FGF glicosilado se desglicosila parcialmente antes de la puesta en contacto.

En otra realización, el grupo de enlace de glicosilo intacto es un residuo de ácido siálico.

Además, el procedimiento puede realizarse en un entorno sin células.

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

Se desvela un procedimiento de formación de un conjugado covalente entre un primer péptido glicosilado o no glicosilado, y un segundo péptido glicosilado o no glicosilado, unido conjuntamente por un resto de ligador, en el que

40 el resto de ligador está conjugado con el primer péptido mediante un primer grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y ligado covalentemente a tanto el primer péptido como al resto de ligador, y

el resto de ligador está conjugado con el segundo péptido mediante un segundo grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y ligado covalentemente a tanto el segundo péptido como al resto de ligador. El procedimiento comprende:

45 (a) poner en contacto el primer péptido con un derivado del precursor de resto de ligador que comprende un precursor del primer grupo de enlace de glicosilo intacto y un precursor del segundo grupo de enlace de glicosilo intacto;

(b) poner en contacto la mezcla de (a) con una glicosiltransferasa para la que el precursor del primer grupo de enlace de glicosilo es un sustrato, en condiciones suficientes para convertir el precursor del primer grupo de enlace de glicosilo intacto en el primer grupo de enlace de glicosilo intacto, formando así un primer conjugado entre el precursor de resto de ligador y el primer péptido;

50 (c) poner en contacto el primer conjugado con el segundo péptido y una glicosiltransferasa para la que el precursor del segundo grupo de glicosilo intacto es un sustrato, en condiciones suficientes para convertir el precursor del segundo grupo de enlace de glicosilo intacto en el segundo grupo de enlace de glicosilo, formando así el conjugado entre el resto de ligador y el primer péptido glicosilado o no glicosilado, y el segundo péptido

glicosilado o no glicosilado.

En un aspecto, el resto de ligador comprende un polímero soluble en agua, y en una realización el polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol).

5 Se desvela un procedimiento de formación de un conjugado covalente entre un primer péptido glicosilado o no glicosilado, y un segundo péptido glicosilado o no glicosilado unido conjuntamente por un resto de ligador, en el que el resto de ligador está covalentemente conjugado con el primer péptido, y el resto de ligador está conjugado con el segundo péptido mediante un grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y ligado covalentemente a tanto el segundo péptido como al resto de ligador. El procedimiento comprende:

- 10 (a) poner en contacto el primer péptido con un derivado activado del resto de ligador que comprende; un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria a un residuo sobre el primer péptido, y un precursor del grupo de enlace de glicosilo intacto, en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el grupo funcional reactivo y el residuo, formando así un primer conjugado; y
- 15 (b) poner en contacto el primer conjugado con el segundo péptido y una glicosiltransferasa para la que el precursor del grupo de enlace de glicosilo intacto es un sustrato, en condiciones suficientes para convertir el precursor del grupo de enlace de glicosilo intacto en el grupo de enlace de glicosilo intacto, formando así el conjugado entre el primer péptido glicosilado o no glicosilado, y el segundo péptido glicosilado o no glicosilado unido conjuntamente por el resto de ligador.

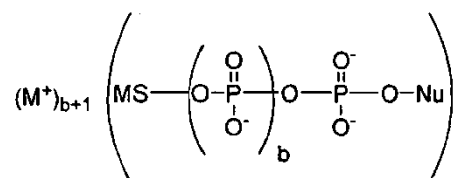
El resto de ligador puede comprender un polímero soluble en agua, que puede ser poli(etilenglicol).

20 También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un polímero y un péptido de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) glicosilado o no glicosilado, en la que el polímero está conjugado con el péptido mediante un grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y ligado covalentemente a tanto el péptido como al polímero; en el que el polímero no es un azúcar que está presente en la naturaleza

25 Se desvela una composición para formar un conjugado entre un péptido y un azúcar modificado, comprendiendo la composición: una mezcla de un azúcar modificado, una glicosiltransferasa y un sustrato aceptor de péptido, en la que el azúcar modificado tiene unido covalentemente al mismo un miembro seleccionado de un polímero, un resto terapéutico y una biomolécula.

30 La invención también incluye péptidos remodelados usando los procedimientos de la invención y composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos remodelados.

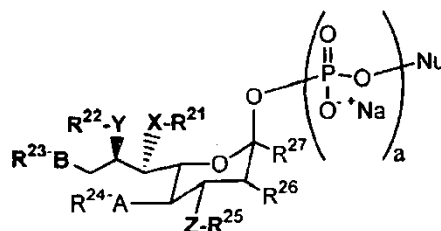
También se desvela un compuesto que tiene la fórmula:



en la que

- 35 MS es un azúcar modificado que comprende un azúcar covalentemente unido a un grupo modificador;
Nu es un nucleósido; y
b es un número entero de 0 a 2.

Puede incluirse un compuesto que tiene la fórmula:

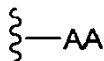


en la que

- 40 X, Y, Z, A y B son miembros independientemente seleccionados de S, O y NH;
R²¹, R²², R²³, R²⁴ y R²⁵ miembros independientemente seleccionados de H y un polímero;

R²⁶ es un miembro seleccionado de H, OH y un polímero;
 R²⁷ es un miembro seleccionado de COO⁻ y Na⁺;
 Nu es un nucleósido; y
 a es un número entero de 1 a 3.

5 Se desvela además un procedimiento *in vitro* sin células de remodelación de un péptido que tiene la fórmula:



en la que

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

10 poner en contacto el péptido con al menos una glicosiltransferasa y al menos un donante de glicosilo en condiciones adecuadas para transferir el al menos un donante de glicosilo al residuo de aminoácido, en la que el donante de glicosilo comprende un grupo modificador, remodelándose así el péptido.

Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 1, que comprende la Figura 1K, es una lista de péptidos útiles en los procedimientos de la divulgación. La Figura 2 es un esquema que representa un glicano de núcleo de trimanosilo (lado izquierdo) y el procedimiento enzimático para la generación de un glicano que tiene una GlcNAc bisectriz (lado derecho).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 La Figura 13, que comprende Figura 13A y Figura 13B, es una serie de esquemas que muestran una realización a modo de ejemplo de la invención en la que residuos de hidrato de carbono que comprenden estructuras de hidratos de carbono complejas y/o estructuras de alta manosa son recortados a la estructura biantenaria de la primera generación. Un azúcar modificado que lleva un polímero soluble en agua (WSP) se conjuga entonces con uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el procedimiento de recorte.

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

La Figura 15 es un esquema similar al mostrado en la Figura 2, en el que alta manosa se recorta a la GlcNAc a la que está unida la primera manosa, y un azúcar modificado que lleva un polímero soluble en agua se conjuga

entonces con uno o más de los residuos de azúcar expuestos por el procedimiento de recorte.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 27 es una imagen de un gel de acrilamida que representa los resultados de análisis de FACE de la pre- y post-sialilación de TP10. La especie BiNA₀ no tiene residuos de ácido siálico. La especie BiNA₁ tiene un residuo de ácido siálico. La especie BiNA₂ tiene dos residuos de ácido siálico. Bi = biantenaria; AN = ácido neuramínico.

35 La Figura 28 es una gráfica que representa la concentración en plasma en µg/ml con el tiempo de TP10 pre- y post-sialilación inyectado en ratas.

La Figura 29 es una gráfica que representa el área bajo la curva de la concentración en plasma-tiempo (ABC) en µg/h/ml para TP10 pre- y post sialilado.

40 La Figura 30 es una imagen de un gel de acrilamida que representa los resultados de análisis de FACE de la pre- y post-fucosilación de TP10. La especie BiNA₂F₂ tiene dos residuos de ácido neuramínico (AN) y dos residuos de fucosa (F).

La Figura 31 es una gráfica que representa la unión *in vitro* de TP20 (sCR1sLe^x) glicosilado *in vitro* (diamantes) e *in vivo* en células CHO de Lec11 (cuadrados).

45 La Figura 32 es una gráfica que representa el análisis por HPLC 2-AA de glicofomas de la GlcNAc-ilación de EPO.

La Figura 33, que comprende las Figuras 33A y 33B, es dos gráficas que representan el espectro de MALDI-TOF de RNasaB (Figura 33A) y el perfil de HPLC de los oligosacáridos escindidos de RNasaB por N-glicanasa (Figura 33B). La mayoría de sitios de N-glicosilación del péptido se modifican con oligosacáridos de alta manosa constituidos por 5 a 9 residuos de manosa.

50 La Figura 34 es un esquema que representa la conversión de N-glicanos de alta manosa en N-glicanos híbridos. La enzima 1 es α1,2-manosidasa, de *Trichoderma reesei* o *Aspergillus saitoi*. La enzima 2 es GnT-I (β-1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa I). La enzima 3 es GalT-I (β1,4-galactosiltransferasa 1). La enzima 4 es α2,3-sialiltransferasa o α2,6-sialiltransferasa.

55 La Figura 35, que comprende las Figuras 35A y 35B, es dos gráficas que representa el espectro de MALDI-TOF de RNasaB tratada con una α1,2-manosidasa de *T. reesei* recombinante (Figura 35A) y el perfil de HPLC de los oligosacáridos escindidos por N-glicanasa de la RNasaB modificada (Figura 35B).

La Figura 36 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de RNasaB tratada con una α1,2-manosidasa comercialmente disponible purificada de *A. saitoi* (Glyko & CalBioChem).

60 La Figura 37 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de RNasaB modificada tratando el producto mostrado en la Figura 35 con una GnT-I recombinante (GlcNAc transferasa-I).

La Figura 38 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de RNasaB modificada tratando el producto mostrado en la Figura 37 con una GalT 1 recombinante (galactosiltransferasa 1).

65 La Figura 39 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de RNasaB modificada tratando el producto mostrado en la Figura 38 con una ST3Gal III recombinante (α2,3-sialiltransferasa III) usando MFC-AS

como donante para la transferasa.

La Figura 40 es una gráfica que representa el espectro de MALDI-TOF de RNasaB modificada tratando el producto mostrado en la Figura 38 con una ST3Gal III recombinante (α 2,3-sialiltransferasa III) usando MFC-AS-PEG (10 kDa) como donante para la transferasa.

La Figura 41 es una serie de esquemas que representa la conversión de N-glicanos de alta manosa en N-glicanos complejos. La enzima 1 es α 1,2-manosidasa de *Trichoderma reesei* o *Aspergillus saitoi*. La enzima 2 es GnT-I. La enzima 3 es GalT 1. La enzima 4 es α 2,3-sialiltransferasa o α 2,6-sialiltransferasa. La enzima 5 es α -manosidasa II. La enzima 6 es α -manosidasa. La enzima 7 es GnT-II. La enzima 8 es α 1,6-manosidasa. La enzima 9 es α 1,3-manosidasa.

La Figura 42 es un diagrama del enlace catalizado por N-acetilglucosaminiltransferasa I a VI (GnT I-VI). R = GlcNAc β 1,4GlcNAc-Asn-X.

La Figura 43, que comprende las Figuras 43A y 43B, son gráficas que representan el análisis de HPLC 2-AA de dos lotes de EPO a los que se ha añadido N-acetilglucosamina. La Figura 43A representa el análisis del lote A y la Figura 43B representa el análisis del lote B.

La Figura 44 es una gráfica que representa el análisis de HPLC 2-AA de los productos la reacción introduciendo una tercera rama de glicano en EPO con GnT-V.

La Figura 45 es una gráfica que representa un espectro de MALDI-TOF de los glicanos de la preparación de EPO después del tratamiento con GnT-I, GnT-II, GnT-III, GnT-IV y GalT1, con grupos donantes apropiados.

La Figura 46 es una imagen de un gel de isoelectroenfoque (IEF) que representa los productos de la reacción de desialilación de FSH de pituitaria humana. Los carriles 1 y 4 son patrones de isoelectroenfoque (IEF). El carril 2 es FSH nativa. El carril 3 es FSH desialilada.

La Figura 47 es una imagen de un gel de SDS-PAGE de los productos de las reacciones para hacer la PEG-sialilación de FSHr. Los carriles 1 y 8 son patrones de peso molecular SeeBlue+2. El carril 2 es 15 μ g de FSH nativa. El carril 3 es 15 μ g de asialo-FSH (AS-FSH). El carril 4 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS. El carril 5 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (1 kDa). El carril 6 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (5 kDa). El carril 7 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (10 kDa).

La Figura 48 es una imagen de un gel de isoelectroenfoque de los productos de las reacciones para hacer la PEG-sialilación de FSH. Los carriles 1 y 8 son patrones de IEF. El carril 2 es 15 μ g de FSH nativa. El carril 3 es 15 μ g de asialo-FSH (AS-FSH). El carril 4 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS. El carril 5 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (1 kDa). El carril 6 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (5 kDa). El carril 7 es 15 μ g de los productos de la reacción de AS-FSH con MFC-AS-PEG (10 kDa).

La Figura 49 es una imagen de un gel de SDS-PAGE de FSH no recombinante nativa producida en células de la pituitaria humana. Los carriles 1, 2 y 5 son patrones de peso molecular SeeBlue™+2. Los carriles 3 y 4 son FSH nativa a 5 μ g y 25 μ g, respectivamente.

La Figura 50 es una imagen de un gel de isoelectroenfoque (pH 3-7) que representa los productos de la reacción de asialilación de FSHr. Los carriles 1 y 4 son patrones de IEF. El carril 2 es FSHr nativa. El carril 3 es asialo-FSHr.

La Figura 51 es una imagen de un gel de SDS-PAGE que representa los resultados de la PEG-sialilación de asialo-FSHr. El carril 1 es FSHr nativa. El carril 2 es asialo-FSH. El carril 3 es los productos de la reacción de asialo-FSH y MFC-AS. Los carriles 4-7 son los productos de la reacción entre asialo-FSH y MFC-AS-PEG 0,5 mM (10 kDa) a 2 h, 5 h, 24 h y 48 h, respectivamente. El carril 8 es los productos de la reacción entre asialo-FSH y MFC-AS-PEG 1,0 mM (10 kDa) a 48 h. El carril 9 es los productos de la reacción entre asialo-FSH y MFC-AS-PEG 1,0 mM (1 kDa) a 48 h.

La Figura 52 es una imagen de un gel de isoelectroenfoque que muestra los productos de PEG-sialilación de asialo-FSHr con MFC-AS-PEG (1 kDa). El carril 1 es FSHr nativa. El carril 2 es asialo-FSHr. El carril 3 es los productos de la reacción de asialo-FSHr y MFC-AS a 24 h. Los carriles 4-7 son los productos de la reacción de asialo-FSHr y MFC-AS-PEG 0,5 mM (1 kDa) a 2 h, 5 h, 24 h y 48 h, respectivamente. El carril 8 es blanco. Los carriles 9 y 10 son los productos de la reacción a 48 h de asialo-FSHr y MFC-AS-PEG (10 kDa) a 0,5 mM y 1,0 mM, respectivamente.

La Figura 53 es una gráfica de la farmacocinética de FSHr y FSHr-AS-PEG (1 kDa y 10 kDa). Esta gráfica ilustra la relación entre el tiempo que un compuesto de FSHr está en la corriente sanguínea de la rata y la concentración media del compuesto de FSHr en la sangre para FSHr glicoPEGilada con respecto a FSHr no PEGilada.

La Figura 54 es una gráfica de los resultados del bioensayo de FSH usando células Sertoli. Esta gráfica ilustra la relación entre la concentración de FSH en el medio de incubación de células Sertoli y la cantidad de 17 β -estradiol liberado de las células de Sertoli.

La Figura 55 es una imagen de un gel de SDS-PAGE: patrón (carril 1); transferrina nativa (carril 2); asialotransferrina (carril 3); asialotransferrina y MFC-AS (carril 4); carriles 5 y 6, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (1 kDa) a 0,5 mM y 5 mM, respectivamente; carriles 7 y 8, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (5 kDa) a 0,5 mM y 5 mM, respectivamente; carriles 9 y 10, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (10 kDa) a 0,5 mM y 5 mM, respectivamente.

La Figura 56 es una imagen de un gel de IEF: transferrina nativa (carril 1); asialotransferrina (carril 2); asialotransferrina y MFC-AS, 24 h (carril 3); asialotransferrina y MFC-AS, 96 h (carril 4); carriles 5 y 6,

asialotransferrina y MFC-AS-PEG (1 kDa) a 24 h y 96 h, respectivamente; carriles 7 y 8, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (5 kDa) a 24 h y 96 h, respectivamente; carriles 9 y 10, asialotransferrina y MFC-AS-PEG (10 kDa) a 24 h y 96 h, respectivamente.

La Figura 57 es una imagen de un gel de isoelectroenfoque (pH 3-7) de asialo-factor VIIa. El carril 1 es factor VIIar; los carriles 2-5 son asialo-factor VIIa.

La Figura 58 es una gráfica de un espectro de MALDI de factor VIIa.

La Figura 59 es una gráfica de un espectro de MALDI de factor VIIa-PEG (1 kDa).

La Figura 60 es una gráfica que representa un espectro de MALDI del factor VIIa-PEG (10 kDa).

La Figura 61 es una imagen de un gel de SDS-PAGE del factor VIIa PEGilado. El carril 1 es asialo-factor VIIa. El carril 2 es el producto de la reacción de asialo-factor VIIa y MFC-AS-PEG (1 kDa) con ST3Gal3 después de 48 h. El carril 3 es el producto de la reacción de asialo-factor VIIa y MFC-AS-PEG (1 kDa) con ST3Gal3 después de 48 h. El carril 4 es el producto de la reacción de asialo-factor VIIa y MFC-AS-PEG (10 kDa) con ST3Gal3 a 96 h.

La Figura 62 es una imagen de un gel de IEF que representa el pI de los productos del procedimiento de desialilación. Los carriles 1 y 5 son patrones de IEF. El carril 2 es proteína del factor IX. El carril 3 es proteína del factor IXr. El carril 4 es la reacción de desialilación de proteína de factor IXr a 20 h.

La Figura 63 es una imagen de un gel de SDS-PAGE que representa el peso molecular de factor IX conjugado con tanto AS-PEG (1 kDa) como AS-PEG (10 kDa) después de la reacción con MFC-AS-PEG. Los carriles 1 y 6 son patrones de peso molecular SeeBlue +2. El carril 2 es F-IXr. El carril 3 es F-IXr desialilado. El carril 4 es factor IXr conjugado con AS-PEG (1 kDa). El carril 5 es factor IXr conjugado con AS-PEG (10 kDa).

La Figura 64 es una imagen de un gel de SDS-PAGE que representa los productos de reacción de sialilación directa de factor IX y encapuchado de ácido siálico de factor IX-AS-PEG. El carril 1 es patrones de proteína, el carril 2 es blanco; el carril 3 es factor IXr; el carril 4 es factor IXr-AS-PEG encapuchado con AS (10 kDa); el carril 5 es factor IXr-AS-PEG (10 kDa); el carril 6 es ST3Gal1; el carril 7 es ST3Gal3; los carriles 8, 9, 10 son factor IXr-AS-PEG(10 kDa) sin tratamiento con sialidasa previo.

La Figura 65 es una gráfica que representa un espectro de MALDI de los glicanos de EPO nativa.

La Figura 66 es una imagen de un gel de SDS-PAGE de los productos de reacciones de PEGilación usando MFC-NAN-PEG (1 kDa) y MFC-NAN-PEG (10 kDa).

La Figura 67 es una gráfica que representa los resultados del bioensayo *in vitro* de EPO PEGilada. Los diamantes representan los datos de EPO sialilada que no tiene moléculas de PEG. Los cuadrados representan los datos obtenidos usando EPO con PEG (1 kDa). Los triángulos representan los datos obtenidos usando EPO con PEG (10 kDa).

Descripción detallada de la invención

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

Definiciones

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

descritas más adelante son aquellos muy conocidos y comúnmente empleados en la materia.

Técnicas convencionales o modificaciones de las mismas se usan para síntesis químicas y analizadores químicos.

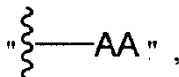
Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del sujeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

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

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

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

Como se usa en el presente documento, la estructura



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

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

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

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

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

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

El término “ácido siálico” se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es ácido N-acetil-neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-

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

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

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

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

El término "semivida" o " $t_{1/2}$ ", como se usa en el presente documento en el contexto de administrar un fármaco de péptido a un paciente, se define como el tiempo requerido para que la concentración en plasma de un fármaco en un paciente se reduzca a la mitad. Puede haber más de una semivida asociada al fármaco de péptido que depende de múltiples mecanismos de eliminación, redistribución, y otros mecanismos muy conocidos en la técnica. Normalmente, las semividas alfa y beta se definen de forma que la fase alfa está asociada con la redistribución y la fase beta está asociada con la eliminación. Sin embargo, con fármacos de proteína que, en general, están confinados a la circulación sanguínea, puede haber al menos dos semividas de eliminación. Para algunos péptidos glicosilados, la rápida eliminación de la fase beta puede mediarse por receptores sobre macrófagos, o células endoteliales que reconocen galactosa terminal, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa o fucosa. La eliminación de fase beta más lenta puede producirse mediante filtración glomerular renal para moléculas con un radio eficaz < 2 nm (aproximadamente 68 kD) y/o captación y metabolismo específico o no específico en tejidos. La glicoPEGilación puede encapuchar azúcares terminales (por ejemplo, galactosa o N-acetilgalactosamina) y así bloquear la rápida eliminación de la fase alfa mediante receptores que reconocen estos azúcares. También puede conferir un radio eficaz más grande y así disminuir el volumen de distribución y captación de tejido, prolongando así la fase beta tardía. Por tanto, el impacto preciso de la glicoPEGilación sobre las semividas de fase alfa y fase beta variará dependiendo del tamaño, estado de glicosilación, y otros parámetros como es muy conocido en la técnica. Más explicación de "semivida" se encuentra en Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin y RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Ámsterdam, pág 101 - 120).

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

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

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

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

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

localizan 5' con respecto a un punto de referencia sobre el ADN se denominan "secuencias en la dirección 5'"; secuencias sobre la hebra de ADN con respecto a un punto de referencia sobre el ADN se denominan "secuencias en la dirección 3'".

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

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

20 "Homólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a la similitud de secuencias de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de péptido. Si una posición de subunidad en cualquiera de las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias de compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas el 50 %, si el 90 % de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten el 90 % de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 3'ATTGCC5' y 3'TATGGC comparten el 50 % de homología.

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

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

50 La identidad en porcentaje entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a aquellas descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo de la identidad en porcentaje, normalmente se cuentan coincidencias exactas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos que existen de forma natural y sintéticos, además de análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácido que funcionan de un modo similar a los aminoácidos que existen de forma natural. Aminoácidos que existen de forma natural son aquellos codificados por el código genético, además de aquellos aminoácidos que se modifican después, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que está presente en la naturaleza, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo

5 carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos de péptido modificados, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido que está presente en la naturaleza. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de un modo similar a un aminoácido que está presente en la naturaleza.

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

10 Tabla 1: Aminoácidos, y los códigos de tres letras y de una letra

Nombre completo	Código de tres letras	Código de una letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	Y
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Th	T
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W

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

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

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

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

extremos que es probable que afecte la función del compuesto, es decir, degradación secuencial del compuesto en un extremo terminal del mismo.

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

20 También pueden incorporarse otras modificaciones sin afectar adversamente la actividad y éstas incluyen sustitución de uno o más de los aminoácidos en la forma isomérica L natural con aminoácidos en la forma isomérica D. Por tanto, el péptido puede incluir uno o más residuos de D-aminoácido, o puede comprender aminoácidos que están todos en la forma D. También se contemplan formas retro-inversas de péptidos según la presente invención, por ejemplo, péptidos invertidos en los que todos los aminoácidos están sustituidos con formas de D-aminoácido.

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

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

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

40 Como se usa en el presente documento, el término "glicosiltransferasa" se refiere a cualquier enzima/proteína que tenga la capacidad para transferir un azúcar donante a un resto aceptor.

45 Como se usa en el presente documento, el término "azúcar modificado" se refiere a un hidrato de carbono que está presente en la naturaleza o que no que está presente en la naturaleza que se añade enzimáticamente sobre un aminoácido o un residuo de glicosilo de un péptido en un procedimiento de la invención. El azúcar modificado está seleccionado de varios sustratos de enzima que incluyen nucleótidos de azúcar (mono-, di- y trifosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo) y azúcares que ni están activados ni son nucleótidos.

50 El "azúcar modificado" se funcionaliza covalentemente con un "grupo modificador". Grupos modificadores útiles incluyen polímeros solubles en agua, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, biomoléculas. El sitio de la funcionalización con el grupo modificador está seleccionado de forma que no prevenga que el "azúcar modificado" se añada enzimáticamente a un péptido.

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

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

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

Como se usa en el presente documento, “resto terapéutico” significa cualquier agente útil para tratamiento, incluidos antibióticos, agentes antiinflamatorios, fármacos antitumorales, citotoxinas y agentes radioactivos. “Resto terapéutico” incluye profármacos de agentes bioactivos, constructos en los que más de un resto terapéutico está unido a un vehículo, por ejemplo agentes multivalentes. Resto terapéutico también incluye péptidos y constructos que incluyen péptidos. Ejemplos de péptidos incluyen los divulgados en la Figura 1 y las Tablas 5 y 6, en el presente documento.

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

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

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

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

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

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

también incluir aditivos aromatizantes y colorantes u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante procedimientos convencionales bien conocidos.

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

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

Cuando los conjugados peptídicos tienen una pureza superior a aproximadamente el 90 %, sus purezas también se expresan, preferentemente, como un intervalo. El extremo inferior del intervalo de pureza es de aproximadamente 90 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 % o aproximadamente 98 %. El extremo superior del intervalo de pureza es de aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 100 %.

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

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

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

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

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

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

Descripción de la invención**I. Procedimiento para remodelar las cadenas de glicano**

- 5 La presente invención incluye procedimientos y composiciones para la adición y/o delección *in Vitro* de azúcares a o desde una molécula de glucopéptido de un modo tal que proporciona una molécula de péptido de FGF que tiene un patrón de glucosilación adaptado o deseado específico, preferentemente que incluye la adición al mismo de un azúcar modificado. Una característica clave de la invención es tomar un péptido de FGF producido por cualquier tipo de célula y generar una estructura de glicano central sobre el péptido, tras lo cual la estructura de glicano se elimina *in vitro* para generar un péptido de FGF que tiene un patrón de glucosilación adecuado para uso terapéutico en un mamífero.
- 10 La importancia del patrón de glucosilación de un péptido es bien conocida en la técnica, así como las limitaciones de los presentes procedimientos *in vivo* para la producción de péptidos glucosilados adecuadamente, en particular cuando estos péptidos se producen usando metodología de ADN recombinante. Además, hasta la presente invención no ha sido posible generar glucopéptidos que tengan una estructura de glicano deseada sobre los mismos, en los que el péptido se pueda producir a escala industrial.
- 15 En la presente invención, un péptido de FGF producido por una célula se trata enzimáticamente *in vitro* mediante la adición sistemática de las enzimas y sustratos adecuados, de modo que se elimina los restos de azúcar que no deben estar presentes sobre el péptido, y se añaden los restos de azúcar, que opcionalmente incluyen azúcares modificados, que se deben añadir al péptido, de un modo que proporcionan un glucopéptido que tiene una "glucosilación deseada", como se define en otros lugares en el presente documento.
- 20 **A. Procedimiento para remodelar glicanos unidos a N**
- 25 En un aspecto, la presente invención aprovecha el hecho de que la mayoría de los péptidos de interés comercial o farmacéutico comprenden una estructura común de cinco azúcares denominada en el presente documento núcleo de trimanosilo, que está unida a través de N a asparagina en la secuencia Asn-X-Ser/Thr sobre una cadena peptídica. El núcleo de trimanosilo elemental consiste esencialmente en dos residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y tres residuos de manosa (Man) unidos a un péptido, es decir comprende estos cinco residuos de azúcar y sin azúcares adicionales, a excepción de que opcionalmente puede incluir un residuo de fucosa. La primera GlcNAc está unida al grupo amida de la asparagina y la segunda GlcNAc está unida a la primera mediante un enlace β 1,4. Un residuo de manosa se une a la segunda GlcNAc mediante un enlace β 1,4 y dos residuos de manosa se unen a esta manosa mediante un enlace α 1,3 y un enlace α 1,6, respectivamente. En la figura 2, lado izquierdo, se muestra una representación esquemática de una estructura central de trimanosilo. Aunque es el caso en el que las estructuras de glicano sobre la mayoría de los péptidos comprenden otros azúcares además del núcleo de trimanosilo, la estructura central de trimanosilo representa una característica esencial de los glicanos unidos por N sobre los péptidos de mamífero.
- 35 La presente invención incluye la generación de un péptido que tiene una estructura central de trimanosilo como elemento fundamental de la estructura de las moléculas de glicano contenidas en el mismo. Dada la variedad de los sistemas celulares usados para producir péptidos, sean los propios sistemas naturales o impliquen metodología de ADN recombinante, la presente invención proporciona procedimientos mediante los cuales una molécula de glicano en un péptido producido en cualquier tipo de célula se puede reducir a una estructura central de trimanosilo. Una vez que se ha generado la estructura central de trimanosilo elemental, es posible usar los procedimientos descritos en el presente documento para generar *in Vitro* una estructura de glicano deseada sobre el péptido que confiere al péptido una o más propiedades que potencien la eficacia terapéutica del péptido.
- 40 Debe quedar claro, de la discusión del presente documento, que la expresión "núcleo de trimanosilo" se usa para describir la estructura de glicano mostrada en la Figura 2, lado izquierdo. Los glucopéptidos que tienen una estructura central de trimanosilo pueden también tener azúcares adicionales añadidos y, en su mayor parte, tienen estructuras adicionales añadidas con independencia de si los azúcares dan lugar a un péptido que tiene una estructura de glicano deseada. La expresión "estructura central de trimanosilo elemental" se define en otros lugares en el presente documento. Cuando el término "elemental" no se incluye en la descripción de la "estructura central de trimanosilo", el glicano comprende la estructura central de trimanosilo con azúcares adicionales añadidos a la misma.
- 45 La expresión "glucopéptido central de trimanosilo elemental" se usa en el presente documento para hacer referencia a un glucopéptido que tiene estructuras de glicano compuestas principalmente por una estructura central de trimanosilo elemental. No obstante, también puede contener, opcionalmente, un residuo de fucosa añadido. Como se trata en el presente documento, los glucopéptidos centrales de trimanosilo elemental son un material de partida óptimo y, por tanto, preferido, para los procedimientos de remodelado de glicano de la invención.
- 50 Otro material de partida óptimo para el procedimiento de remodelado de glicano de la invención es una estructura de glicano que tiene un núcleo de trimanosilo en el que se añaden uno o dos residuos adicionales de GlcNAc a cada uno de los residuos de manosa en α 1,3 y α 1,6 (véase, por ejemplo, la estructura sobre la segunda línea de la Figura 3, la segunda estructura desde la izquierda de la figura). Esta estructura se denomina en el presente documento

“Man3GlcNAc4”. Opcionalmente, esta estructura puede contener también una molécula de fucosa central. Una vez que se ha generado la estructura de Man3GlcNAc4, es posible usar los procedimientos descritos en el presente documento para generar *in vitro* una estructura de glicano deseada sobre el glucopéptido que confiere al glucopéptido una o más propiedades que potencien la eficacia terapéutica del péptido.

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

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

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

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

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

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

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

b) es posible generar un péptido que tenga una estructura central de trimanosilo elemental como la única estructura de glicano sobre el péptido aislando una célula natural cuya maquinaria de glucosilación produce dicho péptido. Después, el ADN que codifica un péptido de elección se transfecta a la célula en la que el ADN se transcribe, se traduce y se glicosila de un modo tal que el péptido de elección tiene una estructura central de

trimanosilo elemental como la única estructura de glicano del mismo. Por ejemplo, una célula que carece de una enzima GnT-I funcional producirá varios tipos de glucopéptidos. En algunos casos, estos serán glucopéptidos que no tienen azúcares adicionales añadidos al núcleo de trimanosilo. No obstante, en otros casos, los péptidos producidos pueden tener dos residuos de manosa adicionales unidos al núcleo de trimanosilo, lo que tiene como resultado un Man5 glicano. Este es también un material de partida deseado para el procedimiento de remodelado de la presente invención. Ejemplos específicos de la generación de dichas estructuras de glicano se describen en el presente documento.

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

d) es fácilmente evidente a partir de la discusión en b) y c) que no es necesario que las células produzcan únicamente péptidos que tengan un núcleo de trimanosilo elemental o estructuras Man3GlcNAc4 unidos a los mismos. En su lugar, a menos que las células descritas en b) y c) produzcan péptidos que tengan estructuras centrales de trimanosilo elemental 100 % (es decir que no tienen azúcares adicionales unidas a los mismos) o 100 % de estructuras Man3GlcNAc4, las células, de hecho, producen una mezcla heterogénea de péptidos que tienen, en combinación, estructuras centrales de trimanosilo elemental o estructuras Man3GlcNAc4 como la única estructura de glicano además de estas estructuras que tienen azúcares adicionales unidas a los mismos. La proporción de péptidos que tienen un núcleo de trimanosilo o una estructura de Man3GlcNAc4 que tiene azúcares adicionales unidos a los mismos, frente a los que tienen una estructura, variará en función de la célula que los produzca. La complejidad de los glicanos (es decir, cuál y cómo muchos azúcares se unen al núcleo de trimanosilo) también variará en función de la célula que los produzca.

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

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

Aislamiento de un glucopéptido central de trimanosilo elemental

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

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

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

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

mamífero puede ser cualquier tipo de mamífero adecuado y es, preferentemente, un ser humano.

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

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

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

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

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

35 La adición química de los restos glicosilo se lleva a cabo mediante cualquier procedimiento reconocido en la técnica. La adición enzimática de restos de azúcar se consigue, preferentemente, usando una modificación de los procedimientos expuestos en el presente documento, sustituyendo las unidades de glicosilo nativas por los azúcares modificados usados en la invención. Otros procedimientos de añadir restos de azúcar se divulgan en las patentes de EE.UU. Nº 5.876.980. 6.030.815. 5.728.554 y 5.922.577.

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

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

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

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

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

En la Figura 6 se muestra una estructura compleja típica de glicano unido a N producida en células vegetales. Es importante destacar que cuando las células vegetales son deficientes en la actividad enzimática GnT-I no se puede añadir xilosa y fucosa al glicano. Por tanto, el uso de células defectivas en GnT-I proporciona una ventaja concreta en la presente invención en cuanto a que estas células producen péptidos que tienen un núcleo de trimanosilo elemental sobre el cual se pueden añadir azúcares adicionales sin realizar ninguna reacción de "recorte". De un modo similar, en los casos en los que la estructura producida en una célula vegetal puede ser de la variedad Man5 de glicano, si no hay GnT-I en estas células no se puede añadir xilosa y fucosa a la estructura. En este caso, la estructura de Man5 se puede recortar a un núcleo de trimanosilo elemental (Man3) usando manosidasa 3. De acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento, ahora es posible añadir restos de azúcar deseados al núcleo de trimanosilo para generar una estructura de glicano deseada.

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

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

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

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

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

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

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

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

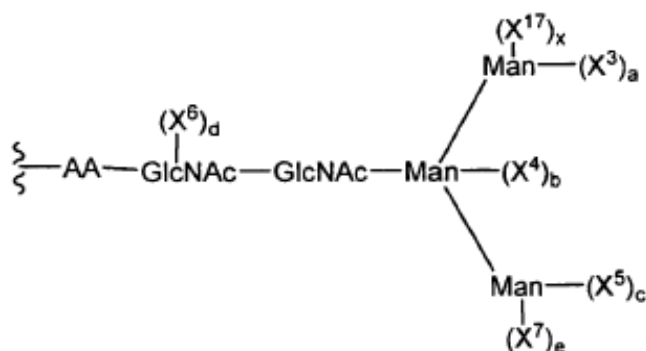
Determinación de la estructura primaria del glicano

Cuando una célula produce glucopéptido unido a N, como se indica en otros ligares del presente documento, puede comprender una mezcla heterogénea de estructuras de glicano que se debe reducir a un núcleo de trimanosilo común generalmente elemental o a una estructura de Man3GlcNAc4, antes de añadir otros restos de azúcar al mismo. Con el fin de determinar exactamente qué azúcares se deben eliminar de cualquier estructura de glicano concreta, en ocasiones es necesario identificar la estructura primaria del glicano. En la materia se conocen bien técnicas para determinar la estructura primaria del glicano y se describen con detalle en, por ejemplo, Montreuil, "Structure and Biosynthesis of Glycopeptides" en Polysaccharides in Medicinal Applications, pág. 273-327, 1996, Eds. Severian Damitriu, Marcel Dekker, NY. Por tanto, es sencillo para un experto en la materia de glucobiología aislar una población de péptidos producidos por una célula y determinar la o las estructuras de los glicanos unidos a los mismos. Por ejemplo, se dispone de procedimientos eficientes para (i) romper los enlaces glucosídicos mediante escisión química tal como hidrólisis, acetólisis, hidrazinólisis, o mediante desaminación nitrosa; (ii) metilación completa seguida de hidrólisis o metanólisis y mediante cromatografía de gases-líquidos y espectroscopia de masas de los monosacáridos parcialmente metilados; y (iii) la definición de enlaces anóméricos entre monosacáridos usando exoglucosidasas, que también proporcionan información sobre la estructura primaria del glicano mediante degradación secuencial. En concreto, las técnicas de espectroscopia de masas y de espectrometría por resonancia magnética nuclear (RMN), especialmente RMN de campo alto, se han usado con éxito para determinar la estructura primaria del glicano.

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

Ejemplo

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



en la que X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷ and X¹⁷ son residuos monosacáridos u oligosacáridos (seleccionados de forma independiente); y a, b, c, d, e y x son 0, 1 o 2 ((seleccionados de forma independiente), con la condición de que

al menos un miembro seleccionado de a, b, c, d, e y x son 1 ó 2.

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

10 Se desvela que las estructuras de glicano se remodelan de un modo tal que la estructura descrita en la Fórmula 1 tenga determinantes específicos. La estructura del glicano se puede elegir para potenciar la actividad biológica del péptido, dar al péptido una nueva actividad biológica, eliminar la actividad biológica del péptido o mejor aproximación al patrón de glucosilación del péptido nativo, entre otros.

Se desvela además que los glicanos unidos a N del péptido se remodelan para que se aproximen mejor al patrón de glucosilación de las proteínas humanas nativas. En este ejemplo, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 1 se remodela para tener los restos siguientes:

15 X^3 y X^5 = |-GlcNAc-Gal-AS;
a y c = 1;
d = 0 o 1;
b, e y x = 0.

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

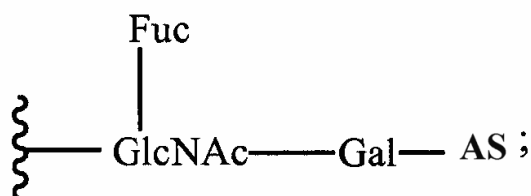
En el segundo ejemplo preferido, los glicanos unidos a N del péptido se remodelan de modo que tengan un residuo de GlcNAc bisectada sobre el núcleo de trimanosilo. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 1 se remodela para tener los restos siguientes:

25 X^3 y X^5 are |-GlcNAc-Gal-AS;
a y c = 1;
30 X^4 es GlcNAc;
b=1;
d = 0 o 1;
e y x = 0.

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

35 En un tercer ejemplo preferido, los glicanos unidos a N del péptido se remodelan de modo que tengan un resto X de Lewis sialilado. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 1 se remodela para tener los restos siguientes:

X^3 y X^5 son



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

Este ejemplo es particularmente ventajosa cuando se pretende dirigir el péptido que se está remodelando a moléculas de selectina y células que exhiben las mismas.

45 En un cuarto ejemplo preferido, los glicanos unidos a N del péptido se remodelan para tener un resto conjugado.

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

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

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

15 Para un experto en la técnica quedará claro que la invención no está limitada a las moléculas de glicano preferidas descritas anteriormente. Los ejemplos preferidos son únicamente unas pocas de las muchas moléculas de glicano útiles que se pueden elaborar mediante el procedimiento de remodelado de la invención. Los expertos en la técnica conocerán cómo diseñar otros glicanos útiles dentro del alcance de las reivindicaciones.

20 En los primeras realizaciones a modo de ejemplo, el péptido se expresa en una célula CHO (línea celular de ovario de hámster chino) de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Cuando un péptido con sitios consenso de glicano unido a N se expresa y secreta en células CHO, los glicanos unidos a N tendrán las estructuras representadas en la fila superior de la Figura 3. Aunque todas estas estructuras pueden estar presentes, las estructuras con mucho más frecuentes son las dos del lado derecho. En los términos de la Fórmula 1,

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

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

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

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

50 El núcleo de trimanosa está presente en la gran mayoría de los glicanos unidos a N fabricados por células de insecto y, en ocasiones también está presente una GlcNAc antenaria y/o residuo(s) de fucosa. En una realización a modo de ejemplo, los glicanos unidos a N de un péptido expresado y secretado en células de insecto se remodelan en el glicano humanizado preferido poniendo en contacto primero los glicanos con una glucosidasa específica de moléculas de fucosa, después poniendo en contacto los glicanos con una glucosiltransferasa específica de la molécula aceptora de manosa en cada antena del núcleo de trimanosa, una molécula donante de GlcNAc en presencia de moléculas de nucleótido-GlcNAc, después poniendo en contacto los glicanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de GlcNAc, una molécula donante de Gal, en presencia de moléculas de nucleótido-Gal y, después, poniendo en contacto los glicanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de galactosa, una molécula donante de ácido siálico en presencia de moléculas de nucleótido-AS. Un experto en la técnica apreciará que las moléculas de fucosa, si existen, se pueden eliminar en cualquier momento durante el procedimiento. En otra realización a modo de ejemplo, el glicano humanizado del

ejemplo anterior se remodela además en el glicano de Lewis X sialilado poniendo en contacto el glicano además con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de GlcNAc, una molécula donante de fucosa en presencia de moléculas de nucleótido-fucosa. Este procedimiento se ilustra en la Figura 10 y el Ejemplo 3.

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

$$10 \quad X^3 \text{ y } X^5 = |-\text{Man} - \text{Man} - (\text{Man})_{0-1000};$$

$$a \text{ y } c = 1 \text{ o } 2;$$

$$b, d, e \text{ y } x = 0.$$

15 En una realización a modo de ejemplo, los glicanos unidos a N de un péptido expresado y secretado por células de levadura se remodelan en el núcleo de trimanosa elemental poniendo en contacto primero los glicanos con una glucosidasa específica de moléculas de $\alpha 2$ manosa, después poniendo en contacto con una glucosidasa específica de moléculas de $\alpha 6$ manosa. Este procedimiento se ilustra en la Figura 5 y el Ejemplo 6. En otra realización a modo de ejemplo, los glicanos unidos a N se remodelan además para hacer un glicano adecuado para un anticuerpo recombinante con función de toxicidad celular mediada por Fc poniendo en contacto los glicanos centrales de trimanosa elemental con una glucosiltransferasa específica de la molécula aceptora de manosa en cada antena del núcleo de trimanosa, una molécula donante de GlcNAc en presencia de moléculas de nucleótido-GlcNAc, después poniendo en contacto los glicanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de manosa en medio del núcleo de trimanosa, una molécula donante de GlcNAc en presencia de moléculas de nucleótido-GlcNAc; después, poniendo en contacto los glicanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de GlcNAc, una molécula donante de Gal en presencia de moléculas de nucleótido-Gal y, después, poniendo en contacto los glicanos con glucosiltransferasa específica de una molécula aceptora de galactosa, una molécula donante de ácido siálico en presencia de moléculas de nucleótido-AS. Este procedimiento se ilustra en las Figuras 2, 3 y 4.

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

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

B. Procedimiento para remodelar glicanos unidos a O

35 La O-glucosilación se caracteriza por la unión de varios monosacáridos en un enlace O-glucosídico a hidroxiaminoácidos. La O-glucosilación es una amplia modificación postraduccional en los reinos animal y vegetal. La complejidad estructural de los glicanos unidos con O a proteínas supera considerablemente la de los glicanos unidos a N. Los residuos de serina o treonina de un péptido recién traducido pasan a estar modificados en virtud de una peptidil GalNAc transferasa en los compartimentos cis a trans del Golgi. El sitio de la I-glucosilación no solo está determinado por la especificidad de secuencia de la glucosiltransferasa, sino también la regulación epigenética mediada por competición entre diferentes sitios de sustrato y por competición con otras glucosiltransferasas responsables para formar el glicano.

40 El glicano unido a O se ha definido arbitrariamente como que tiene tres regiones: el núcleo, la región estructural y la región periférica. La región "central" de un glicano unido a O es los dos o tres azúcares más internos de la cadena de glicano proximales al péptido. La región estructural contribuye principalmente a la longitud de la cadena de

glicano formada mediante elongación uniforme. La región periférica exhibe un elevado grado de complejidad estructural. La complejidad estructural de los glicanos unidos a O comienza con la estructura del núcleo. En la mayoría de los casos, el primer residuo de azúcar añadido al sitio consenso del glicano unido a O es GalNAc; no obstante, el azúcar puede también ser GlcNAc, glucosa, manosa, galactosa o fucosa, entre otros. La Figura 11 es un diagrama de algunas de las estructuras del núcleo de glicano unido a O conocidas y las enzimas responsables de su síntesis *in vivo*.

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

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

La etapa inicial en la glucosilación-O en células de mamífero es la unión de N-acetilgalactosamina (GalNAc) usando cualquiera de una familia de al menos once α -N-acetilgalactosaminiltransferasas conocidas, cada una de las cuales tiene una especificidad por el péptido aceptor restringida. En general, el péptido aceptor reconocido por cada enzima constituye una secuencia de al menos diez aminoácidos. Los péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos reconocida por una GalNAc-transferasa concreta se convierten en O-glucosilados en el sitio aceptor si se expresan en una célula que expresa la enzima y si se localizan adecuadamente en el aparato de Golgi en el que también hay UDP-GalNAc.

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

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

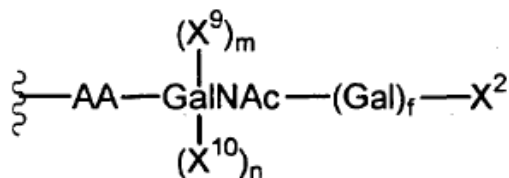
En una realización puede estar presente una secuencia adicional de aminoácidos que constituyen un aceptor eficaz para transferir un azúcar unido a O. Dicha secuencia de aminoácidos está codificada por una secuencia de ADN condensada en marco con la secuencia de codificación del péptido o, como alternativa,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

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

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

Ejemplos

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



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

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

20 En el primer ejemplo preferido, los glicanos unidos a O del péptido se remodelan para que se aproximen mejor al patrón de glucosilación de las proteínas humanas nativas. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 2 se remodela para tener los restos siguientes:

X^2 es |-AS; o |-AS-AS;
f y n = 0 o 1;
 X^{10} es AS;
m = 0.

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

30 En el otro ejemplo preferido, los glicanos unidos a O del péptido se remodelan de modo que muestran un antígeno X de Lewis sialilado. En esta realización, la estructura del glicano descrito en la Fórmula 2 se remodela para tener los restos siguientes:

X^2 es |-AS;
 X^{10} es Fuc o |-GlcNAc(Fuc)-Gal-AS;
f y n = 1;
m = 0.

35 Este ejemplo es particularmente ventajoso cuando el péptido que se está remodelando es más eficaz cuando está dirigido a una molécula de selectina y a células que exhiben las mismas.

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

X^2 es |-AS-R;
f = 1;
n y m = 0;
en la que R es el grupo conjugado.

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

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

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

$$10 \quad \begin{aligned} X^2 &= | -AS; \\ f &= 1; \\ m \text{ y } n &= 0. \end{aligned}$$

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

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

$$\begin{aligned} X^2 &= H; \\ f &= 0 \text{ o } 1; \\ n \text{ y } m &= 0. \end{aligned}$$

- 25 Véase, por ejemplo, Marchal y col., (2001, Biol. Chem. 382:151-159). En una realización a modo de ejemplo, el glicano unido a O sobre un péptido expresado en una célula de insecto se remodela a un glicano humanizado poniendo en contacto los glicanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptor de GalNAc y una molécula donante de galactosa en presencia de nucleótido-Gal; y, después, poner en contacto los glicanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptor de Gal y una molécula donante de AS en presencia de nucleótido-AS. En otra realización a modo de ejemplo, los glicanos unidos a O se remodelan después a partir de la forma humanizada en la forma de Lewis X sialilado poniendo en contacto además los glicanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptor de GlcNAc, una molécula donante de fucosa en presencia de moléculas de nucleótido-fucosa.

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



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

- 45 En una realización a modo de ejemplo, el glicano es el glicano unido a O sobre un péptido expresado en una célula fúngica y se remodela en un glicano humanizado poniendo en contacto el glicano con una endoglucosilasa específica de un enlace aminoácido GalNAc y, después, poniendo en contacto el glicano con una glucosiltransferasa específica de un sitio consenso unido a O y una molécula donante de GalNAc en presencia de nucleótido-GalNAc; poniendo en contacto el glicano con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptor de GalNAc y una molécula donante de galactosa en presencia de nucleótido-Gal; y, después, poniendo en contacto los glicanos con una glucosiltransferasa específica de una molécula aceptor de Gal y una molécula donante de AS en presencia de nucleótido-AS.

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

En otra realización a modo de ejemplo, el péptido se expresa en células bacterianas, en particular células de *E. coli*,

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

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

C. Glucoconjugación en general

La invención proporciona procedimientos de preparar un conjugado de un péptido glucosilado o no glucosilado. Los conjugados de la invención se forman entre péptidos y diversas especies tales como polímeros solubles en agua, restos terapéuticos, restos de diagnóstico, restos dirigidos. También se proporcionan conjugados que incluyen dos o más péptidos unidos entre sí mediante una rama ligadora, es decir conjugados multifuncionales. Los conjugados multifuncionales de la invención pueden incluir dos o más copias del mismo péptido o un conjunto de diversos péptidos con diferentes estructuras y/o propiedades.

Los conjugados de la invención se forman mediante la unión enzimática de un azúcar modificado al péptido glucosilado o no glucosilado. El azúcar modificado, cuando se interpone entre el péptido y el grupo modificador en el azúcar se convierte en lo que en el presente documento se denomina "grupo de unión a glicosilo intacto". Usando la selectividad exquisita de las enzimas, tal como las glucosiltransferasas, el presente procedimiento proporciona péptidos portadores de un grupo deseado en una o más localizaciones específicas. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, un azúcar modificado se une directamente a un locus seleccionado sobre la cadena peptídica o, como alternativa, el azúcar modificado se cuelga sobre un resto carbohidrato de un péptido. Los péptidos en los que los azúcares modificados están unidos a un carbohidrato peptídico y directamente a un residuo de aminoácido de la estructura peptídica también están dentro del alcance de la presente invención.

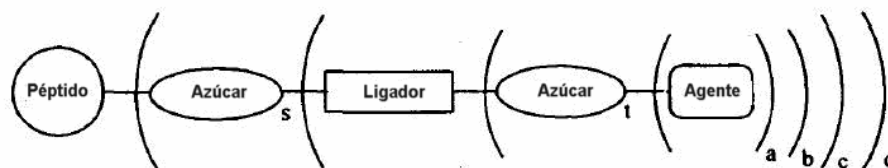
En contraste a las estrategia de elaboración de péptidos químicas y enzimáticas, los procedimientos de la invención hacen posible unir péptidos y glucopéptidos que tienen un patrón de derivación sustancialmente homogéneo; las enzimas usadas en la invención son, en general, selectivas de un residuo de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

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

1. Los conjugados

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

Normalmente, los conjugados de la invención se corresponden con la estructura general.



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

En una realización a modo de ejemplo, el resto seleccionado es un polímero soluble en agua. El polímero soluble en agua está unido covalentemente al péptido a través de un grupo de unión a glicosilo intacto. El grupo de unión a glicosilo está unido covalentemente a un residuo aminoácido o un residuo glicosilo del péptido. Como alternativa, el grupo de unión a glicosilo está unido a una o más unidades de glicosilo de un glucopéptido. La invención también proporciona conjugados en los que el grupo de unión a glicosilo está unido a un residuo aminoácido y a un residuo glicosilo.

Además de proporcionar conjugados que se forman a través de un grupo de unión a glicosilo intacto añadido enzimáticamente, la presente invención proporciona conjugados que son altamente homogéneos en sus patrones de sustitución. Usando los procedimientos de la invención es posible formar conjugados peptídicos en los que esencialmente todos los restos de azúcar modificados en una población de conjugados de la invención están unidos a múltiples copias de un residuo aminoácido o glicosilo estructuralmente idéntico. Por tanto, en un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos polímeros solubles en agua que están unidos covalentemente al péptido a través de un grupo de unión a glicosilo intacto. En un conjugado preferido de la invención, esencialmente cada miembro de la población está unido mediante el grupo de unión a glicosilo a un residuo glicosilo del péptido y cada residuo glicosilo del péptido al que está unido el grupo de unión a glicosilo tiene la misma estructura.

También se proporciona un conjugado peptídico que tiene una población de restos polímeros solubles en agua unidos covalentemente al péptido a través de un grupo de unión a glicosilo intacto. En una realización preferida, esencialmente cada miembro de la población de restos polímeros solubles en agua está unido a un residuo de aminoácido del péptido a través de un grupo de unión a glicosilo intacto y cada residuo de aminoácido que tiene un grupo de unión a glicosilo intacto unido al mismo tiene la misma estructura.

La presente invención también proporciona conjugados análogos a los descritos anteriormente en los que el péptido está conjugado a un resto terapéutico, resto diagnóstico, resto dirigido, resto de toxina o similar mediante un grupo de unión a glicosilo intacto. Cada uno de los restos citados anteriormente puede ser una molécula pequeña, polímero natural (p. ej., péptidos) o polímero sintético.

En un ejemplo, la interleucina-2 (IL-2) está conjugada a la transferrina mediante un ligador bifuncional que incluye un grupo de unión a glicosilo intacto en cada extremo del resto PEG (Esquema 1). Por ejemplo, un extremo del ligador PEG está funcionalizado con un ligador de ácido siálico intacto que está unido a la transferrina y el otro está funcionalizado con un ligador GalNAc intacto que está unido a la IL-2.

En otro ejemplo, EPO se conjuga a la transferrina. En otra divulgación a modo de ejemplo, EPO se conjuga al factor de crecimiento neurotrópico derivado de la glía (GDNF). En estas divulgaciones, cada conjugación se consigue mediante ligador bifuncional que incluye un grupo de unión a glicosilo intacto en cada extremo del resto PEG, como se ha mencionado anteriormente. La transferrina transfiere la proteína a través de la barrera hematoencefálica.

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

En otro ejemplo más, la divulgación proporciona conjugados que se localizan de forma selectiva en un tejido concreto debido a la presencia de un agente dirigido como componente del conjugado. En una realización a modo de ejemplo, el agente dirigido es una proteína. Proteínas a modo de ejemplo incluyen transferrina (cerebro, acumulación de sangre), suero humano-glucoproteína-(HS) (hueso, cerebro, acumulación de sangre), anticuerpos (cerebro, tejido con antígeno específico de anticuerpo, acumulación de sangre), factores de coagulación V-XII (tejido dañado, coágulos, cáncer, acumulación de sangre), proteínas séricas, por ejemplo glucoproteína α -ácida, fetuína, α -fetoproteína (cerebro, acumulación de sangre), β 2-glucoproteína (hígado, pacas de aterosclerosis, cerebro, acumulación de sangre), G-CSF, GM-CSF, M-CSF, y EPO (estimulación inmunitaria, cánceres, acumulación de sangre, sobreproducción de glóbulos rojos, neuroprotección) y albúmina (incremento de la semivida).

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

En realizaciones a modo de ejemplo, el conjugado se forma entre un polímero soluble en agua, un resto terapéutico, resto dirigido o una biomolécula, y un péptido de FGF glicosilado o no glicosilado. El polímero, resto terapéutico o biomolécula está conjugado al péptido a través de un grupo de unión a glicosilo intacto que se interpone entre, y se une covalentemente a, tanto el péptido de FGF como el grupo modificador (es decir, polímero soluble en agua). El procedimiento incluye poner en contacto el péptido de FGF con una mezcla que contiene un azúcar modificado y una glucosiltransferasa para la cual el azúcar modificado es un sustrato. La reacción se lleva a cabo en condiciones suficientes para formar un enlace covalente entre el azúcar modificado y el péptido. El resto azúcar del azúcar modificado se selecciona preferentemente de azúcares de nucleótidos, azúcares activados y azúcares, que ni son nucleótidos ni están activados.

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

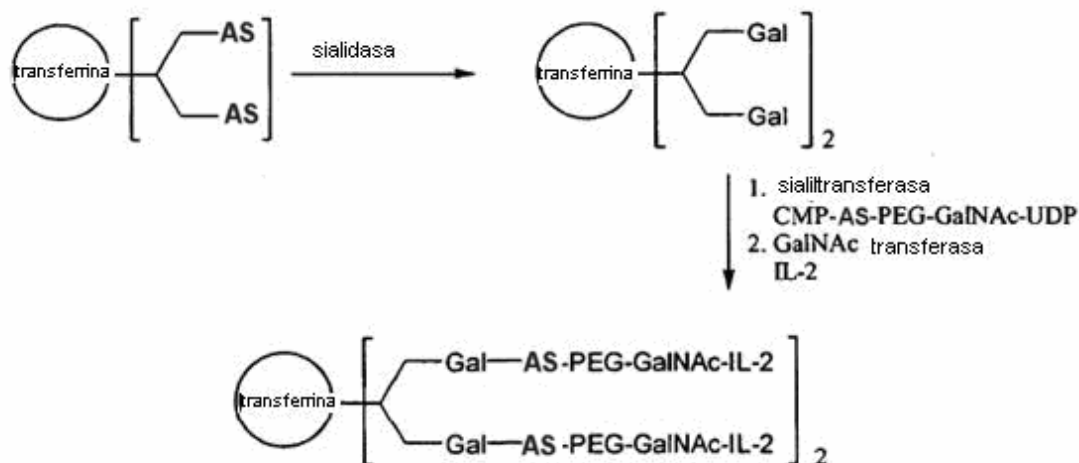
En un procedimiento a modo de ejemplo de la invención, dos péptidos se unen entre sí a través de un resto ligador que incluye un ligador de PEF. El constructo se adapta a la estructura general establecida en el recuadro anterior. Como se ha descrito en el presente documento, el constructo de la invención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

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

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

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

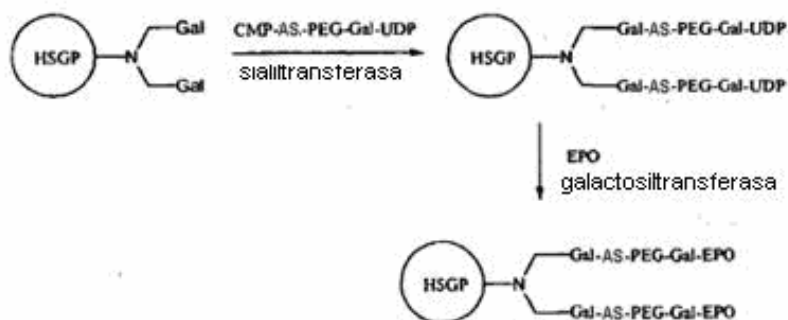
Esquema 1



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

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

Esquema 2

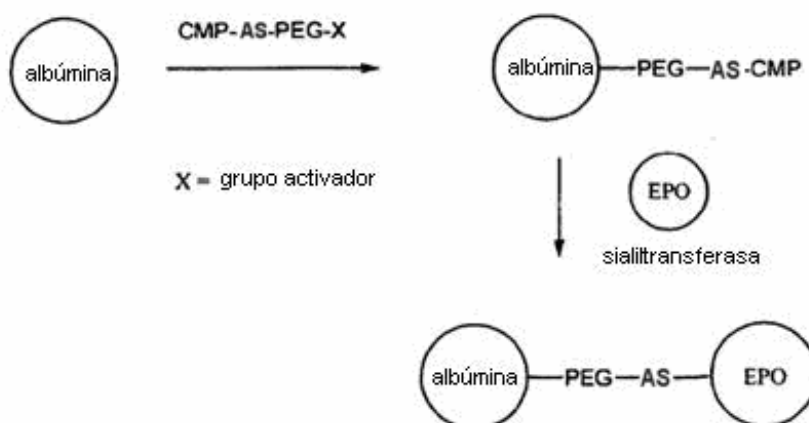


El uso de derivados reactivos de PEG (u otros ligadores) para unir uno o más restos peptídicos al ligador está dentro del alcance de la presente invención. La invención no está limitada por la identidad del análogo de PEG reactivo. Muchos derivados activados de poli(etilenglicol) están disponibles comercialmente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

152 (1985)), formiatos de imidazolilo (Beauchamp y col., Anal. Biochem., 131: 25-33 (1983); Berger y col., Blood, 71: 1641-1647 (1988)), 4-ditiopiridinas (Woghiren y col., Bioconjugate Chem., 4: 314-318 (1993)), isocianatos (Byun y col., ASAIO Journal, M649-M-653 (1992)) y epóxidos (patente de EE.UU, N° 4.806.595, concedida a Noishiki y col. (1989)). Otros grupos de unión incluyen el enlace uretano entre grupos amino y PEG activado. Véase, Veronese y col., Appl. Biochem. Biotechnol., 11: 141-152 (1985).

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

Esquema 3



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

2. Azúcares modificados

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

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

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

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

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

Ejemplos de grupos activadores (grupos salientes) incluyen flúor, cloro, bromo, éster de tosilato, éster de mesilato, éster de triflato. Grupos salientes activados preferidos, para uso en la presente invención, son aquellos que no estorban estéricamente de forma significativa la transferencia enzimática del glucósido al aceptor. En consecuencia,
15 realizaciones preferidas de derivados de glucósido activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, siendo los fluoruros de glicosilo particularmente preferidos. Entre los fluoruros de glicosilo, los más preferidos son fluoruro de α -galactosilo, fluoruro de α -manosilo, fluoruro de α -glucosilo, fluoruro de α -fucosilo, fluoruro de α -xilosilo, fluoruro de α -sialilo, fluoruro de α -N-acetilglucosaminilo, fluoruro de α -N-acetilgalactosaminilo, fluoruro de β -galactosilo, fluoruro de β -manosilo, fluoruro de β -glucosilo, fluoruro de β -fucosilo, fluoruro de β -xilosilo, fluoruro de β -sialilo, fluoruro de β -N-acetilglucosaminilo y fluoruro de β -N-acetilgalactosaminilo.
20

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

Otros derivados de glicosilo activados se pueden preparar usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los mesilatos de glicosilo se pueden preparar mediante tratamiento de la forma hemiacetal completamente bencilado del azúcar con cloruro de mesilo, seguido de hidrogenación catalítica para eliminar los grupos bencilo.
30

En otra realización a modo de ejemplo, el azúcar modificado es un oligosacárido que tiene una estructura antenaria. En una realización preferida, uno o más de los extremos de la antena portan el resto modificador. Cuando más de un resto modificador está unido a un oligosacárido que tiene una estructura antenaria, el oligosacárido es útil para
35 "amplificar" el resto modificador; cada unidad de oligosacárido conjugada con el péptido une múltiples copias del grupo modificador al péptido. La estructura general de un quilato típico de la invención como se expone en la figura anterior abarca especies multivalentes que son el resultado de preparar un conjugado de la invención usando una estructura antenaria. En la técnica se conocen muchas estructuras de sacárido antenarias y el presente procedimiento se puede poner en práctica con ellas sin limitaciones.
40

Ejemplos de grupos modificadores se tratan a continuación. Los grupos modificadores se pueden seleccionar de una o más propiedades deseables. Ejemplos de propiedades incluyen mayor farmacocinética, mayor farmacodinamia, mejor biodistribución, que proporciona una especie polivalente, mejor solubilidad en agua, mayor o menor lipofilicidad y elección de tejido como diana.

45 D. Conjugados peptídicos

a) Polímeros solubles en agua

La hidrofiliicidad de un péptido seleccionado se potencia mediante conjugación con moléculas polares, tales como moléculas que contienen amina, éster, hidroxilo y polihidroxilo. Ejemplos representativos incluyen polilisina, polietilenimina, poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol). Polímeros solubles en agua preferidos son, esencialmente, no fluorescentes o emiten una cantidad tan mínima de fluorescencia que son inadecuados para usar como marcadores fluorescentes en un ensayo. Se pueden usar polímeros que no sean azúcares naturales. Además, también se contempla el uso de un azúcar de otro modo natural que está modificado por la unión covalente de otra entidad (p. ej., poli(Etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(aspartato), biomolécula, resto terapéutico, resto diagnóstico etc.). En otra realización a modo de ejemplo, un resto de azúcar terapéutico se conjuga con una rama ligadora y la rama ligadora-azúcar se conjuga después con un péptido a través de un procedimiento de la invención.
55

En la literatura se describen procedimientos y químicas para la activación de polímeros y sacáridos solubles en agua, así como procedimientos para conjugar sacáridos y polímeros a varias especies. Procedimientos de uso habitual para la activación de polímeros incluyen activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno,

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

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

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

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

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

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

Los expertos en la técnica conocen muchos polímeros solubles en agua y son útiles en la práctica de la presente invención. El término polímero soluble en agua abarca especies tales como sacáridos (p. ej., dextrano, amilosa, ácido hialurónico, ácido poli(silícico), heparanos, heparinas etc.); poli(aminoácidos); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (p. ej., ácido poli(acrílico), poli(éteres), por ejemplo poli(etilenglicol); péptidos, proteínas. La presente invención puede ponerse en práctica con cualquier polímero soluble en agua con la única limitación de que el polímero deba incluir un punto en el que pueda unirse el resto del conjugado.

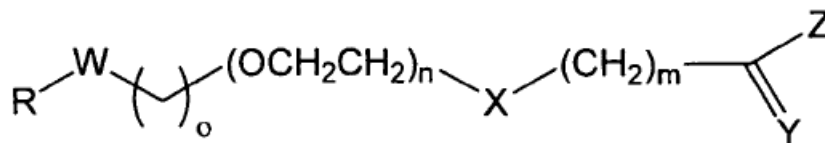
Procedimientos para activación de polímeros también se pueden encontrar en el documento WO 94/17039, la patente de EE.UU. N° 5.324.844, los documentos WO 94/18247, WO 94/04193, la patente de EE.UU. N° 5.219.564, la patente de EE.UU. N° 5.122.614, el documento WO 90/13540, la patente de EE.UU. N° 5.281.698,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

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

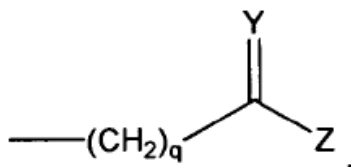
La presente invención se ilustra además por referencia a un conjugado de poli(etilenglicol). Se dispone de varias revisiones y monografías sobre la funcionalización y conjugación de PEG. Véanse, por ejemplo, Harris, Macromol. Chem. Phys. C25: 325-373 (1985); Scouten, Methods in Enzymology 135: 30-65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

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

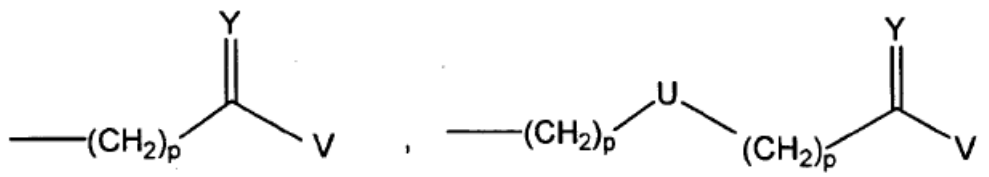
Fórmula 3



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

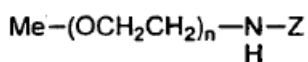
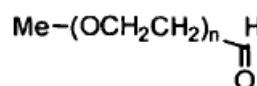
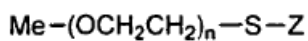
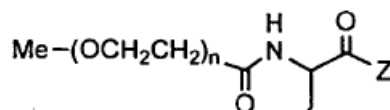
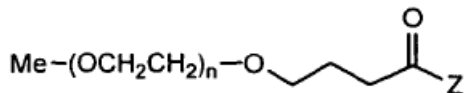
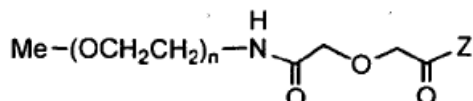
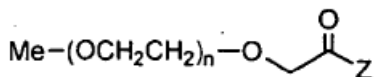
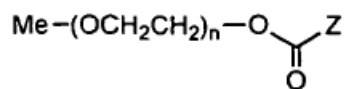
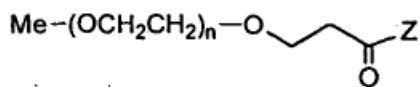


- 5 -azúcar-nucleótido, proteína, metilo, etilo;
 X, Y, W, U (seleccionados de forma independiente) = O, S, NH, N-R';
 R', R'' (seleccionados de forma independiente) = alquilo, bencilo, arilo, alquilo, arilo, piridilo, arilo sustituido, arilalquilo, acilarilo;
 n = 1 a 2.000;
 10 m, q, p (seleccionados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



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

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



b) Polímeros insolubles en agua

Los conjugados de la invención pueden incluir también uno o más polímeros insolubles en agua. Esta realización de la invención se ilustra mediante el uso del conjugado como vehículo con el cual liberar un péptido terapéutico de un modo controlado. En la técnica se conocen sistemas de liberación de fármacos poliméricos. Véase, por ejemplo, 5 Dunn y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Los expertos en la técnica apreciarán que sustancialmente cualquier sistema de liberación de fármacos conocido es aplicable a los conjugados de la presente invención.

Polímeros insolubles en agua representativos incluyen polifosfazina, alcoholes de polivinilo, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poli(acrilamidas), polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglicólidos, 10 polisiloxanos, poliuretanos, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo) polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), polióxido de etileno, poli(tereftalato de etileno), poli(acetato de vinilo), cloruro de polivinilo, poliestireno, polivinilpirrolidona, pluronics y polivinilfenol y copolímeros de los mismos.

Polímeros naturales modificados sintéticamente de uso en conjugados de la invención incluyen alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa y nitrocelulosas. Miembros particularmente preferidos de las clases amplias de polímeros naturales modificados sintéticamente incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, 20 hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboximetilcelulosa, triacetato de celulosa, sal de sodio de sulfato de celulosa y polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos y ácido alginico.

Estos y los otros polímeros tratados en el presente documento se pueden obtener fácilmente a partir de fuentes comerciales tales como Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.), Polysciences (Warrenton, PA.), Aldrich (Milwaukee, WI.), 25 Fluka (Ronkonkoma, NY), y BioRad (Richmond, CA), o sintetizarse a partir de monómeros obtenidos de estos suministradores usando técnicas estándar.

Polímeros biodegradables representativos de uso en los conjugados de la invención incluyen poliláctidas, poliglicólidos y copolímeros de los mismos, poli(tereftalato de etileno), ácido poli(butírico), ácido poli(valérico), poli(láctida-cocaprolactona), poli(láctida-coglicólido), polianhídridos, poliortoésteres, mezclas y copolímeros de los 30 mismos. De particular uso son las composición que forman geles, como las que incluyen colágeno y pluronics.

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

Para los fines de la presente invención, "materiales insolubles en agua" incluye materiales que son sustancialmente insolubles en agua o ambientes que contienen agua. Por tanto, aunque ciertas regiones o segmentos del copolímero pueden ser hidrófilas o incluso solubles en agua, la molécula polimérica, como un nodo, no se disuelve en agua en ningún grado sustancial.

Para los fines de la presente invención, la expresión "molécula biorreabsorbible" incluye una región que es capaz de 40 metabolizarse o degradarse y reabsorberse y/o eliminarse por vías de excreción normales del cuerpo. Dichos metabolitos o productos de degradación son, preferentemente, sustancialmente no tóxicos para el cuerpo.

La región biorreabsorbible puede ser hidrófoba o hidrófila, siempre que la composición copolimérica como un todo no se haga soluble en agua. Por tanto, la región biorreabsorbible se selecciona basándose en la preferencia de que el polímero, como un todo, permanezca insoluble en agua. En consecuencia, las propiedades relativas, es decir los 45 tipos de grupos funcionales contenidos y las proporciones relativas de la región biorreabsorbible y la región hidrófila se seleccionan para garantizar que las composiciones biorreabsorbibles útiles siguen siendo insolubles en agua.

Polímeros reabsorbibles a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, copolímeros de bloque reabsorbibles producidos de forma sintética de poli(ácido α -hidroxi-carboxílico)/poli(alquileno), (véase Cohn y col., patente de EE.UU. N° 4.826.945). Estos copolímeros no están reticulados y son solubles en agua, de modo que el cuerpo puede excretar 50 las composiciones de copolímeros de bloque degradadas. Véanse Younes y col., J Biomed. Mater. Res. 21: 1301-1316 (1987); y Cohn y col., J Biomed. Mater. Res. 22: 993-1009 (1988).

Polímeros biorreabsorbibles preferidos en el presente documento incluyen uno o más componentes seleccionados de poli(ésteres), poli(hidroxiácidos), poli(lactonas), poli(amidas), poli(éster-amidas), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(fosfazinas), poli(fosfoésteres), poli(tioésteres), polisacáridos y mezclas de los mismos. Todavía más preferentemente, el polímero biorreabsorbible incluye un componente de poli(hidroxiácido). De los poli(hidroxiácidos) se prefieren ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido policaproico, ácido polibutírico, ácido polivalérico y copolímeros y mezclas de los mismos.

Además de formar fragmentos que se absorben *in vivo* ("biorreabsorbidos"), los recubrimientos poliméricos preferidos para usar en los procedimientos de la invención también pueden formar un fragmento excretable y/o metabolizable.

5 En la presente invención también se pueden usar copolímeros de mayor orden. Por ejemplo, Casey y col., patente de EE.UU. N° 4.438.253, concedida el 20 de marzo de 1984, divulga copolímeros de tri-bloque producidos a partir de la transesterificación de poli(ácido glicólico) y un poli(alquilenglicol) terminado en hidroxilo. Dichas composiciones se divulgan para usar como suturas monofilamento reabsorbibles. La flexibilidad de dichas composiciones se controla mediante la incorporación de un ortocarbonato aromático, tal como ortocarbonato de tetra-p-tolilo en la estructura del copolímero.

10 También se pueden utilizar otros recubrimientos basados en ácidos láctico y/o glicólico. Por ejemplo, Spinu, patente de EE.UU. N° 5.202.413, concedida el 13 de abril de 1993, divulga copolímeros de multi-bloque biodegradables que tienen bloques ordenados secuencialmente de poliláctida y/o poliglicólido producidos mediante polimerización con apertura de anillo de láctida y/o glicólido sobre un diol oligomérico o un residuo de diamina, seguido de la extensión de la cadena con un compuesto difuncional, tal como un diisocianato, diacilcloruro o diclorosilano.

15 Las regiones biorreabsorbibles de los recubrimientos útiles en la presente invención se pueden denominar hidrolíticamente y/o enzimáticamente escindibles. Para los fines de la presente invención, "hidrolíticamente escindible" hace referencia a la susceptibilidad del copolímero, especialmente de la regiones biorreabsorbible, a la hidrólisis en agua o a un ambiente que contiene agua. De un modo similar, "enzimáticamente escindible" como se usa en el presente documento hace referencia a la susceptibilidad del copolímero, especialmente de la región
20 biorreabsorbible, a ser escindida por enzimas endógenas o exógenas.

Cuando se introducen en el cuerpo, la región hidrofílica se puede procesar en fragmentos excretables y/o metabolizables. Por tanto, la región hidrofílica puede incluir, por ejemplo, poliéteres, óxidos de polialquileno, polioles, poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(alquinoxazolininas), polisacáridos, carbohidratos, péptidos, proteínas y copolímeros y mezclas de los mismos. Además, la región hidrofílica puede ser también, por ejemplo, un óxido de
25 poli(alquileno). Dichos óxidos de poli(alquileno) pueden incluir, por ejemplo, óxido de poli(etileno), óxido de poli(propileno) y mezclas y copolímeros de los mismos.

Los polímeros que son componentes de hidrogeles también son útiles en la presente invención. Los hidrogeles son materiales poliméricos que son capaces de absorber cantidades relativamente grandes de agua. Ejemplos de compuestos formadores de hidrogeles incluyen ácidos poliacrílicos, carboximetilcelulosa sódica, alcohol polivinílico,
30 polivinilpirrolidona, gelatina, carragenina y otros polisacáridos, ácido hidroxietilmetacrílico (HEMA), así como derivados de los mismos. Se pueden producir hidrogeles estables, biodegradables y biorreabsorbibles. Además, las composiciones de hidrogeles pueden incluir subunidades que exhiban una o más de estas propiedades.

Se conocen composiciones de hidrogeles biocompatibles cuya integridad se puede controlar mediante reticulación y actualmente se prefieren para usar en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, Hubbell y col., patentes de
35 EE.UU. N° 5.410.016, concedida el 25 de abril de 1995 y 5.529.914, concedida el 25 de junio de 1996, divulgan sistemas solubles en agua que son copolímeros de bloque reticulados que tienen un segmento de bloque central soluble en agua en medio de dos extensiones hidrolíticamente lábiles. Dichos copolímeros se protegen en sus extremos adicionalmente con funcionalidades de acrilato fotopolimerizables. Cuando se reticulan, estos sistemas se convierten en hidrogeles. El bloque central soluble en agua de dichos copolímeros puede incluir poli(etilenglicol),
40 mientras que las extensiones hidrolíticamente lábiles pueden ser un poli(α -hidroxiácido), tal como ácido poliglicólico o ácido poliláctico. Véase Sawhney y col., *Macromolecules* 26: 581-587 (1993).

En otra forma de realización preferida, el gel es un gel termoreversible. Actualmente se prefieren geles termoreversibles que incluyen componentes, tales como pluronics, colágeno, gelatina, ácido hialurónico, polisacáridos, hidrogel de poliuretano, hidrogel de poliuretano-urea y combinaciones de los mismos.

45 En otra realización a modo de ejemplo, el conjugado de la invención incluye un componente de un liposoma. Los liposomas se pueden preparar se acuerdo con procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo como se describe en Eppstein y col., patente de EE.UU. N° 4.522,811, concedida el 11 de junio de 1985. Por ejemplo, se pueden preparar formulaciones en liposomas disolviendo lípido(s) adecuados, (tales como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, aracadoil fosfatidol colina y colesterol) en un disolvente inorgánico
50 que después se evapora, dejando tras de sí una película fina de lípido seco sobre la superficie del envase. Después, en el envase se introduce una disolución acuosa del compuesto activo o su sal farmacéuticamente aceptable. Después, el envase se agita a mano para liberar el material lipídico de los laterales del envase y para dispersar los agregados lipídicos, de modo que se forma la suspensión liposómica.

Las micropartículas citadas anteriormente y los procedimientos de preparar las micropartículas se ofrecen a modo
55 de ejemplo y no se pretende que definan el alcance de las micropartículas de uso en la presente invención. Será evidente para los expertos en la técnica que en la presente invención se puede usar una matriz de nanopartículas.

c) Biomoléculas

En otra forma de realización preferida, el azúcar modificado es portador de una biomolécula. En realizaciones adicionales preferidas, la biomolécula es una proteína funcional, enzima, antígeno, anticuerpo, péptido, ácido nucleico (p. ej., nucleótidos sencillos o nucleósidos, oligonucleótidos, polinucleótidos u ácidos nucleicos de una o más cadenas), lectina, receptor o una combinación de los mismos.

Algunas biomoléculas preferidas son, esencialmente, no fluorescentes o emiten una cantidad tan mínima de fluorescencia que son inadecuados para usar como marcadores fluorescentes en un ensayo. Otras biomoléculas pueden ser fluorescentes. El uso de un azúcar de otro modo natural que está modificado por la unión covalente de otra entidad (p. ej., PEG, biomolécula, resto terapéutico, resto diagnóstico etc.) es adecuado. En una realización a modo de ejemplo, un resto de azúcar, que es una biomolécula, se conjuga con una rama ligadora y el casete ligador-azúcar se conjuga después con un péptido a través de un procedimiento de la invención.

Las biomoléculas útiles en la práctica de la presente invención pueden derivar de cualquier fuente. Las biomoléculas se pueden aislar de fuentes naturales o se pueden producir mediante procedimientos sintéticos. Los péptidos pueden ser péptidos naturales o péptidos mutados. Las mutaciones se pueden efectuar mediante mutagénesis química, mutagénesis dirigida a sitio u otros medios de inducir mutaciones conocidas para los expertos en la técnica. Los péptidos útiles en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, enzimas, antígenos, anticuerpos y receptores. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, bien intactos o fragmentos. Los péptidos son, opcionalmente, los productos de un programa de evolución dirigida.

Los péptidos y ácidos nucleicos tanto naturales como sintéticos son de utilidad en la presente invención, estas moléculas se pueden unir a un componente residuo de azúcar o a un agente de reticulación por cualquier grupo reactivo disponible. Por ejemplo, los péptidos se pueden unir a través de un grupo amina, carboxilo, sulfhidrilo o hidroxilo reactivo. El grupo reactivo puede residir en un extremo del péptido o en un sitio interno de la cadena peptídica. Los ácidos nucleicos se pueden unir a través de un grupo reactivo sobre una base (p. ej., amina exocíclica o un grupo hidroxilo disponible sobre un resto de azúcar (p.ej., 3' o 5'-hidroxilo). Las cadenas peptídicas o de ácidos nucleicos se pueden derivar además en uno o más sitios para permitir la unión de grupos reactivos adecuados a la cadena. Véase Chrisey y col. *Nucleic Acids Res.* 24: 3031-3039 (1996).

En una realización preferida adicional, la biomolécula se selecciona para dirigir el péptido modificado mediante los procedimientos de la invención a un tejido específico, de modo que se potencia la liberación del péptido en ese tejido respecto a la cantidad de péptido no derivado que se libera en el tejido. En una realización más preferida adicional, la cantidad del péptido derivado liberado en un tejido específico en un periodo de tiempo seleccionado se potencia mediante derivación en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 40 % y más preferentemente al menos aproximadamente un 100 %. Actualmente, las biomoléculas preferidas para aplicaciones dirigidas incluyen anticuerpos, hormonas y ligandos para receptores de superficie celular.

En un ejemplo, la proteína es un interferón. Los interferones son glicoproteínas antivirales que, en seres humanos, son secretados por fibroblastos primarios humanos tras la inducción con virus o con ARN bicatenario. Los interferones son de interés como terapéuticos, por ejemplo antivirales y tratamiento de la esclerosis múltiple. Para referencias sobre el interferón- β , véanse, por ejemplo, Yu y col., *J Neuroimmunol.*, 64(1):91-100 (1996); Schmidt, J., *J. Neurosci. Res.*, 65(1):59-67 (2001); Wender y col., *Folia Neuropathol.*, 39(2):91-93 (2001); Martin y col., *Springer Semin. Immunopathol.*, 18(1):1-24 (1996); Takane y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 294(2):746-752 (2000); Sburlati y col., *Biotechnol. Prog.*, 14:189-192 (1998); Dodd y col., *Biochimica et Biophysica Acta*, 787:183-187 (1984); Edelbaum y col., *J. Interferon Res.*, 12:449-453 (1992); Conradt y col., *J. Biol. Chem.*, 262(30):14600-14605 (1987); Civas y col., *Eur. J. Biochem.*, 173:311-316 (1988); Demolder y col., *J. Biotechnol.*, 32:179-189 (1994); Sedmak y col., *J. Interferon Res.*, 9(Suppl 1):S61-S65 (1989); Kagawa y col., *J. Biol. Chem.*, 263(33):17508-17515 (1988); Hershenson y col., patente de EE.UU. n° 4.894.330; Jayaram y col., *J. Interferon Res.*, 3(2):177-180 (1983); Menge y col., *Develop. Biol. Standard.*, 66:391-401 (1987); Vonk y col., *J. Interferon Res.*, 3(2):169-175 (1983); and Adolf y col., *J. Interferon Res.*, 10:255-267 (1990). Para referencias relevantes al interferón- α , véanse, Asano y col., *Eur. J. Cancer*, 27(Suppl 4):S21-S25 (1991); Nagy y col., *Anticancer Research*, 8(3):467-470 (1988); Dron y col., *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 3(1):13-19 (1989); Habib y col., *Am. Surg.*, 67(3):257-260 (3/2001); y Sugiyama y col., *Eur. J. Biochem.*, 217:921-927 (1993).

En un conjugado de interferón a modo de ejemplo, el interferón β está conjugado con un segundo péptido a través de una rama ligadora. La rama ligadora incluye un grupo de unión al glicosilo intacto a través del cual se une al segundo péptido mediante un procedimiento de la invención. La rama ligadora incluye también opcionalmente un grupo de unión al glicosilo intacto a través del cual se une al interferón.

En otro ejemplo, la invención proporciona un conjugado de la hormona estimulante del folículo (FSH). La FSH es una hormona glucoproteica. Véanse, por ejemplo, Saneyoshi y col. *Biol. Reprod.*, 65:1686-1690 (2001); Hakola y col., *J. Endocrinol.*, 158:441-448 (1998); Stanton y col., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 125:133-141 (1996); Walton y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86(8):3675-3685 (08/2001); Ulloa-Aguirre y col., *Endocrine*, 11(3):205-215 (12/1999); Castro-Fernández y col., *I. J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85(12):4603-4610 (2000); Prevost, Rebecca R., *Pharmacotherapy*, 18(5): 1001-1010 (1998); Linskens y col., *The FASEB Journal*, 13:639-645 (04/1999); Butnev y

col., *Biol. Reprod.*, 58:458-469 (1998); Muyan y col., *Mol. Endo.*, 12(5):766-772 (1998); Min y col., *Endo. J.*, 43(5):585-593 (1996); Boime y col., *Recent Progress in Hormone Research*, 34:271-289 (1999); y Rafferty y col., *J. Endo.*, 145:527-533 (1995). El conjugado de FSH se puede formar de un modo similar al descrito para el interferón.

5 En otro ejemplo más, el conjugado incluye eritropoyetina (EPO). Se sabe que la EPO participa en la respuesta a la hipoxia para estimular la producción de glóbulos rojos. Para las referencias pertinentes, véase Cerami y col., *Seminars in Oncology*, 28(2)(Suppl 8):66-70 (04/2001). Un conjugado de EPO a modo de ejemplo se forma de un modo análogo al conjugado del interferón.

10 En otro ejemplo más, la invención proporciona un conjugado del factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF). El G-CSF es una glicoproteína que estimula la proliferación, diferenciación y activación de las células progenitoras neutropoyéticas en neutrófilos funcionalmente maduros. Se sabe que el G-CSF inyectado se elimina rápidamente del cuerpo. Véanse, por ejemplo, Nohynek y col., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 39:259-266 (1997); Lord y col., *Clinical Cancer Research*, 7(7):2085-2090 (07/2001); Rotondaro y col., *Molecular Biotechnology*, 11(2):117-128 (1999); y Bönig y col., *Bone Marrow Transplantation*, 28:259-264 (2001). Un conjugado a modo de ejemplo del G-CSF se prepara como se ha tratado anteriormente para el conjugado de los interferones. Un experto en la técnica apreciará que muchas otras proteínas se pueden conjugar al interferón usando los procedimientos y composiciones de la invención, incluidos los péptidos indicados en la Tabla 6 (que se presentan en otros lugares del presente documento) y la Figura 1.

20 En un ejemplo adicional, se proporciona un conjugado con biotina. Por tanto, por ejemplo, un péptido biotinilado de forma selectiva se elabora mediante la unión de un resto avidina o estreptavidina portador de uno o más grupos modificadores.

25 En una realización preferida adicional, la biomolécula se selecciona para dirigir el péptido modificado mediante los procedimientos de la invención a un compartimento intracelular específico, de modo que se potencia la liberación del péptido en dicho compartimento intracelular respecto a la cantidad de péptido no derivado que se libera en el tejido. En una realización preferida adicional más, la cantidad del péptido derivado liberado en compartimento intracelular específico en un periodo de tiempo seleccionado se potencia mediante derivación en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 40 % y más preferentemente al menos aproximadamente un 100 %. En otra realización particularmente preferida, la biomolécula está unida al péptido mediante un ligador escindible que se puede hidrolizar una vez internalizado. Actualmente, las biomoléculas preferidas para aplicaciones dirigidas intracelulares incluyen transferrina, lactotransferrina (lactoferrina), melanotransferrina (p97), ceruloplasmina y transportado de cationes divalentes. Los enlaces contemplados incluyen proteína-azúcar-ligador-azúcar-proteína, proteína-azúcar-ligador-proteína y formas multivalentes de los mismos, y proteína-azúcar-ligador-fármaco, en la que el fármaco incluye moléculas pequeñas, péptidos, lípidos, entre otros.

35 La liberación específica de sitio y orientada a la diana de agentes terapéuticos es deseable con el fin de tratar una amplia variedad de enfermedades humanas, tales como diferentes tipos de neoplasias malignas y ciertos trastornos neurológicos. Dichos procedimientos se acompañan de menos efectos secundarios y una eficacia mayor del fármaco. Varios principios dependen del diseño de estos sistemas de liberación. Para una revisión, véase Garnett, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53:171-216, 2001).

40 Una consideración importante a la hora de diseñar un sistema de liberación de fármaco a tejidos diana específicamente. El descubrimiento de los antígenos de superficie tumoral ha hecho posible desarrollar abordajes terapéuticos en los que se apunta específicamente a las células tumorales que muestran antígenos de superficie definible y las mata. Existen tres clases principales de anticuerpos monoclonales terapéuticos (MAb) que han mostrado eficacia en ensayos clínicos humanos en el tratamiento de neoplasias malignas. (1) MAb sin conjugar, que induce directamente la inhibición del crecimiento y/o apoptosis o activa indirectamente los mecanismos de defensa del huésped para que actúe la citotoxicidad antitumoral; (2) MAb conjugado con fármaco que libera preferentemente una potente toxina citotóxica en las células tumorales y, por tanto, minimiza la citotoxicidad sistémica asociada habitualmente con quimioterapia convencional y (3) MAb conjugado con radioisótopos, que libera una dosis esterilizante de radiación en el tumor. Véase, la revisión de Reff y col., *Cancer Control* 9:152-166 (2002).

50 Con el fin de dar a los Mab el poder de matar células malignas, los Mab pueden conectarse con a una toxina que puede obtenerse de una planta, bacteria u hongo, para formar proteínas quiméricas denominadas inmunotoxinas. Las toxinas vegetales de uso habitual se dividen en dos clases: (1) holotoxinas (o proteínas de inactivación del ribosoma de clase II), tales como ricina, abrina, lectinas de muérdago y modeccina, y (2) hemitoxinas (proteínas de inactivación del ribosoma de clase I), tales como la proteína antiviral de la hierba carmín, saporina, briodina 1, bouganina y gelonina. Las toxinas bacterianas de uso habitual incluyen la toxina diftérica (DT) y la exotoxina de pseudomonas (PE). Kreitman, *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2:313-325 (2001).

55 Las inmunotoxinas convencionales contienen un Mab conjugado químicamente a una toxina que está mutada o modificada químicamente para minimizar la unión a las células normales. Ejemplos incluyen anti-ricina bloqueada en B4, que está dirigido al CD5, y la RFB2-cadena A de ricina desglucosilada, que está dirigida al CD22. Las inmunotoxinas recombinantes desarrolladas más recientemente son proteínas quiméricas que consisten en la región variable de un anticuerpo dirigido contra un antígeno tumoral condensado con una toxina proteica usando tecnología

de ADN recombinante. Con frecuencia, la toxina también está modificada genéticamente para eliminar los sitios de unión al tejido normal pero manteniendo su citotoxicidad. Un gran número de antígenos de diferenciación, receptores sobreexpresados o antígenos específicos del cáncer como dianas para las inmunotoxinas, por ejemplo CD19, CD22, CD20, el receptor de la IL-2 (CD25), CD33, el receptor de la IL-4, el receptor del EGF y sus mutantes, Erb2, carbohidrato de Lewis, mesotelina, el receptor de la transferrina, el receptor del GM-CSF, Ras, Bcr-Abl y c-Kit, para el tratamiento de varias neoplasias malignas, incluidas cánceres hematopoyéticos, glioma y cánceres de mama, de colon, de ovarios, de vejiga urinaria y gastrointestinal. Véanse, por ejemplo, Brinkmann y col., *Expert Opin. Biol. Ther.* 1:693-702 (2001); Perentesis y Sievers, *Hematology/Oncology Clinics of North America* 15:677-701 (2001).

Los Mab conjugados con radioisótopos se usan como otro medio de tratar las neoplasias malignas humanas, en particular las neoplasias malignas hematopoyéticas, con un nivel elevado de especificidad y eficacia. Los isótopos más usados para tratamientos son los emisores de alta energía, tales como ¹³¹I y ⁹⁰Y. Recientemente, el Mab humanizado anti-CD33 marcado con ²¹³Bi también se ha analizado en ensayos clínicos con humanos en fase I. Reff y col., *ant.*

Se han usado numerosos Mab para fines terapéuticos. Por ejemplo, el uso de rituximab (Rituxan™), un Mab anti-cd20 quimérico recombinante, para tratar ciertas neoplasias malignas hematopoyéticas fue autorizado por la FDA en 1997. Otros MAb aprobados desde entonces para usos terapéuticos en el tratamiento de cánceres humanos incluyen: alemtuzumab (Campath-1H™), un anticuerpo de rata humanizado contra CD52; y gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg™), un Mab anti-CD33 de ratón humanizado conjugado con caliqueamicina. Asimismo, actualmente la FDA está examinando la seguridad y eficacia de varios otros Mab para los fines de liberación específica de sitio de agentes citotóxicos o radiación, por ejemplo Zevalin™ radiomarcada y Bexxar™. Reff y col., *ant.*

Una segunda consideración importante en el diseño de un sistema de liberación de fármacos es la accesibilidad de un tejido diana a un agente terapéutico. Esto es un tema de preocupación en el caso del tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso central (SNC), en la que la barrera hematoencefálica impide la difusión de macromoléculas. Se han desarrollado varios abordajes para sortear la barrera hematoencefálica para liberar de forma eficaz agentes terapéuticos en el SNC.

La comprensión del mecanismo de transporte de hierro desde el plasma al cerebro proporciona una útil herramienta para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). El hierro, transportado en el plasma por la transferrina, es un componente esencial de casi todos los tipos de células. El cerebro necesita hierro para los procesos metabólicos y recibe hierro a través de los receptores de la transferrina localizados en las células endoteliales capilares del cerebro a través de transcitosis y endocitosis mediadas por el receptor. Moos y Morgan, *Cellular and Molecular Neurobiology* 20:77-95 (2000). Se han establecido sistemas de liberación basándose en la interacción transferrina-receptor de transferrina para la liberación eficiente de péptidos, proteínas y liposomas en el cerebro. Por ejemplo, los péptidos se pueden acoplar a un Mab dirigido contra el receptor de transferrina para conseguir una mayor captación por el cerebro, Moos y Morgan, *ant.* De un modo similar, cuando se acoplan a un Mab dirigido contra el receptor de transferrina, se potencia el transporte del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a través de la barrera hematoencefálica. Song y col., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301:605-610 (2002); Wu y col., *Journal of Drug Targeting* 10:239-245 (2002). Además, se ha comunicado un sistema de liberación liposómico para el transporte eficaz del fármaco quimioterapéutico, doxorubicina, en el glioma C6, en el que la transferrina estaba unida a los extremos distantes de las cadenas de PEG liposómico. Eavarone y col., *J. Biomed. Mater. Res.* 51:10-14 (2000). Una serie de patentes de EE.UU. también están relacionadas con procedimientos de liberación que sortean la barrera hematoencefálica basándose en la interacción transferrina-receptor de transferrina. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.154.924; 5.182.107; 5.527.527; 5.833.988; 6.015.555.

Existen otras parejas de conjugación adecuadas para un agente farmacéutico para sortear la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5,672,683, 5,977,307 y el documento WO 95/02421 se refieren a un procedimiento de liberar un agente neurofarmacéutico a través de la barrera hematoencefálica, en el que el agente se administra en forma de una proteína de fusión con un ligando que es reactivo con un receptor de células endoteliales capilares cerebrales; el documento WO 99/00150 describe un sistema de liberación de fármacos en el que el transporte de un fármaco a través de la barrera hematoencefálica se facilita mediante conjugación con un Mab dirigido contra el receptor humano de la insulina; el documento WO 89/10134 describe un péptido quimérico que incluye un péptido capaz de atravesar la barrera hematoencefálica a una velocidad relativamente alta y un neuropéptido hidrófilo incapaz de transcitosis, como medio de introducir neuropéptidos hidrófilos en el cerebro; el documento WO 01/60411 A1 proporciona una composición farmacéutica que puede transportar fácilmente un ingrediente farmacéuticamente activo en el cerebro. El ingrediente activo se une a una proteína específica de hibernación que se usa como conjugado y se administra con una hormona tiroidea o una sustancia que estimula la producción de hormona tiroidea. Además, se ha explorado una vía alternativa de liberación de fármaco para atravesar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, se ha demostrado que la liberación intranasal de agentes terapéuticos sin la necesidad de conjugarse es un prometedor método de liberación alternativo (Frey, 2002, *Drug Delivery Technology*, 2(5):46-49).

Además de facilitar el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica, la interacción transferrina-receptor de transferrina también es útil para dirigir específicamente a determinadas células tumorales, ya que

muchas células tumorales sobreexpresan el receptor de la transferrina sobre su superficie. Esta estrategia se ha usado para liberar macromoléculas bioactivas en células K562 a través de un conjugado con transferrina (Wellhoner y col., *The Journal of Biological Chemistry* 266:4309-4314 (1991)), y para liberar insulina en células Caco-2 de tipo enterocito a través de un conjugado con transferrina (Shah y Shen, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85: 1306-1311 (1996)).

Además, a medida que se sabe más sobre las funciones de varias proteínas transportadoras de hierro, como el receptor de la lactotransferrina, melanotransferrina, ceruloplasmina y el transportador de cationes divalentes y su patrón de expresión, se ha encontrado que algunas de las proteínas implicadas en el mecanismo del transporte del hierro (p. ej., melanotransferrina) o sus fragmentos tienen una eficacia similar en lo que respecta a la ayuda al transporte de agentes terapéuticos a través de la barrera hematoencefálica o para llegar a tejidos específicos (documentos WO 02/13843 A2, WO 02/13873 A2). Para una revisión sobre el uso de la transferrina y proteínas relacionadas implicadas en la captación de hierro como conjugados en la liberación de fármacos, véase Li y Qian, *Medical Research Reviews* 22:225-250 (2002).

El concepto de liberación específica de tejido de agentes terapéuticos va más allá de la interacción entre la transferrina y el receptor de la transferrina o sus proteínas relacionadas. Por ejemplo, se ha descrito un sistema de liberación específico en el hueso en el que las proteínas se conjugan con un aminobisfosfonato que busca el hueso para mejorar la liberación de proteínas a tejido mineralizado. Uludag y Yang, *Biotechnol. Prog.* 18:604-611 (2002). Para una revisión sobre este tema, véase Vyas y col., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System* 18:1-76 (2001).

Se pueden usar varios ligadores en el proceso de generar bioconjugados con el fin de liberar específicamente agentes terapéuticos. Ligadores adecuados incluyen reactivos de reticulación homo y heterobifuncionales, que pueden ser escindibles mediante, por ejemplo, disociación catalizada por ácido, o no ser escindibles (véanse, por ejemplo, Srinivasachar y Neville, *Biochemistry* 28: 2501-2509 (1989); Wellhoner y col., *The Journal of Biological Chemistry* 266:4309-4314 (1991)). La interacción entre muchos patrones de unión conocidos, tales como biotina y avidina/estreptavidina, también se puede usar como medio para unir un agente terapéutico y una pareja de conjugado que garantiza la liberación específica y eficaz del agente terapéutico. Usando los procedimientos de la invención, las proteínas se pueden usar para liberar moléculas en compartimentos intracelulares como conjugados. Para el direccionamiento intracelular de compuestos terapéuticos conjugados se pueden usar proteínas, péptidos, hormonas, citoquinas, moléculas pequeñas o similares que se unen a receptores de superficie celular específicos que se internalizan tras la unión del ligando. Normalmente, el complejo receptor-ligando se internaliza en vesículas intracelulares que se liberan en compartimentos celulares específicos, incluidos el núcleo, las mitocondrias, el aparato de Golgi, el RE, los lisosomas y los endosomas, en función de la localización intracelular a la que está dirigida el receptor. Conjugando el ligando del receptor con la molécula deseada, el fármaco será transportado por el complejo receptor-ligando y liberado en los compartimentos intracelulares a los que normalmente está dirigido el receptor. Por tanto, el fármaco puede liberarse en una localización intracelular específica de la célula en la que es necesaria tratar una enfermedad.

Se pueden usar muchas proteínas para dirigir agentes terapéuticos a tejidos y órganos específicos. Estas proteínas incluyen factores de crecimiento (EPO, HGH, EGF, factor de crecimiento neural, FGF, entre otros), citoquinas (GM-CSF, G-CSF, la familia de los interferones, interleucinas, entre otros), hormonas (FSH, LH, las familias de esteroides, estrógenos, corticosteroides, insulina, entre otros), proteínas séricas (albúmina, lipoproteínas, fetoproteína, proteínas séricas humanas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos) y vitaminas (folato, vitamina C, vitamina A, entre otros). Se dispone de agentes dirigidos que son específicos de receptores de la mayoría de los tipos celulares.

Configuraciones de enlaces contempladas incluyen proteína-azúcar-ligador-azúcar-proteína, proteína-azúcar-ligador-proteína y formas multivalentes de la misma, proteína-azúcar-ligador-proteína y formas multivalentes de la misma, proteína-azúcar-ligador-agente terapéutico en la que el agente terapéutico incluye moléculas pequeñas, péptidos y lípidos. En algunas realizaciones se usa un ligador hidrolizable que se puede hidrolizar una vez internalizado. Se puede usar un ligador lábil a ácidos para aprovechar cuando el conjugado proteico se internaliza en los endosomas o lisosomas que tienen un pH ácido. Una vez internalizado en el endosoma o el lisosoma, el ligador se hidroliza y el agente terapéutico se libera del agente dirigido.

En un ejemplo, la transferrina se conjuga a través de un ligador con una enzima deseada para dirigirla a una célula que presente receptores de transferrina en un paciente. El paciente podría, por ejemplo, requerir tratamiento de sustitución enzimático para dicha enzima concreta. En realizaciones particularmente preferidas, la enzima es una de la que carece un paciente con una enfermedad del almacenamiento lisosómico (véase la Tabla 4). Una vez en la circulación, el conjugado transferrina-enzima se une a los receptores de transferrina y se internaliza en los endosomas precoces (Xing y col., 1998, *Biochem. J.* 336:667; Liy col., 2002, *Trends in Pharmacol. Sci.* 23:206; Suhaila y col., 1998, *J. Biol. Chem.* 273:14355). Otros agentes dirigidos contemplados relacionados con la transferrina incluyen lactotransferrina (lactoferrina), melanotransferrina (p97), ceruloplasmina y transportado de cationes divalentes.

En otro ejemplo, los conjugados transferrina-distrofina entrarían en los endosomas mediante la vía de la transferrina. Una vez allí, la distrofina se libera debido a un ligador hidrolizable que después se puede pasar al compartimento intracelular cuando sea necesario. Esta realización se puede usar para tratar a un paciente con distrofia muscular suplementando un gen de distrofina defectuoso genéticamente y/o su proteína con el péptido distrofina funcional conectado a la transferrina.

E. Restos terapéuticos

En otra realización preferida, el azúcar modificado que incluye un resto terapéutico. Los expertos en la técnica apreciarán que existe un solapamiento entre la categoría de restos terapéuticos y biomoléculas; muchas biomoléculas tienen propiedades o potencial terapéuticos.

Los restos terapéuticos pueden ser agentes ya aceptados para uso clínico o pueden ser fármacos cuyo uso es experimental o cuya actividad o mecanismo de acción están en investigación. Los restos terapéuticos pueden tener una acción demostrada en un estado de enfermedad dado o puede que exista la hipótesis de que muestran una acción deseable en un estado de enfermedad dado. En una realización preferida, los restos terapéuticos son compuestos que se están sometiendo a detección selectiva según su capacidad para interactuar con un tejido de elección. Los restos terapéuticos, que son útiles en la práctica de la presente invención, incluyen fármacos de un amplio abanico de clases farmacológicas que tienen diversas actividades farmacológicas. En algunas realizaciones se prefiere usar restos terapéuticos que no son azúcares. Una excepción a esta preferencia es el uso de un azúcar de otro modo natural que está modificado por la unión covalente de otra entidad, tal como PEG, biomolécula, resto terapéutico, resto diagnóstico. En otra realización a modo de ejemplo, un resto de azúcar terapéutico se conjuga con una rama ligadora y el casete de la rama ligadora-azúcar se conjuga después con un péptido a través de un procedimiento de la invención.

Procedimientos para conjugar agentes terapéuticos y diagnósticos con otras varias especies son bien conocidos para los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; y Dunn y col., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991.

En un ejemplo, el resto terapéutico está unido al azúcar modificado mediante un enlace que se rompe en determinadas condiciones. Ejemplos de condiciones incluyen un pH (p. ej. del estómago, el intestino, las vacuolas de endocitosis), la presencia de una enzima activa (p. ej., esterasa, proteasa, reductasa, oxidasa), luz, calor. En la técnica se conocen muchos grupos escindibles. Véanse, por ejemplo, Jung y col., Biochem. Biophys. Acta 761: 152-162 (1983); Joshi y col., J. Biol. Chem. 265: 14518-14525 (1990); Zarling y col., J. Immunol. 124: 913-920 (1980); Bouizart y col., Eur. J. Biochem. 155: 141-147 (1986); Park y col., J Biol. Chem. 261: 205-210 (1986); Browning y col., J. Immunol. 143: 1859-1867 (1989).

Clases de restos terapéuticos útiles incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los AINE pueden seleccionarse de, por ejemplo, las siguientes categorías: (p. ej., derivados de ácido propiónico, derivados de ácido acético, derivados de ácido dinámico, derivados de ácido bifenilcarboxílico y oxicams); fármacos antiinflamatorios esteroideos que incluyen hidrocortisona; adyuvantes; fármacos antihistamínicos (p. ej., clorfeniramina, triprolidina); fármacos antitusivos (p. ej., dextrometorfano, codeína, caramifeno y carbetapentano); fármacos antipruríticos (p. ej., metdialazina y trimeprazina); fármacos anticolinérgicos (p. ej., escopolamina, atropina, homatropina, levodopa); fármacos antieméticos y antináuseas (p. ej., ciclizina, meclizina, clorpromazina, buclizina); fármacos anorexígenos (p. ej., benzfetamina, fenetermina, clorfenetermina, fenfluramina); fármacos estimulantes del sistema nervioso central (p. ej., anfetamina, metanfetamina, dextroanfetamina y metilfenidato); fármacos antiarrítmicos (p. ej., propanolol, procainamida, disopiramida, quinidina, encainida); fármacos bloqueantes β -adrenérgicos (p. ej., metoprolol, acebutolol, betaxolol, labetalol y timolol); fármacos cardiotónicos (p. ej., milrinona, amrinona y dobutamina); fármacos antihipertensores (p. ej., enalapril, clonidina, hidralazina, minoxidilo, guanadrel, guanetidina); fármacos diuréticos (p. ej., amilorida e hidroclorotiazida); fármacos vasodilatadores (p. ej., diltiazem, amiodarona, isoxsuprina, nilidrina, tolazolina y verapamilo); fármacos vasoconstrictores (p. ej., dihidroergotamina, ergotamina y metilsergida); fármacos antiulcerosos (p. ej., ranitidina y cimetidina); fármacos anestésicos (p. ej., lidocaína, bupivacaína, clorprocaína, dibucaína); fármacos antidepresivos (p. ej., imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina); fármacos tranquilizantes y sedantes (p. ej., clordiazepóxido, benaciticina, benzquinamida, flurazepam, hidroxizina, loxapina y promazina); fármacos antipsicóticos (p. ej., clorprotixeno, flufenazina, haloperidol, molindona, tioridazina y trifluoperazina); fármacos antimicrobianos (antibacterianos, antifúngicos, antiprotzoicos y antivirales).

Clases de restos terapéuticos útiles incluyen adyuvantes. Los adyuvantes pueden seleccionarse por ejemplo de conjugados de hemocianina de lapa californiana, lipopéptido derivado de micoplasma MALP-2, monofosforilo lípido A, subunidad B de la toxina del cólera, toxina termolábil de Escherichia coli, epítipo universal de linfocitos T colaboradores del toxoide del tétanos, interleucina-12, oligodesoxinucleótidos CpG, bromuro de dimetildiodecilaamónio, ciclodextrina, escualeno, sales de aluminio, vesículas de membrana externa del meningococo (VME), montanida ISA, TiterMax™ (disponible en Sigma, St. Louis MO), absorción de nitrocelulosa, complejos estimulantes inmunitarios tales como Quil A, Gerbu™ adyuvante (Gerbu Biotechnik, Kirchwald, Alemania), treonil muramil dipéptido, limosina alfa, bupivacaína, GM-CSF, adyuvante incompleto de Freund, MTP-PE/MF59

(Ciba/Geigy, Basilea, Suiza), polifosfazeno, saponina derivada del árbol *Quillaja saponaria*, y formulación adyuvante de Syntex (Biocine, Emeryville, CA), entre otros bien conocidos en la técnica.

Los fármacos antimicrobianos que se prefieren para incorporar en la presente composición incluyen, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de fármacos β -lactámicos, fármacos quinolonas, ciprofloxacino, norfloxacino, tetraciclina, eritromicina, amikacina, triclosan, doxiciclina, capreomicina, clorhexidina, clortetraciclina, oxitetraciclina, clindamicina, etambutol, isetionato de hexamidina, metronidazol, pentamidina, gentamicina, kanamicina, lineomicina, metaciclina, metenammina, minociclina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomycin, tobramicina, miconazol y amantadina.

Otros restos farmacológicos de uso en la práctica de la presente invención incluyen fármacos antineoplásicos (p. ej., antiandrógenos (p.ej., leuprolida o flutamida), agentes citocidas (p. ej., adriamicina, doxorubicina, taxol, ciclofosfamida, busulfan, cisplatino, β -2-interferón) anti-estrógenos (p. ej., tamoxifeno), antimetabolitos (p. ej., fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina). También incluidos en esta clase están los agentes basados en radioisótopos para diagnóstico y tratamiento, y toxinas conjugadas tales como ricina, geldanamicina, mitansina, CC-1065, C-1027, las duocarmicinas, caliqueamicina y estructuras relacionadas y análogos de los mismos.

El resto terapéutico también puede ser una hormona (p. ej., medroxiprogesterona, estradiol, leuprolida, megestrol, octreotida o somatostatina); fármacos relajantes musculares (p. ej., cinnamedrina, ciclobenzaprina, flavoxato, orfenadrina, papaverina, mebeverina, idaverina, ritodrina, difenoxilato, dantroleno y azumolen); fármacos antiespasmódicos; fármacos activos en hueso (p. ej., compuestos de fármacos de difosfonato y fosfonoalquilfosfinato); fármacos moduladores endocrinos (p. ej., anticonceptivos (p. ej., etinodiol, etinilestradiol, noretindrona, mestranol, desogestrel, medroxiprogesterona), moduladores de la diabetes (p. ej., gliburida o clorpropamida), anabolizantes tales como testolactona o estanozolol, pirógenos (p. ej., metiltestosterona, testosterona o fluoximesterona), anti-diuréticos (p. ej., desmopresina) y calcitoninas).

También de uso en la presente invención son los estrógenos (p. ej., dietilestilbesterol), glucocorticoides (p. ej., triamcinolona, betametasona, etc.) y progesteronas, tales como noretindrona, etinodiol, noretindrona, levonorgestrel; agentes tiroideos (p. ej., liotironina o levotiroxina) o agentes anti-tiroideos (p. ej., metimazol); también se pueden usar fármacos antihiperprolactinémicos (p. ej., cabergolina); supresores hormonales (p. ej., danazol o goserelina), oxióticos (p. ej., metilergonovina u oxitocina) y prostaglandinas tales como mioprostol, alprostadilo o dinoprostona.

Otros grupos modificadores útiles incluyen fármacos inmunomoduladores (p. ej., antihistamínicos, estabilizantes de los mastocitos, tales como lodoxamida y/o cromolin, esteroides (p. ej., triamcinolona, beclometazona, cortisona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, beclometazona, o clobetasol), antagonistas de la histamina H_2 (p. ej., famotidina, cimetidina, ranitidina), inmunosupresores (p.ej., azatioprina, ciclosporina), etc. También sin útiles los grupos con actividad antiinflamatoria tales sulindac, etodolac, ketoprofeno y ketorolaco. Otros fármacos de uso junto con la presente invención serán evidentes para el experto en la técnica.

F. Preparación de azúcares modificados

Los azúcares modificados útiles en la formación de conjugados de la invención se tratan en el presente documento. La discusión se centra en la preparación de un azúcar modificado con un polímero soluble en agua para claridad de la ilustración. En particular, la discusión se centra en la preparación de azúcares modificados que incluyen un resto poli(etilenglicol). Los expertos apreciarán que los procedimientos expuestos en el presente documento son ampliamente aplicables a la preparación de azúcares modificados, por lo que la discusión no debe interpretarse como limitante del alcance de la invención.

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

Grupos funcionales reactivos útiles pendientes de un núcleo de azúcar o grupo modificador incluyen:

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

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

(c) grupos haloalquilo, en los que el haluro se puede desplazar después con un grupo nucleofílico tal como, por

ejemplo, una amina, un anión carboxilato, anión tiol, carbanión o un ion alcóxido, de modo que tiene como resultado la unión covalente de un grupo nuevo en el grupo funcional del átomo de halógeno;

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

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

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

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

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

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

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

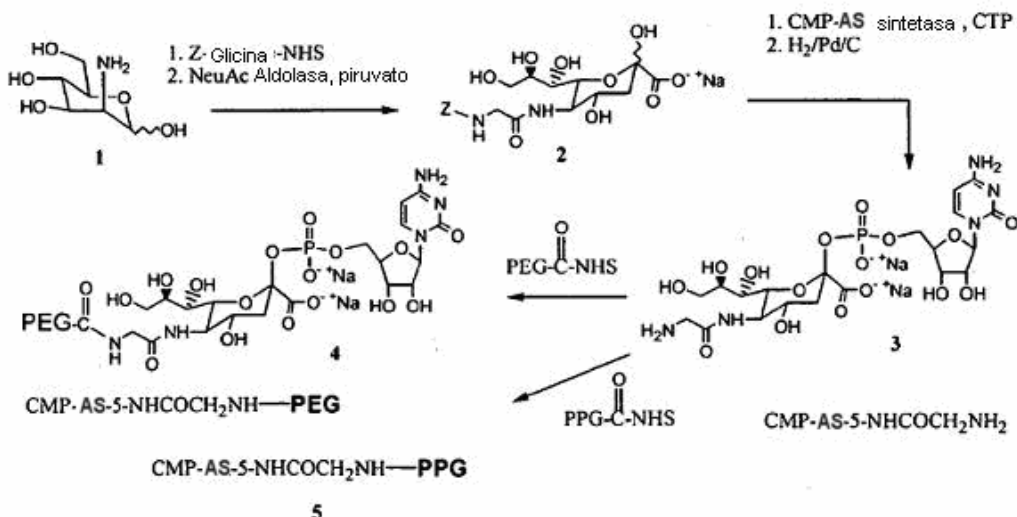
15 Los grupos funcionales reactivos se pueden elegir de un modo tal que no participen ni interfieran en las reacciones necesarias para ensamblar el núcleo de azúcar reactivo o el grupo modificador. Como alternativa, un grupo funcional reactivo se puede proteger de participar en la reacción mediante la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

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

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

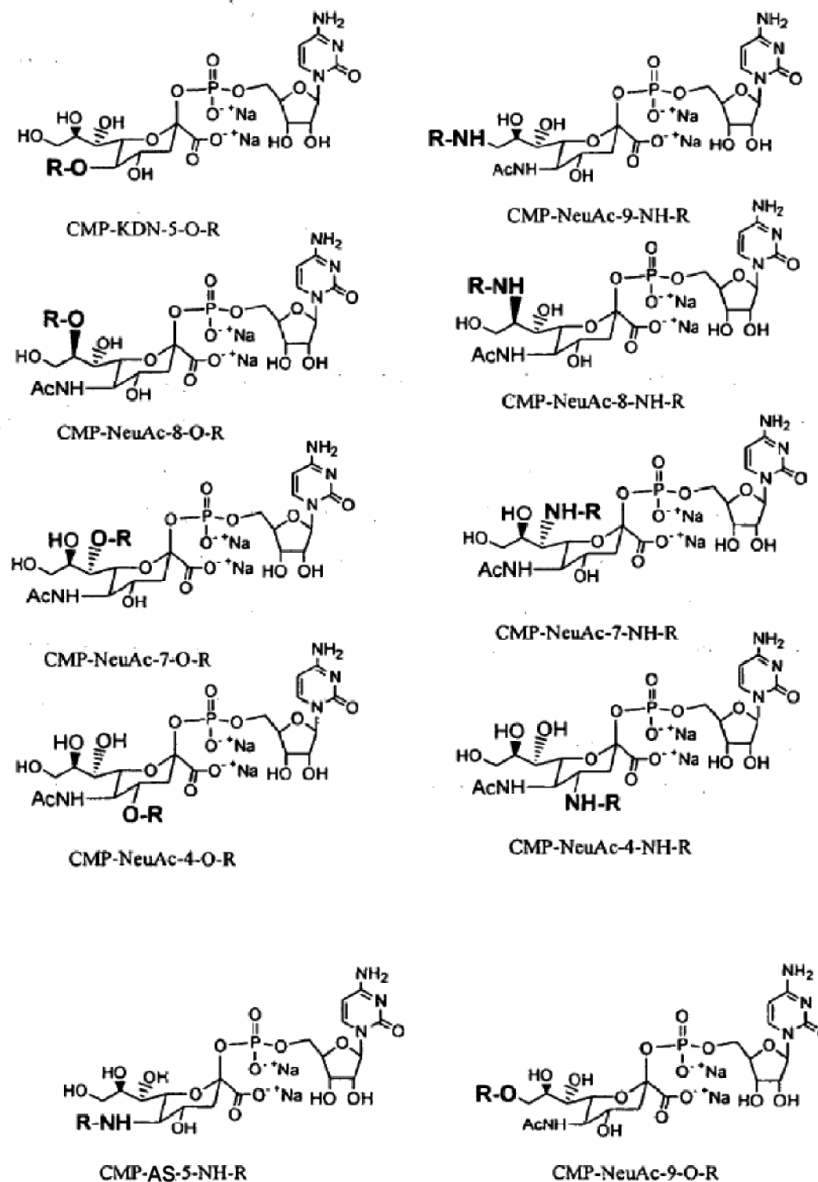
35 En el esquema 4, el glucósido manosamina1 se trata con el éster activo de un derivado de aminoácido protegido (p. ej., glicina), que convierte el residuo de amino azúcar en el correspondiente aducto de amida de aminoácido protegido. El aducto se trata con una aldolasa para formar el ácido siálico 2. El compuesto 2 se convierte en el correspondiente derivado de CMP mediante la acción de la CMP-AS sintetasa, seguido de hidrogenación catalítica del derivado de MCP para producir el compuesto 3. La amina introducida mediante la formación del aducto de glicina se usa como un locus de unión de PEG o PPG haciendo reaccionar el compuesto 3 con un derivado de PEG o PPG
40 activado (p. ej., PEG-C(O)NHS, PPG-C(O)NHS), produciendo 4 o 5, respectivamente.

Esquema 4



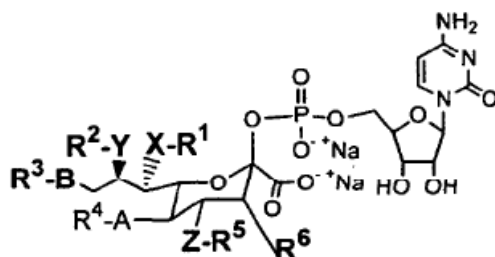
La tabla 2 expone ejemplos representativos de monofosfatos de azúcar que se derivan con un resto PEG o PPG. Determinados de los compuestos de la Tabla 2 se preparan mediante el procedimiento del esquema 1. Otros derivados se preparan mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo,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

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



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

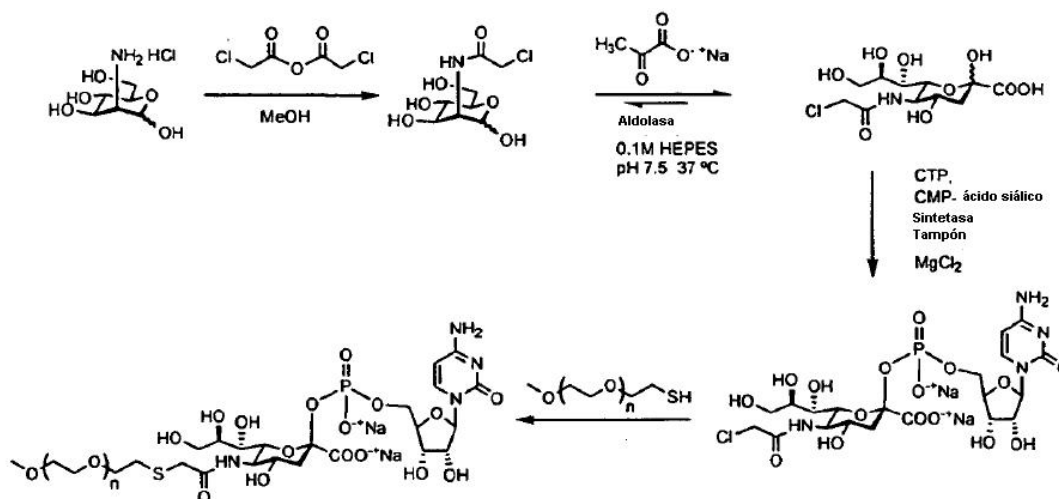
Fórmula 5



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

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

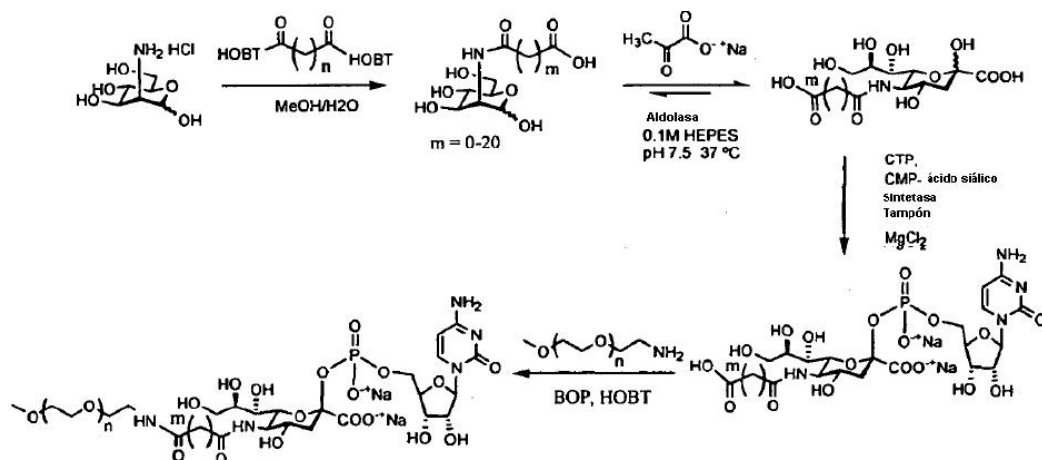
Esquema 5



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

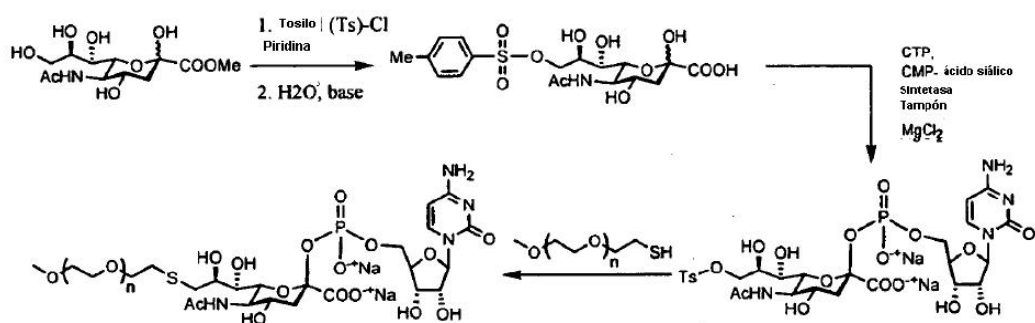
20 En una realización a modo de ejemplo adicional, como se muestra en el Esquema 6, se acila una manosamina con un bis-HOPT dicarboxilato, produciendo el correspondiente ácido amidoalquilcarbosílico, que después se convierte en un derivado de ácido siálico. El derivado de ácido siálico se convierte en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

Esquema 6



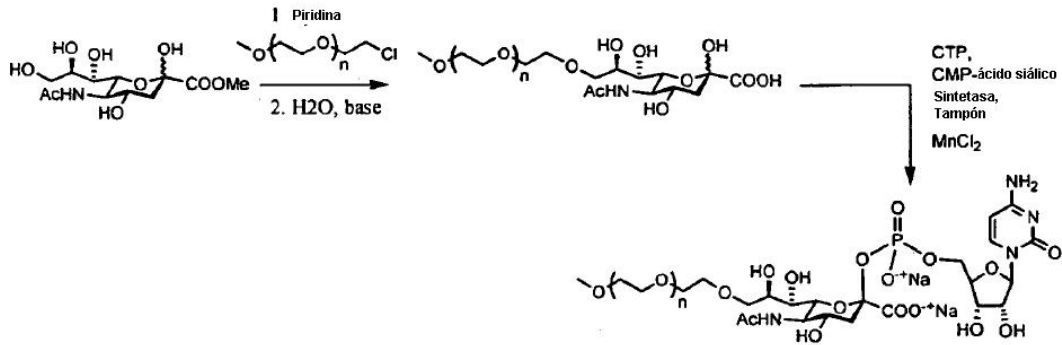
5 En otra realización a modo de ejemplo expuesta en el Esquema 7, un ácido neuramínico protegido con amina y con carboxilo se activa convirtiendo el grupo hidroxilo primario en el correspondiente éster de p-toluenosulfonato y el éster metílico se escinde. El ácido neuramínico activado se convierte en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

Esquema 7



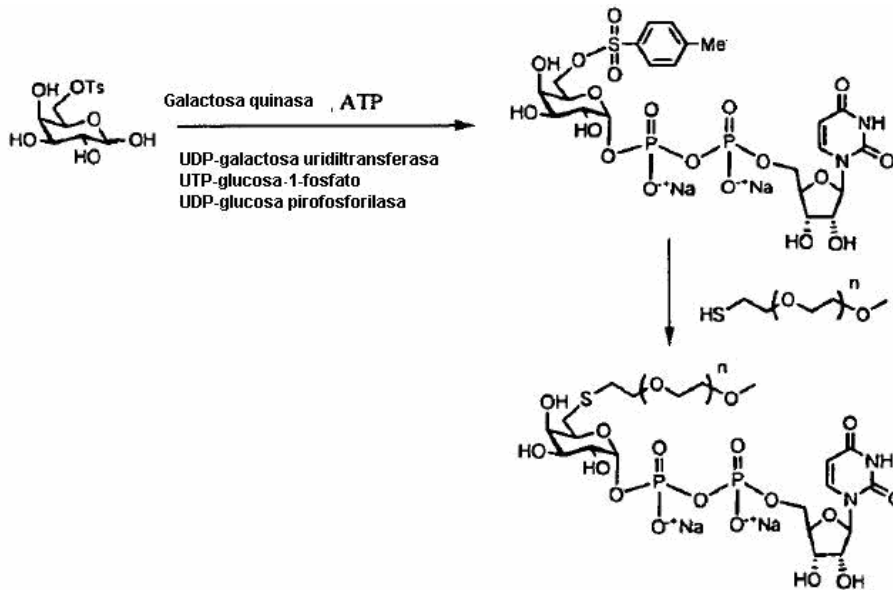
10 En otra realización a modo de ejemplo adicional, como se expone en el Esquema 8, el resto hidroxilo primario de un derivado de ácido neuramínico protegido con amina y con carboxilo se alquila usando un PEG electrofílico, tal como cloro-PEG. Después se escinde el éster metílico y el PEG-azúcar se convierte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

Esquema 8



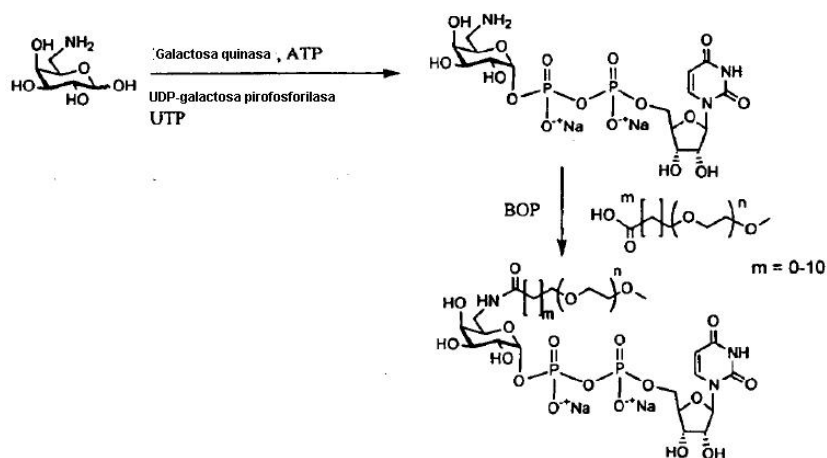
5 Los glicanos distintos al ácido siálico pueden derivarse con PEG usando los procedimientos expuestos en el presente documento. Los glicanos derivatizados también están, por sí mismos, dentro del alcance de la invención. Por tanto, el esquema 9 proporciona una vía de síntesis a modo de ejemplo a un azúcar de nucleótido de galactosa PEGilada. El grupo hidroxilo primario de la galactosa se activa como el correspondiente éster de toluenosulfonato, que después se convierte en un azúcar del nucleótido.

Esquema 9



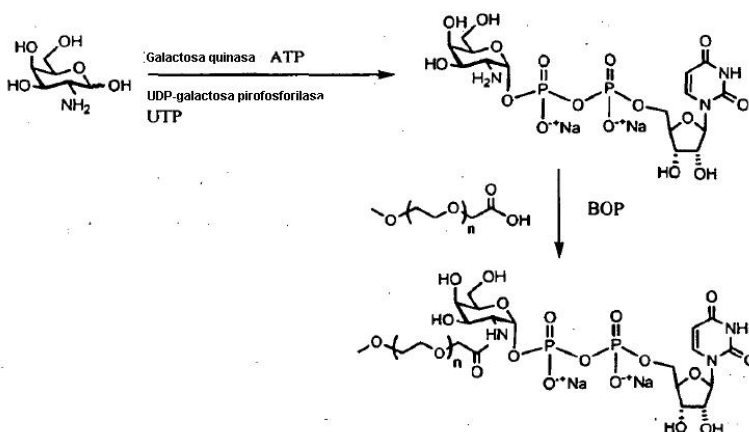
10 El esquema 10 establece una vía a modo de ejemplo para preparar un derivado de galactosa-PEG que se basa en un resto de galactosa-6-amina. Por tanto, la galactosamina se convierte en un azúcar de nucleótido y el resto amina de galactosamina se funcionaliza con un derivado activo de PEG.

Esquema 10



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

Esquema 11



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

20 Purificación de azúcares, azúcares de nucleótidos y derivados

Los azúcares de nucleótidos y derivados producidos por los procedimientos anteriores se pueden usar sin purificar. No obstante, normalmente se prefiere recuperar el producto. Se pueden usar técnicas estándar bien conocidas para la recuperación de sacáridos glucosilados, tales como cromatografía en capa fina o gruesa, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico o filtración por membrana. Se prefiere usar filtración por membrana, más preferentemente usando una membrana osmótica inversa o una o más técnicas de cromatografía en columna

para la recuperación como se trata en lo sucesivo en el presente documento y en la literatura citada en el presente documento. Por ejemplo, la filtración por membrana, en la que las membranas tienen un valor de corte de peso molecular de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 10.000, se puede usar para eliminar proteínas para reactivos que tienen un peso molecular inferior a 10.000 Da. La filtración por membrana u ósmosis inversa se pueden usar para eliminar las sales y/o purificar los sacáridos del producto (véase, por ejemplo, el documento WO 98/15581). Las membranas con nanofiltros son una clase de membranas para ósmosis inversa por las que pasan sales monovalentes pero retienen las sales polivalentes y los solutos son carga mayores de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Dalton, dependiendo de la membrana usada. Por tanto, en una aplicación típica, los sacáridos preparados mediante los procedimientos de la presente invención quedarán retenidos en la membrana y las sales contaminantes pasarán.

G. Grupos de reticulación

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

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

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

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

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

Se usa una variedad de reactivos para modificar los componentes del azúcar modificado con reticulaciones químicas intramoleculares (para revisiones de los reactivos de reticulación y procedimientos de reticulación véanse: Wold, F., *Meth. Enzymol.* 25: 623-651, 1972; Weetall, H. H. y Cooney, D. A., en: *ENZYMES AS DRUGS*. (Holcenberg, y Roberts, eds.) pp. 395-442, Wiley, New York, 1981; Ji, T. H., *Meth. Enzymol.* 91: 580-609, 1983; Mattson y col., *Mol. Biol. Rep.* 17: 167-183, 1993, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia). Los reactivos de reticulación preferidos derivan de varios reactivos de reticulación de longitud cero, homobifuncionales y heterobifuncionales. Los reactivos de reticulación de longitud cero incluyen conjugación directa de dos grupos químicos intrínsecos sin introducción de material extrínseco. Los agentes que catalizan la formación de un puente

5 disulfuro pertenecen a esta categoría. Otro ejemplo son los reactivos que inducen la condensación de un carboxilo y un grupo amino primario para formar un enlace amida, tales como carbodiimidas, etilcloroformiato, reactivo de Woodward K (2-etil-5-fenilisoxazolio-3'-sulfonato) y carbonildiimidazol. Además de estos reactivos químicos, la enzima transglutaminasa (glutamil-péptido γ -glutamyltransferasa; EC 2.3.2.13) se puede usar como reactivo de reticulación de longitud cero. Esta enzima cataliza las reacciones de transferencia de acilo en los grupos carboxamida de los residuos glutamínico unidos a proteína, normalmente con un grupo amino primario como sustrato. Reactivos homo y heterobifuncionales preferidos contienen dos sitios idénticos o dos diferentes, respectivamente, que pueden ser reactivos para grupos amino, sulfhidrilo, guanidino, indol o no específicos.

2. Sitios específicos preferidos de reactivos de reticulación

10 a. Grupos reactivos con amino

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

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

20 Los imidoésteres son los reactivos de acilación más específicos para la reacción con los grupos amina de los componentes de azúcar modificados. A un pH entre 7 y 10, los imidoésteres solo reaccionan con aminas primarias. Las aminas primarias atacan los imidatos nucleofílicamente para producir un intermedio que rompe la amidina a un pH alto o a un nuevo imidato a un pH bajo. El nuevo imidato puede reaccionar con otra amina primaria, por tanto reticulando dos grupos amino, un caso de un imidato supuestamente monofuncional que reacciona bifuncionalmente. El producto principal de la reacción con las aminas primarias es una amidina que es una base más fuerte que la amina original. Por tanto, la carga positiva del grupo amino original se retiene.

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

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

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

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

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

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

b. Grupos reactivos con sulfhidrilo

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

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

Los haluros de alquilo reaccionan con grupos sulfhidrilo, imidazoles y amino. A un pH de neutro a ligeramente

alcalino, los haluros de alquilo reaccionan principalmente con los grupos sulfhidrilo para formar enlaces tioéter estables. A un pH mayor, la reacción con los grupos amino se ve favorecida.

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

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

c. Residuo reactivo con carboxilo

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

3. Sitios no específicos preferidos en reactivos de reticulación

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

15 Reticuladores a modo de ejemplo no específicos incluyen grupos fotoactivables completamente inertes en la oscuridad que se convierten en especies reactivas tras la absorción de un fotón de la energía adecuada. En una realización preferida, los grupos fotoactivables se seleccionan de precursores de nítrenos generados tras el calentamiento o fotólisis de las azidas. Los nítrenos deficientes en electrones son extremadamente reactivos y pueden reaccionar con diversos enlaces químicos, incluyendo N-H, O-H, C-H, and C=C. Aunque se pueden usar tres
20 tipos de azidas (derivados arilo, alquilo y acilo), las arilazidas son actualmente las preferidas. La reactividad de las arilazidas tras la fotólisis es mejor con enlaces N-H y O-H que con C-H. Los arilnítrenos deficientes en electrones expanden el anillo rápidamente para formar deshidroazepinas, que tienden a reaccionar con nucleófilos en lugar de formar productos de inserción C-H. La reactividad de las arilazidas se puede aumentar mediante la presencia de sustituyentes aceptores de electrones tales como grupos nitro o hidroxilo en el anillo. Dichos sustituyentes empujan
25 la máxima absorción de arilazidas a una longitud de onda más larga. Las arilazidas sin sustituir tienen un máximo de absorción en el intervalo de 260-280 nm, mientras que el hidroxilo y las nitroarilazidas absorben significativamente la luz más allá de 305 nm. Por tanto, los hidroxilo y las nitroarilazidas son más preferibles ya que permiten usar condiciones de fotólisis menos dañinas para el componente de afinidad que las arilazidas sin sustituir.

30 En otra realización preferida, los grupos fotoactivables se seleccionan de arilazidas fluoradas. Los productos de la fotólisis de las arilazidas fluoradas son arilnítrenos, todos los cuales sufren las reacciones características de este grupo, incluida la inserción del enlace C-H, con una eficiencia elevada (Keana y col., J Org. Chem. 55: 3640-3647, 1990).

En otra realización, los grupos fotoactivables se seleccionan de residuos de benzofenona. Los reactivos de benzofenona normalmente dan rendimientos de reticulación mayores que los reactivos de arilazida.

35 En otra realización preferida, los grupos fotoactivables se seleccionan de compuestos diazo que forman un carbeno deficiente en electrones tras fotólisis. Estos carbenos sufren diversas reacciones, incluida la inserción en enlaces C-H, la adición a dobles enlaces (incluidos sistemas aromáticos), atracción de hidrógenos y coordinación con los centros nucleófilos para dar iones carbono.

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

4. Reactivos homobifuncionales

a. Reticuladores homobifuncionales reactivos con aminas primarias

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

50 Ejemplos no limitantes preferidos de ésteres de NHS homobifuncionales incluyen glutamato de disuccinimidilo (DSG), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS), tartarato de disuccinimidilo (DST), tartarato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis-2-(succinimidoxicarboniloxi)etilsulfona (BSOCOES), bis-2-(sulfosuccinimidoxi-carboniloxi)etilsulfona (sulfo-BSOCOES), glicolbis(succinimidilsuccinato) de etileno (EGS), glicolbis(succinimidilsuccinato) de etileno (EGS), ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP) y ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato) (sulfo-DSP). Ejemplos no limitantes preferidos de imidoésteres homobifuncionales

incluyen malonimidato de dimetilo (DMM), succinimidato de dimetilo (DMSC), adipimato de dimetilo (DMS), pimelimidato de dimetilo (DMP), suberimidato de dimetilo (DMS), dimetil-3,3'-oxidipropionimidato (DODP), dimetil-3,3'-metilendioxi)dipropionimidato (DMDP), dimetil-3'-(dimetilendioxi)dipropionimidato (DDDP), dimetil-3,3'-(tetrametilendioxi)-dipropionimidato (DTDP) y dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP).

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

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

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

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

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

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

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

- 20 b. Reactivos reticuladores homobifuncionales con grupos sulfhidrilo libres

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

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

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

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

c. Reticuladores fotoactivables homobifuncionales

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

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

- 40 5. Reactivos heterobifuncionales

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

d. Grupos de unión escindibles

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

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

e. Conjugación de azúcares modificados a péptidos

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

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

La presente invención se pone en práctica usando una única glucosiltransferasa o una combinación de glucosiltransferasas. Por ejemplo, se puede usar una combinación de una sialiltransferasa y una galactosiltransferasa. En dichas realizaciones que usan más de una enzima, las enzimas y sustratos se combinan, preferentemente, en una mezcla de reacción inicial, o las enzimas y reactivos para una segunda reacción enzimática se añaden al medio de reacción una vez que la reacción enzimática está completa o casi completa. Realizando dos

reacciones enzimáticas en secuencia en un único vaso, los rendimientos globales mejoran sobre los procedimientos en los que se aísla una especie intermedia. Además, se reduce la limpieza y la eliminación de los disolventes y subproductos sobrantes.

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

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

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

25 En otra realización, al menos dos de las enzimas usadas en la reacción son glucosiltransferasas y, de nuevo, se añaden azúcares modificados diferentes a los glicanos unidos a N o unidos a O en el péptido. Esta realización es útil cuando se van a añadir dos azúcares modificados diferentes a los glicanos de un péptido, pero cuando es importante para separar espacialmente unos de otros los azúcares modificados en el péptido. Por ejemplo, si los azúcares modificados comprenden moléculas voluminosas, incluidos PEG y otras moléculas como una molécula ligadora, puede ser preferible este procedimiento. Los azúcares modificados se pueden añadir de forma simultánea a las estructuras de glicano sobre un péptido o se pueden añadir secuencialmente. En una realización a modo de ejemplo, la incubación con ST3Gal3 y CMP-AS-PEG sirve para añadir ácido siálico-PEG a los glicanos unidos a N, mientras que la incubación con ST3Gal1 and CMP-AS-bis-fosfonato sirve para añadir ácido siálico-bis-fosfonato a los glicanos unidos a O (Figura 22C).

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

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

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

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

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

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

En el siguiente debate, la invención se ejemplifica mediante la conjugación de los restos de ácido siálico modificados a un péptido glucosilado. El ácido siálico modificado a modo de ejemplo está marcado con PEG. El centro de la siguiente discusión sobre el uso de ácido siálico modificado con PEG y péptidos glucosilados es para claridad de ilustración y no está previsto que implique que la invención esté limitada a la conjugación de estos dos componentes. Un experto entiende que el debate es, generalmente, aplicable a las adiciones de restos de glicosilo modificados aparte del ácido siálico. Además, el debate es igualmente aplicable a la modificación de una unidad de glicosilo con agentes distintos al PEG, incluidos otros polímeros solubles en agua, restos terapéuticos y biomoléculas.

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

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

En una realización, un aceptor para la sialiltransferasa está presente sobre el péptido que se va a modificar tras la síntesis *in vivo* del péptido. Dichos péptidos se pueden sialilar usando los procedimientos reivindicados sin la modificación previa del patrón de glucosilación del péptido. Como alternativa, los procedimientos de la invención se pueden usar para sialilar un péptido que no incluye un aceptor adecuado; uno primero modifica el péptido para incluir un aceptor por procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. En una realización a modo de ejemplo se añade un residuo GalNAc mediante la acción de una GalNAc transferasa.

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

En otra realización más, los oligosacáridos unidos a péptido se "recortan" primero todo o en parte para exponer un aceptor a la sialiltransferasa o un resto al cual se pueden añadir uno o más residuos adecuados para obtener un aceptor adecuado. Enzimas tales como glucosiltransferasas y endoglucosidasas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.716.812) son útiles para las reacciones de unión y recorte. Un debate detallado del "recorte" y remodelado de los glicanos unidos a N y unidos a O se proporciona en otros lugares del presente documento.

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

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

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

- 5 En otro ejemplo más, se añade un polímero soluble en agua sobre un residuo Gal usando un ácido siálico modificado.

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

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

La Figura 16 es un esquema similar al mostrado en la Figura 13 en el que la estructura de alta manosa se recorta a la primera GlcNAc unida a la Asn del péptido. En un ejemplo, la GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc) está conjugada con una GlcNAc portadora de un polímero soluble en agua.

En otro ejemplo, la GlcNAc del residuo GlcNAc-(Fuc) está modificada con Gal, que es portadora de un polímero soluble en agua. En otra realización más, la GlcNAc está modificada con Gal, seguida de conjugación al Gal de un ácido siálico modificado con polímero soluble en agua.

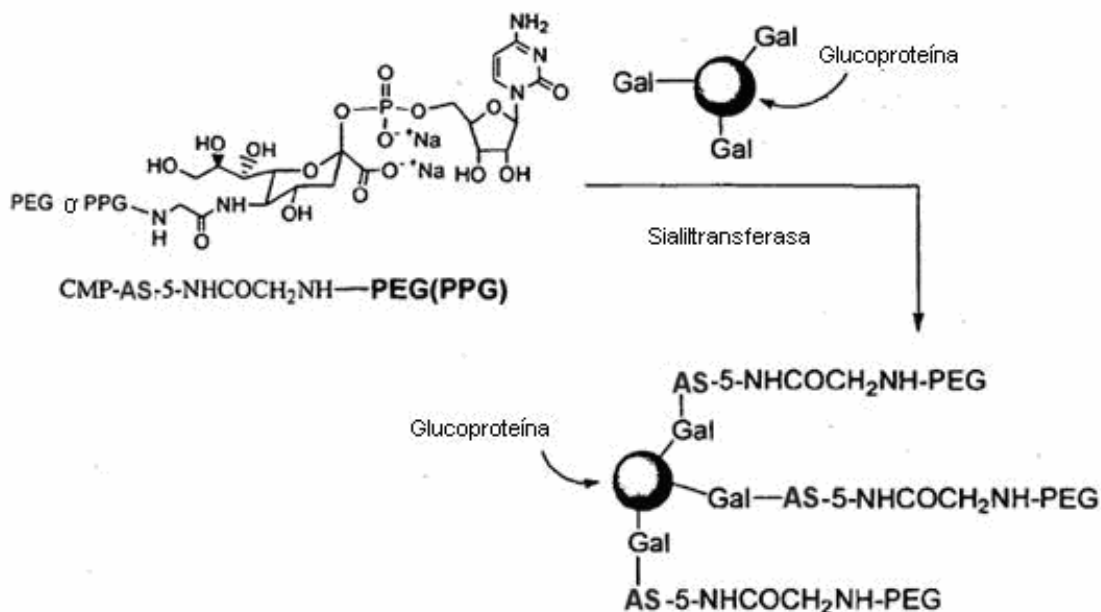
25 Otras realizaciones a modo de ejemplos se exponen en las Figuras 17-21. Una ilustración de la matriz de los tipos de reacción con los que la presente invención se puede poner en práctica se proporciona en cada una de las figuras mencionadas anteriormente.

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

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

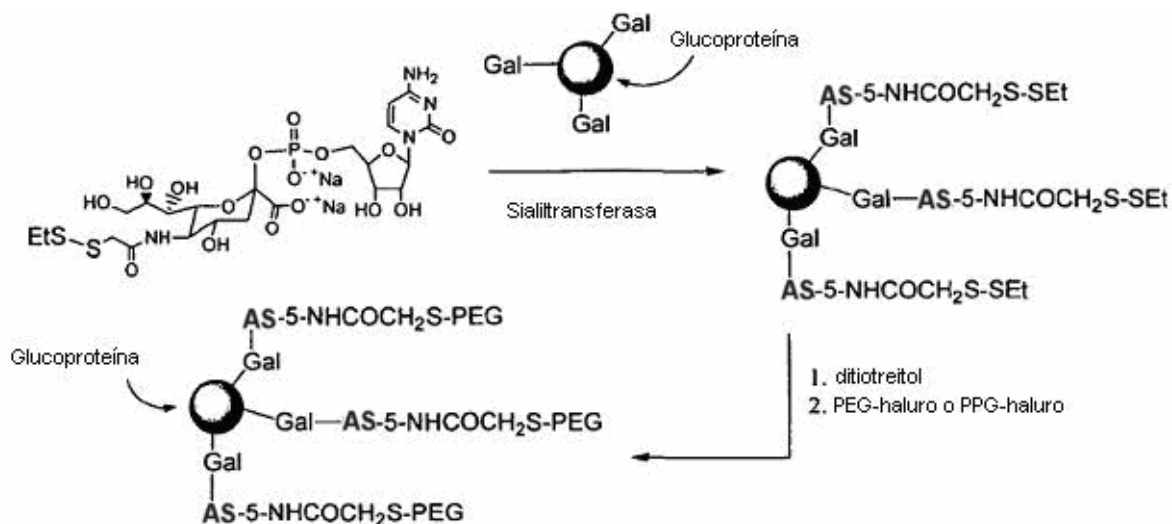
35

Esquema 12



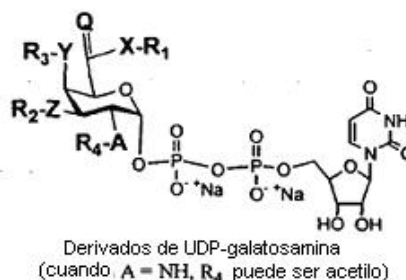
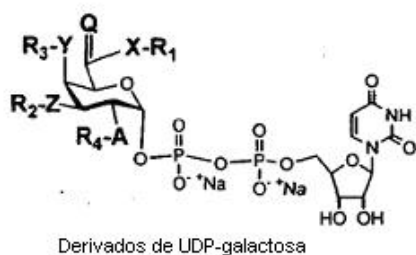
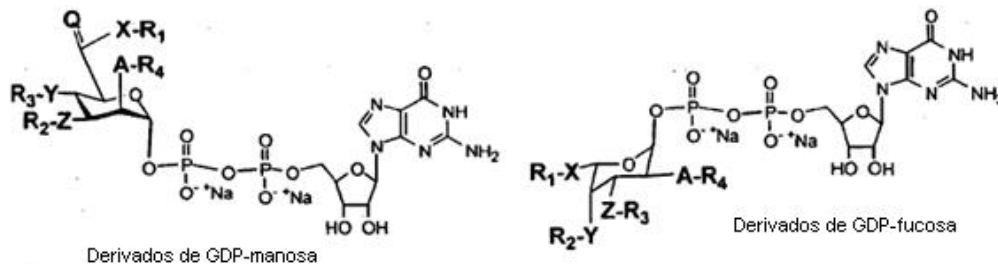
En otro abordaje adicional, resumido en el Esquema 13, una funcionalidad reactiva enmascarada está presente en el ácido siálico. El grupo reactivo enmascarado no está, preferentemente, afectado por las condiciones usadas para unir el ácido siálico modificado al péptido. Tras la unión covalente del ácido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

Esquema 13



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

Tabla 3



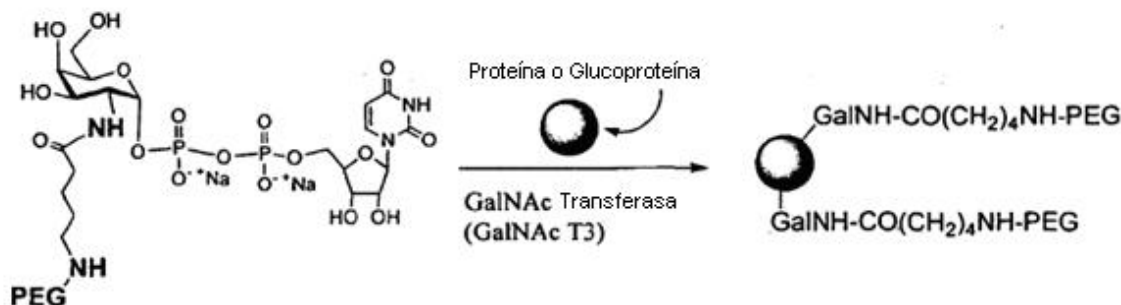
<p>X = O, NH, S, CH₂, N-(R₁₋₅)₂. Y = X; Z = X; A = X; B = X.</p> <p>Q = H₂, O, S, NH, N-R.</p> <p>R, R₁₋₄ = H, Ligador-M, M</p> <p>M = Ligando de interés</p>	<p>Ligando de interés = acil-PEG, acil-PPG, alquil-PEG, acil-alquil-PEG, acil-alquil-PEG, carbamoil-PEG, carbamoil-PPG, PEG, PPG, acil-aril-PEG, acil-aril-PPG, aril-PEG, aril-PPG, Manosa-6-fosfato, heparina, heparán, SLex, manosa, FGF, VFGF, proteína, condroitina, queratán, albúmina, integrinas, péptidos etc.</p>	<p>JF,</p>
--	--	------------

- 5 En una realización a modo de ejemplo adicional, la UDP-galactosa-PEG reacciona con β1,4-galactosiltransferasa de leche bovina de modo que transfiere la galactosa modificada a la estructura de N-acetilglucosamina terminal adecuada. Los residuos de GlcNAc terminales sobre el glucopéptido se pueden producir durante la expresión, como puede pasar en los sistemas de expresión de mamíferos, insectos, plantas u hongos, pero también se pueden producir tratando el glucopéptido con una sialidasa y/o glucosidasa y/o glucosiltransferasa, según sea necesario.
- 10 En otra realización a modo de ejemplo se usa una GlcNAc transferasa, como GnTI-V, para transferir PEGilada-GlcNc a un residuo de manosa en un glucopéptido. En otra realización a modo de ejemplo adicional, las estructuras de glucano unidas a N y/o unidas a O se eliminan enzimáticamente de un glucopéptido para exponer un aminoácido o un residuo glicosilo terminal que después de conjuga con el azúcar modificado. Por ejemplo, se usa una endoglucanasa para eliminar las estructuras unidas a N de un glucopéptido para exponer una GlcNAc terminal como GlcNAc unida a Asn en el glucopéptido. UDP-Gal-PEG y la galactosiltransferasa adecuada se usan para introducir la funcionalidad galactosa-PEG o -PPG en la GlcNAc expuesta.
- 15

En una realización alternativa, el azúcar modificado se añade directamente al armazón peptídico usando una glucosiltransferasa conocida para transferir residuos de azúcar al armazón peptídico. Esta realización de ejemplo se

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

Esquema 14



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

Direccionamiento peptídico con manosa 6-fosfato

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

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

Tabla 4: Enfermedades del almacenamiento lisosómico y defectos enzimáticos asociados

Enfermedad	Defecto enzimático
Enfermedad de Pompe	α-glucosidasa ácida (maltasa ácida)
MPSI* (enfermedad de Hurler)	α-L-iduronidasa
MPSII (enfermedad de Hunter)	iduronato sulfatasa
MPSIII (Sanfilippo)	heparán N-sulfatasa

(continuación)

Enfermedad	Defecto enzimático
MPS IV (Morquio A)	galactosa-6-sulfatasa
MPS IV (Morquio B)	β -galactosidasa ácida
MPS VII (enfermedad de Sly)	β -glucuronidasa
Enfermedad de células I	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa
Enfermedad de Schindler	α -N-acetilgalactosaminidasa (α -galactosidasa B)
Enfermedad de Wolman	Lipasa ácida
Enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol	Lipasa ácida
Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida lisosomal
Enfermedad de Niemann-Pick	esfingomielinasa ácida
Enfermedad de Gaucher	glucocerebrosidasa
Enfermedad de Krabbe	galactosilceramidasa
Enfermedad de Fabry	α -galactosidasa A
GM1 gangliosidosis	β -galactosidasa ácida
Galactosialidosis	β -galactosidasa y neuraminidasa
Enfermedad de Tay-Sach	hexosaminidasa A .
Enfermedad de Sandhoff	hexosaminidasa A y B

*MPS = mucopolisacaridosis

De Duve sugirió primero que la sustitución de la enzima lisosómica ausente con una enzima exógena biológicamente activa podría ser un abordaje viable al tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico (De Duve, Fed. Proc. 23: 1045 (1964). Desde entonces, en varios estudios se ha sugerido que el tratamiento de sustitución enzimático puede ser beneficioso para tratar varias enfermedades de almacenamiento lisosómico . El mejor éxito se ha mostrado en individuos con la enfermedad de Gaucher de tipo 1, que han sido tratados con la enzima exógena (β -glucocerebrosidasa), preparada a partir de placenta (Ceredase™) o. más recientemente, de forma recombinante (Cerezyme™) Se ha sugerido que la sustitución enzimática puede también ser beneficiosa para tratar la enfermedad de Fabry, así como otras enfermedades de almacenamiento lisosómico. Véanse, por ejemplo, Dawson y col., Ped. Res. 7(8): 684-690 (1973) (in vitro) y Mapes y col. Science 169: 987 (1970) (in vivo). Se han notificado ensayos clínicos de tratamiento de sustitución enzimática para pacientes de Fabry usando perfusiones de plasma normal (Mapes y col., Science 169: 987-989 (1970)), α -galactosidasa A purificada de placenta (Brady y col., N Eng. J. Med. 279: 1163 (1973)); o α -galactosidasa A purificada de bazo o plasma (Desnick y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76: 5326-5330 (1979)) y han demostrado la eficacia bioquímica de la sustitución enzimática directa para la enfermedad de Fabry. Estos estudios indican el potencial de eliminación, o de reducir significativamente, el almacenamiento patológico de glucolípidos mediante la repetida sustitución de la enzima. Por ejemplo, en un estudio (Desnick y col., ant.), la inyección intravenosa de la enzima purificada tuvo como resultado una reducción temporal de los niveles de plasma del sustrato lipídico almacenado, globotriasilceramida.

En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de procedimientos para proporcionar cantidades suficientes de enzimas lisosomales biológicamente activas, tales como la α -galactosidasa a, a las células deficientes en la misma. Recientemente se han intentado abordajes recombinantes para abordar estas necesidades, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº . 5.658.567; 5.580.757; Bishop y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 83: 4859-4863 (1986); Medin y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 93: 7917-7922 (1996); Novo, F. J., Gene Therapy. 4: 488-492 (1997); Ohshima y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 94: 2540-2544 (1997); y Sugimoto y col., Human Gene Therapy 6: 905-915, (1995). A través de la dirección mediada por la manosa-6-fosfato de péptidos terapéuticos a los lisosomas, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para liberar cantidades suficientes de péptidos lisosomales biológicamente activos a las células deficientes.

Por tanto, en una realización a modo de ejemplo, la presente invención proporciona un péptido de acuerdo con la Tabla 6 que se obtiene con manosa-6-fosfato (Figura 23 y Figura 24). El péptido se puede preparar de forma recombinante o química. Además, el péptido puede tener la secuencia natural completa o puede estar modificado por, por ejemplo, truncamiento, extensión o puede incluir sustituciones o deleciones. Ejemplos de proteínas que se remodelan usando un procedimiento de la presente invención incluyen la glucocerebrosidasa, la β -glucosidasa, la α -galactosidasa A, la α -glucosidasa ácida (maltasa ácida). Péptidos modificados representativos que están en uso clínico incluyen Ceredase™, Cerezyme™, y Fabryzyme™. Un grupo glicosilo en péptidos modificados y clínicamente relevantes también se puede alterar usando un procedimiento de la invención. La manosa-6-fosfato está unida al péptido a través de un grupo de unión a glicosilo. En una realización a modo de ejemplo, el grupo de unión a glicosilo deriva de ácido siálico. Ejemplos de grupos de unión a glicosilo derivados de ácido siálico se exponen en la Tabla 2, en los que uno o más de los restos "R" son manosa-6-fosfato o un grupo espaciador que

tiene uno o más restos de manosa-6-fosfato unidos al mismo. El resto de ácido siálico modificado es, preferentemente, e residuo terminal de un oligosacáridos unido a la superficie del péptido (Figura 25).

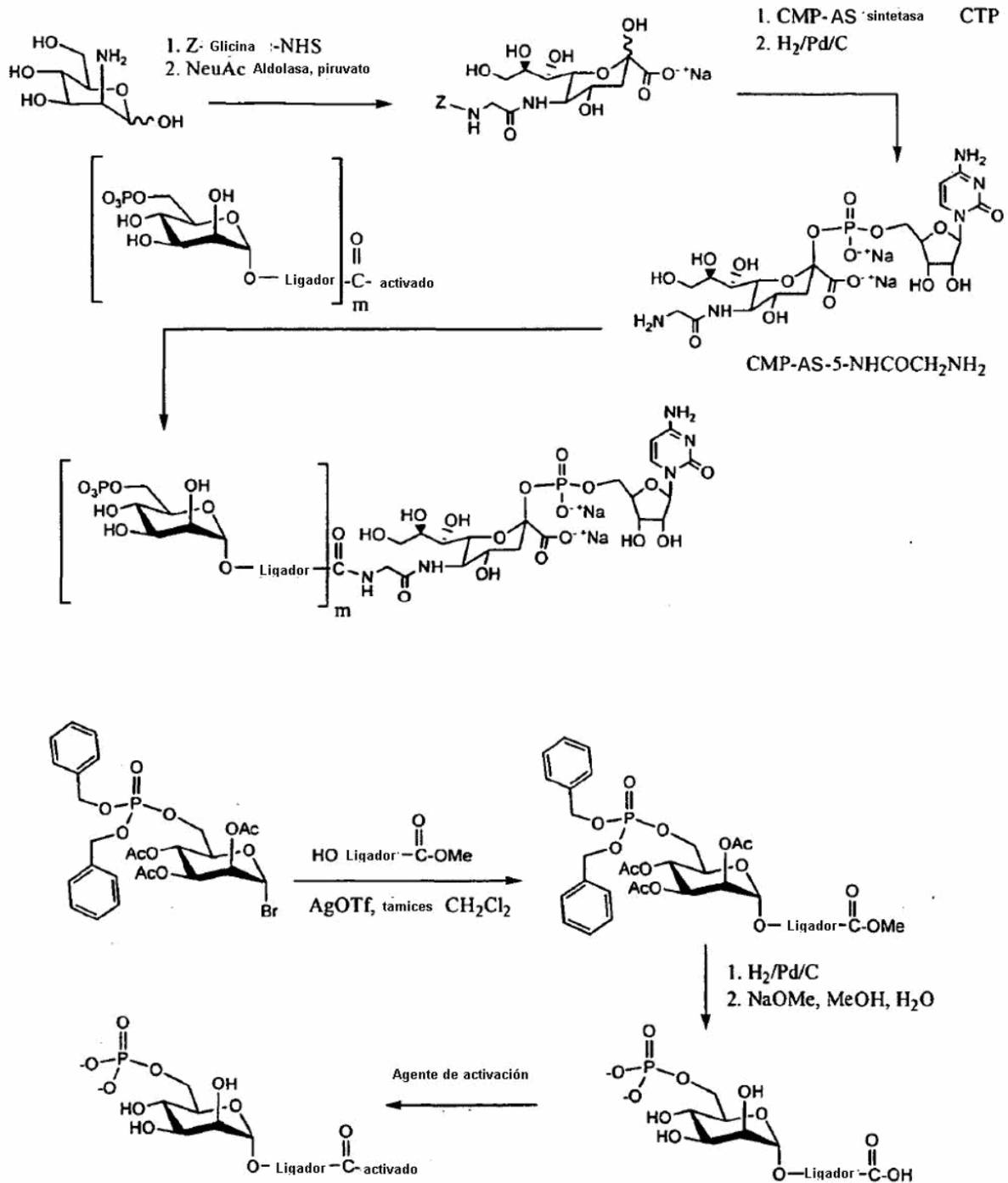
5 Además de la manosa-6-fosfato, los péptidos de la invención pueden derivarse adicionalmente con un resto tal como un polímero soluble en agua, un resto terapéutico o un resto dirigido adicional. Los procedimientos para unir estos y otros grupos se indican en el presente documento. En una realización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

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

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

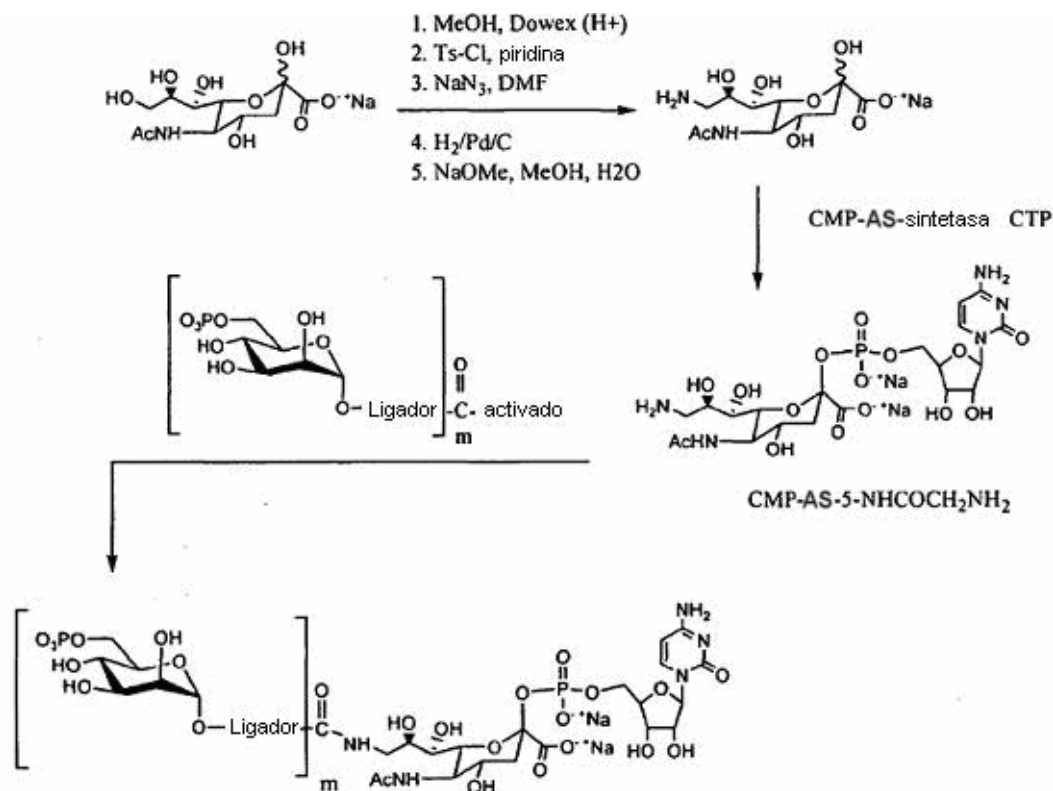
20

Esquema 15



5 En otra realización a modo de ejemplo, como se muestra en el siguiente esquema (Esquema 16), un ácido siálico N-acetilado se convierte en una amina mediante manipulación del resto piruvilo. Por tanto, el hidroxilo primario se convierte en un éster sulfonato y reacciona con azida sódica. La azida se reduce catalíticamente en la correspondiente amina. El azúcar se convierte después en su análogo nucleotídico y se acopla, a través del grupo amina, a la manosa-6-fosfato derivada de la rama ligadora preparada como se ha tratado anteriormente.

Esquema 16



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

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

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

II. Péptidos /Glucopéptidos de la invención

En una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende múltiples copias de un solo péptido que tiene un núcleo de trimanosilo elemental como la estructura de glicano primaria unida al mismo. En realizaciones preferidas, el péptido puede ser una molécula terapéutica. La forma natural del péptido puede comprender glicanos unidos a N complejos o puede ser un glicano rico en manosa. El péptido puede ser un péptido
 25 de mamífero y es, preferentemente, un péptido de ser humano.

Péptidos a modo de ejemplo cuyos glicanos se pueden remodelar usando los procedimientos desvelados se indican en la Figura 1.

Tabla 5. Péptidos desvelados para la remodelación de glicanos

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

Tabla 6. Péptidos desvelados para remodelado de glicano

Factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF)	Interleucina-2 (IL-2)
Interferón α	Factor VIII
Interferón β	hrDNasa
Factor de coagulación VII	Insulina
Factor de coagulación IX	Proteína de superficie de la Hepatitis B (HbsAg)
Hormona estimulante de los folículos(FSH)	Hormona de crecimiento humana (HGH)
Eritropoyetina (EPO)	Uroquinasa
Factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)	Fusión del receptor de TN -IgG Fc (Enbrel™)
Interferón γ S	MAB-Her-2 (Herceptin™)
Inhibidor de la α 1 proteasa (α 1 antitripsina)	MAB-proteína F del virus sincitial respiratorio (Synagis™)
Activador del plasminógeno tisular (TPA)	MAB-CD20 (Rituxan™)
Glucocerebrosidasa (Cerezyme™)	MAB-TNF α (Remicade™)
	MAB-Glucoproteína IIb/IIIa (Reopro™)

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

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

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

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

La presente invención contempla el uso de péptidos en los que el (los) sitio(s) de la(s) cadena(s) de glicano del péptido se ha(n) alterado con respecto al péptido natural. Normalmente, las cadenas de glicano unidas a N se unen a la estructura del péptido primario en los restos de la asparagina en los que el resto de la asparagina está comprendido en una secuencia de aminoácidos que se reconoce por una glicosiltransferasa unida a membrana en el retículo endoplásmico (ER). Normalmente, el sitio de reconocimiento en la estructura peptídica primaria es la secuencia asparagina-X-serina/treonina en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico. Aunque este sitio de reconocimiento es típico, la invención abarca además péptidos que tienen cadenas de glicano unidas a N y otros sitios de reconocimiento en los que se añaden cadenas unidas a N utilizando glicosiltransferasas naturales o recombinantes.

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

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

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

Además, el ácido nucleico que codifica una estructura peptídica primaria se puede sintetizar *in vitro*, utilizando técnicas normalizadas. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico se puede sintetizar en una "máquina génica" utilizando protocolos tales como el procedimiento de la fosforamida. Si se requiere sintetizar químicamente ADN

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

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

En general, la mutagénesis dirigida al emplazamiento se lleva a cabo en primer lugar obteniendo un vector monocatenario o fundiendo las dos hebras de un vector bicatenario que incluye en el interior de su secuencia una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Un cebador de oligonucleótido que soporta la secuencia mutada deseada se prepara por lo general de forma sintética. A continuación, este cebador se hibrida con el vector monocatenario, y se somete a enzimas de polimerización del ADN tales como el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli*, a fin de completar la síntesis de la hebra que soporta la mutación. De esta manera, se forma un heteroduplete en el que una hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hebra soporta la mutación deseada. Este vector heteroduplete se utiliza a continuación para transformar o transfectar las células adecuadas, tales como las células de *E. coli*, y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que soportan la disposición de la secuencia mutada. Kunkel y col. (1987, Kunkel y col., Methods Enzymol. 154: 367-382) diseñaron un esquema de selección genética para enriquecer los clones que incorporan el oligonucleótido mutagénico. De forma alternativa, el uso de la PCRTM con enzimas termoestables comercialmente disponibles tales como la polimerasa Taq se puede emplear para incorporar un cebador de oligonucleótido mutagénico en un fragmento de ADN amplificado que se puede clonar a continuación en un vector de clonación o expresión adecuado. Los procedimientos de la mutagénesis mediada por la PCRTM de Tomic y col. (1990, Nucl. Acids Res., 12: 1656) y Uppender y col. (1995, Biotechniques, 18: 29-31) proporcionan dos ejemplos de dichos protocolos. Se puede utilizar también una PCRTM que emplea una ligasa termoestable además de una polimerasa termoestable para incorporar un oligonucleótido mutagénico fosforilado en un fragmento de ADN amplificado que se puede clonar a continuación en un vector de clonación o de expresión adecuado. El procedimiento de mutagénesis descrito por (1994, Biotechniques 16:410-412) proporciona un ejemplo de uno de dichos protocolos.

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

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

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

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

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

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

En otro enfoque más, se pueden encontrar sitios ventajosos para nuevos sitios unidos a O en un péptido creando bibliotecas del péptido que contiene diversos sitios unidos a O nuevos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos consenso para la adición de N-acetilgalactosamina mediante una N-acetilgalactosaminiltransferasa depende de la transferasa específica utilizada. Se puede realizar un barrido de la secuencia de aminoácidos de un péptido para identificar los grupos de aminoácidos contiguos que se pueden mutar para generar sitios potenciales para la adición de cadenas de glicano unidas a O. Se pueden generar estas mutaciones utilizando los procedimientos normalizados conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica tal como se ha descrito anteriormente. Con el fin de determinar si cualquier sitio de glicosilación descubierto se encuentra realmente glicosilado, cada péptido mutado recombinante se expresa a continuación en un sistema de expresión adecuado y se analiza posteriormente para la adición del sitio y/o la presencia de una cadena de glicano unida a O.

C. Síntesis química de péptidos

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

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

Los péptidos útiles en la presente invención se pueden sintetizar mediante síntesis en fase sólida exclusiva, procedimientos en fase sólida parciales, condensación fragmentaria o síntesis clásica en disolución. Estos procedimientos de síntesis son bien conocidos de los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1963), Stewart y col., "Solid Phase Peptide Synthesis" (2ª Edición), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer y Rapp, Chem. Pept. Prot. 3:3 (1986), Atherton y col., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press 1989), Fields y Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis", Methods in Enzymology Volume 289 (Academic Press 1997), y Lloyd-Williams y col., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Peptides

(CRC Press, Inc. 1997)). Están también normalizadas las variaciones en las estrategias de síntesis química total tales como la "ligadura química natural" y la "ligadura peptídica expresada" (véanse, por ejemplo, Dawson y col., Science 266: 776 (1994); Hackeng y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94: 7845 (1997), Dawson, Methods Enzymol. 287: 34 (1997), Muir y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:6705 (1998), y Severinov y Muir, J. Biol. Chem. 273: 16205 (1998)). También útiles son los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida desarrollados por Gryphon Sciences, South San Francisco, CA. Véanse las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 6.326.468, 6.217.873, 6.174.530, y 6.001.364, todos los cuales se incorporan en su totalidad por referencia en el presente documento.

D. Modificaciones posteriores a la traducción

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

Los expertos en la técnica conocen bien dichas modificaciones que se han descrito con gran detalle en la bibliografía específica. Algunas modificaciones particularmente comunes, glicosilación, unión lipídica, sulfatación, gammacarboxilación o restos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP, por ejemplo, se describen en los textos más básicos, tales como Peptides--Structure and Molecular Properties, 2^a Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993). Muchas revisiones detalladas están disponibles sobre este sujeto, tales como la de Wold, F., Post-translational Covalent Modification of Peptides, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York 1-12 (1983); Seifter y col. (Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990)) y Rattan y col. (Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992)).

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

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

E. Péptidos de fusión /péptidos

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

Dichos péptidos de fusión son bien conocidos en la técnica, y los procedimientos de creación son bien conocidos de los expertos en la técnica. Por ejemplo, se ha preparado un péptido de fusión humano del interferón α humano en el que el péptido resultante tiene los beneficios terapéuticos del interferón α combinados con una vida larga en

circulación de la albúmina, creando de esta forma una composición terapéutica que permite una frecuencia de dosificación reducida y unos efectos secundarios en pacientes potencialmente reducidos. Véanse, Albuferon™ de Human Genome Sciences, Inc. y la Patente de los Estados Unidos N° 5.766.883. Otros péptidos de fusión incluyen las moléculas de anticuerpo que se describen en otra parte en el presente documento.

5 F. Generación de moléculas “biológicamente activas” más pequeñas

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

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

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

G. generación de péptidos novedosos

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

H. mutaciones

1. Mutación de diseño lógico

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

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

mutagénesis de inserción del enlazador, la digestión con la nucleasa Bal31, y la mutagénesis de barrido del enlazador, entre otros procedimientos bien conocidos de los expertos en la técnica (Sambrook y col., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

5 Se ha utilizado satisfactoriamente el diseño lógico del péptido para aumentar la estabilidad de las enzimas con respecto a la termoinactivación y a la oxidación. Por ejemplo, se ha mejorado la estabilidad de una enzima mediante la eliminación de restos de asparagina en la α -amilasa (Declerck y col., 2000, J. Mol. Biol. 301: 1041-1057), la introducción de elementos estructurales más rígidos tales como prolina en la α -amilasa (Igarashi y col., 1999, Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 1535-1540) y la D-xilosa isomerasa (Zhu y col., 1999, Peptide Eng. 12: 635-638). Además, la introducción de contactos hidrófobos adicionales estabiliza la 3-isopropilmalto deshidrogenasa (Akanuma y col., 10 1999, Eur. J. Biochem. 260: 499-504) y la formiato deshidrogenasa obtenidas de *Pseudomonas* sp. (Rojkova y col., 1999, FEBS Lett. 445: 183-188). Los mecanismos que retrasan el efecto estabilizante de estas mutaciones son generalmente aplicables a muchos péptidos. Se contempla que estas y similares mutaciones sean útiles con respecto a los péptidos remodelados en los procedimientos de la presente invención

2. Técnicas de mutagénesis aleatorias

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

25 En la mutagénesis mediante la PCR se utiliza la fidelidad reducida de la polimerasa Taq para introducir mutaciones aleatorias en un fragmento de ADN clonado (Leung y col., 1989, Technique 1: 11-15). Este es un procedimiento muy poderoso y relativamente rápido para introducir mutaciones aleatorias en una secuencia de ADN. La región de ADN que se va a mutagenizar se amplifica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en condiciones que reducen la fidelidad de la síntesis de ADN mediante la ADN polimerasa Taq utilizando, por ejemplo, una relación dGTP/dATP alterada y añadiendo Mn^{2+} a la reacción de la PCR. El combinado de fragmentos de ADN amplificados se inserta en vectores de clonación adecuados para proporcionar bibliotecas de mutantes aleatorios.

30 La mutagénesis por saturación permite la rápida introducción de un gran número de sustituciones de bases individuales en fragmentos de ADN clonados (Mayers y col., 1985, Science 229: 242). Esta técnica incluye la generación de mutaciones, por ejemplo, mediante tratamiento o irradiación química de ADN monocatenario *in vitro*, y la síntesis de una hebra de ADN complementario. Se puede modular la frecuencia de la mutación modulando la severidad del tratamiento, y se pueden obtener esencialmente todas las sustituciones de bases posibles. Debido a 35 que este procedimiento no implica una selección genética de los fragmentos de mutantes, se obtienen sustituciones neutras, así como aquellas que alteran la función. La distribución de mutaciones puntuales no está sesgada hacia elementos de secuencias conservados.

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

a. Evolución dirigida

50 Se pueden generar también péptidos útiles en los procedimientos de la invención utilizando técnicas de "evolución dirigida". A diferencia de las técnicas de mutagénesis dirigida al emplazamiento en las que se requiere el conocimiento de la estructura del péptido, en la actualidad existen estrategias para generar bibliotecas de mutaciones a partir de las cuales se puede obtener péptidos con propiedades mejoradas sin conocimiento de las características estructurales del péptido. Estas estrategias se conocen generalmente como tecnologías de "evolución dirigida" y son diferentes de los procedimientos de mutagénesis aleatoria tradicionales que implican 55 someter la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de interés a ciclos repetitivos de mutación, cribado y amplificación.

En algunas técnicas de "evolución dirigida", la diversidad de los ácidos nucleicos obtenidos se genera mediante procedimientos de mutación que crean de forma aleatoria mutaciones puntuales en la secuencia de ácido nucleico.

Las técnicas de mutación puntuales incluyen “la PCR propensa a error TM” (Caldwell y Joyce, 1994; PCR Methods Appl. 2: 28-33; y Ke y Madison, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3371-3372), la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos repetidos (Reidhaar-Olson y col., 1991, Methods Enzymol. 208: 564-586), y cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados de mutagénesis aleatoria.

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

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

20 b. Transposición de ADN

Se pueden generar también péptidos novedosos útiles en los procedimientos de la invención utilizando las técnicas de transposición de genes, transposición de motivos, transposición de exones, y/o transposición de codones (denominadas en su conjunto “transposición de ADN”). Las técnicas de transposición del ADN también se pueden
25 emplear para modular las actividades de péptidos útiles en la invención y se pueden utilizar para generar péptidos que tengan la actividad alterada. Véanse, generalmente, las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Stemmer y col. (1994, Nature 370(6488): 389-391); Cramer y col. (1998, Nature 391 (6664): 288-291); Zhang y col. (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(9): 4504-4509); Stemmer y col. (1994, Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (22): 10747-10751), Patten y col. (1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8: 724-33); Harayama, (1998, Trends Biotechnol. 16 (2): 76-82); Hansson y col., (1999, J. Mol. Biol. 287: 265-76); y Lorenzo
30 y Blasco (1998, Biotechniques 24(2): 308-13).

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

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

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

La técnica proporciona también modificaciones incluso más recientes de la técnica básica de transposición del ADN. En un ejemplo, la transposición de exones, exones o combinaciones de exones que codifican dominios específicos de péptidos se amplifican utilizando oligonucleótidos quiméricos. A continuación se recombinan las moléculas amplificadas autocebando el ensamblaje de la PCR (Kolkman y Stemmler, 2001, Nat. Biotech. 19: 423-428). En otro ejemplo, utilizando la técnica de quimeragénesis aleatoria en la construcción de bibliotecas mediante moldes transitorios (RACHITT) se han hibridado fragmentos de ADN parental monocatenario sobre moldes monocatenarios

de longitud completa (Coco y col., 2001, Nat. Biotechnol. 19: 354-359). En otro ejemplo más, el procedimiento de extensión por etapas (StEP), se emplea la termociclación con ciclos de hibridación/extensión muy abreviados para interrumpir repetidamente la polimerización del ADN a partir de moldes flanqueantes (Zhao y col., 1998, Nat. Biotechnol. 16: 258-261). En la técnica conocida como CLERY, se combina la transposición de la familia *in vitro* con la recombinación homóloga *in vivo* en levadura (Abecassis y col., 2000, Nucleic Acids Res. 28: E88). Para maximizar la recombinación intergénica, el ADN monocatenario procedente de hebras complementarias de cada uno de los ácidos nucleicos se digiere con DNasa y se hibrida (Kikuchi y col., 2000, Gene 243: 133-137). Los extremos enromados de dos ácidos nucleicos truncados de longitudes variables que están unidos mediante una secuencia que se puede escindir se ligan a continuación para generar la fusión génica sin recombinación homóloga (Sieber y col., 2001, Nat Biotechnol. 19: 456-460; Lutz y col., 2001, Nucleic Acids Res. 29: E16; Ostermeier y col., 1999, Nat. Biotechnol. 17: 1205-1209; Lutz y Benkovic, 2000, Curr. Opin. Biotechnol. 11: 319-324). Se ha potenciado también la recombinación entre ácidos nucleicos con poca homología de secuencias en común utilizando extremos enromados mediados por exonucleasas de fragmentos de ADN y ligadura de los fragmentos juntos para recombinarlos (Patente de los Estados Unidos N° 6.361.974, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad). La invención contempla el uso de todas y cada una de las variaciones descritas anteriormente como un medio de potenciar las propiedades biológicas de cualquiera de los péptidos y/o enzimas en los procedimientos de la invención.

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

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

c. Procedimientos de cribado

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

d. Combinaciones de técnicas

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

III. Glicosidasas y glicotransferasas

A. Glicosidasas

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

Una glicosidasa puede funcionar reteniendo la estereoquímica al romper el enlace durante la hidrólisis o invirtiendo la estereoquímica al romper el enlace durante la hidrólisis, clasificándose la glicosidasa tanto como glicosidasa "retenedora" como glicosidasa "inversora", respectivamente. Las glicosidasas retenedoras tienen dos restos críticos

de ácido carboxílico presentes en el sitio activo, actuando un carboxilato como catalizador ácido/base y el otro como nucleófilo, mientras que en las glicosidasas inversoras, un ácido carboxílico funciona como ácido y el otro funciona como base.

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

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

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

20

B. Glicosiltransferasas

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

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

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

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

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

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

55

Las enzimas glicosiltransferasas se pueden sintetizar en una célula hospedadora transformada con un vector que contiene el ADN que codifica la enzima glicosiltransferasa. Un vector es una construcción de ADN que se puede

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

1. Fucosiltransferasas

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

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

2. Galactosiltransferasas

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

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

Es bien conocida la producción de proteínas tales como la enzima GalNAc T_{I-XIV} a partir de genes clonados mediante genomanipulación. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n $^{\circ}$ 4.761.371. Un procedimiento implica la recogida de suficientes muestras, a continuación se determina la secuencia de aminoácidos mediante secuenciación del extremo N. A continuación se usa esta información para aislar un clon de ADNc que codifica una transferasa de longitud completa (unida a membrana) que, tras su expresión en la línea Sf9 de células de insecto, da como resultado la síntesis de una enzima completamente activa. A continuación se determina la especificidad del aceptor de la enzima utilizando un análisis semicuantitativo de los aminoácidos que rodean los sitios de glicosilación conocidos en 16 proteínas diferentes seguido por los estudios de glicosilación *in vitro* de péptidos sintéticos. Este trabajo ha demostrado que determinados restos de aminoácidos están representados en exceso en segmentos peptídicos glicosilados y que los restos situados en posiciones específicas que rodean los restos de serina y treonina glicosilados pueden tener una importante influencia sobre la eficacia aceptora de los diferentes restos de aminoácidos.

3. Sialiltransferasas

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

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

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

Sialiltransferasa	Fuente	Secuencia(s) formada(s)	Ref.
ST6Gal I	Mamífero	NeuAca2,6Gal β 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	Mamífero	NeuAca2,3Gal β 1,4GlcNAc-	1
		NeuAca2,3Gal β 1,3GlcNAc-	
ST3Gal IV	Mamífero	NeuAca2,3Gal β 1,4GlcNAc-	1
		NeuAca2,3Gal β 1,3GlcNAc-	
ST6Gal II	Mamífero	NeuAca2,6Gal β 1,4GlcNAc-	
ST6Gal II	<i>Photobacterium</i>	NeuAca2,6Gal β 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitides</i>	NeuAca2,3Gal β 1,4GlcNAc-	3
	<i>N. gonorrhoeae</i>		

1) Goochee y col., *Bio/Technology* 9: 1347-1355 (1991)
 2) Yamamoto y col., *J. Biochem.* 120: 104-110 (1996)
 3) Gilbert y col., *J. Biol. Chem.* 271: 28271-28276 (1996)

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

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

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

4. Otras glicosiltransferasas

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

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

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

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

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

Las glicosiltransferasas procariotas son también útiles en la práctica de la invención. Dichas glicosiltransferasas incluyen las enzimas implicadas en la síntesis de lipooligosacáridos (LOS), que se producen por muchas bacterias gram negativas. Los LOS tienen normalmente secuencias de glicano en los extremos que imitan los glicoconjugados que se encuentran sobre la superficie de las células epiteliales humanas o en las secreciones del hospedador (Preston y col., Critical Reviews in Microbiology 23(3): 139-180 (1996)). Dichas enzimas incluyen las proteínas de los operones *rfa* de especies tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, que incluyen una $\beta 1,6$ galactosiltransferasa y una $\beta 1,3$ galactosiltransferasa (véanse, por ejemplo., EMBL N° de Acceso. M80599 y M86935 (*E. coli*); EMBL N° de Acceso. S56361 (*S. typhimurium*)), una glucosiltransferasa (Swiss-Prot N° de Acceso. P25740 (*E. coli*)), una $\beta 1,2$ -glucosiltransferasa (*rfaJ*)(Swiss-Prot n° de Acceso P27129 (*E. coli*) y Swiss-Prot N° de Acceso P19817 (*S. typhimurium*)), y una $\beta 1,2$ -N-acetilglucosaminiltransferasa (*rfaK*) (EMBL n° de Acceso U00039 (*E. coli*)). Otras glicosiltransferasas cuyas secuencias de aminoácidos son conocidas incluyen las que están codificadas por operones tales como *rfaB*, que se han caracterizado en organismos tales como *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium leprosum*, y el operón *rh1* de *Pseudomonas aeruginosa*.

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

B. Sulfotransferasas

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

10 C. Glicosiltransferasas unidas a célula

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

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

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

D. Enzimas de fusión

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

50 E. Enzimas inmovilizadas

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

F. Mutagénesis de glicosiltransferasas

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

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

Los extensos datos estructurales terciarios en las glicosiltransferasas y las glucosidasa hidrolasas pueden dar idea de las mutaciones de estas enzimas que implican intercambios de dominios. Las glicosiltransferasas y glucosidasa hidrolasas son enzimas modulares (véase, Bourne y Henrissat, 2001, Current Opinion in Structural Biology 11:593-600). Las glicosiltransferasas se dividen en dos familias básicas según su estructura: GT-A y GT-B. Las glicosiltransferasas de la familia GT-A comprenden dos dominios disimilares, uno implicado en la unión del nucleótido y el otro en la unión del aceptor. De esta manera, se podría fusionar de forma conveniente la secuencia de ADN que codifica el dominio de un gen en marco con un dominio de un segundo gen para crear un nuevo gen que codifica una proteína con una nueva especificidad aceptora7donante. Dichos intercambios de dominios podrían incluir adicionalmente los módulos de hidratos de carbono y otros dominios accesorios.

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

IV. Sistemas de expresión *in vitro* e *in vivo*

A. Células para la producción de glicopéptidos

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

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

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

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

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

B. Hongos y levaduras

Los péptidos producidos en levaduras se glicosilan y las estructuras de glicano presentes en los mismos son principalmente estructuras con un alto contenido en manosa. En el caso de los N-glicanos, las estructuras de glicano producidas en levaduras pueden contener como mucho nueve o más restos de manosa que pueden contener o no azúcares adicionales añadidos a los anteriores. En la Figura 5, lado de la izquierda se muestra un ejemplo del tipo de glicano en los péptidos producidos por células de levadura. Sin tener en cuenta el número de restos de manosa y el tipo y la complejidad de los azúcares adicionales añadidos a los anteriores, los N-glicanos como componentes de los péptidos producidos en células de levadura comprenden una estructura de un núcleo de trimanosilo tal como se muestra en la Figura 5. Cuando la estructura de glicano de un péptido producido en las células de levadura es una estructura con un alto contenido en manosa, es un tema sencillo para la persona normalmente experta eliminar, *in vitro*, utilizando las enzimas manosidasas disponibles, todos los restos de manosa procedentes de la molécula excepto aquellos que comprenden el núcleo de trimanosilo del glicano, generando de esta forma un péptido que tiene una estructura elemental de núcleo de trimanosilo unida a la anterior. Ahora, utilizando las técnicas disponibles en la materia, y provistos con la presente divulgación, es un tema sencillo añadir enzimáticamente, *in vitro*, restos de azúcar adicionales a la estructura elemental del núcleo de trimanosilo para generar un péptido que tenga una estructura de glicano deseada unida a la anterior. De forma similar, cuando el péptido producido por la célula de levadura comprende una estructura con un alto contenido de manosa además de otros azúcares complejos unidos a la anterior, es un tema sencillo escindir enzimáticamente todos los azúcares adicionales, incluyendo los restos extra de manosa, para llegar a una estructura elemental de núcleo de trimanosilo. Una vez que se produce la estructura elemental de núcleo de trimanosilo, es posible la generación de un péptido que tenga una glicosilación deseada siguiendo las directrices proporcionadas en el presente documento.

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

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

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

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

1. Saccharomyces

En *Saccharomyces*, los vectores de levaduras adecuados para el uso que producen un péptido incluyen YRp7 (Struhl y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1035-1039, 1978), YEp13 (Broach y col., Gene 8: 121-133, 1979), vectores POT (Kawasaki y col., Patente de los Estados Unidos N° 4.931.373), pJDB249 y pJDB219 (Beggs, Nature 275: 104-108, 1978) y sus derivados. Los promotores preferidos para el uso en levaduras incluyen promotores para la expresión del gen glicolítico en levaduras (Hitzeman y col., J. Biol. Chem. 255: 12073-12080, 1980; Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Genet. 1: 419-434, 1982; Kawasaki, Patente de los Estados Unidos N° 4.599.311) o los genes de la alcohol deshidrogenasa (Young y col., en Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Hollaender y col., (eds.), p. 355, Plenum, Nueva York, 1982; Ammerer, Meth. Enzymol. 101: 192-201, 1983), y el promotor de la ADH2-4⁶ (Russell y col., Nature 304: 652-654, 1983; Irani y Kilgore, Solicitud de patente de los Estados Unidos con N° de serie 07/784.653, documento CA 1.304.020 y documento EP 284 044, que se incorporan en el presente documento por referencia). Las unidades de expresión pueden incluir también un terminador de la transcripción. Un terminador de la transcripción preferido es el terminador TPI1 (Alber y Kawasaki, *ibid.*).

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

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

2. Pichia

El uso de *Pichia methanolica* como célula hospedadora para la producción de péptidos recombinantes se da a conocer en las Solicitudes PCT WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536, y WO 98/02565. Las moléculas de ADN para uso en *P. methanolica* transformante se preparan comúnmente como plásmidos circulares bicatenarios, que se linealizan de forma preferible antes de la transformación. Para la producción de péptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y el terminador en el plásmido sean el de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen para la utilización de alcohol de *P. methanolica* (AUG1 o AUG2). Otros promotores útiles incluyen los procedentes de los genes de la dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD), y catalasa (CAT), así como los dados a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 5.252.726. Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma hospedador, se prefiere tener el segmento de expresión completo del plásmido flanqueado en ambos extremos por secuencias de ADN hospedador. Un marcador seleccionable preferido para uso en *Pichia methanolica* es un gen ADE2 de *P. methanolica*, que codifica la fosforibosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), que

permite a las células hospedadoras *ade2* crecer en ausencia de adenina. Para los procedimientos industriales a gran escala, en los que es deseable minimizar el uso de metanol, se prefieren las células hospedadoras en las que se eliminan ambos genes de utilización del metanol (AUG1 y AUG2). Se utiliza la electroporación para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un péptido de interés en células de *P. methanolica*. Se prefiere transformar las células de *P. methanolica* mediante electroporación utilizando un campo eléctrico alternante cuya intensidad disminuye de manera exponencial que tiene una fuerza del campo de entre 2,5 a 4,5 kV/cm, preferiblemente de aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (t) de entre 1 a 40 milisegundos, lo más preferible de aproximadamente 20 milisegundos. Para una revisión del uso de *Pichia pastoris* para la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpo, véase Fischer y col., (1999, *Biotechnol Appl Biochem.* 30 (Pt 2):117-120).

3. *Aspergillus*

Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para expresar péptidos en *Aspergillus* spp., que incluyen aquellos descritos en Carrez y col., 1990, *Gene* 94: 147-154; Contreras, 1991, *Bio/Technology* 9: 378-381; Yelton y col., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470-1474; Tilburn y col., 1983, *Gene* 26: 205-221; Kelly y. Hynes, 1985, *EMBO J.* 4: 475-479; Ballance y col., 1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 112: 284-289; Buxton y col., 1985, *Gene* 37: 207-214, y la Patente de los Estados Unidos N° 4.935.349. Se encuentran ejemplos de promotores útiles en *Aspergillus* en la Patente de los Estados Unidos N° 5.252.726. Se encuentran cepas de *Aspergillus* útiles para la expresión de péptidos en la Patente de los Estados Unidos N° 4.935.349. La producción comercial de péptidos exógenos está disponible de Novoenzymes para *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*.

4. *Trichoderma*

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

Las especies de *Trichoderma* útiles como hospedadores para la producción de péptidos que se van a remodelar incluyen *T. reesei*, tal como QM6a, ALKO2442 o CBS383.78 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, PO Box 273, 3740 AG Baarn, Países Bajos, o, ATCC 13631 (American Type Culture Collection, Manassas VA, 10852, USA, tipo); *T. viride* (tal como CBS189.79 (det. W. Gams); *T. longibrachiatum*, tal como CBS816.68 (tipo); *T. pseudokoningii* (tal como MUCL19358; Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain); *T. satumisporum* CBS330.70 (tipo); *T. harzianum* CBS316.31 (det. W. Gams); *T. virgatum* (*T. pseudokoningii*) ATCC24961. Lo más preferible, el hospedador es *T. reesei* y de forma más preferible, son las cepas QM9414 de *T. reesei* (ATCC 26921), RUT-C-30 (ATCC 56765), y mutantes muy productivos tales como VTT-D-79125, que se deriva de QM9414 (Nevalainen, Technical Research Centre of Finland Publications 26, (1985), Espoo, Finlandia).

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

5. *Kluyveromyces*

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

Los procedimientos para expresar péptidos recombinantes en *Kluyveromyces* spp, son bien conocidos en la técnica. Los vectores para la expresión y la secreción de péptidos recombinantes humanos en *Kluyveromyces* son conocidos en la técnica (Yeh, *J. Cell. Biochem. Suppl.* 14C:68, Abst. H402; Fleer, 1990, *Yeast* 6 (Volumen Especial):S449) que

son procedimientos para la transformación y la expresión de péptidos recombinantes (Ito y col., 1983, J. Bacteriol. 153:163-168; van den Berg, 1990, Bio/Technology 8: 135-139; Patente de los Estados Unidos N° 5.633.146, Documentos WO8304050A1, EP0096910, EP0241435, EP0301670, EP0361991). Para una revisión de la manipulación génica del ADN lineal de *Kluyveromyces lactis* mediante referenciación genética e intercambio plásmido véase Schaffarth y col. (FEMS Microbol Lett. 178(2):201-210, 1999).

6. *Chrysosporium*

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

7. Otros

En la Patente Europea 394 538 se dan a conocer procedimientos para transformar *Schwanniomyces*. Los procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum* se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 5.162.228. Se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.486.533 los procedimientos para transformar *Neurospora*. Se conoce también un sistema de expresión específico de *Schizosaccharomyces pombe* (Patente europea N° 385 391) Los procedimientos generales para expresar péptidos en la levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe* se pueden encontrar en Giga-Hama y Kumagai (1997, Foreign gene expression in fission yeast: *Schizosaccharomyces pombe*, Springer, Berlín).

C. Sistemas de mamífero

Como se menciona anteriormente, las células de mamífero producen normalmente una mezcla heterogénea de estructuras de N-glicano que varían con respecto al número y la disposición de azúcares adicionales unidos al núcleo de trimanosilo. Normalmente, las células de mamífero producen péptidos que tienen una estructura de glicano compleja, tal como la que se muestra en la Figura 4, lado de la derecha. Utilizando los procedimientos de la presente invención, un péptido producido en una célula de mamífero puede remodelarse *in vitro* para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada identificando en primer lugar la estructura de glicano y determinando a continuación qué azúcares deben eliminarse con el fin de remodelar la estructura de glicano. Tal como se ha discutido en el presente documento, los azúcares que se van a eliminar determinarán qué enzimas de escisión se utilizarán y de esta manera, las etapas precisas del procedimiento de remodelación variarán dependiendo de la estructura de glicano primaria utilizada como el sustrato inicial. En la Figura 3 se muestra un esquema de ejemplo para remodelar una estructura de glicano comúnmente producida en células de mamífero. Se ha caracterizado bien la ruta biosintética de N-glicano en células de mamífero (revisado en Moremen, 1994, Glycobiology 4:113-125). Se han identificado muchas de las enzimas necesarias para la síntesis de glicano, y se han aislado líneas de células mutantes defectivas en esta ruta enzimática que incluyen las líneas de células de ovario de hámster chino (CHO) Lec23 (defectivas en alfa-glucosidasa I) y Lec18 (GlcNAc-TVIII novedosa). El modelo de glicosilación de los péptidos producidos por estas células mutantes está alterado con respecto a las células CHO normales. Tal como se discute en el presente documento, los defectos de la glicosilación en estas y otras células mutantes pueden aprovecharse con el fin de producir un péptido que carece de una estructura compleja de glicano. Por ejemplo, los péptidos producidos por células Lec23 carecen de restos de ácido siálico, y por tanto requieren menos manipulación enzimática con el fin de reducir la estructura de glicano a un núcleo de trimanosilo elemental o a Man3GlcNAc4. De esta manera, los péptidos producidos en estas células pueden servir como sustratos preferidos para la remodelación del glicano. Una persona normalmente experta en la técnica podría aislar o identificar otras líneas de células defectivas para la glicosilación basándose en procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento descrito en Stanley y col., 1990, Somatic Cell Mol. Genet., 16: 211-223. El uso de líneas de células defectivas para la glicosilación, unas identificadas y otras todavía sin identificar, se incluye en la invención a fin de generar sustratos peptídicos preferidos para los procedimientos de remodelación descritos en el presente documento.

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

Existen algunas líneas de células de mamíferos que son particularmente adecuadas para expresar péptidos exógenos. Normalmente, las líneas de células de mamíferos originadas a partir de células tumorales que se han llegado a inmortalizar, es decir, que se pueden replicar en cultivo esencialmente de forma indefinida. Estas líneas de células incluyen, CHO (Ovario de hámster chino, por ejemplo, CHO-K1, ATCC N°. CCL 61) y sus variantes, NSO

(mieloma de ratón), BNK, BHK 570 (ATCC N° CRL 10314), BHK (ATCC N° CRL 1632), Per.C6™ (células humanas inmortalizadas, Crucell N.V., Leiden, Países Bajos), COS-1 (ATCC N° CRL 1650), COS-7 (ATCC N° CRL 1651), HEK 293, células L de ratón, Líneas celulares de linfocitos T, células BW5147 y MDCK (riñón canino Madin-Darby), HeLa (ser humano), A549 (carcinoma de pulmón humano), 293 (ATCC N° CRL 1573; Graham y col., 1977, Gen. Virol. 36 :59-72), BGMK (riñón de mono verde Buffalo), Hep-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana), LLC-MK2 (Riñón de Mono Verde Africano), McCoy, NCI-H292 (carcinoma tubular mucoepidermoide pulmonar humano), RD (rabdomiosarcoma), Vero (riñón de Mono verde Africano), HEL (pulmón embrionario humano), Pulmón Fetal Humano-Chang, MRC5 (pulmón embrionario humano), MRHF (prepucio humano), y WI-38 (pulmón embrionario humano, y WI-38 (pulmón embrionario humano). En algunos casos, las células en las que se expresa el péptido terapéutico pueden ser células derivadas del paciente que se va a tratar, o pueden derivarse de otro mamífero relacionado o no relacionado. Por ejemplo, se pueden aislar células de fibroblastos procedentes de tejido de la piel de un mamífero, y cultivarse y transformarse *in vitro*. Esta tecnología está comercialmente disponible de Transkaryotic Therapies, Inc. (Cambridge, MA). Casi todas las líneas celulares actualmente utilizadas están disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y BioWhittaker (Walkersville, Maryland).

Las células de mamífero pueden transformarse con ADN utilizando cualquiera de las diversas técnicas que son bien conocidas en la materia. Dichas técnicas incluyen, transformación con fosfato de calcio (Chen y Okayama, 1988 ; Graham y van der Eb, 1973; Corsaro y Pearson, 1981, Somatic Cell Genetics 7:603), transfección con dextrano-dietilaminoetilo (DEAE) (Fujita y col., 1986; Lopata y col., 1984; Selden y col., 1986), electroporación (Neumann y col., 1982; Potter, 1988, ; Potter y col., 1984, ; Wong y Neuman, 1982), transfección de reactivo lípido catiónico (Elroy-Stein y Moss, 1990; Feigner y col., 1987; Rose y col., 1991; Whitt y col., 1990; Hawley-Nelson y col., 1993, Focus 15: 73; Ciccarone y col., 1993, Focus 15: 80), retroviral (Cepko y col., 1984; Miller y Baltimore, 1986; Pear y col., 1993; Austin y Cepko, 1990; Bodine y col., 1991; Fekete y Cepko, 1993; Lemischka y col., 1986; Turner y col., 1990; Williams y col., 1984; Miller y Rosman, 1989, BioTechniques 7: 980-90; Wang y Finer, 1996, Nature Med. 2:714-6), polibreno (Chaney y col., 1986; Kawai y Nishizawa, 1984), microinyección (Capecchi, 1980), y fusión de protoplastos (Rassoulzadegan y col., 1982; Sandri-Goldin y col., 1981; Schaffer, 1980), entre otros. En general, véanse Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) y Ausubel y col. (2002, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York) para las técnicas de transformación

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

D. Insecto

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

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

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

60

Son bien conocidos en la técnica los protocolos para el uso de baculovirus para transformar células de insecto. Se han publicado algunos libros que proporcionan los procedimientos para el uso del sistema de baculovirus para expresar péptidos en células de insecto. Estos libros incluyen Richardson (Baculovirus Expression Protocols, 1998, Methods in Molecular Biology, Vol 39, Humana Pr), O'Reilly y col. (1994, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Oxford Univ Press), y King y Possee (1992, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman & Hall). Además, existen también publicaciones tales como Lucklow (1993, Curr. Opin. Biotechnol. 4:564-572) y Miller (1993, Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 97-101).

Se han presentado también muchas patentes relacionadas con los sistemas de expresión en baculovirus de proteínas extrañas. Estas patentes incluyen, la patente de los Estados Unidos N° 6.210.966 (Culture medium for insect cells lacking glutamine an contains ammonium salt [Medio de cultivo para células de insecto que carece de glutamina y contiene sal de amonio]), Patente de los Estados Unidos N° 6.090.584 ((Use of BVACs (BaculoVirus Artificial Chromosomes) to produce recombinant peptides [Uso de BVAC (Cromosomas Artificiales de BaculoVirus) para producir péptidos recombinantes]), Patente de los Estados Unidos N° 5.871.986 ((Use of a baculovirus to express a recombinant nucleic acid in a mammalian cell [Uso de un baculovirus para expresar un ácido nucleico recombinante en una célula de mamífero]), Patente de los Estados Unidos N° 5.759.809 (Methods of expressing peptides in insect cells and methods of killing insects [Procedimientos para expresar péptidos en células de insecto y procedimientos para matar insectos]), Patente de los Estados Unidos N° 5.753.220 (Cysteine protease gene defective baculovirus, process for its production, and process for the production of economic peptide by using the same [Baculovirus defectivo en el gen de la cisteína proteasa, procedimiento para su producción, y procedimiento para la producción económica de péptidos utilizando los mismos]), Patente de los Estados Unidos. 5.750.383 (Baculovirus cloning system [Sistema de clonación de baculovirus]), Patente de los Estados Unidos N° 5.731.182 (Non-mammalian DNA virus to express a recombinant nucleic acid in a mammalian cell [Virus de ADN no de mamífero para expresar un ácido nucleico recombinante en una célula de mamífero]), Patente de los Estados Unidos N° 5.728.580 (Methods and culture media for inducing single cell suspension in insect cell lines [Procedimientos y medios de cultivo para inducir una suspensión de células individuales en líneas celulares de insecto]), Patente de los Estados Unidos N° 5.583.023 (Modified baculovirus, its preparation process and its application as a gene expression vector [Baculovirus modificados, su procedimiento de preparación y su aplicación como un vector de expresión génica]), Patente de los Estados Unidos N° 5.571.709 (Modified baculovirus and baculovirus expression vectors [Baculovirus modificados y vectores de expresión de baculovirus]), Patente de los Estados Unidos N° 5.521.299 (Oligonucleotides for detection of baculovirus infection [Oligonucleótidos para la detección de la infección por baculovirus]), Patente de los Estados Unidos N° 5,516,657 ((Baculovirus vectors for expression of secretory and membrane-bound peptides [Vectores de baculovirus para la expresión de péptidos secretores y unidos a membrana]), Patente de los Estados Unidos 5.475.090 (Gene encoding a peptide which enhances virus infection of host insects [Gen que codifica un péptido que potencia la infección por virus de insectos hospedadores]), Patente de los Estados Unidos N° 5.472.858 (Production of recombinant peptides in insect larvae [Producción de péptidos recombinantes en larvas de insectos]), Patente de los Estados Unidos N° 5.348.886 (Method of producing recombinant eukaryotic viruses in bacteria [Procedimiento para producir virus eucariotas recombinantes en bacterias]), Patente de los Estados Unidos N° 5.322.774 (Prokaryotic leader sequence in recombinant baculovirus expression system [Secuencia líder procarionta en un sistema de expresión de baculovirus recombinante]), Patente de los Estados Unidos N° 5.278.050 (Method to improve the efficiency of processing and secretion of recombinant genes in insect systems [Procedimiento para mejorar la eficacia de procesamiento y la secreción de genes recombinantes en sistemas de insectos]), Patente de los Estados Unidos N° 5.244.805 (Baculovirus expression vectors [Vectores de expresión de baculovirus]), Patente de los Estados Unidos N° 5.229.293 (Recombinant baculovirus [Baculovirus recombinante]), Patente de los Estados Unidos N° 5.194.376 (Baculovirus expression system capable of producing recombinant peptides at high levels [Sistema de expresión de baculovirus capaz de producir péptidos recombinantes a altos niveles]), Patente de los Estados Unidos N° 5.179.007 (Method and vector for the purification of recombinant peptides [Procedimiento y vector para la purificación de péptidos recombinantes]), Patente de los Estados Unidos N° 5.169.784 (Baculovirus dual promoter expression vector [Vector de expresión del promotor doble de baculovirus]), Patente de los Estados Unidos N° 5.162.222 (Use of baculovirus early promoters for expression of recombinant nucleic acids in stably transformed insect cells or recombinant baculoviruses [Uso de promotores tempranos de baculovirus en la expresión de ácidos nucleicos recombinantes en células de insecto transformadas de forma estable o baculovirus recombinantes]), Patente de los Estados Unidos N° 5.155.037 (Insect signal sequences useful to improve the efficiency of processing and secretion of recombinant nucleic acids in insect systems [Secuencias señal de insectos útiles para mejorar la eficacia del procesamiento y la secreción de ácidos nucleicos recombinantes en sistemas de insectos]), Patente de los Estados Unidos N° 5.147.788 (Baculovirus vectors and methods of use [Vectores de baculovirus y procedimientos de uso]), Patente de los Estados Unidos N° 5.110.729 (Method of producing peptides using baculovirus vectors in cultured cells [Procedimiento para la producción de péptidos utilizando vectores de baculovirus en células cultivadas]), Patente de los Estados Unidos N° 5.077.214 ((Use of baculovirus early promoters for expression of recombinant genes in stably transformed insect cells [Uso de promotores tempranos de baculovirus para la expresión de genes recombinantes en células de insecto transformadas de manera estable]), Patente de los Estados Unidos N° 5.023.328 (Lepidopteran AKH signal sequence [Secuencia señal de AKH de Lepidópteros]), y Patentes de los Estados Unidos N° 4.879.236 y 4.745.051 (Method for producing a recombinant baculovirus expression vector [Procedimiento para producir un vector de expresión de baculovirus recombinante]). Todas las patentes anteriormente mencionadas se incorporan en su totalidad por referencia en el presente documento.

Se están usando en la actualidad varias líneas celulares procedentes de insectos de varias especies diferentes para la expresión de péptidos, y estas líneas son bien conocidas de los expertos en la técnica. Las líneas celulares de insecto de interés incluyen células de insecto de dípteros y lepidópteros en general, Sf9 y sus variantes (palomilla del maíz de *Spodoptera frugiperda*), *Estigmene acrea*, *Trichoplusia ni*, *Bombyx mori*, *Malacosoma disstria*, líneas kc1 y SL2 de *Drosophila* entre otras, y mosquito.

E. Plantas

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

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

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

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

Se utilizan en la actualidad varios procedimientos para transformar de manera estable células vegetales con material genético recombinante. Estos procedimientos incluyen transformación en *Agrobacterium* (Bechtold y Pelletier, 1998; Escudero y Hohn, 1997; Hansen y Chilton, 1999; Touraev y col., 1997), biolísticos (microproyectiles) (Finer y col., 1999; Hansen y Chilton, 1999; Shilito, 1999), electroporación de protoplastos (Fromm y col., 1985, Ou-Lee y col., 1986; Rhodes y col., 1988; Saunders y col., 1989; Trick y col., 1997), tratamiento con polietilenglicol (Shilito, 1999; Trick y col., 1997), microinyección en plantas (Leduc y col., 1996; Zhou y col., 1983), inhibición de semillas (Trick y col., 1997), haz de láser (1996), y limaduras de carburo de silicio (Thompson y col., 1995; Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 20020100077).

Muchos tipos de plantas son adecuados para la transformación y expresión de péptidos exógenos. Las plantas de particular interés para expresar los péptidos que se van a usar en el procedimiento de remodelación de la invención *Arabidopsis thaliana*, colza (*Brassica* spp.; Ruiz y Blumwald, 2002, Planta 214: 965-969), soja (*Glycine max*), girasol

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

Si se desea la expresión del ácido nucleico recombinante en una planta completa en lugar de en células cultivadas, las células vegetales se transforman en primer lugar con el ADN que codifica el péptido, tras lo cual, la planta se regenera. Esto implica procedimientos de cultivo de tejidos que se optimizan normalmente para cada especie de planta. Se conocen bien ya en la técnica para muchas especies los protocolos para regenerar plantas. Además, un experto en la técnica puede desarrollar protocolos para otras especies utilizando la experimentación rutinaria. Están disponibles numerosos manuales de laboratorio que describen procedimientos para la regeneración de plantas, incluyendo Smith (2000, Plant tissue culture: techniques and experiments, Academic Press, San Diego), Bhojwani y Razdan (1996, Plant tissue culture: theory and practice, Elsevier Science Pub., Ámsterdam), Islam (1996, Plant tissue culture, Oxford & IBH Pub. Co., Nueva Delhi, India), Dodds y. Roberts (1995, Experiments in plant tissue culture, Nueva York : Cambridge University Press, Cambridge Inglaterra), Bhojwani (Plant tissue culture: applications and limitations, Elsevier, Ámsterdam, 1990), Trigiano y Gray (2000, Plant tissue culture concepts and laboratory exercises, CRC Press, Boca Raton, Fla) y Lindsey (1991, Plant tissue culture manual: fundamentals and applications, Kluwer Academic, Boston).

Aunque la purificación de péptidos recombinantes a partir de plantas puede ser potencialmente costosa, se han desarrollado algunos sistemas que minimizan estos costes. Un procedimiento dirige el péptido sintetizado al endospermo de la semilla desde el cual este puede extraerse fácilmente (Wright y col., 2001, Transgenic Res. 10:177-181, Guda y col., 2000, Plant Cell Res. 19: 257-262; y la Patente de los Estados Unidos N° 5.767.379). Una solución alternativa es la extracción simultánea del péptido recombinante con productos vegetales convencionales tales como almidón, harina o aceite. En el aceite de colza, un péptido de fusión de oleosina-hurudina cuando se expresa en la planta, se une al cuerpo oleoso de la semilla, y se puede extraer de la semilla de la planta junto con el aceite (Parmenter, 1995, Plant Mol. Biol. 29: 1167-1180; Patentes de los Estados Unidos N°s. 5.650.554, 5.792.922, 5.948.682 y 6.288.304, y la Solicitud de los Estados Unidos 2002/0037303, todos los cuales se incorporan en su totalidad por referencia en el presente documento). En una variación sobre esta solución, la oleosina se fusiona a un péptido para la expresión simultánea exógena del péptido de interés (Patente de los estados Unidos N° 5.856.452).

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

F. Animales transgénicos

Se puede llevar a cabo la introducción de un ADN recombinante en el huevo fertilizado de un animal (por ejemplo, un mamífero) utilizando cualquier tipo de técnica normalizada en la tecnología de animales transgénicos. Véanse, por ejemplo, Hogan y col., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986; y Patente de los Estados Unidos N° 5.811.634. De forma más común, el ADN recombinante se introduce en el embrión por medio de una inyección pronuclear (Gordon y col., 1980, PNAS 77: 7380-7384; Gordon y Ruddle, 1981, Science 214: 1244-1246; Brinster y col., 1981, Cell 27: 223-231; Costantini y Lacy, 1981, Nature 294: 92-94). La microinyección tiene la ventaja de ser aplicable a una amplia variedad de especies. Se puede transformar también el preimplante de embriones con retrovirus (Jaenisch y Mintz, 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 1250-1254; Jaenisch y col., 1976, Hamatol Bluttransfus. 19: 341-356; Stuhmann y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 7151-7155). La transformación mediada por retrovirus tiene la ventaja de añadir copias individuales del ácido nucleico recombinante a la célula, pero produce un grado elevado de mosaicismo. De forma más reciente, se han utilizado técnicas mediadas por embriocitoblastos (Gossler y col., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 9065-9069), transferencia de segmentos cromosómicos completos (Lavitrano y col.,

1989, Cell 57: 717-723), y transfección de gametos junto con fertilización *in vitro* (Lavitrano y col., 1989, Cell 57: 717-723). Se han publicado algunos manuales de procedimientos de laboratorio que dan a conocer estas técnicas Cid-Arregui y García-Carrancá (1998, *Microinjection and Transgenesis: Strategies and Protocols*, Springer, Berlín), Clarke (2002, *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ), y Pinkert (1994, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press, San Diego).

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

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

Si el péptido recombinante está previsto para su acumulación en la leche del animal, los mamíferos adecuados son rumiantes, ungulados, mamíferos domesticados, y animales de granja. Los animales particularmente preferidos son cabras, ovejas, camellos, vacas, cerdos, caballos, bueyes, y llamas. Son bien conocidos los procedimientos para generar vacas transgénicas que acumulan un péptido recombinante en su leche; véanse Newton (1999, *J. Immunol. Methods* 231: 159-167), Ebert y col. (1991, *Biotechnology* 9: 835-838), y Patentes de los Estados Unidos N^{os} 6.210.736, 5.849.992, 5.843.705, 5.827.690, 6.222.094, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. La generación de animales transgénicos que producen un péptido recombinante deseado se encuentra comercialmente disponible de GTC Biotherapeutics, Framingham, MA.

Si el péptido recombinante se ha de acumular en huevos, entre las aves apropiadas se incluyen pollos, gansos, pavos. Otros animales de interés incluyen otras especies de aves, reptiles y anfibios. La introducción de ADN recombinante en pollos mediante transformación retroviral es bien conocida en la técnica: Thoraval y col. (*Transgenic Research* 4; 369-376, 1995) Bosselman (*Science* 234: 533-535, 1989), Petropoulos y col. (*J. Virol.* 66; 3391-3397, 1992), Patente US n. 5.162,251. También se ha conseguido la transformación exitosa de pollos con ADN recombinante, en la cual se introduce ADN en células blastodérmicas y las células blastodérmicas son introducidas en embriones: Brazolot y col. (*Mol. Reprod. Dev.* 30: 304-312, 1991), Fraser y col. (*Int. J. Dev. Biol.* 37:381-385, 1993) y Petite y col. (*Development* 108:185-189, 1990) Se ha desarrollado tecnología de alto rendimiento para evaluar si los pollos transgénicos expresan el péptido deseado (Harvey y col., *Poult. Sci.* 81:202-212, 2002, Patente US n. 6.423,488). Usando transformación retroviral de gallinas con ADN recombinante, se acumuló beta-lactamasa exógena en clara de huevos de gallina (Harvey y col. 2002, *Nat. Biotechnol* 20(4):396-399, 2002). La producción de gallinas productoras de péptidos exógenos en huevos está comercialmente disponible en AviGenics, Inc. Athens, Ga.

G. Bacterias

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

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

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

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

enlace disulfuro

H. Genomanipulación celular

5 Será evidente a partir de la presente divulgación que cuánto más uniforme sea el material de partida producido por una célula, más eficaz será la generación *in vitro* de grandes cantidades de péptidos que tengan la glicosilación deseada. De esta manera, la genomanipulación de las células hospedadoras para producir péptidos uniformemente glicosilados como material de partida de las reacciones enzimáticas *in vitro* dadas a conocer en el presente documento proporciona una significativa ventaja sobre el uso de un material de partida de péptidos que tengan un conjunto heterogéneo de estructuras de glicano unidas al anterior. Un material de partida de péptido preferido para uso en la presente invención es un péptido que tiene principalmente moléculas de glicano que consisten únicamente en una estructura elemental de núcleo de trimanosilo. Otro material de partida preferido es Man3GlcNAc4. Tras el procedimiento de remodelación, los péptidos preferidos proporcionarán un aumento de la cantidad mayor de péptidos que tengan la glicosilación deseada, y de esta manera, una eficacia clínica mejorada. Sin embargo, otro material de partida de glicano es también adecuado para el uso en los procedimientos descritos en el presente documento, en que por ejemplo, se puede reducir fácilmente, *in vitro*, un alto contenido de glicanos de manosa a estructuras elementales de núcleos de trimanosilo utilizando una serie de manosidasas. Tal como se describe en otra parte en el presente documento, también se puede usar otro material de partida de glicano, con la condición de que sea posible escindir todos los restos de azúcar extraños de tal manera que se genera una estructura elemental de núcleo de trimanosilo o Man3GlcNAc4. De esta manera, el fin de usar células genomanipuladas para la producción de los péptidos de la presente invención es generar péptidos que tengan una estructura de glicano tan uniforme como sea posible unida a la anterior, en la que la estructura de glicano se puede remodelar *in vitro* para generar un péptido que tenga la glicosilación deseada. Esto dará como resultado una drástica reducción en los costes de producción de estos péptidos. Debido a que los glicopéptidos producidos utilizando esta metodología tendrán predominantemente la misma estructura de glicano unida a N, el protocolo de modificación posterior a la producción puede normalizarse y optimizarse para producir una mayor consistencia entre los lotes del producto final. Como resultado, los productos finales de la cadena completados pueden ser menos heterogéneos que aquellos que se encuentran actualmente disponibles. Los productos tendrán una semivida biológica y bioactividad aumentadas en comparación con los productos de la técnica anterior. De forma alternativa, si se desea, se puede utilizar la invención para introducir una heterogeneidad limitada y específica, por ejemplo, seleccionando las condiciones de reacción que dan como resultado la adición diferencial de restos de azúcares.

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

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

50 Son bien conocidas las técnicas para modificar genéticamente las células hospedadoras para alterar el perfil de glicosilación de los péptidos expresados. Véanse, por ejemplo, Altmann y col. (1999, Glycoconjugate J. 16: 109-123), Ailor y col. (2000, Glycobiology 10(8): 837-847), Jarvis y col., (Conferencia In vitrogen, marzo de 1999, resumen), Hollister y Jarvis, (2001, Glycobiology 11(1): 1-9), y Palacpac y col., (1999, PNAS USA 96: 4697), Jarvis y col., (1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 528-533), Gemgross (Publicación de Patente de los Estados Unidos N°. 20020137134), todos los cuales dan a conocer las técnicas para "asimilar a sistemas de expresión de mamíferos" sistemas de expresión de células de insecto o vegetales transfectando células de insecto o vegetales con genes de la glicosiltransferasa.

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

60 También se han genomanipulado células de hongos para producir glicosiltransferasas exógenas (Yoshida y col., 1999, Glycobiology, 9(1):53-58; Kalsner y col., 1995, Glycoconj. J. 12:360-370; Schwientek y Ernst, 1994, Gene 145

(2):299-303; Chiba y col., 1995, Biochem J. 308:405-409).

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

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

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

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

En otras realizaciones, se puede seleccionar la enzima glicosilasa heteróloga de un grupo que consiste en manosidasa 1, manosidasa 2, manosidasa 3, y otras manosidasas, que incluyen manosidasas microbianas. Se proporciona en otra parte en el presente documento una divulgación adicional con respecto a las enzimas útiles en la presente invención.

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

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

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

V. Purificación de péptidos glicoconjugados y/o remodelados con glicano

Si la glicoproteína modificada se produce intracelularmente o se secreta, como primera etapa, los residuos de material particulado, ya sean las células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan por ejemplo mediante centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente, la proteína se puede concentrar con un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, seguido por la separación de la variante del péptido de otras impurezas

mediante una o más etapas seleccionadas entre cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio iónico (por ejemplo, en dietilaminoetil (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo). Cromatografía en Blue-Sepharose, CN Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, lentil lectina-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Éter Toyopearl, Butil Toyopearl, fenil Toyopearl, o proteína A Sepharose, Cromatografía en SDS-PAGE, cromatografía en gel de sílice, cromatografía en fase inversa (RP-HPLC), filtración en gel utilizando, *por ejemplo*, un tamiz molecular de Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en columnas que se unen selectivamente al péptido, y etanol, pH o precipitación con sulfato de amonio, filtración en membrana y diversas técnicas.

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

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

En otra realización, los sobrenadantes del sistema que producen el péptido modificado de la invención se concentran en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender un ligando para el péptido, una lectina o una molécula de anticuerpo unida a un soporte adecuado. De forma alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos DEAE colgantes. Las matrices adecuadas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa, u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. De forma alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren particularmente grupos sulfopropilo.

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

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

VI. Péptidos preferidos y ácidos nucleicos que codifican los péptidos preferidos

La presente divulgación incluye ácidos nucleicos aislados que codifican diversos péptidos y proteínas, y moléculas similares o sus fragmentos. Dichos péptidos incluyen el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el interferón alfa humano (IFN-alfa), el interferón beta humano (IFN-beta), el Factor VII humano (Factor VII), el Factor IX humano (Factor IX), la hormona estimuladora del folículo humana (FSH), la eritropoyetina humana (EPO), el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), el interferón gamma humano (IFN-gamma), el inhibidor de la proteasa alfa-1 humana (conocido también como alfa-1-antitripsina o inhibidor de la alfa-1-tripsina; A-1-PI), la glucocerebrosidasa, el activador de tipo tisular humano (TPA), la interleuquina-2 humana (IL-2), Factor VIII humano (Factor VIII), un receptor del factor de necrosis tumoral de 75 kDa fusionado a una porción Fc de la inmunoglobulina IgG humana, conocida comercialmente como ENBREL™ o ETANERCEPT™ (TNFR quimérico), la uroquinasa humana (uroquinasa), un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal quimérico humano/de ratón que se une de forma específica a la glicoproteína IIb/IIIa y el receptor alfa_v beta₃ de la vitronectina, conocido comercialmente como REOPRO™ o ABCIXIMAB (antiglicoproteína IIb/IIIa quimérica) un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón/ser humano que se une de forma específica a HER2, conocido comercialmente como HERCEPTIN™ (dirigido contra HER-2 quimérico), un anticuerpo quimérico humano/de ratón que se une de forma específica al sitio antigénico A o a la proteína F o al virus sincitial respiratorio comercialmente conocido como SYNAGIS™ o PALIVIZUMAB (dirigido contra RSV quimérico) un anticuerpo monoclonal humano/de ratón quimérico que se une de forma específica a las células CD20 o a los linfocitos B humanos, comercialmente conocido RITUXAN™ o RITUXAMAB (dirigido contra CD20 quimérico), una DNasa recombinante humana (DNasa), un anticuerpo monoclonal humano/de ratón quimérico que se une de forma específica al factor de necrosis tumoral humano, comercialmente conocido como REMICADE™ o INFlixIMAB (dirigido contra TNF quimérico), insulina humana, el antígeno superficial de un virus de la hepatitis B (subtipo adw; HBsAg), y la hormona del crecimiento humana (HGH).

El ácido nucleico aislado de la invención debe construirse de forma que incluya una secuencia de ARN o una secuencia de ADN que codifica cualquiera de los anteriores péptidos identificados de la invención, y cualquiera de

- 5 sus formas modificadas, incluyendo las modificaciones químicas del ADN o del ARN que convierten la secuencia de nucleótidos en más estable cuando está exenta de células o cuando está asociada a una célula. Como ejemplo no limitante, se sabe que los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato confieren al oligonucleótido una resistencia mejorada a las nucleasas. Los ejemplos específicos de oligonucleótidos modificados incluyen aquellos que contienen fosforotioato, fosfotriéster, metil fosfonato, enlaces entre alquil azúcares o cicloalquil azúcares de cadena corta, o enlaces entre azúcares heteroaromáticos o heterocíclicos de cadena corta ("estructura"). Además, se pueden utilizar también oligonucleótidos que tengan estructuras de esqueleto de morfolino (Patente de los Estados Unidos N° 5.034.506) o estructuras de esqueleto de poliamida (Nielsen y col., 1991, Science 254: 1497).
- 10 Se pueden usar también modificaciones químicas de nucleótidos para aumentar la eficacia con la que una secuencia de nucleótido es capturada por una célula o la eficacia con la que se expresa en una célula. Se contemplan cualquiera y todas las combinaciones de modificaciones de las secuencias de nucleótidos en la presente invención.
- 15 La presente invención no debe considerarse como limitada únicamente a las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos dadas a conocer en el presente documento. Tal como se describe con más detalle en otra parte en el presente documento, una vez provistos con la presente invención, será fácilmente evidente para un experto en la técnica que se pueden obtener otros ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la presente invención siguiendo los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, mutagénesis dirigida al emplazamiento, mutaciones de cambio de marco), y procedimientos que son bien conocidos en la técnica.
- 20 Se incluyen también ácidos nucleicos aislados que codifican fragmentos de péptidos en los que los fragmentos de péptidos retienen la actividad biológica deseada del péptido. En su lugar, debe considerarse que la invención incluye todas y cada una de las moléculas de ácido nucleico que tengan un porcentaje de identidad suficiente con las secuencias dadas a conocer en el presente documento de tal manera que estos ácidos nucleicos codifican también un péptido que tiene la actividad biológica deseada dada a conocer en el presente documento. Se contemplan también los ácidos nucleicos aislados que sean más cortos que los ácidos nucleicos de longitud completa, en los que se retiene embargo la actividad biológica del péptido codificado. Los procedimientos para determinar el porcentaje de identidad entre un ácido nucleico y otro se dan a conocer en otra parte en el presente documento dado que son ensayos para la determinación de la actividad biológica de cualquier péptido preferido específico.
- 25 También se dan a conocer también en otra parte en el presente documento cualesquiera otro tipo de procedimientos que se pueden utilizar para la generación de derivados, mutantes, o formas variantes de los péptidos de la presente invención que utilizan la metodología de ADN recombinante bien conocida en la técnica tal como, por ejemplo, la descrita en Sambrook y col. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y Ausubel y col. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, Nueva York). Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para la introducción de cambios de aminoácidos en el péptido o el polipéptido alterando la secuencia de ADN que codifica el péptido, y se describen también en Sambrook y col. (1989, supra); Ausubel y col. (1997, más arriba).
- 30 La invención incluye un ácido nucleico que codifica un G-CSF, IFN-alfa, IFN-beta, Factor VII, Factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN-gamma, A-1-PI, glucocerebrosidasa, TPA, IL-2, Factor VIII, TNFR quimérico, uroquinasa, antiglicoproteína IIb/IIa quimérica, anticuerpo quimérico dirigido contra HER2, anticuerpo quimérico dirigido contra RSV, anticuerpo quimérico dirigido contra CD20, DNasa, anticuerpo quimérico dirigido contra TNF, insulina humana, HBsAg, y HGH, en el que un ácido nucleico que codifica un péptido etiqueta se une de forma covalente al anterior. Esto es, la invención abarca un ácido nucleico quimérico en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido etiqueta se une de forma covalente al ácido nucleico que codifica un péptido de la presente invención. Dichos péptidos etiqueta son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP), myc, myc-piruvato quinasa (myc-PK), His6, proteína de unión a maltosa (MBP), y polipéptido etiqueta de la hemaglutinina del virus de la gripe, un polipéptido con la etiqueta flag (FLAG) y un polipéptido etiqueta de la glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, la etiqueta no debe considerarse en forma alguna limitada a los ácidos nucleicos que codifican los péptidos etiqueta anteriormente relacionados. En su lugar, cualquier secuencia que codifica un péptido que puede funcionar de una manera sustancialmente similar a estos péptidos etiqueta se debe considerar como incluida en la presente invención.
- 35 El ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido etiqueta se puede utilizar para localizar un péptido de la presente invención en una célula, un tejido, y/o un organismo completo (por ejemplo, un embrión de mamífero), detectar un péptido de la presente invención secretado a partir de una célula, y estudiar el(los) papel(es) del péptido en una célula. Además, la adición de un péptido etiqueta facilita el aislamiento y la purificación del péptido "etiquetado" de tal manera que se pueden producir los péptidos de la invención y purificarse fácilmente.
- 50 La invención incluye los siguientes péptidos aislados preferidos: G-CSF, IFN-alfa, IFN-beta, Factor VII, Factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN-gamma, A-1-PI, glucocerebrosidasa, TPA, IL-2, Factor VIII, TNFR quimérico, uroquinasa, quimérica anticuerpo dirigido contra la glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo quimérico dirigido contra HER2, anticuerpo quimérico dirigido contra RSV, anticuerpo quimérico dirigido contra CD20, DNasa, anticuerpo quimérico dirigido contra TNF, insulina humana, HBsAg, y HGH.
- 55

Se debe considerar también que la presente invención abarca “derivados”, “mutantes”, y “variantes” de los péptidos de la invención (o del ADN que codifica los mismos) cuyos derivados, mutantes, y variantes son péptidos que están alterados en uno o más aminoácidos (o, cuando se hace referencia a la secuencia de nucleótidos que codifica los mismos, están alterados en uno o más pares de bases) de tal manera que el péptido resultante (o ADN) no es idéntico a las secuencias enumeradas en el presente documento, pero tiene la misma propiedad biológica que los péptidos dados a conocer en el presente documento, en que el péptido tiene las propiedades biológicas/bioquímicas de G-CSF, IFN-alfa, IFN-beta, Factor VII, Factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN-gamma, A-1-PI, glucocerebrosidasa, TPA, IL-2, Factor VIII, TNFR quimérico, uroquinasa, anticuerpo quimérico dirigido contra la glicoproteína IIb/IIIa, anticuerpo quimérico dirigido contra HER2, anticuerpo quimérico dirigido contra RSV, anticuerpo quimérico dirigido contra CD20, DNasa, anticuerpo quimérico dirigido contra TNF, insulina humana, HBsAg, y HGH.

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

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

VII. Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un polímero, resto terapéutico o biomolécula soluble en agua de origen no natural y un péptido glicosilado o sin glicosilar. El polímero, resto terapéutico o biomolécula se conjuga con el péptido mediante un grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y unido covalentemente tanto al péptido como al polímero, resto terapéutico o biomolécula.

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

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier manera de administración apropiada, incluyendo por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo comprende preferentemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se pueden usar cualquiera de los vehículos mencionados anteriormente o un vehículo sólido, tales como, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, y carbonato de magnesio. También se pueden usar microesferas biodegradables (*por ejemplo*, polilactato, poliglicolato) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Las microesferas biodegradables adecuadas se desvelan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.897.268 y N° 5.075.109.

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

Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden filtrar de forma estéril. Las disoluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso como tal, o liofilizadas, siendo la preparación liofilizada combinada con un vehículo acuoso estéril antes de su administración. El pH de las preparaciones normalmente estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9 y lo más preferentemente entre 7 y 8.

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

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

derivatizados, tales como los péptidos derivatizados con lípidos de la invención.

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

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

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

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

En una realización a modo de ejemplo, los péptidos son componentes de un liposoma, usado como un sistema de administración dirigida. Cuando los fosfolípidos se dispersan suavemente en medios acuosos, se hinchan, se hidratan, y forman espontáneamente vesículas multilaminares de bicapas concéntricas con fases de medios acuosos que separan la bicapa lipídica. Dichos sistemas normalmente se denominan liposomas multilaminares o vesículas multilaminares (MLV) y tienen diámetros que varían de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 4 μ m. Cuando se sonicen las MLV, se forman pequeñas vesículas unilaminares (SUVS) con diámetros en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nm, que contienen una disolución acuosa en el núcleo de la SUV.

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

En la preparación de liposomas que contienen los péptidos de la invención, se deberían considerar variables tales como la eficacia de encapsulación del péptido, labilidad del péptido, homogeneidad y tamaño de la población

resultante de liposomas, relación de péptido a lípido, inestabilidad a la permeabilidad de la preparación, y aceptabilidad farmacéutica de la formulación. Szoka y col., Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 9: 467 (1980); Deamer y col., en LIPOSOMES, Marcel Dekker, Nueva York, 1983, 27: Hope y col., Chem. Phys. Lipids, 40: 89 (1986)).

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

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

Ejemplos Experimentales

La divulgación se describe ahora con referencia a los siguientes Ejemplos. Estos Ejemplos se proporcionan solamente con fines de ilustración.

20 A. Glicosilación

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

1. Sialilación y Fucosilación de TP10

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

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

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

- Sialilación de 66 mg de TP10.** TP10 (2,5 mg/ml), CMP-AS (5 mM), y ST3Gal3 (0,1 U/ml) se incubaron a 32 °C en Tris 50 mM, NaCl 0,15M, azida sódica al 0,05 %, pH 7,2 durante 48 horas. El ácido siálico CMP radiomarcado se añadió a una pequeña alícuota para controlar la incorporación. TP10 se separó a partir de azúcar de nucleótidos por
45 HPLC SEC. Las muestras analizadas a las 24 horas y 48 horas demostraron que la reacción se completó después de 24 horas. La mezcla de reacción se congeló después. Los productos de reacción se sometieron a análisis por Electroforesis de Hidratos de Carbono Asistida por Fluoróforos (FACE[®], Glyko, Inc, Novato CA) (Figura 27).

- Estudios farmacocinéticos.** Se adquirieron ratas con una cánula en la vena yugular. Se administraron 10 mg/kg de péptido TP10 de sialilación previa o de sialilación posterior mediante una inyección en la vena de la cola a tres ratas para cada tratamiento (n = 3). Se tomaron catorce muestras de sangre de 0 a 50 horas. La concentración en la
50 sangre del péptido TP10 de sialilación posterior fue mayor que la que la del TP10 de sialilación previa en cada punto temporal pasadas 0 horas (Figura 28). La adición de ácido siálico duplicó el área bajo la curva de concentración de plasma-tiempo (ABC) de la curva farmacocinética en comparación con el material de partida (Figura 29).

- Fucosilación de TP10 sialilado.** 10 ml (25 mg de TP10) de la mezcla de sialilación anterior se descongelaron, y se añadió GDP-fucosa a 5 mM, MnCl₂ a 5 mM, y FTVI (fucosiltransferasa VI) a 0,05 U/ml. La reacción se incubó a 32
55 °C durante 48 horas. Los productos de reacción se sometieron a análisis por Electroforesis de Hidratos de Carbono

Asistida por Fluoróforos (FACE[®]; Glyko, Inc, Novato CA) (Figura 30). A una pequeña alícuota, se añadió GDP-fucosa radiomarcada para controlar la incorporación. TP10 se separó a partir de azúcar de nucleótidos por HPLC SEC. Las muestras analizadas a las 24 horas y 48 horas demostraron que la reacción se completó a las 24 horas. Un ensayo *in vitro* que mide la unión a E-selectina indica que la adición de fucosa puede producir un ligando de E-selectina biológicamente activo (Figura 31).

2. Sialilación de Glicoproteínas Recombinantes

Este ejemplo expone la preparación de formas sialiladas de varios péptidos recombinantes.

Sialilación de Glicoproteínas Recombinantes Usando ST3Gal III. Se examinó la capacidad de varias glicoproteínas para ser sialiladas mediante ST3Gal III recombinante de rata. Para cada una de estas glicoproteínas, la sialilación será una etapa valiosa del procedimiento en el desarrollo de las respectivas glicoproteínas como productos comerciales.

Condiciones de Reacción. Las condiciones de reacción fueron como se resumen en la Tabla 9. Las reacciones de sialiltransferasa se realizaron durante 24 horas a una temperatura entre temperatura ambiente y 37 °C. Se estableció el grado de sialilación mediante la determinación de la cantidad de ¹⁴C-NeuAc incorporada en los oligosacáridos unidos a glicoproteína. Véase la Tabla 9 para las condiciones de reacción para cada proteína.

Tabla 9. Condiciones de reacción.

Proteína	Fuente	Proteína Total (mg)	Conc. Proteína (mg/ml)	ST (mU/ml)	ST/Proteína (mU/mg)	CMP-NeuAc de "ciclo" ¹
ATIII	Genzyme Transgenics	8,6	4,3	210	48	ciclo
ATIII	Genzyme Transgenics	860	403	53	12	ciclo
Asialo-fetuína	Sigma	0,4	105	20	13	10 mM
asialo-AAAT	PPL	0,4	0,5	20	20	20 mM

¹ "Ciclo" se refiere a la generación de CMP-NeuAc "in situ" que usa enzimáticamente condiciones convencionales como se describe en la memoria descriptiva (NeuAc 20 mM y CMP 2 mM). El tampón fue HEPES 0,1 M, pH 7,5.

Los resultados presentados en la Tabla 10 demuestran que se consiguió un grado notable de sialilación en cada caso, a pesar de los bajos niveles de enzima usada. Básicamente, se obtuvo la sialilación completa, basándose en la estimación de la galactosa terminal disponible. La Tabla 10 muestra los resultados de las reacciones de sialilación. La cantidad de enzima usada por cada mg de proteína (mU/mg) como una base de comparación para los diversos estudios. En varios de los ejemplos que se muestran, solamente se necesitaron 7-13 mU de ST3Gal III por cada mg de proteína para dar básicamente la sialilación completa después de 24 horas.

Tabla 10. Resultados analíticos

Proteína	Fuente	Gal Terminal ¹ mol/mol	NeuAc Incorp. ² mol/mol	% de Rxn ³	Otra caracterización
ATIII ⁴	Genzyme Transgenics	102	104	117	Ninguna
ATIII ⁴	Genzyme Transgenics	102	1,3	108	SDS-geles: pureza de la proteína FAC: glicofomas de hidratos de carbono
Asialo-fetuína	Sigma	802	905	116	Ninguna
asialo-AAAT ⁵	PPL	7	7,0	100	SDS-geles: pureza de la proteína

¹ Contenido de Gal (expuesto) terminal en los oligosacáridos unidos a N determinado por el proveedor, o a partir de los valores de las literaturas (fetuína, asialo-AAAT).

² NeuAc incorporada determinada mediante la incorporación de ¹⁴C-NeuAc después de la separación a partir de precursores libres radiomarcados por filtración en gel.

³ El % de Rxn se refiere a un % de finalización de la reacción basándose en el contenido de Gal terminal como un máximo teórico.

⁴ Antitrombina III.

⁵ α1 Antitripsina.

Estos resultados están en marcado contraste con los indicados en estudios detallados con ST6Gal I bovina en los que menos de 50 mU/mg de proteína dieran menos de un 50 % de sialilación, y 1070 mU/mg de proteína dieron aproximadamente un 85-90 % de sialilación en 24 horas. Paulson y col. (1977) J. Biol. Chem. 252: 2363-2371; Paulson y col. (1978) J. Biol. Chem. 253: 5617-5624. Un estudio de sialiltransferasas α 2,3 y α 2,6 de rata por otro grupo reveló que la sialilación completa de asialo-AGP necesitaba concentraciones de enzima de 150-250 mU/mg de proteína (Weinstein y col. (1982) J. Biol. Chem. 257: 13845-13853). Estos estudios anteriores tomados en conjunto sugieren que la sialiltransferasa ST6Gal I necesita una cantidad mayor que 50 mU/mg y hasta 150 mU/mg para conseguir la sialilación completa.

Este ejemplo demuestra que la sialilación de las glicoproteínas recombinantes que usan sialiltransferasa ST3 Gal III necesita mucha menos enzima de lo esperado. Para una reacción a escala de un kilogramo, se necesitarían aproximadamente 7.000 unidades de sialiltransferasa ST3Gal III, en lugar de las 100.000-150.000 unidades que indicaban los estudios anteriores. La purificación de estas enzimas a partir de fuentes naturales es prohibitiva, con rendimientos de sólo 1-10 unidades para una preparación a gran escala después de 1-2 meses de trabajo. Suponiendo que las sialiltransferasas tanto ST6Gal I como ST3Gal III se producen como sialil-transferasas recombinantes, consiguiendo los mismos niveles de expresión de las dos enzimas, se necesitaría una escala de fermentación 14-21 veces mayor (o superior) para la sialiltransferasa ST6Gal I con respecto a la sialiltransferasa ST3Gal III. Para la sialiltransferasa ST6Gal I, se han indicado niveles de expresión de 0,3 U/l en levadura (Borsig y col. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 210: 14-20). Se han conseguido niveles de expresión de 1000 U/litro de sialiltransferasa ST3 Gal III en *Aspergillus niger*. A los niveles actuales de expresión se necesitarían 300-450.000 litros de fermentación de levadura para producir suficiente enzima para la sialilación de 1 kg de la glicoproteína usando la sialiltransferasa ST6Gal I. En contraste, se necesitarían menos de 10 litros de fermentación de *Aspergillus niger* para la sialilación de 1 kg de glicoproteína usando la sialiltransferasa ST3Gal III. Por lo tanto, la capacidad de fermentación necesaria para producir la sialiltransferasa ST3Gal III para una reacción de sialilación a gran escala sería 10-100 veces menor que la necesaria para producir la ST6Gal I; el coste de producción de la sialiltransferasa se reduciría proporcionalmente.

3. Fucosilación para crear Sialil Lewis X

Este ejemplo expone la preparación de Activador del Plasminógeno de tipo Tisular (TPA) con antígeno de sialil Lewis X unido a N.

Sialilación. TPA expresado en células de mamíferos a menudo contiene una mayoría de los glicanos que terminan en ácido siálico, pero para asegurar la sialilación completa, sería beneficioso realizar primero una sialilación *in vitro*. Se incubaba TPA en un tampón adecuado (más preferentemente a pH entre 5,5 y 9, por ejemplo solución salina tamponada con Tris, pH 7,2) con ácido CMP siálico y sialiltransferasa durante un tiempo suficiente para convertir cualquier glicano que carece de ácido siálico en las especies sialiladas. Las condiciones típicas serían 1 mg/ml de TPA, ácido CMP siálico 3 mM, 0,02 U/ml de ST3Gal3, 32 °C durante 24 horas. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o mediante la inclusión de azida sódica al 0,02 %. La concentración de TPA está más preferentemente en el intervalo de 0,1 mg/ml hasta el límite de solubilidad del péptido. La concentración de CMP-AS debería ser suficiente para que haya exceso sobre los sitios disponibles, y puede variar de 50 μ M hasta 50 mM, y la temperatura de 2 °C hasta 40 °C. El tiempo necesario para completar la reacción dependerá de la temperatura, las cantidades relativas de enzima a sustrato aceptor, la concentración de sustrato donador, y el pH. Otras sialiltransferasas que pueden ser capaces de añadir ácido siálico en la unión 2,3 incluyen ST3Gal4; también se podrían usar transferasas microbianas.

Fucosilación. Las condiciones típicas para la fucosilación serían 1 mg/ml de TPA, GDP-fucosa 3 mM, 0,02 U/ml de FTVI, MnCl₂ 5 mM, 32 °C durante 24 h en solución salina tamponada con Tris. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o mediante la inclusión de azida sódica al 0,02 %. La concentración de TPA está más preferentemente en el intervalo de 0,1 mg/ml hasta el límite de solubilidad del péptido. La concentración de GDP-fucosa debería ser suficiente para que haya exceso en los sitios disponibles, y podría variar desde 50 μ M hasta 50 mM, y la temperatura de 2 °C hasta 40 °C. El tiempo necesario para completar la reacción dependerá de la temperatura, las cantidades relativas de enzima a sustrato aceptor, la concentración de sustrato donador, y el pH. Otras fucosiltransferasas que pueden ser capaces de preparar sialil Lewis x incluyen FTVII, FTV, FTIII, así como que también se podrían usar transferasas microbianas.

4. Reducción de la estructura del núcleo de alta manosa a tri-manosa: Activador del plasminógeno de tipo Tejido producido en CHO

Este ejemplo expone la preparación de Activador del Plasminógeno de tipo Tejido con un núcleo de trimanosa por reducción a partir de un glicano de alta manosa.

El activador del plasminógeno de tipo tejido (TPA) se produce actualmente en células de ovario de hámster chino (CHO) y contiene una baja cantidad de oligosacárido unido a N de alta manosa. Las manosas se pueden reducir usando diversas manosidasas específicas. La primera etapa es generar Man5GlcNAc2(Fuc0-1) a partir de Man9GlcNAc2(Fuc0-1). Esto se puede hacer usando manosidasa I. Después se usa GlcNAc (GlcNAc transferasa I) para preparar GlcNAcMan5GlcNAc2 (Fuc0-1) o se usa Manosidasa III para preparar Man3GlcNAc2(Fuc0-1). A partir

de Man3GlcNAc2(Fuc0-1), se puede producir GlcNAc1Man3GlcNAc2 (Fuc0-1) usando GlcNAcT1 o a partir de GlcNAc1Man5GlcNAc2(Fuc0-1), se puede producir GlcNAc1Man3GlcNAc2 (Fuc0-1) usando Manosidasa II. Después, GlcNAc1Man3GlcNAc2(Fuc0-1) se convierte en GlcNAc2Man3GlcNAc2 (Fuc0-1) usando GlcNAcTransferasa II (GlcNAcTII). Los dos restos de GlcNAc terminal después se galactosilan usando GalTI y después se sialilan con AS-PEG usando ST3GalIII.

A la inversa, se puede producir TPA en sistemas de levaduras o fúngicos. Se necesitaría un procesamiento similar para el material derivado de hongos.

5. Adición de GlcNAc a EPO

Este ejemplo expone la adición de un resto de GlcNAc sobre un núcleo de tri-manosilo.

10 **Adición de GlcNAc a EPO.** EPO se expresó en células de insecto SF-9 y se purificó (Protein Sciences, Meriden, CT). La conversión de un 100 % a partir de la glicofoma de tri-manosilo de Epo al "núcleo de tri-manosilo + 2 GlcNAc" (Pico 1, P1 en la Figura 32) se consiguió en 24 horas de incubación a 32 °C con 100 mU/ml de GlcNAcT-I y 100 mU/ml de GlcNAcT-II en las siguientes concentraciones finales de reacción:

15 MES 100 mM a pH 6,5, o Tris 100 mM a pH 7,5
 UDP-GlcNAc 5 mM
 MnCl₂ 20 mM
 100 mU/ml de GlcNAcT-I
 100 mU/ml de GlcNAcT-II
 1 mg/ml de EPO (purificada, expresada en células Sf9, adquirida en Protein Sciences).

20 **Análisis de glicofomas.** El presente ensayo es una ligera modificación en K-R Anumula y ST Dhume, Glycobiology 8 (1998) 685-69. N-glicanos liberados por N-glicanasa (PNGasa) se marcaron reductoramente con ácido antranílico. Los N-glicanos aminados reductoramente se inyectaron en una amino columna Shodex Asahipak NH2P-50 4D (4,6 mm x 150 mm). Se usaron dos disolventes para la separación: A) ácido acético al 5 % (v/v), tetrahidrofurano al 1 %, y trietilamina al 3 % en agua, y B) ácido acético al 2 % y tetrahidrofurano al 1 % en acetonitrilo. La columna después se eluyó isocráticamente con B al 70 % durante 2,5 minutos, seguido de un gradiente lineal durante un periodo de 25 se eluyó isocráticamente con B al 70 % durante 2,5 minutos, seguido de un gradiente lineal durante un periodo de 97,5 minutos yendo de B del 70 al 5 % y una elución isocrática final con B al 5 % durante 15 minutos. Los picos eluidos se detectaron usando detección por fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 230 nm y de emisión de 420 nm.

30 En estas condiciones, el núcleo de trimanosilo presentaba un tiempo de retención de 22,3 minutos, y el producto de la reacción de GnT presenta un tiempo de retención de 26,3 minutos. El material de partida fue exclusivamente núcleo de trimanosilo con núcleo de GlcNAc (Figura 32).

6. Remodelación de N-glicanos de alta manosa para hibridar y formar complejos de N-glicanos: RNasa pancreática bovina

35 Este ejemplo expone la preparación de RNasa de páncreas bovino con N-glicanos híbridos o complejos. Los glicanos de alta manosa unidos a la RNasa se digieren enzimáticamente y se elaboran para crear glicanos híbridos unidos a N. Adicionalmente, los glicanos unidos a N de alta manosa de la RNasa se digieren enzimáticamente y se elaboran con más detalle para crear glicanos complejos unidos a N.

40 Las estructuras de alta manosa de oligosacáridos unidos a N en glicopéptidos se pueden modificar a formas híbridas o complejas usando la combinación de α -manosidasas y glicosiltransferasas. Este ejemplo resume los resultados de dichos esfuerzos usando un N-Glicano sencillo como un sustrato modelo.

45 La ribonucleasa B (RNasa B) purificada a partir de páncreas bovino (Sigma) es un glicopéptido que consiste en 124 restos de aminoácido. Tiene un único sitio de N-glicosilación potencial modificado con estructuras de alta manosa. Debido a su simplicidad y su bajo peso molecular (13,7 kDa a 15,5 kDa), la ribonucleasa B es un buen candidato para demostrar la viabilidad de la remodelación de N-Glicano a partir de estructuras de alta manosa para hibridar para formar complejos de oligosacáridos unidos a N. El espectro de MALDI-TOF de la RNasaB y el perfil por HPLC para los oligosacáridos escindidos a partir de RNasaB mediante N-Glicanasa (Figura 33) indicaron que, aparte de una pequeña porción del péptido no modificada, la mayoría de los sitios de N-glicosilación del péptido se modifican con oligosacáridos de alta manosa que consisten en 5 a 9 restos de manosa.

50 **Conversión de N-glicanos de alta manosa en N-glicanos híbridos.** N-Glicanos de alta manosa se convirtieron en N-Glicanos híbridos usando la combinación de α 1,2-manosidasa, GlcNAcT-I (β -1,2-N-acetil glucosaminil transferasa), GalT-I (β 1,4-galactosiltransferasa) y α 2,3-sialiltransferasa /o α 2,6-sialiltransferasa como se muestra en la Figura 34.

Como un ejemplo, las estructuras de alta manosa en la RNasaB se convirtieron satisfactoriamente en estructuras híbridas.

Man₅GlcNAc₂-R se obtuvo a partir de Man_{5,9}GlcNAc₂-R catalizada mediante una sola α 1,2-manosidasa clonada a partir de *Trichoderma reesei* (Figura 35). La RNasa B (1 g, aproximadamente 67 μ mol) se incubó a 30 °C durante 45 h con 15 mU de la α 1,2-manosidasa de *T. reesei* recombinante en tampón MES (50 mM, pH 6,5) en un volumen total de 10 ml. Las estructuras Man_{6,9}GlcNAc₂-proteína se han convertido satisfactoriamente en Man₅GlcNAc₂-proteína con alta eficacia mediante la manosidasa recombinante.

Como alternativa, Man₅GlcNAc₂-R se obtuvo a partir de Man_{5,9}GlcNAc₂-R catalizada mediante una sola α 1,2-manosidasa purificada a partir de *Aspergillus saitoi* (Figura 36). RNasa B (40 μ g, aproximadamente 2,7 nmol) se incubó a 37 °C durante 42,5 h con 25 μ U de la α 1,2-manosidasa de *A. saitoi* comercial (Glyko o CalBioChem) en tampón NaOAc (100 mM, pH 5,0) en un volumen total de 20 μ l. Las estructuras de Man_{6,9}GlcNAc₂-proteína se convirtieron satisfactoriamente en Man₅GlcNAc₂-proteína mediante la manosidasa disponible en el mercado. Sin embargo, un nuevo pico que corresponde con la GlcNAc-proteína aparece en el espectro, indicando la posible contaminación de la endoglicosidasa H en la preparación. Aunque se necesitaron varias alfa-manosidasas de mamífero para conseguir esta etapa, la α 1,2-manosidasa fúngica fue muy eficaz para retirar todos los restos de manosa unidos en α 1,2.

A continuación, GlcNAcT-1 añadió un resto de GlcNAc a la Man₅GlcNAc₂-R (Figura 37). La mezcla de reacción después de la reacción de la α 1,2-manosidasa de *T. reesei* que contenía RNasa B (600 μ g, aproximadamente 40 nmol) se incubó con GlcNAcT-I recombinante no purificada (34 mU) en tampón MES (50 mM, pH 6,5) que contenía MnCl₂ (20 mM) y UDP-GlcNAc (5 mM) en un volumen total de 400 μ l. a 37 °C durante 42 h. Un resto de GlcNAc se añadió cuantitativamente a Man₅GlcNAc₂-proteína mediante la GlcNAcT-I recombinante.

Después se añadió en resto de Gal usando GalT 1 (Figura 38). La mezcla de reacción después de la reacción de GnT-1 que contenía RNasa B (120 μ g, aproximadamente 8 nmol) se incubó a 37 °C durante 20 h con 3,3 mU de la GalT-1 recombinante en tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7,3) que contenía UDP-Gal (7,5 mM) y MnCl₂ (20 mM) en un volumen total de 100 μ l. Se añadió un resto de Gal a aproximadamente un 98 % de la GlcNAc-Man₅GlcNAc₂-proteína mediante la GalT 1 recombinante.

La siguiente etapa fue la adición de un ácido siálico usando una α 2,3-sialiltransferasa o una α 2,6-sialiltransferasa (Figura 39). Como un ejemplo, se usó ST3Gal III, una α 2,3-sialiltransferasa. La mezcla de reacción después de la reacción de la GalT-1 que contenía RNasa B (13 μ g, aproximadamente 0,87 nmol) se incubó a 37 °C durante 16 h con 8,9 mU de ST3Gal III recombinante en tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7,3) que contenía CMP-Ácido siálico (5 mM) y MnCl₂ (20 mM) en un volumen total de 20 μ l. Se añadió un resto de ácido siálico a aproximadamente un 90 % de la Gal-GlcNAc-Man₅GlcNAc₂-proteína mediante ST3Gal III recombinante usando CMP-AS como el donador. El rendimiento se puede mejorar adicionalmente ajustando las condiciones de reacción.

Por conveniencia, no fue necesaria etapa de purificación o de diálisis después de cada reacción que se ha descrito anteriormente. De forma más interesante, GalT 1 y ST3Gal III se pueden combinar en una reacción en un solo recipiente. Se obtuvieron rendimientos similares en comparación con las reacciones separadas. La mezcla de reacción después de la reacción de GlcNAcT-I que contenía RNasa B (60 μ g, aproximadamente 4 nmol) se incubó a 37° C durante 20 h con 1,7 mU de GalT 1 recombinante, 9,8 mU de ST3Gal III recombinante en tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7,3) que contenía UDP-Gal (7,5 mM), CMP-ácido siálico (5 mM) y MnCl₂ (20 mM) en un volumen total de 60 μ l.

Como se muestra en la Figura 40, AS-PEG (10 kDa) se añadió satisfactoriamente a la RNasa B. La mezcla de reacción después de la reacción de GalT-1 que contenía RNasa B (6,7 μ g, aproximadamente 0,45 nmol) se dializó frente a H₂O durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubó a 37 °C durante 15,5 horas con 55 mU de la ST3Gal III recombinante en tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,3) que contenía CMP-AS-PEG (10 KDa) (0,25 mM) y MnCl₂ (20 mM) en un volumen total de 20 μ l. Los restos de ácido siálico modificado con PEG se añadieron satisfactoriamente al Gal-GlcNAc-Man₅GlcNAc₂-péptido mediante la ST3Gal III recombinante. El rendimiento se puede mejorar adicionalmente ajustando las condiciones de reacción.

Conversión de N-glicanos de alta manosa en N-glicanos complejos. Para conseguir esta conversión, se obtiene un compuesto intermedio de GlcNAc β 1,2Man₃GlcNAc₂-péptido. Como se muestra en la Figura 41, existen al menos cuatro rutas factibles para realizar la reacción a partir de Man₅GlcNAc₂-péptido hasta este compuesto intermedio:

Ruta I: El Man₅GlcNAc₂-péptido producido mediante la α 1,2 manosidasa fúngica es un sustrato de GlcNAc transferasa I (GlcNAcT-I, enzima 2) que añade una GlcNAc. Los restos de manosa terminal unidos a α 1,3- y α 1,6- del GlcNAcMan₅GlcNAc₂-péptido se retiran mediante α -manosidasa II de Golgi (ManII, enzima 5). Esta ruta es una parte de la secuencia natural para el procesamiento de oligosacáridos unidos a N realizada en organismos superiores.

Ruta II: Dos restos de manosa se retiran primero mediante una α -manosidasa (enzima 6), después se añade una GlcNAc mediante GlcNAcT-I (enzima 2). Aparte de su aceptor natural Man₅GlcNAc₂-R, GlcNAcT-I también puede reconocer a Man₃GlcNAc₂-R como su sustrato y añadir una GlcNAc a la estructura del núcleo de manosa para formar GlcNAcMan₃GlcNAc₂-péptido.

Ruta III: La manosa unida a α 1,6 se retira mediante una α 1,6-manosidasa, seguido de la adición de GlcNAc mediante GlcNAcT-1 y retirada de la manosa terminal unida a α 1,3 mediante una α 1,3-manosidasa. A partir de

los datos experimentales obtenidos, GlcNAcT-I puede reconocer este $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ -péptido como aceptor y añadir un resto de GlcNAc para formar $\text{GlcNAcMan}_4\text{GlcNAc}_2$ -péptido.

Ruta IV: De forma similar a la Ruta III, la manosa unida a $\alpha 1,3$ se retira mediante una $\alpha 1,3$ -manosidasa, seguido de reacción de GlcNAcT-I. Después la manosa terminal unida a $\alpha 1,6$ se puede retirar mediante una $\alpha 1,6$ -manosidasa.

Después de la función de GlcNAcT-I (responsable de la adición de la GlcNAc unida a $\beta 1,2$ a la $\alpha 1,3$ -manosa en el núcleo de manosa) y GlcNAcT-II (responsable de la adición de una segunda GlcNAc unida a $\beta 1,2$ a la $\alpha 1,6$ -manosa en el núcleo de manosa), el $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -péptido se puede procesar mediante GalT 1 y sialiltransferasa para formar N-glicanos biantenarios complejos. Otras GlcNAc transferasas tales como GlcNAcT-IV, GlcNAcT-V, y/o GlcNAcT-VI (Figura 41 y Figura 42) también pueden glicosilar el $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -péptido. La glicosilación adicional mediante GalT 1 y sialiltransferasas formarán N-glicanos poliantenarios complejos. La enzima GlcNAcT-III cataliza la inserción de una GlcNAc bisectriz, previniendo de este modo las acciones de ManII, GlcNAcT-II, GlcNAcT-IV y GlcNAcT-V.

7. Preparación de EPO con glicanos complejos poliantenarios.

Este ejemplo expone la preparación de EPO biantenaria, PEGilada, y EPO sialilada, triantenaria a partir de EPO expresada en células de insectos.

La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) a partir del sistema de expresión de baculovirus/Sf9 (Protein Sciences Corp., Meriden, CT) se sometió a análisis de glicanos y los glicanos resultantes mostraron que eran el núcleo principal de trimanosilo con núcleo de fucosa, con un pequeño porcentaje de glicanos que también tenían una única GlcNAc (EPO 1).

Adición de N-acetilglucosamina con GnT-I y GnT-II. Dos lotes de rhEPO (1 mg/ml) se incubaron con GnT-I y GnT-II, UDP-glcNAc 5 mM; MnCl_2 20 mM, y azida sódica al 0,02 % en MES 100 mM a pH 6,5 a 32 °C durante 24h. El lote A contenía 20 mg de EPO, y 100 mU/ml de GnT-I y 60 mU/ml de GnT-II. El lote B contenía 41 mg de EPO, y 41 mU/ml de GnT-I + 50 mU/ml de GnT-II. Después de la reacción, la muestra se desaló mediante filtración con gel (columnas PD10, Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ).

Glicanos de EPO analizados mediante establecimiento de perfiles por 2-AA HPLC. Este ensayo es una ligera modificación en Anumula y Dume, *Glycobiology* 8 (1998) 685-69. Los N-glicanos aminados reductoramente se inyectaron en una amino columna Shodex Asahipak NH2P-50 4D (4,6 mm x 150 mm). Se usaron dos disolventes para la separación, A) ácido acético al 5 % (v/v), tetrahidrofurano al 1 %, y trietilamina al 3 % en agua y B) ácido acético al 2 % y tetrahidrofurano al 1 % en acetonitrilo. La columna después se eluyó isocráticamente con B al 70 % durante 2,5 min, seguido de un gradiente lineal durante un periodo de 100 min yendo del 70 al 5 % de B, y una elución isocrática final con B al 5 % durante 20 min. Se detectaron los picos eluidos usando detección por fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 230 nm y de emisión de 420 nm. Los glicanos unidos a N no-sialilados entran en el intervalo de LC de 23-34 min, monosialilados de 34-42 min, disialilados de 42-52 min, trisialilados de 55-65 min y tetrasialilados de 68 -78 min.

El establecimiento de perfiles de glicanos por 2AA HPLC reveló que el lote A se convirtió en un 92 % en una estructura biantenaria con dos GlcNAc (el equilibrio tenía un único GlcNAc. El lote B mostró un 97 % de conversión al producto deseado (Figuras 43A y 42B).

Introducción de una tercera rama antenaria con GnT-V. EPO (1 mg/ml del lote B) a partir del producto de las reacciones de GnT-I y GnT-II, después de desalar en columnas PD-10 y posterior concentración, se incubó con 10 mU/ml de GnT-V y UDP-GlcNAc 5 mM en MES 100 mM a pH 6,5 que contenía MnCl_2 5 mM y azida sódica al 0,02 % a 32 °C durante 24 h. El análisis por 2AA HPLC demostró que la conversión se produjo con una eficacia de un 92 % (Figura 44).

Después de desalar (PD-10) y concentrar, se añadió galactosa con rGalTI: EPO (1 mg/ml) se incubó con 0,1 U/ml de GalT1, UDP-galactosa 5 mM, MnCl_2 5 mM a 32 °C durante 24 h.

Análisis MALDI de N-glicanos aminados reductoramente a partir de EPO. Una pequeña alícuota de los N-glicanos liberados por PNGasa a partir de EPO que se había marcado reductoramente con ácido antranílico se dializó durante 45 min en un filtro de membrana MF-Millipore (0,025 μm de poro, 47 mm de diámetro), que estaba flotando en agua. La alícuota dializada se secó en una concentradora speedvac, se volvió a disolver en una pequeña cantidad de agua, y se mezcló con una disolución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (10 g/l) disuelto en agua/acetoneitrilo (50:50). La mezcla se secó sobre el objetivo y se analizó usando un espectrómetro de masas DE-Pro MALDI-TOF de Applied Biosystems funcionando en modo lineal/ión negativo. Los oligosacáridos se asignaron basándose en la relación de masa a carga observada y en la literatura precedente.

El análisis de los glicanos liberados por MALDI mostró que la galactosa se añadió cuantitativamente a todos los sitios disponibles (Figura 45). La EPO galactosilada a partir de lo anterior se purificó después mediante filtración en gel en una columna Superdex 1,6/60 en Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 6.

Sialilación. Después de concentración y desalación (PD-10), 10 mg de EPO galactosilada (1 mg/ml) se incubó con ST3Gal3 (0,05 U/ml), y CMP-AS (3 mM) en Tris50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2 que contenía azida sódica al 0,02 %. Una alícuota separada contenía CMP-AS radiomarcado. La etiqueta resultante incorporada y la etiqueta libre se separaron por cromatografía de exclusión por tamaño isocrática/HPLC a 0,5 ml/min en MeOH al 45 %, TFA al 0,1 % (columna de 7,8 mm x 30 cm, tamaño de partícula de 5 µm, TSK G2000SW_{XL}, Toso Haas, Ansys Technologies Lake Forest, CA). Usando este procedimiento, se incorporaron un 12 % de las cuentas (360 micromolar, a EPO 33 micromolar, o aproximadamente 10,9 moles/mol). Incorporación teórica (3 sitios unidos a N, tri-antenario) es aproximadamente 9 moles/mol. Estos tienen correspondencia dentro de los límites del procedimiento. En una reacción idéntica con ST6Gal1 en lugar de ST3Gal3, se incorporó un 5,7 % de la radioetiqueta en la EPO galactosilada, o aproximadamente un 48 % en comparación con ST3Gal3.

B. GlicoPEGilación

8. Preparación de CMP-AS-PEG

Este ejemplo expone la preparación de CMP-AS-PEG.

Preparación de 2-(benciloxicarboxamido)-glicilamida-2-desoxi-D-manopiranososa. Se añadió éster de N-benciloxicarbonil-glicil-N-hidroxisuccinimida (3,125 g, 10,2 mmol) a una disolución que contenía D-manosamina-HCl (2 g, 9,3 mmol) y trietilamina (1,42 ml, 10,2 mmol) disuelta en MeOH (10 ml) y H₂O (6 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y se concentró usando evaporación rotatoria. La cromatografía (sílice, MeOH/CH₂Cl₂ al 10 %) produjo 1,71 g (rendimiento de un 50 %) de producto en forma de un sólido de color blanco: R_f = 0,62 (sílice; CHCl₃:MeOH:H₂O, 6/4/1); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ 3,24-3,27 (m, 2H), 3,44 (t, 1H), 3,55 (t, 1H), 3,63-3,66 (m, 1H), 3,76-3,90 (m, 6H), 3,91 (s, 2H), 4,0 (dd, 2H), 4,28 (d, 1H, J = 4,4), 4,41 (d, 1H, J = 3,2), 5,03 (s, 1H), 5,10 (m, 3H), 7,29-7,38 (m, 10H).

Preparación de 5-(N-benciloxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato. 2-(N-Benciloxicarboxamido) glicilamida-2-desoxi-D-manopiranososa (1,59 g, 4,3 mmol) se disolvió en una disolución de HEPES 0,1 M (12 ml, pH 7,5) y piruvato sódico (4,73 g, 43 mmol). Ácido neuramínico aldolasa (540 U de enzima en 45 ml de disolución tamponada con fosfato 10 mM que contenía NaCl 0,1 M a pH 6,9) y la mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 24 h. La mezcla de reacción después se centrifugó y el sobrenadante se cromatografió (sílice C18, gradiente de H₂O (100 %) a MeOH al 30 %/agua). Las fracciones apropiadas se combinaron, se concentraron y el residuo se cromatografió (sílice, gradiente de MeOH al 10 %/CH₂Cl₂ a CH₂Cl₂/MeOH/H₂O a 6/4/1). Las fracciones apropiadas se recogieron, se concentraron y el residuo se volvió a suspender en agua. Después de liofilización, se obtuvo el producto (1,67 g, rendimiento de un 87 %) en forma de un sólido de color blanco: R_f = 0,26 (sílice, CHCl₃/MeOH/H₂O a 6/4/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,82 (t, 1H), 2,20 (m, 1H), 3,49 (d, 1H), 3,59 (dd, 1H), 3,67-3,86 (m, 2H), 3,87 (s, 2H), 8,89-4,05 (m, 3H), 5,16 (s, 2H), 7,45 (m, 5H).

Preparación de 5-glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato. 5-(N-Benciloxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (1,66 g, 3,6 mmol) se disolvió en 20 ml de agua/metanol al 50 %. El matraz se evacuó repetidamente y se colocó en atmósfera de argón y después se añadió Pd al 10 %/C (0,225 g). Tras la evacuación repetida, después se añadió hidrógeno (aproximadamente 1 atm) al matraz y la mezcla de reacción se agitó durante 18 h. La mezcla de reacción se filtró a través de celite, se concentró por evaporación rotatoria y se liofilizó para producir 1,24 g (rendimiento de un 100 %) de producto en forma de un sólido de color blanco: R_f = 0,25 (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,83 (t, 1H, J = 9,9), 2,23 (dd, 1H, J = 12,9, 4,69), 3,51-3,70 (m, 2H), 3,61 (s, 2H), 3,75-3,84 (m, 2H), 3,95-4,06 (m, 3H).

Preparación de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-fluorenilmetoxi-carboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Una disolución que contiene 5-glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (0,55 g, 1,70 mmol) disuelto en 20 ml de H₂O se añadió a una disolución de Tris (1,38 g, 11,4 mmol), MgCl₂ 1 M (1,1 ml) y BSA (55 mg). El pH de la disolución se ajustó a 8,8 con NaOH 1 M (2 ml) y se añadió CTP-2Na⁺ (2,23 g, 4,2 mmol). El pH de la mezcla de reacción se controló con un controlador de pH que administraba NaOH 1 M según la necesidad para mantener un pH 8,8. La proteína de fusión (sialiltransferasa/CMP-ácido neuramínico sintetasa) se añadió a la disolución y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 días, se añadió una cantidad adicional de proteína de fusión y la reacción se agitó un periodo adicional de 40 horas. La mezcla de reacción se precipitó en EtOH y el precipitado se lavó 5 veces con EtOH frío para producir 2,3 gramos de un sólido de color blanco. Aproximadamente 1,0 g del producto en bruto se disolvió en 1,4 dioxano (4 ml), H₂O (4 ml) y NaHCO₃ saturado (3 ml) y se añadió gota a gota una disolución de Fmoc-Cl (308 mg, 1,2 mmol) disuelta en 2 ml de dioxano. Después de agitar durante 16 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró a aproximadamente 6 ml por evaporación rotatoria y se purificó usando cromatografía (sílice C18, gradiente de H₂O al 100 % a MeOH al 30 %/H₂O). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron. El residuo se disolvió en agua y liofilizó para producir 253 mg de un sólido de color blanco: R_f = 0,50 (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,64 (dt, 1H, J = 12,0, 6,0), 2,50 (dd, 1H, J = 13,2, 4,9), 3,38 (d, J = 9,67, 1H), 3,60 (dd, J = 11,65, 6,64, 1H), 3,79 (d, J = 4,11, 1H), 3,87 (dd, J = 12,24, 1,0, 1H), 3,97 (m, 2H), 4,07 (td, J = 10,75, 4,84, 1H), 4,17 (dd, J = 10,68, 1,0, 1H), 4,25 (s, 2H), 4,32 (t, J = 4,4, 1H), 4,37 (t, J = 5,8, 1H), 4,6-4,7 (m, oscurecido por el pico de disolvente), 5,95 (d, J = 4, 1H), 6,03 (d, J = 7,4, 1H), 7,43-7,53 (m, 3H), 7,74 (m,

2H), 7,94 (c, J = 7, 3H). MS (ES); calc. Para $C_{35}H_{42}N_5O_{18}P$ ($[M-H]^-$), 851,7; encontrado 850,0.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato). Se añadió diisopropilamina (83 µl, 0,587 µmol) a una disolución de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-fluorenil-metoxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato] (100 mg, 0,117 mmol) disuelto en agua (3 ml) y metanol (1 ml). La mezcla de reacción se agitó 16 h a temperatura ambiente y el metanol de la reacción se retiró de la mezcla de reacción por evaporación rotatoria. La mezcla de reacción bruta se filtró a través de una columna de gel de sílice C18 usando agua y el eluyente se recogió y se liofilizó para producir (87 mg, 100 %) de producto en forma de un sólido de color blanco: $R_f = 0,21$ (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H, J = 5,3), 2,50 (dd, 1H, J = 13,2,4,6), 3,43 (d, J = 9,58, 1H), 3,63 (dd, J = 11,9, 6,44, 1H), 3,88 (dd, J = 11,8, 1,0, 1H), 3,95 (td, J = 9,0, 2,3, 1H), 4,10 (t, J = 10,42, 1H), 4,12 (td, J = 10,34, 4,66, 1H), 4,18 (d, J = 10,36, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,31 (t, J = 4,64, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J = 4,37, 1H), 6,13 (d, J = 7,71, 1H), 7,98 (d, J = 7,64, 1H). MS (ES); calc. para $C_{21}H_{32}N_5O_{11}P$ ($[M-H]^-$), 629,47; encontrado 627,9.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-metoxi-poliioxietileno-(1 KDa)-3-oxipropionamido)-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Se añadió hexafluorofosfato de benciltriazol-1-iloitris(dimetilamino)-fosfonio (BOP, 21 mg, 48 µmol) a una disolución de ácido metoxipoliioxietileno-(peso molecular medio de 1 KDa)-3-oxipropiónico (48 mg, 48 µmol) disuelto en DMF anhidra (700 µl) y trietilamina (13 µl, 95 µmol). Después de 30 min, se añadió una disolución que contenía citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato) (30 mg, 48 µmol), agua (400 µl) y trietilamina (13 µl, 95 µmol). Esta disolución se agitó 20 min a temperatura ambiente y después se cromatografió (sílice C18, gradiente de metanol/agua). Las fracciones apropiadas se recogieron, se concentraron, el residuo se disolvió en agua y se liofilizó para producir 40 mg (rendimiento de un 50 %) de un sólido de color blanco: $R_f = 0,36$ (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H, J = 5,3), 2,50 (dd, 1H, J = 13,2, 4,6), 2,64 (t, J = 5,99, 3H), 3,43 (d, J = 9,58, 1H), 3,63 (m, 1H), 3,71 (s, 70H), 3,79 (m, oscurecido por un pico a 3,71), 3,82 (t, J = 6,19, 1H), 3,88 (dd, J = 11,8, 1,0, 1H), 3,95 (td, J = 9,0, 2,3, 1H), 3,98 (t, J = 5,06, 1H), 4,12 (td, J = 10,34, 4,66, 1H), 4,18 (d, J = 10,36, 1H), 4,23 (d, J = 4,85, 2H), 4,31 (t, J = 4,64, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J = 4,55, 1H), 6,13 (d, J = 7,56, 1H), 7,98 (d, J = 7,54, 1H). MS (MALDI), observado $[M-H]^-$; 1594,5, 1638,5, 1682,4, 1726,4, 1770,3, 1814,4, 1858,2, 1881,5, 1903,5, 1947,3.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-metoxi-poliioxietileno-(10 KDa)-oxicarboxamido)-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Se añadió citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato) (2,5 mg, 4 µmol) y agua (180 µl) a una disolución de éster de (metoxipoliioxietileno-(10 KDa, peso molecular medio)-oxicarbonil-(N-oxibenzotriazol) (40 mg, 4 µmol) en DMF anhidra (800 µl) que contiene trietilamina (1,1 µl, 8 µmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se diluyó con agua (8 ml) y se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (C 18 sílice, gradiente de metanol/agua). Las fracciones apropiadas se combinaron, se concentraron, el residuo se disolvió en agua y se liofilizó produciendo 20 mg (rendimiento de un 46%) de producto en forma de un sólido de color blanco: $R_f = 0,35$ (sílice, IPA/H₂O/NH₄OH a 7/2/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H), 2,50 (dd, 1H), 2,64 (t, 3H), 3,55-3,7 (m, oscurecido por un pico a 3,71), 3,71 (s, 488H), 3,72-4,0 (m, oscurecido por un pico a 3,71), 4,23 (m, 3H), 4,31 (t, 1H), 4,35 (t, 1H), 6,00 (d, J = 4,77, 1H), 6,12 (d, J = 7,52, 1H), 7,98 (d, J = 7,89, 1H). MS (MALDI), observado $[M-CMP+Na]^+$; 10780.

9. GlicoPEGilación de FSH derivada de pituitaria humana

Este ejemplo ilustra el ensamblaje de un conjugado de la divulgación. La Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) se desialila y después se conjuga con CMP-(ácido siálico)-PEG.

Desialilación de Hormona Estimuladora de los Folículos. Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) (Pituitaria Humana, Calbiochem N° de Cat. 869001), 1 mg, se disolvió en 500 µl de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM. Esta disolución, 375 µl, se transfirió a un tubo de plástico pequeño y se le añadieron 263 mU de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*). La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 15 horas a 32 °C. La mezcla de reacción se añadió a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa, 600 µl, equilibrado previamente con Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM y NaN₃ al 0,05 % y se hizo girar suavemente durante 6,5 horas a 4 °C. La suspensión se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavaron 5 veces con 0,5 ml del tampón y todos los sobrenadantes se combinaron. La disolución enzimática se dializó (7000 MWCO) durante 15 horas a 4 °C con 2 l de una disolución que contenía Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05 %, y después dos veces durante 4 horas a 4 °C en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05 %. La disolución se concentró a 2 µg/µl mediante Speed Vac y se almacenó a -20 °C. Las muestras de reacción se analizaron mediante geles de IEF (pH 3-7) (Invitrogen) (Figura 46).

Preparación de AS-FSH derivada de pituitaria humana y PEG-AS-Hormona Estimuladora de los Folículos. FSH desialilada (100 µg, 50 µl) y CMP-ácido siálico o CMP-AS-PEG (1 kDa o 10 kDa) (0,05 µmol) se disolvieron en 13,5 µl de H₂O (ajustado a pH 8 con NaOH) en tubos de plástico de 0,5 ml. Los tubos se agitaron vorticialmente brevemente y se añadieron 40 mU de ST3Gal3 (36,5 µl) (volumen total de 100 µl). Los tubos se agitaron vorticialmente de nuevo y se agitaron suavemente durante 24 horas a 32 °C. Las reacciones se detuvieron por congelación a -80 °C. Las masas de reacción de 15 µg se analizaron por SDS-PAGE (Figura 47), geles de IEF

(Figura 48) y MALDI-TOF. También se analizó la FSH nativa por SDS-PAGE (Figura 49).

Análisis de SDS PAGE e IEF en Geles de los Productos de Reacción. Geles de 1 mm de Tris-Glicina al 8-16% de Novex para análisis de SDS PAGE se adquirieron en Invitrogen. 7,5 μ l (15 μ g) de muestras de reacción de FSH se diluyeron con 5 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tampón NaN_3 al 0,05 %, se mezclaron con 15 μ l de tampón de carga de muestras y 1 μ l de μ -mercaptoetanol 9 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se realizaron según las indicaciones de Invitrogen y se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Invitrogen).

Muestras de FSH (15 μ g) se diluyeron con 5 μ l de tampón Tris y se mezclaron con 15 μ l de tampón de carga de muestras (Figura 46). Después las muestras se aplicaron a Geles de Enfoque Isoeléctrico (pH 3-7) (Invitrogen) (Figura 49). Los geles se realizaron y se fijaron según las indicaciones de Invitrogen y después se tiñeron con Tinte Azul Coloidal.

10. GlicoPEGilación de FSH recombinante producida recombinantemente en células CHO

Este ejemplo ilustra el ensamblaje de un conjugado de la divulgación. FSH desialilada se conjugó con CMP-(ácido siálico)-PEG.

Preparación de Asialo-Hormona Estimuladora de los Folículos recombinante. La Hormona Estimuladora de los Folículos recombinante (rFSH) producida a partir de CHO se usó en estos estudios. Las 7.500 IU de Gonadotropin (Gonal-F) se disolvieron en 8 ml de agua. La disolución de FSH se dializó en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl_2 5 mM y se concentró a 500 μ l en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. Una porción de esta disolución (400 μ l) (~ 0,8 mg de FSH) se transfirió a un tubo de plástico pequeño y se le añadieron 275 mU de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*). La mezcla de reacción se mezcló durante 16 horas a 32 °C. La mezcla de reacción se añadió a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa lavado previamente (800 μ l) y se hizo girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavaron 3 veces con 0,6 ml de tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinaron. El sobrenadante se dializó a 4 °C frente a 2 l de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN_3 al 0,05 % y después dos veces más frente a Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN_3 al 0,05 %. La disolución dializada se concentró después a 420 μ l en un filtro centrífugo Centricon Plus 20 y se almacenó a -20 °C.

Las muestras de rFSH nativa y desialilada se analizaron por SDS-PAGE e IEF (Figura 50). Los geles de 1 mm de Tris-Glicina al 8-16% de Novex se adquirieron en Invitrogen. Las muestras (7,5 μ l, 15 μ g) se diluyeron con 5 μ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tampón NaN_3 al 0,05 %, se mezclaron con 15 μ l de tampón de carga de muestras y 1 μ l de β -mercaptoetanol 9 M y calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se realizaron según las indicaciones de Invitrogen y se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Invitrogen). Los Geles de Enfoque Isoeléctrico (pH 3-7) se adquirieron en Invitrogen. Las muestras (7,5 μ l, 15 μ g) se diluyeron con 5 μ l de tampón Tris y se mezclaron con 15 μ l tampón de carga de muestras. Los geles se cargaron, se desarrollaron y se fijaron según las indicaciones de Invitrogen. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal. Las muestras de FSH nativa y desialilada también se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF.

Sialil-PEGilación de Hormona Estimuladora de los Folículos recombinante. FSH desialilada (100 μ g, 54 μ l) y CMP-AS-PEG (1 kDa o 10 kDa) (0,05 μ mol) se disolvieron en 28 μ l Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN_3 al 0,05 %, pH 7,2 en tubos de plástico de 0,5 ml. Los tubos se agitaron vorticialmente brevemente y se añadieron 20 mU de ST3Gal3 (volumen total de 100 μ l). Los tubos se agitaron vorticialmente de nuevo, se mezcló suavemente durante 24 horas a 32 °C y las reacciones se detuvieron por congelación a -80 °C. Las muestras de esta reacción se analizaron como se ha descrito anteriormente por geles de SDS-PAGE (Figura 51), geles de IEF (Figura 52) y EM MALDI-TOF.

También se realizó MALDI en la rFSH PEGilada. Durante la ionización, AS-PEG se elimina partir de la estructura del N-glicano de la glicoproteína. La FSH nativa dio un pico a 13928; AS-rFSH (13282); r-FSH resialilada (13332); PEG100-rFSH (13515; 14960 (1); 16455 (2); 17796 (3); 19321 (4)); y PEG 10000 (23560 (1); 24790 (2); 45670 (3); y 56760 (4)).

11. Estudio Farmacocinético de FSH GlicoPEGilada

Este ejemplo expone el ensayo de las propiedades farmacocinéticas de la Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) glicoPEGilada preparada de acuerdo con los procedimientos de la divulgación en comparación con la FSH no PEGilada.

FSH, FSH-AS-PEG (1 KDa) y FSH-AS-PEG (10 KDa) se radioionizaron usando condiciones convencionales (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) y se formularon en solución salina tamponada con fosfato que contenía BSA al 0,1 %. Después de dilución en tampón de fosfato hasta la concentración apropiada, cada una de las proteínas FSH del ensayo (0,4 μ g, cada una) se inyectó por vía intravenosa en ratas hembra de Sprague Dawley (250-300 g de peso corporal) y se extrajo sangre en los puntos temporales de 0 a 80 horas. Se analizó la radiactividad en las muestras de sangre usando un contador gamma y se analizó la farmacocinética usando procedimientos convencionales (Figura 53). FSH se aclaró a partir de la sangre mucho más rápidamente que FSH-PEG (1 KDa), que a su vez era transparente en cierto modo más rápidamente que FSH-PEG (10 KDa).

12. Bioensayo para péptidos de FSH

Este ejemplo expone un bioensayo para la actividad de la Hormona Estimuladora de los Folículos (FSH) basado en células de Sertoli cultivadas. Este ensayo es útil para determinar la bioactividad de FSH después de la remodelación de glicanos, incluyendo la glicoconjugación.

- 5 Este bioensayo se basa en la relación dosis-respuesta que existe entre la cantidad de estradiol producido cuando la FSH, pero no la hormona luteinizante (LH), se añade a células de Sertoli cultivadas obtenidas a partir de ratas viejas inmaduras. La testosterona exógena se convierte en 17 β -estradiol en presencia de FSH.

10 Ratas Sprague-Dawley con siete a 10 días se usaron para obtener células de Sertoli. Después de sacrificarlas, los testículos se desencapsularon y el tejido se dispersó por incubación en colagenasa (1 mg/ml), tripsina (1 mg/ml), hialuronidasa (1 mg/ml) y DNasas (5 μ g/ml) durante 5 a 10 min. Los fragmentos de túbulos se asentaron en el fondo del matraz y se lavaron en PBS (1x). Los fragmentos de túbulos se volvieron a incubar durante 20 min con un medio que contenía las mismas enzimas: colagenasa (1 mg/ml), tripsina (1 mg/ml), hialuronidasa (1 mg/ml) y DNasas (5 μ g/ml).

15 Los fragmentos de túbulos se homogeneizaron y se sembraron en una placa de 24 pocillos en un medio sin suero. Se dispersaron 5 x 10⁵ células por pocillo. Después de 48 h de incubación a 37 °C y CO₂ al 5 %, se añadió medio recién preparado a las células. Composición del medio sin suero: DMEM (1 vol), mezcla de nutrientes F10 de Ham (1 vol), insulina 1 μ g/ml, Transferrina 5 μ g/ml, EGF 10 ng/ml, T4 20 pg/ml, Hidrocortisona 10⁻⁸ M, Ácido retinoico 10⁻⁶ M.

20 El experimento de estimulación consiste en una incubación de 24 horas con FSH convencional o con muestras a 37 °C y CO₂ al 5 %. El coeficiente de variación medio dentro de los ensayos es de un 8 % y el coeficiente de variación media entre los ensayos es de un 11 %.

El Kit DE2000 para calcular 17 β -estradiol por Elisa (R&D Systems, Minneapolis, MN) se usó para cuantificar el nivel de estradiol después de incubación con FSH, FSH-AS-PEG (1 KDa) y FSH-AS-PEG (10 KDa).

25 El procedimiento fue como sigue a continuación: 100 μ l de Estradiol Convencional (proporcionado con el kit y preparado según las instrucciones con el kit) o una muestra se pipeteó en pocillos de la placa o las placas para Elisa para 17 β -estradiol; se añadieron a cada pocillo 50 μ l de Conjugado de 17 β -estradiol (proporcionado con el kit, preparado según las instrucciones con el kit); se añadieron a cada pocillo 50 μ l de disolución de anticuerpos de 17 β -estradiol (proporcionada con el kit, preparado según las instrucciones con el kit); las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente a 200 rpm; el líquido se aspiró de cada pocillo; los pocillos se lavaron 4 veces usando la disolución de lavado; todo el líquido se retiró de los pocillos; 200 μ l de sustrato de pNPP (proporcionado con el kit, preparado según las instrucciones con el kit) se añadieron a todos los pocillos y se incubó durante 45 min; se añadieron 50 μ l de disolución de Parada (proporcionada con el kit, preparado según las instrucciones con el kit) y las placas se leyeron a 405 nm (Figura 54). Mientras que FSH-PEG (10 KDa) presentaba una estimulación discreta de las células de Sertoli, a 1 μ g/ml, FSH-PEG (1 KDa) estimuló las células de Sertoli hasta un 50 % más que la FSH sin PEGilar.

13. GlicoPEGilación de Transferrina

Este ejemplo expone la preparación de asialotransferrina y su sialilación con PEG-CMP-ácido siálico.

40 **Preparación de Asialo-transferrina.** Holo-Transferrina derivada de ser humano, (10 mg) se disolvió en 500 μ l de NaOAc 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 5,5. A esta disolución se añadieron 500 mU de Neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) y la mezcla de reacción se agitó suavemente durante 20,5 horas a 37 °C. La mezcla de reacción se añadió al conjugado lavado previamente de ácido N-(p-aminofenil) oxámico-agarosa (600 μ l) y las perlas lavadas se hicieron girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. La mezcla de reacción se ajustó a EDTA 5 mM mediante la adición de 100 μ l de EDTA 30 mM a las perlas lavadas, que se hicieron girar suavemente durante 20 horas a 4 °C. La suspensión se centrifugó Durante 2 minutos a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavaron 5 veces con 0,35 ml de NaOAc 50 mM, CaCl₂ 5 mM, EDTA 5 mM, pH 5,5 y todos los sobrenadantes se combinaron. La disolución enzimática se dializó dos veces a 4 °C en Tris-HCl 15 mM, NaCl 1 M, pH 7,4. Se retiraron 0,3 ml de la disolución de transferrina (3,3 ml en total) y se dializó dos veces frente a agua. El resto se dializó dos veces más a 4 °C frente a solución salina tamponada con fosfato. La disolución dializada se almacenó a -20 °C. Las muestras de proteínas se analizaron por IEF Electroforesis. Las muestras (9 μ l, 25 μ g) se diluyeron con 16 μ l de tampón Tris y se mezclaron con 25 μ l del tampón de carga de muestras y se aplicó a Geles de Enfoque Isoeléctrico (pH 3-7). Los geles se desarrollaron y se fijaron usando procedimientos convencionales. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal.

55 **Sialil-PEGilación de asialo-Transferrina.** Transferrina desialilada (250 μ g) y CMP-ácido siálico o CMP-AS-PEG (1 kDa o 10 kDa) (0,05 μ mol) se disolvieron en 69 μ l de Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2 en tubos de plástico de 1,5 ml. Los tubos se agitaron vorticialmente brevemente y se añadieron 100 mU de ST3Gal3 (90 μ l) (volumen total de 250 μ l). Los tubos se agitaron vorticialmente de nuevo y se mezcló suavemente durante 24 horas a 32 °C. Las reacciones se detuvieron por congelación a -80 °C. Se usaron geles de 1 mm de Tris-Glicina al 8-16% de

Novex para el análisis SDS PAGE (Figura 55). Las muestras (25 μ l, 25 μ g) se mezclaron con 25 μ l de tampón de carga de muestras y 0,4 μ l de β -mercaptoetanol y se calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se desarrollaron usando condiciones convencionales y se tiñeron con Tinte Azul Coloidal. Los geles para IEF también se realizaron como se ha descrito anteriormente (Figura 56). Las muestras también se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF.

Resultados. También se realizó MALDI. Transferrina nativa (78729); asialotransferrina (78197); transferrina resialilada (79626/80703); con AS-PEG 1k (79037 (1); 80961 (2); 82535 (3); 84778 (4)); con AS-PEG 5k (90003 (2); 96117 (3); 96117 (4)); con AS-PEG 10k (100336 (2); 111421 (3); 122510(4)).

14. GlicoPEGilación de Factor VIIa Recombinante producido en células BHK

Este ejemplo expone la PEGilación del Factor VIIa recombinante producida en células CHO.

Preparación de Asialo-Factor VIIa. El Factor VIIa recombinante se produjo en células BHK (células renales de cría de hámster). El Factor VIIa (14,2 mg) se disolvió a 1 mg/ml en disolución tampón (pH 7,4, Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 0,001 M, NaN₃ al 0,05 %) y se incubó con 300 mU/ml de conjugado de sialidasa (*Vibrio cholera*)-agarosa durante 3 días a 32 °C. Para controlar la reacción, se diluyó una pequeña alícuota de la reacción con el tampón apropiado y se realizó un gel para IEF de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen (Figura 57). La mezcla se centrifugó a 3.500 rpm y se recogió el sobrenadante. La resina se lavó tres veces (3 x 2 ml) con la disolución tampón anterior (pH 7,4, Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %) y los lavados combinados se concentraron en un Centricon-Plus-20. La disolución restante se cambió de tampón con Tris 0,05 M (pH 7,4), NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 % hasta un volumen final de 14,4 ml.

Preparación de Factor VIIa-AS-PEG (1 KDa y 10 KDa). La disolución de desialilación del rFactor VIIa se dividió en dos muestras iguales de 7,2 ml. A cada muestra se añadió CMP-AS-5-PEG (1 KDa) (7,4 mg) o CMP-AS-5-PEG (10 KDa) (7,4 mg). Se añadió ST3Gal3 (1,58 U) a ambos tubos y las mezclas de reacción se incubaron a 32 °C durante 96 h. La reacción se controló por gel para SDS-PAGE usando los reactivos y las condiciones descritos por Invitrogen. Cuando la reacción se completó, la mezcla de reacción se purificó usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. Las fracciones combinadas que contenían el producto se concentraron a 4 °C en filtros centrifugos Centricon-Plus-20 (Millipore, Bedford, MA) y la disolución concentrada se volvió a formular para producir 1,97 mg (ensayo de proteínas del ácido bicinconínico, ensayo BCA, Sigma-Aldrich, St. Louis MO) de Factor VIIa-PEG. El producto de la reacción se analizó usando análisis de SDS-PAGE y de IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos suministrados por Invitrogen. Las muestras se dializaron frente a agua y se analizaron por MALDI-TOF. La Figura 58 muestra los resultados por MALDI para el Factor VIIa nativo. La Figura 59 contiene los resultados por MALDI para el Factor VIIa PEGilado con PEG de 1 KDa en los que el Factor VIIa PEGilado con PEG de 1 KDa es evidente. La Figura 60 contiene los resultados por MALDI para el Factor VIIa PEGilado con PEG de 10 KDa en los que es evidente un pico para el Factor VIIa PEGilado con PEG de 10 KDa. La Figura 61 representa el análisis de SDS-PAGE de todos los productos de reacción, en el que es evidente una banda para el Factor VIII-AS-PEG (10-KDa).

15. GlicoPEGilación del Factor IX producido en células CHO

Este ejemplo expone la preparación de asialoFactor IX y su sialilación con PEG-CMP-ácido siálico.

Desialilación del rFactor IX. Una forma recombinante del Factor IX de Coagulación (rFactor IX) se preparó en células CHO. 6000 IU de rFactor IX se disolvieron en un total de 12 ml de USP H₂O. Esta disolución se transfirió a un filtro centrifugo PL-10, Centricon Plus 20, con otros 6 ml de USP H₂O. La disolución se concentró a 2 ml y después se diluyó con 15 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05 % y después se volvió a concentrar. La dilución/concentración se repitió 4 veces para cambiar eficazmente el tampón hasta un volumen final de 3,0 ml. De esta disolución, se transfirieron 2,9 ml (aproximadamente 29 mg de rFactor IX) a un tubo de plástico pequeño y se le añadieron 530 mU de conjugado de α 2-3,6,8-Neuraminidasa-agarosa (*Vibrio cholerae*, Calbiochem, 450 μ l). La mezcla de reacción se hizo girar suavemente durante 26,5 horas a 32 °C. La mezcla se centrifugó 2 minutos a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas de agarosa (que contenían neuraminidasa) se lavaron 6 veces con 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,12, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05 %. Los lavados y los sobrenadantes combinados se centrifugaron de nuevo durante 2 minutos a 10.000 rpm para retirar cualquier resina de agarosa residual. La disolución de proteínas desialilada, combinada se diluyó a 19 ml con el mismo tampón y se concentró por debajo de ~ 2 ml en un filtro centrifugo PL-10 Centricon Plus 20. La disolución se diluyó dos veces con 15 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 % y se volvió a concentrar hasta 2 ml. La disolución final de rFactor IX desialilado se diluyó hasta un volumen final de 3 ml (~10 mg/ml) con el tampón Tris. Las muestras de rFactor IX nativo y desialilado se analizaron por IEF-Electroforesis. Los Geles de Enfoque Isoeléctrico (pH 3-7) se desarrollaron usando muestras de 1,5 μ l (15 μ g) diluidas primero con 10 μ l de tampón Tris y mezcladas con 12 μ l de tampón de carga de muestras. Los geles se cargaron, se desarrollaron y se fijaron usando procedimientos convencionales. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Figura 62), mostrando una banda para el Factor IX desialilado.

Preparación de PEG (1 kDa y 10 kDa)-AS-Factor IX. rFactor-IX desialidado (29 mg, 3 ml) se dividió en dos muestras de 1,5 ml (14,5 mg) en dos tubos para centrifuga de 15 ml. Cada disolución se diluyó con 12,67 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 % y se añadió CMP-AS-PEG-1k o 10k (7,25 µmol). Los tubos se invirtieron suavemente para mezclar y se añadieron 2,9 U de ST3Gal3 (326 µl) (volumen total 14,5 ml). Los tubos se invirtieron de nuevo y se hicieron girar suavemente durante 65 horas a 32 °C. Las reacciones se detuvieron por congelación a -20 °C. Se analizaron muestras de 10 µg de las reacciones por SDS-PAGE. Las proteínas PEGiladas se purificaron en una columna Toso Haas Biosep G3000SW (21,5 x 30 cm, 13 µm) para HPLC con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH 7,1 (Gibco), 6 ml/min. La reacción y la purificación se controlaron usando SDS Page y geles para IEF. Se cargaron geles de 1 mm de Tris-Glicina al 4-20 % de Novex con 10 µl (10 µg) de muestras después de dilución con 2 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tampón NaN₃ al 0,05 % y se mezcló con 12 µl de tampón de carga de muestras y 1 µl de DTT 0,5 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C. Los geles se tiñeron con Tinte Azul Coloidal (Figura 63) mostrando una banda para PEG (1 kDa y 10 kDa)-AS-Factor IX.

16. Sialil-GlicoPEGilación Directa de Factor-IX

Este ejemplo expone la preparación de sialil-glicoPEGilación de péptidos sin tratamiento anterior con sialidasa. Aquí, el Factor-IX es el péptido a modo de ejemplo.

Sialil-PEGilación Directa (10 KDa) de Factor-IX. Se disolvió Factor IX (1100 IU) en 5 ml de histidina 20 mM, tampón de glicina 520 mM que contenía sacarosa al 2 %, NaN₃ al 0,05 %, y polisorbato 80 al 0,01 %, pH 5,0. El CMP-AS-PEG (10 KDa) (27,8 mg, 3,5 µmol) se añadió después a esta disolución, la mezcla de reacción se invirtió suavemente para mezclar y se añadieron 1,4 U de ST3Gal3. La mezcla de reacción se hizo girar suavemente durante 19 horas a 32 °C y la reacción se detuvo por congelación. La mezcla de reacción se analizó por geles para SDS-PAGE usando las condiciones de desarrollo y tinción (Azul Coloidal) descritas por Invitrogen. Brevemente, se mezclaron muestras (10 µl) con 12 µl de tampón de carga de muestras y 2 µl de DTT 0,5 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C (Figura 64, líneas 8, 9 y 10). El producto se purificó en una columna 10/20 Superdex 200 (Amersham, Uppsala, Suecia) con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH 7,1 (Gibco), 6 ml/min. Figura (Figura 64 contiene una banda (línea 5) del Factor-IX PEGilado purificado por HPLC.

17. Protección con ácido siálico de Factor IX GlicoPEGilado

Este ejemplo expone el procedimiento para la protección con ácido siálico de péptidos sialil-glicoPEGilados. Aquí, el Factor-IX es el péptido a modo de ejemplo.

Protección con ácido siálico de Glicanos de Factor-IX-AS-PEG (10 KDa) unidos a N y unidos a O. Se concentró r-Factor-IX-PEG purificado (10 KDa) (2,4 mg) en un filtro centrifugo PL-10 Centricon[®] Plus 20 (Millipore Corp., Bedford, MA) y el tampón se cambió por Tris-HCl 50 mM a pH 7,2, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 % hasta un volumen final de 1,85 ml. La disolución de proteínas se diluyó con 372 µl del mismo tampón Tris y se añadieron 7,4 mg de CMP-AS (12 µmol) en forma de un sólido. La disolución se invirtió suavemente para mezclar y se añadieron 0,1 U de ST3Gal1 y 0,1 U de ST3Gal3. La mezcla de reacción se hizo girar suavemente durante 42 horas a 32 °C.

Una muestra de 10 µg de la reacción se analizó por SDS-PAGE. Se desarrollaron geles de 1 mm de Tris-Glicina al 4-12 % de Novex y se tiñeron usando Azul Coloidal tal como lo describe Invitrogen. En resumen, muestras de 10 µl (10 µg), se mezclaron con 12 µl de tampón de carga de muestras y 1 µl de DTT 0,5 M y se calentó durante 6 minutos a 85 °C (Figura 64, línea 4).

18. GlicoPEGilación de Proteínas expresadas en Sistemas de Mamíferos o de Insectos: EPO, Interferón α e Interferón β

Este ejemplo expone la preparación de péptidos PEGilados que se expresan en sistemas de mamíferos y de insectos.

Preparación de aceptor a partir de sistemas de expresión en mamíferos. Los péptidos a glicoPEGilar usando CMP-ácido siálico PEG necesitan tener glicanos que terminen en galactosa. La mayoría de péptidos procedentes de sistemas de expresión en mamíferos tendrán ácido siálico terminal que primero necesita ser retirado.

Digestión con sialidasa. El péptido se desialida usando una sialidasa. Un procedimiento típico implica la incubación de una disolución de 1 mg/ml del péptido en disolución salina tamponada con Tris, pH 7,2, con CaCl₂ 5 mM añadido, con 0,2 U/ml de sialidasa inmovilizada a partir de *Vibrio cholera* (Calbiochem) a 32 °C durante 24 horas. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o por la inclusión de azida sódica al 0,02 %. La resina después se retira por centrifugación o por filtración, y después se lava para recuperar el péptido atrapado. En este punto, se puede añadir EDTA a la disolución para inhibir cualquier sialidasa que se haya lixiviado a partir de la resina.

Preparación a partir de sistemas de expresión en insectos. EPO, interferón-alfa, e interferón-beta también se pueden expresar en sistemas no mamíferos tales como levadura, plantas, o células de insectos. Los péptidos a glicoPEGilar usando CMP-ácido siálico PEG necesitan tener glicanos que terminen en galactosa. La mayoría de los N-glicanos en péptidos expresados en células de insectos, por ejemplo, son el núcleo de trimanosilo. Estos glicanos

se construyen primero en glicanos que terminan en galactosa antes de que sean aceptores para la sialiltransferasa.

Construcción de glicanos aceptores a partir de núcleo de trimanosilo. Péptido (1 mg/ml) en solución salina tamponada con Tris, pH 7,2, que contiene MnCl₂ 5 mM, UDP-glcNAc 5 mM, 0,05 U/ml de GLCNACT I, 0,05 U/ml de GLCNACT II, se incubó a 32 °C durante 24 horas o hasta que la reacción está básicamente completa. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o por la inclusión de azida sódica al 0,02 %. Después de intercambio de tampón para retirar UDP y otras moléculas pequeñas, cada uno de UDP-galactosa y MnCl₂ se añaden a 5 mM, galactosiltransferasa se añade a 0,05 U/ml, y se incubó a 32 °C durante 24 h o hasta que la reacción esté básicamente completa. El crecimiento microbiano se puede detener por filtración estéril o por la inclusión de azida sódica al 0,02 %. Los péptidos entonces están listos para la glicoPEGilación.

Construcción de glicanos unidos a O. Una estrategia similar se puede usar para que el interferón alfa produzca enzimáticamente el O-glicano Gal-GalNAc deseado. Si fuera necesario, GalNAc unida a serina o a treonina se puede añadir al péptido usando péptido GalNAc transferasas adecuadas (por ejemplo, GalNAc T1, GalNAc T2, T3, T4, etc.) y UDP-GalNAc. Además, si fuera necesario, se puede añadir galactosa usando galactosiltransferasa y UDP-galactosa.

GlicoPEGilación usando sialiltransferasa. Los glicopéptidos (1 mg/ml) que soportan galactosa terminal en solución salina tamponada con Tris + azida sódica al 0,02 % se incuban con CMP-AS-PEG (0,75 mM) y 0,4 U/ml de sialiltransferasa (ST3Gal3 o ST3Gal4 para N-glicanos en EPO e interferón beta; ST3Gal4, o ST3Gal1 para O-glicanos en interferón alfa) a 32 °C durante 24 horas. Otras transferasas que pueden funcionar incluyen la 2,6 sialiltransferasa a partir de *Photobacterium damsella*. La concentración del péptido aceptor está más preferentemente en el intervalo de 0,1 mg/ml hasta el límite de solubilidad del péptido. La concentración de CMP-AS-PEG debería ser suficiente para que hubiera un exceso sobre los sitios disponibles, pero no tan alto como para causar problemas de solubilidad del péptido debido al PEG, y puede variar de 50 µM hasta 5 mM, y la temperatura puede variar de 2 °C hasta 40 °C. El tiempo requerido para completar la reacción dependerá de la temperatura, las cantidades relativas de enzima a sustrato aceptor, la concentración de sustrato donador, y el pH.

19. GlicoPEGilación de EPO producida en células de insectos

Este ejemplo expone la preparación de EPO biantenaria PEGilada a partir de EPO expresada en células de insecto.

La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) a partir del sistema de expresión de baculovirus/Sf9 (Protein Sciences Corp., Meriden, CT) se sometió a análisis de glicanos y los glicanos resultantes mostraron ser principalmente núcleo de trimanosilo con núcleo de fucosa, con un pequeño porcentaje de glicanos que también presentan una única GlcNAc (Figura 124).

Adición de N-acetilglucosamina con GnT-I y GnT-II. Dos lotes de rhEPO (1 mg/ml) se incubaron con GnT-I y GnT-II, UDP-glcNAc 5 mM, MnCl₂ 20 mM, y azida sódica al 0,02 % en MES 100 mM a pH 6,5 a 32 °C durante 24 h. El lote A contenía 20 mg de EPO, y 100 mU/ml de GnT-I y 60 mU/ml de GnT-II. El lote B contenía 41 mg de EPO, y 41 mU/ml de GnT-I + 50 mU/ml de GnT-II. Después de la reacción, la muestra se desaló por filtración en gel (columnas PD10, Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ).

El establecimiento de perfiles de glicanos por 2AA HPLC reveló que el lote A se convirtió en un 92 % en una estructura biantenaria con dos GlcNAc (el equilibrio tiene una única glcNAc. El lote B mostró una conversión de un 97 % en el producto deseado (Figuras 43A y 43B.).

Galactosilación del lote A de EPO. EPO (~16 mg del lote A) se trató con GnTII para completar la adición de GlcNAc. La reacción se realizó en Tris 50 mM a pH 7,2 que contenía NaCl 150 mM, EPO mg/ml, UDP-GlcNAc 1 mM, MnCl₂ 5 mM, azida sódica al 0,02 % y 0,02 U/ml de GnTII a 32 °C durante 4 h. Después se efectuó la galactosilación de EPO mediante la adición de UDP-galactosa a 3 mM y GalT1 a 0,5 U/ml y la incubación continuó a 32 °C durante 48 h.

La EPO galactosilada después se purificó por filtración en gel en una columna Superdex 1,6/60 en Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 6. El pico que contiene EPO se analizó después por 2AA HPLC. Basándose en los datos por HPLC ~85 % de los glicanos contiene dos galactosas y ~15 % de los glicanos no presenta ninguna galactosa después de la reacción de galactosilación.

Sialilación de EPO galactosilada. La sialilación de EPO galactosilada se realizó en Tris 100 mM a pH que contenía NaCl 150 mM, 0,5 mg/ml de EPO, 200 mU/ml de ST3Gal3 y CMP-NAN 0,5 mM o CMP-NAN-PEG (1 KDa) o CMP-NAN-PEG (10 KDa) durante 48 horas a 32 °C. Casi todos los glicanos que tienen dos restos de galactosa se sialilaron totalmente (2 ácidos siálicos / glicano) después de la reacción de sialilación con CMP-NAN. El análisis por MALDI-TOF confirmó los datos por HPLC.

PEGilación de EPO galactosilada. Para las reacciones de PEGilación que usan CMP-NAN-PEG (1 KDa) y CMP-NAN-PEG (10 KDa), se analizó una alícuota de la mezcla de reacción por SDS-PAGE (Figura 66). El peso molecular del péptido de EPO aumentó con la adición de cada azúcar, y aumentó más radicalmente en el peso molecular después de las reacciones de PEGilación.

Bioensayo de EPO *in vitro*. El bioensayo de EPO *in vitro* (adaptado a partir de Hammerling y col, 1996, J. Pharm. Biomed. Anal. 14: 1455-1469) se basa en la respuesta de la línea celular TF-1 a niveles múltiples de EPO. Las células TF-1 proporcionan un buen sistema para investigar la proliferación y la diferenciación de células progenitoras mieloides. Esta línea celular fue establecida por T. Kitamura y col. en Octubre de 1987 a partir de la muestra de aspiración de médula ósea heparinizada a partir de un varón japonés de 35 años con pancitopenia grave. Estas células son totalmente dependientes de la interleuquina 3 o del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

La línea celular TF-1 (ATCC, N° de Cat. CRL-2003) se cultivó en RPMI + FBS al 10 % + GM-CSF (12 ng/ml) y se incubó a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células estuvieron en suspensión a una concentración de 5000 células/ml de medios, y se dispensaron 200 µl en una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron con diversas concentraciones de EPO (de 0,1 µg/ml a 10 µg/ml) durante 48 horas. Un Ensayo de Viabilidad de MTT se realizó mediante la adición de 25 µl de MTT a 5 mg/ml (SIGMA M5655), incubando la placa a 37 °C durante 20 min a 4 horas, añadiendo 100 µl de disolución de isopropanol/HCl (100 ml de isopropanol + 333 µl de HCl 6 N), leyendo la DO a 570 nm, y a 630 nm o a 690 nm, y restando las lecturas a 630 nm o a 690 nm a partir de las lecturas a 570 nm.

La Figura 67 contiene los resultados obtenidos cuando EPO sialilada, y EPO glicoPEGilada con PEG de 1 KDa o 10 KDa se sometió a un ensayo de bioactividad de EPO *in vitro*. La EPO glicoPEGilada con PEG de 1 KDa presentaba casi la misma actividad que la EPO sin glicoPEGilar cuando ambas estaban a una concentración de aproximadamente 5 µg/ml. La EPO glicoPEGilada con PEG de 10 KDa presentaba aproximadamente la mitad de la actividad de la EPO sin glicoPEGilar cuando ambas estaban a una concentración de aproximadamente 5 µg/ml.

20. GlicoPEGilación de Interferón α producido en células CHO

Preparación de Asialo-Interferón α . El interferón alfa producido a partir de células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM y se concentra a 500 µl en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. La disolución se incuba con 300 mU/ml de neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, se diluye una pequeña alícuota de la reacción con el tampón apropiado y una realización en gel para IEF. La mezcla de reacción se añade después a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa lavado previamente (800 µl/ml de volumen de reacción) y las perlas lavadas se hicieron girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinaron. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05 % y después dos veces más frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05 %. La disolución dializada se concentra después usando un filtro centrífugo Plus 20 Centricon y se almacena -20 °C. Las condiciones para el gel para IEF se desarrollan de acuerdo con los procedimientos y reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y desialidado se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

Preparación de Interferón-alfa-(alfa2,3)-Sialil-PEG. Interferón-alfa desialidado se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal1 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la etiqueta incorporada en el péptido se separa a partir de la etiqueta libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la etiqueta fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de Interferón-alfa nativo y desialidado se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

Preparación de Interferón-alfa-(alfa2,8)-Sialil-PEG. El Interferón-alfa producido en CHO, que contiene un glicano unido a O alfa2,3-sialilado, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de CST-II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presenta CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la etiqueta incorporada en el péptido se separa a partir de la etiqueta libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la etiqueta fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de Interferón-alfa nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

Preparación de Interferón-alfa-(alfa2,6)-Sialil-PEG. Interferón-alfa, que contiene solamente GalNAc unida a O, se disolvió a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST6GalNAc o II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la

etiqueta incorporada en el péptido se separa a partir de la etiqueta libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la etiqueta fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis de SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de Interferón-alfa nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

21. GlicoPEGilación de G-CSF producido en células CHO

Preparación de Asialo-Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF). G-CSF producido en células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM y se concentra a 500 µl en un filtro centrífugo Centricon Plus 20. La disolución se incuba con 300 mU/ml de neuraminidasa II (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y se desarrolla un gel para IEF. La mezcla de reacción se añade después a conjugado de ácido N-(p-aminofenil)oxámico-agarosa lavado previamente (800 µl/ml de volumen de reacción) y las perlas lavadas se hacen girar suavemente durante 24 horas a 4 °C. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA y todos los sobrenadantes se combinan. El sobrenadante se combina a 4 °C frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05 % y después dos veces más frente a Tris -HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05 %. La disolución dializada se concentra después usando un filtro centrífugo Centricon Plus 20 y se almacena a -20 °C. las condiciones para el gel para IEF se desarrollaron de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y desializado se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

Preparación de G-CSF-(alfa2,3)-Sialil-PEG. G-CSF desializado se disolvió a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal1 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la etiqueta incorporada en el péptido se separa a partir de la etiqueta libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la etiqueta fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

Preparación de G-CSF-(alfa2,8)-Sialil-PEG. G-CSF producido en células CHO, que contienen un glicano unido a O alfa2,3-sialilado, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de CST-II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presenta CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la etiqueta incorporada en el péptido se separa a partir de la etiqueta libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la etiqueta fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

Preparación de G-CSF-(alfa2,6)-Sialil-PEG. G-CSF, que contiene solamente GalNAc unida a O, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con CMP-ácido siálico-PEG 1 mM y 0,1 U/ml de ST6GalNAcI o II a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción presenta CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la etiqueta incorporada en el péptido se separa a partir de la etiqueta libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la etiqueta fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Después de 2 días, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando Análisis por SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras de G-CSF nativo y PEGilado se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

22. GlicoPEGilación de Glicanos de EPO unidos a O producidos en Células CHO

Preparación de EPO-AS-PEG unido a O (10 KDa). Asialo-EPO, producida originalmente en células CHO, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con CMP-AS 5 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal3 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico en los glicanos unidos a N, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-¹⁴C añadido; el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G2000SW usando metanol, agua y el producto detectado usando un

5 detector de radiación. Cuando la reacción es completa, la disolución se concentra usando un filtro Centricon-20. Se intercambia el tampón en la disolución restante con Tris 0,05 M (pH 7,2), NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 % hasta un volumen final de 7,2 ml hasta que el CMP-AS ya no se puede detectar. El retenido después se vuelve a suspender en Tris 0,05 M (pH 7,2), NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 % a 2,5 mg/ml de proteína. La disolución se incuba con CMP-AS-PEG 1 mM (10 KDa) y ST3Gal1, para glicosilar el sitio unido a O, a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-PEG, una pequeña alícuota de la reacción se separa por filtración en gel usando una columna analítica Toso Haas TSK-gel-3000 eluyendo con PBS a pH 7,0 y analizando por detección de UV. Cuando la reacción se completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,0) recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

23. GlicoPEGilación de un anticuerpo

15 Este ejemplo expone los procedimientos para PEGilar los glicanos unidos a O de una molécula de anticuerpo. Aquí, se usa Enbrel™ como un ejemplo, sin embargo un experto en la materia observará que este procedimiento se puede usar con muchas moléculas de anticuerpos.

20 **Preparación de Enbrel™-AS-PEG (10 KDa).** Enbrel™ (TNF-receptor-IgG₁-quimera), con los glicanos unidos a O sialilados antes de la PEGilación o no, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con UDP-galactosa 5 mM y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días para proteger los glicanos de la región Fc con galactosa. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando de ¹⁴C-galactosa-UDP añadido; la etiqueta incorporada en el péptido se separa a partir de la etiqueta libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G2000SW en metanol y agua. La incorporación de la etiqueta radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

25 Cuando la reacción se completa, la disolución se incuba con CMP-ácido siálico-ligador-PEG 1 mM (10 KDa) y 0,1 U/ml de ST3Gal3 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-ligador-PEG, el péptido se separa por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). Cuando la reacción está completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. Las fracciones que contienen el producto se combinan, se concentran, se intercambia el tampón y después se liofilizan. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

24. GlicoPEGilación de anticuerpo Remicade™

35 Este ejemplo expone el procedimiento para glicoPEGilar una molécula de anticuerpo recombinante mediante la introducción de moléculas de PEG a los glicanos de la región Fc. Aquí, Remicade™, una proteína de fusión de la región Fc con TNF-R:IgG, es el péptido a modo de ejemplo.

40 Preparación de Remicade™-Gal-PEG (10 KDa). Remicade™ se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, MnCl₂ 5 mM, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con UDP-galactosa-PEG 1 mM (10 KDa) y 0,1 U/ml de galactosiltransferasa a 32 °C durante 2 días para introducir el PEG en los glicanos de la región Fc. Para controlar la incorporación de galactosa, una pequeña alícuota de la reacción presenta ligando ¹⁴C-galactosa-UDP añadido; la etiqueta incorporada en el péptido se separa a partir de la etiqueta libre por filtración en gel en una columna analítica Toso Haas G3000SW usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la etiqueta radiactiva en el péptido se cuantifica usando un detector de radiación en línea.

45 Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. Las fracciones que contienen el producto se combinan, se concentran, se intercambia el tampón y después se liofilizan. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

25. Generación y PEGilación de estructuras de GlcNAc-Asn: TPA producido en Levaduras

50 Este ejemplo expone la preparación de estructuras de GlcNAc-Asn PEGilada en un péptido tal como TPA expresado en levaduras.

Se espera que la expresión en levaduras de como resultado un TPA que contiene una única estructura de tipo manano unida a N. Esta glicoproteína recombinante se trata primero con endoglicosidasa H para generar estructuras de GlcNAc en los restos de asparagina (Asn) en el péptido.

55 Las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína se modifican después con galactosa o galactosa-PEG usando UDP-galactosa o UDP-galactosa-6-PEG, respectivamente, y una galactosiltransferasa tal como GalT1. En un caso, la galactosa-PEG es el resto terminal. En el segundo caso, la galactosa se modifica

adicionalmente con AS-PEG usando un donador de CMP-AS-PEG y una sialiltransferasa tal como ST3Gal III. En otra realización, las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína pueden estar galactosiladas y sialiladas como se ha descrito anteriormente, y después sialiladas adicionalmente usando CMP-AS-PEG y una α 2,8-sialiltransferasa, tal como la enzima codificada por el gen cst-II de *Campylobacter jejuni*.

5 26. Generación y PEGilación de Estructuras de GlcNAc-ASN: GM-CSF producidas en *Saccharomyces*

Este ejemplo expone la preparación de Activador del tipo Tejido con estructuras PEGiladas de GlcNAc-Asn.

Se espera que GM-CSF recombinante expresado en levaduras contenga 2 glicanos unidos a N y 2 glicanos unidos a O. Los glicanos unidos a N deberían ser del tipo manano ramificado. Esta glicoproteína recombinante se trata con una endoglicosidasa a partir del grupo que consiste en endoglicosidasa H, endoglicosidasa-F1, endoglicosidasa-F2, endoglicosidasa-F3, endoglicosidasa-M solas o en combinación con las manosidasas I, II y III para generar núcleos de GlcNAc en los restos de asparagina (Asn) en la cadena principal de péptido/proteína.

Las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína se modifican después con galactosa o galactosa-PEG usando UDP-galactosa o UDP-galactosa-6-PEG, respectivamente, y una galactosiltransferasa tal como GalT1. En un caso, la galactosa-PEG es el resto terminal. En el segundo caso, la galactosa se modifica adicionalmente con AS-PEG usando un donador de CMP-AS-PEG y una sialiltransferasa tal como ST3GalIII. En otra realización las estructuras de GlcNAc-Asn en la cadena principal de péptido/proteína pueden estar galactosiladas y sialiladas como se ha descrito anteriormente, y después sialiladas adicionalmente usando CMP-AS-PEG y una α 2,8-sialiltransferasa tal como la enzima codificada por el gen cst-II de *Campylobacter jejuni*.

C. Glico-Conjugación de Moléculas Pequeñas

20 27. Síntesis de CMP-AS-Levulinato

Este ejemplo expone el procedimiento para la síntesis de CMP-AS-levulinato.

Preparación de 2-levulinamido-2-desoxi-D-manopiranososa. Cloroformiato de isobutilo (100 μ l, 0,77 mmol) se añadió gota a gota a una disolución de ácido levulínico (86 μ l, 0,84 mmol), THF anhidro (3 ml) y trietilamina (127 μ l, 0,91 mmol). Esta disolución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se añadió después gota a gota a una disolución que contenía clorhidrato de D-manosamina (151 mg, 0,7 mmol), trietilamina (127 μ l, 0,91 mmol), THF (2 ml) y agua (2 ml). La mezcla de reacción se agitó 15 horas y después se concentró a sequedad por evaporación rotatoria. Se usó cromatografía (sílice, gradiente de la etapa de MeOH/CH₂Cl₂ al 5-15 %) para aislar el producto produciendo 0,156 g (rendimiento de un 73 %) de un sólido de color blanco: $R_f = 0,41$ (sílice, CHCl₃/MeOH/agua a 6/4/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 2,23 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,57 (td, J = 6,54, 3,68, 2H), 2,63 (t, J = 6,71, 2H), 2,86-2,90 (m, 4H), 3,42 (m, 1H), 3,53 (t, J = 9,76, 1H), 3,64 (t, J = 9,43, 1H), 3,80-3,91 (m, 4H), 4,04 (dd, J = 9,79, 4,71, 1H), 4,31 (dd, J = 4,63, 1,14, 1H), 4,45 (dd, J = 4,16, 1,13, 1H), 5,02 (d, J = 1,29, 1H), 5,11 (s, J = 1,30, 1H), MS (ES); calculado para C₁₁H₁₉NO₇, 277,27; encontrado [M+1] 277,9.

Preparación de 5-levulinamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato. Se añadieron piruvato sódico (0,616 g, 5,6 mmol) y ácido N-acetilneuramínico aldolasa (50 U) a una disolución de 2-levulinamido-2-desoxi-D-manopiranososa (0,156 g, 0,56 mmol) en HEPES 0,1 M (pH 7,5). La mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 20 horas y después se congeló. La mezcla de reacción se filtró después a través de sílice C 18, se congeló y se liofilizó. El sólido en bruto se purificó usando cromatografía ultrarrápida (sílice, usando primero MeOH/CH₂Cl₂ al 10-40 % y después CH₂Cl₂/Me-OH/H₂O a 6/4/0,5). Las fracciones apropiadas se combinaron y se concentraron produciendo 45 mg (rendimiento de un 80 %) de un sólido de color blanco: $R_f = 0,15$ (sílice, CHCl₃/MeOH/agua a 6/4/1); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) δ 1,82 (t, J = 11,9, 1H), 2,21 (dd, J = 13,76, 4,84, 1H), 2,23 (s, 3H), 2,57 (c aparente, J = 6,6, 2H), 2,86-2,95 (m, 2H), 3,15-3,18 (m, 1H), 3,28-3,61 (complejo, 1H), 3,60 (dd, J = 11,91, 6,66, 1H), 3,75 (td, J = 6,65, 2,62, 1H), 3,84 (dd, J = 11,89, 2,65, 1H), 3,88-4,01 (complejo, 2H), 4,04 (td, J = 11,18, 4,67, 1H), MS (ES); calculado para C₁₄H₂₃NO₁₀, 365,33; encontrado ([M-1]), 363,97.

Preparación de citidina-5'-monofosforil-(5-levulinamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato). Se disolvió 5-Levulinamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (50 mg, 137 μ mol) en 2 ml de tampón HEPES 100 mM a pH 7,5 y se añadió MnCl₂ 1 M (300 μ l, 300 μ mol). Se disolvió CTP-2Na⁺ (79 mg, 1,5 μ mol) en 5 ml de tampón HEPES y se añadió al azúcar. Se añadió la enzima de fusión de sialiltransferasa/CMP-ácido neuramínico sintetasa (11 U) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro MWCO 10.000 y el filtrado, que contenía el producto de la reacción, se usó directamente sin purificación adicional: $R_f = 0,35$ (sílice, IPA/agua/NH₄OH a 7/2/1).

28. Glucocerebrosidasa-manosa-6-fosfato producida en células CHO

Este ejemplo expone el procedimiento para glicoconjuguar manosa-6-fosfato a un péptido producido en células CHO tal como glucocerebrosidasa.

Preparación de asialo-glucoceramidasa. La glucocerebrosidasa producida en células CHO se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, y se incuba con 300 mU/ml de conjugado de sialidasa-

- agarosa durante 16 horas a 32 °C. Para controlar la reacción, una pequeña alícuota de la reacción se diluye con el tampón apropiado y un gel para IEF y se realiza SDS-PAGE de acuerdo con los procedimientos de Invitrogen. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm y el sobrenadante se recoge. Las perlas se lavan 3 veces con tampón Tris-EDTA, una vez con 0,4 ml de tampón Tris-EDTA, y una vez con 0,2 ml del tampón Tris-EDTA. Todos los sobrenadantes se combinan. El sobrenadante se dializa a 4 °C frente a Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05 % y después dos veces más frente a Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 1 M, NaN₃ al 0,05 %. La disolución dializada después se concentra usando un filtro centrífugo Centricon Plus 20. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.
- 5
- 10 **Preparación de glucocerebrosidasa-AS-ligador-manosa-6-fosfato (procedimiento 1).** Asialo-glucocerebrosidasa a partir de lo mencionado anteriormente se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con CMP-ácido siálico-ligador-Man-6-fosfato 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal3 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-ligador-Man-6-fosfato, una pequeña alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la etiqueta incorporada en el péptido se separa a
- 15 a partir de una etiqueta libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la etiqueta fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los
- 20 procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.
- Preparación de glucocerebrosidasa-AS-ligador-manosa-6-fosfato (procedimiento 2).** Glucocerebrosidasa, producida en CHO pero sialilada de forma incompleta, se disuelve a 2,5 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, NaN₃ al 0,05 %, pH 7,2. La disolución se incuba con CMP-ácido siálico-ligador-Man-6-fosfato 1 mM y 0,1 U/ml de ST3Gal3 a 32 °C durante 2 días. Para controlar la incorporación de ácido siálico-ligador-Man-6-fosfato, una pequeña
- 25 alícuota de la reacción presentaba CMP-AS-PEG-ligando fluorescente añadido; la etiqueta incorporada en el péptido se separa a partir de una etiqueta libre mediante filtración en gel en una columna analítica Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1). La incorporación de la etiqueta fluorescente en el péptido se cuantifica usando un detector de fluorescencia en línea. Cuando la reacción es completa, la mezcla de reacción se purifica usando una
- 30 columna preparativa Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampón de PBS (pH 7,1) y recogiendo las fracciones basadas en la absorción de UV. El producto de la reacción se analiza usando análisis por SDS-PAGE e IEF de acuerdo con los procedimientos y los reactivos proporcionados por Invitrogen. Las muestras se dializan frente a agua y se analizan por EM MALDI-TOF.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento *in vitro* sin células de formación de un conjugado covalente entre un péptido de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) glicosilado o no glicosilado y un polímero, en el que el polímero está conjugado con el péptido mediante un grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y covalentemente ligado a tanto el péptido como al polímero, que comprende poner en contacto el péptido con una mezcla que comprende un azúcar de nucleótido ligado covalentemente con una mezcla que comprende un azúcar de nucleótido ligado covalentemente al polímero y una glicosiltransferasa para la que el azúcar de nucleótido es un sustrato bajo condiciones eficaces suficientes para formar el conjugado; en el que el polímero no es un azúcar que esté presente en la naturaleza.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el grupo de enlace de glicosilo está covalentemente unido a un residuo de glicosilo covalentemente unido al péptido.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el grupo de enlace de glicosilo está covalentemente unido a un residuo de aminoácido del péptido.
- 15 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polímero comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en un poli(óxido de alquileo) y un polipéptido, o en el que el polímero es un polímero soluble en agua.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el poli(óxido de alquileo) es poli(etilenglicol).
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el poli(etilenglicol) tiene un grado de polimerización de aproximadamente 1 a aproximadamente 20.000.
- 20 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la glicosiltransferasa está seleccionada del grupo que consiste en sialiltransferasa, galactosiltransferasa, glucosiltransferasa, GalNAc transferasa, GlcNAc transferasa, fucosiltransferasa y manosiltransferasa.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la glicosiltransferasa se produce por recombinación.
- 25 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el azúcar de nucleótido está seleccionado del grupo constituido por UDP-glicósido, CMP-glicósido y GDP-glicósido y está seleccionado preferentemente del grupo constituido por UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, UDP-N-acetilgalactosamina, UDP-N-acetilglucosamina, GDP-manosa, GDP-fucosa, MFC-ácido siálico, MFC-NeuAc.
- 30 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido de FGF glicosilado se desglicosila parcialmente antes de la puesta en contacto.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo de enlace de glicosilo intacto es un residuo de ácido siálico.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido se remodela antes de formar el conjugado, preferentemente, el péptido se remodela para introducir un resto aceptor para el grupo de enlace de glicosilo intacto.
- 35 13. Un conjugado covalente entre un péptido de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y un grupo modificador que altera una propiedad del péptido, en el que el grupo modificador está covalentemente unido al péptido en un residuo de glicosilo o de aminoácido preseleccionado del péptido mediante un grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y ligado covalentemente a tanto el péptido como al grupo modificador; en el que el grupo modificador no es un azúcar que esté presente en la naturaleza.
- 40 14. El conjugado covalente de la reivindicación 13, en el que el grupo modificador es un miembro seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua, un resto terapéutico, una etiqueta detectable, un grupo de ligador reactivo y un resto dirigido.
15. El conjugado covalente de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que el grupo modificador y un precursor de grupo de enlace de glicosilo intacto se unen como una unidad covalentemente unida al péptido mediante la acción de una enzima, convirtiendo la enzima el precursor en el grupo de enlace de glicosilo intacto, formando así el conjugado.
- 45 16. El conjugado covalente de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el grupo modificador es un polímero soluble en agua.
17. El conjugado covalente de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que el polímero soluble en agua comprende poli(etilenglicol).
- 50 18. Una composición farmacéutica que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable y un conjugado covalente entre un polímero y un péptido de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) glicosilado o no glicosilado,

en la que el polímero está conjugado con el péptido mediante un grupo de enlace de glicosilo intacto interpuesto entre y ligado covalentemente a tanto el péptido como al polímero; en el que el polímero no es un azúcar que esté presente en la naturaleza.

eritropoyetina – Alkermes, ProLease, Dong A, Elanex, Genetics Institute, LG Chem, Protein Sciences, Serono, Snow Brand, SRC VB VECTOR, Transkaryotic Therapies	Fas TR- Human Genome Sciences
eritropoyetina Beta - Hoffman La Roche	Felvizumab - Scotgen
eritropoyetina /Epoetina alfa - Chugai	FFR-VIIa- Novo Nordisk
Vacuna de Escherichia coli - North American	FG-001-F-Gene
Vacuna, SBL Vaccin, Swiss Serum and	FG-002-F-Gene
Vacuna Institute Berne	FG-004 - F-Gene
etanercept - Immunex	FG-005 - F-Gene
examorelina - Mediolanum	FGF + fibrina - Repair
exonuclease VII	Fibrimage - Bio-Tech. General
F 105-Centocor	péptidos de unión a fibrina - ISIS Innovation
F-992 - Fornix	fibrinógeno – PPL Therapeutics, Pharming
Factor IX - Alfa Therapeutics, Wellfide Corp., CSL, enetics Institute/AHP, Pharmacia, PPL Therapeutics	factor de crecimiento de fibroblastos - Chiron, NYU, Ramot, ZymoGenetics
Factor IX terapia génica – Cell Genesys	conjugado de fibrolasa - Schering AG
Factor VII - Novo Nordisk, Bayer, Baxter Intl.	Filgrastim -- Amgen
Factor VIIa – PPL Therapeutics, ZymoGenetics	filgrastim - PDA modified - Xencor
Factor VIII - Bayer Genentech, Beaufour-Ipsen, CLB, Inex, Octagen, Pharmacia, Pharming	ligando FLT-3 - Immunex
Factor VIII - PEGilado – Bayer	FN18CRM9-
fragmentos del Factor VIII - Pharmacia	follistatina - Biotech Australia, Human Therapeutics
Factor VIII terapia génica - Targeted Genetics	follitropin alfa - Alkermes, ProLease, PowderJect, Serono, Akzo Nobel
formulación con sacarosa Factor VIII - Bayer, Genentech	Follitropin Beta - Bayer, Organon
Factor VIII-2--Bayer	FP59
Factor VIII-3 -- Bayer	FSH - Ferring
inhibidores del Factor Xa - Merck, Novo Nordisk, Ganirelix - Roche	FSH + LH -- Ferring
Mochida	F-spondina -- CeNeS
Factor XIII - ZymoGenetics	sistema de administración de proteína de fusión – UAB Research Foundation
Factores VIII y IX terapia génica - GeneticsG-CSF - Amgen, SRC VB VECTOR Institute/Targeted Genetics	ftoxinas de fusión - Boston Life Sciences
Famoxin - Genset	G 5598 - Genentech
proteína Fas (delta) TM - LXR BioTech.	GA-II – Transkaryotic Therapies
	análogos de interferón gamma– SRC VB VECTOR
	lipasa gástrica - Meristem
	Gavilimomab -
	GDF-1--CeNeS
	GDF-5 - Biopharm
	GDNF-- Amgen

FIG. 1K

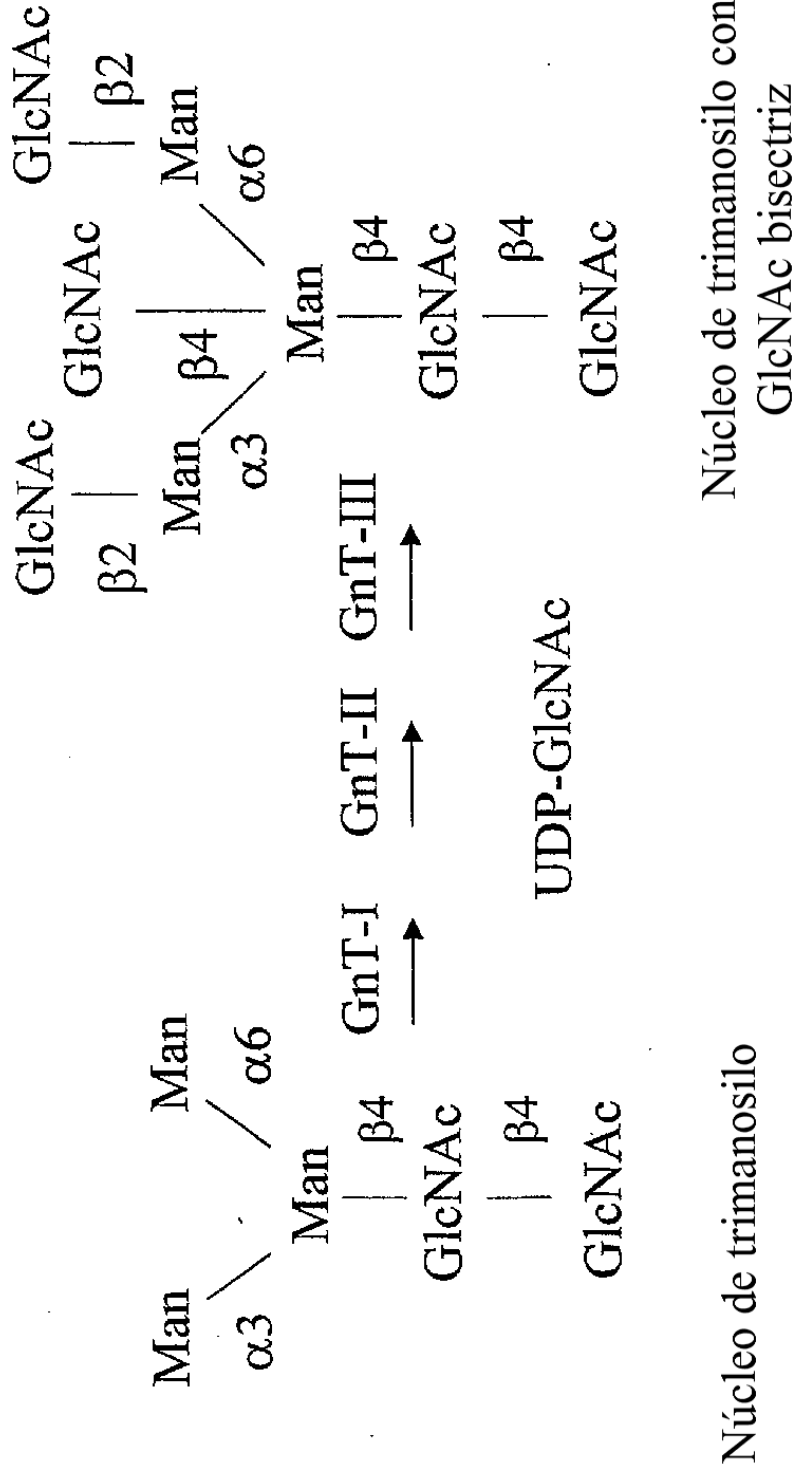


FIG. 2

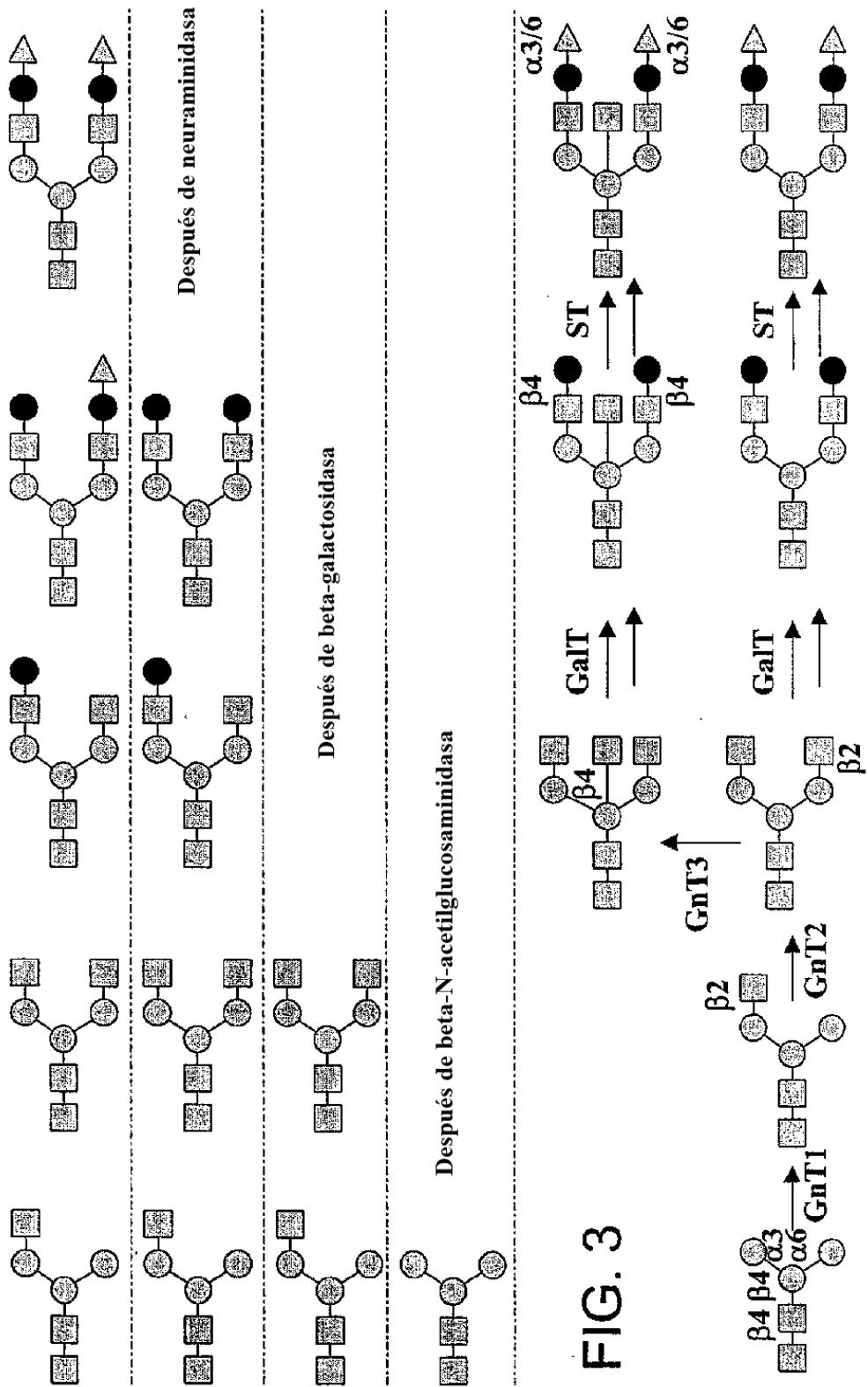


FIG. 3

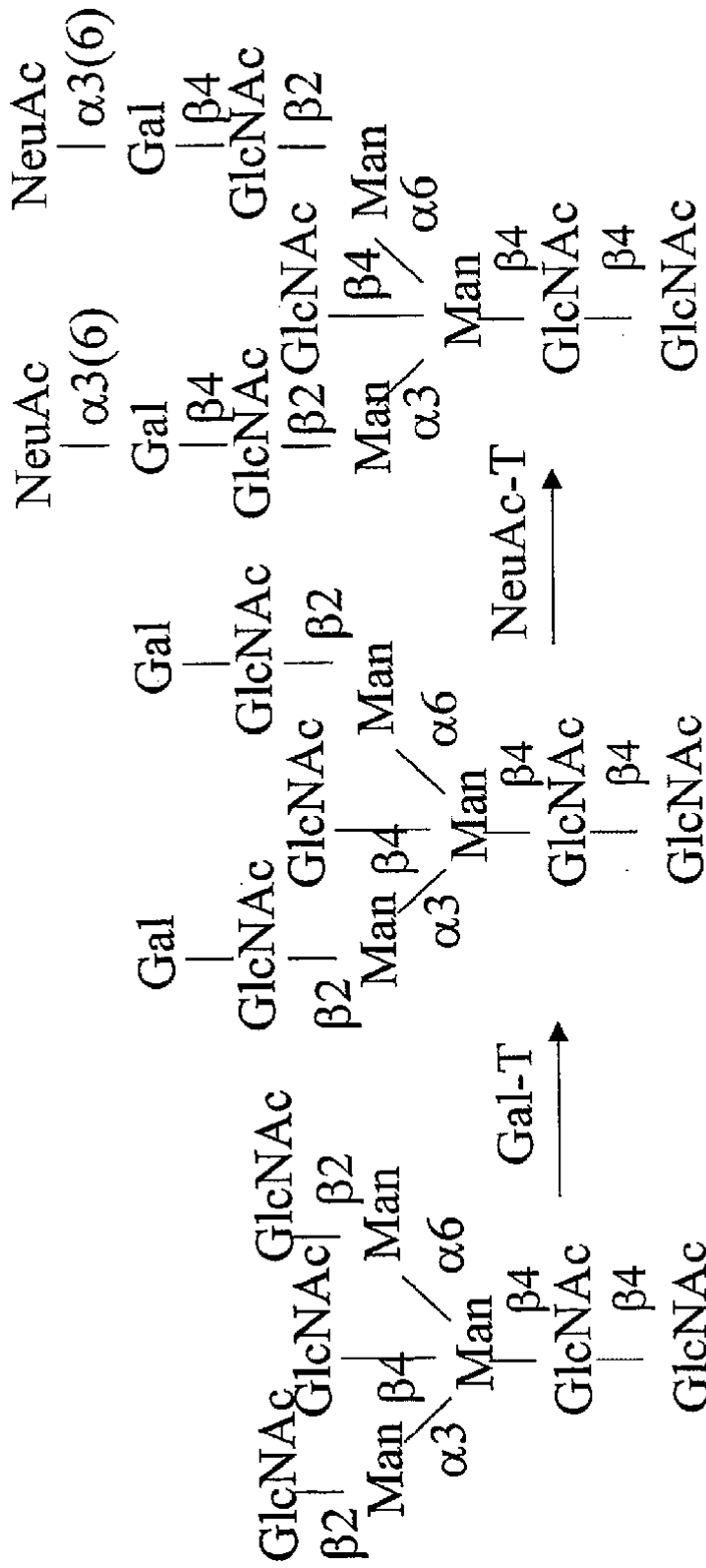


FIG. 4

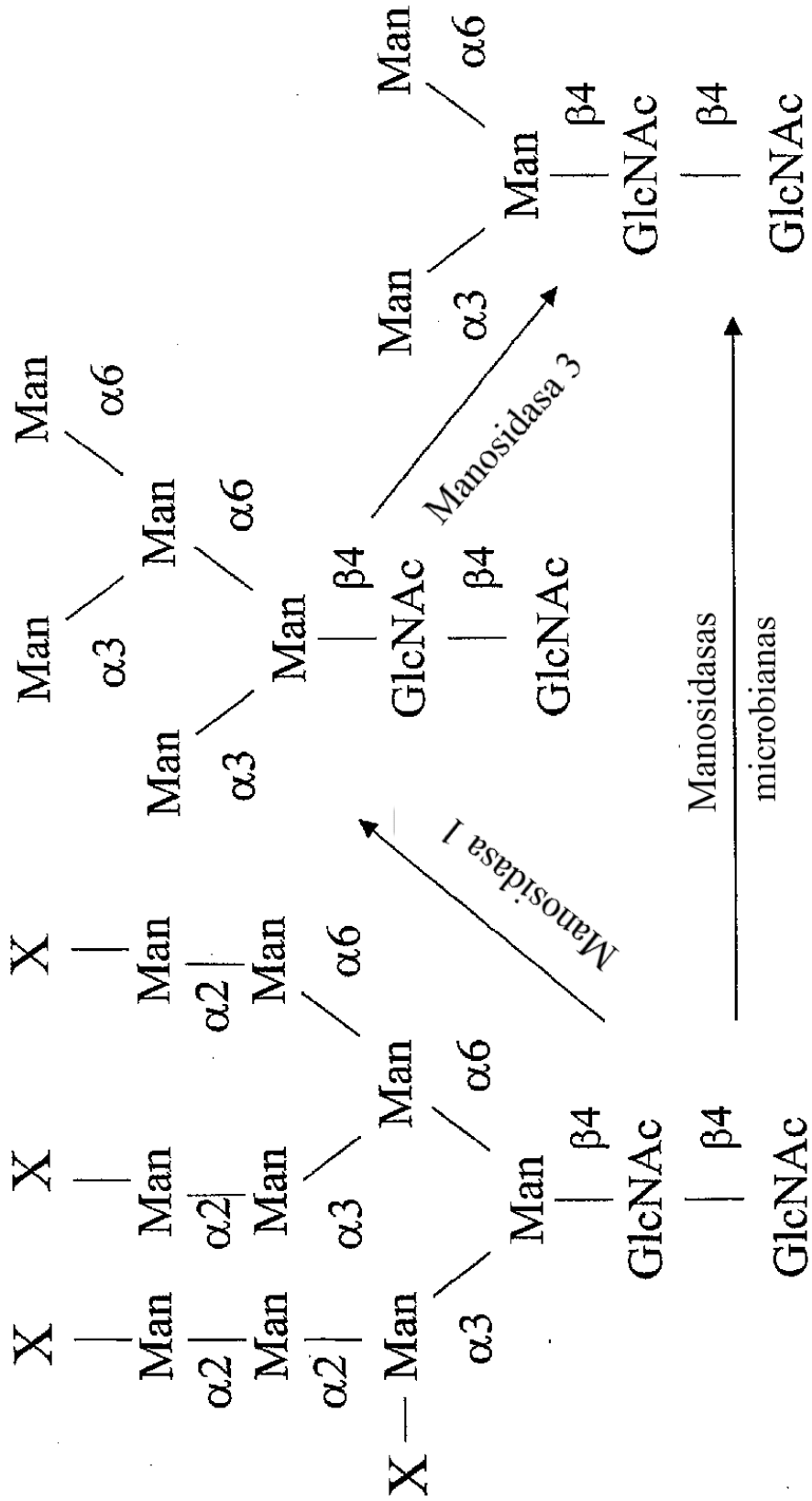


FIG. 5

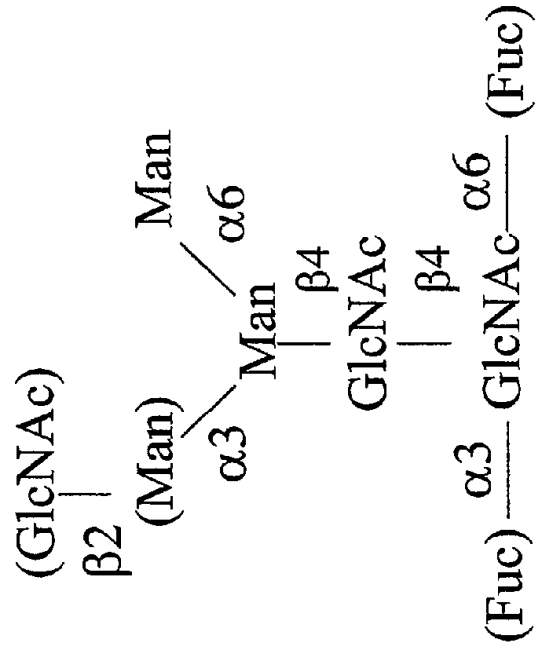


FIG. 7

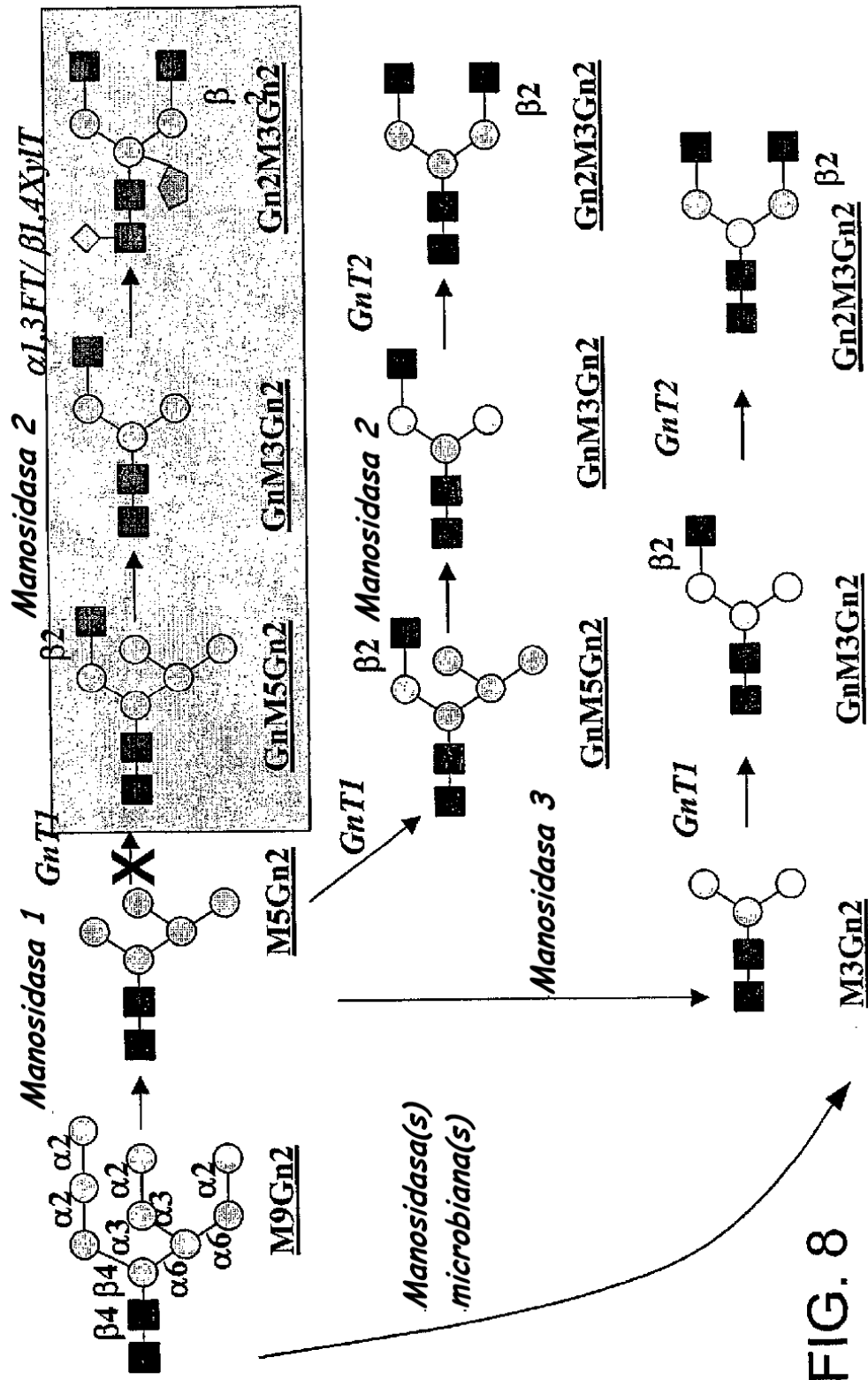


FIG. 8

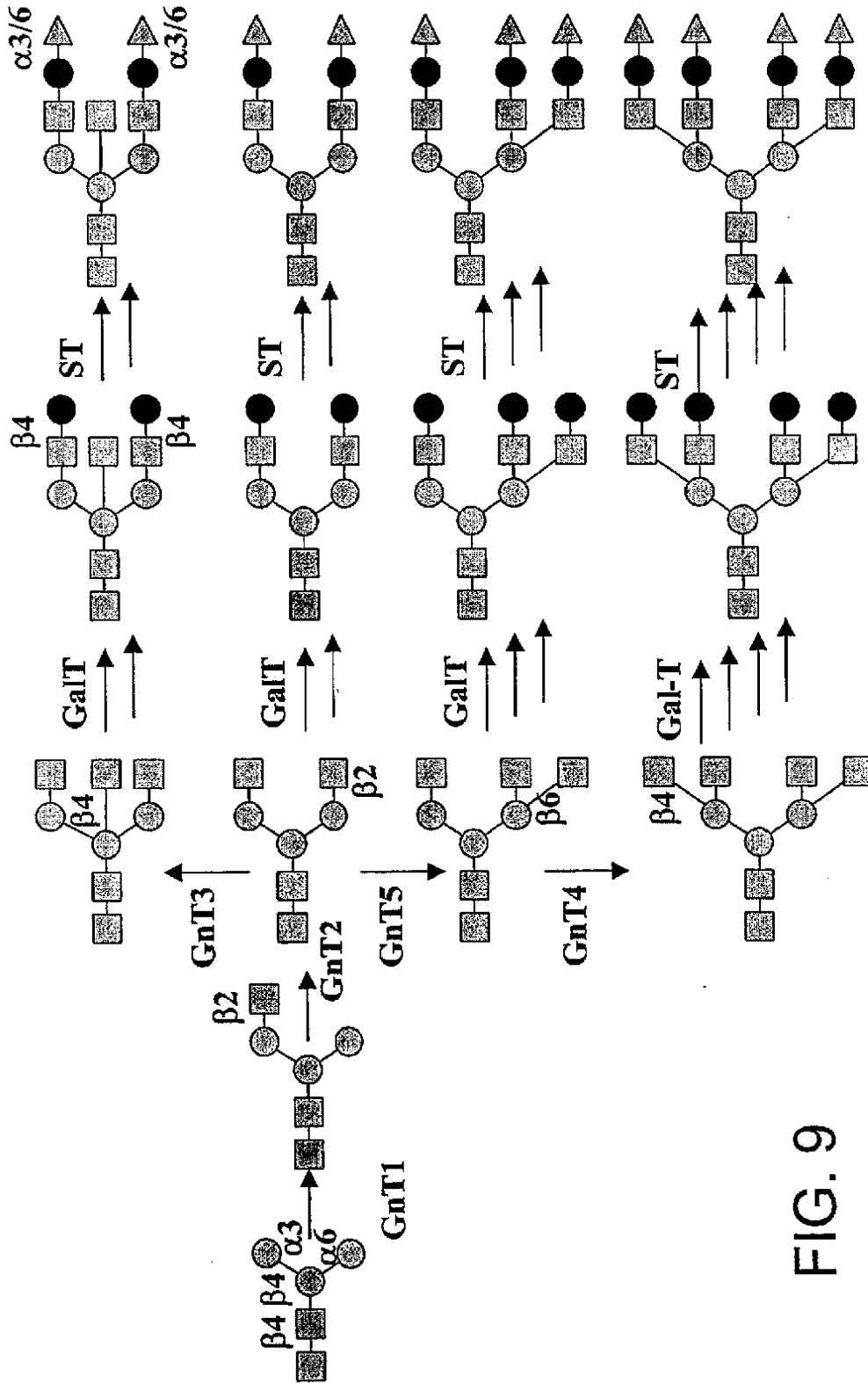


FIG. 9

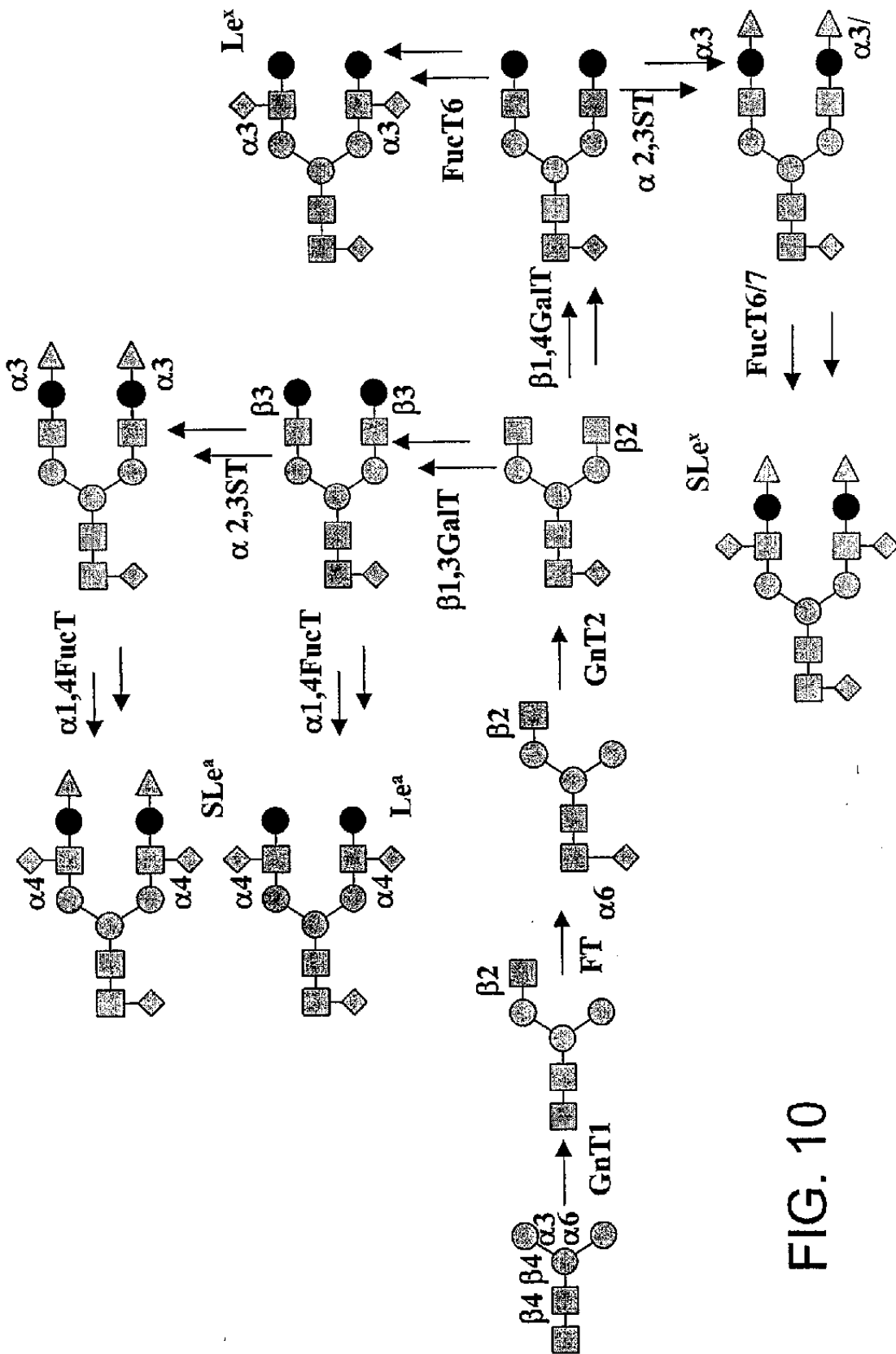
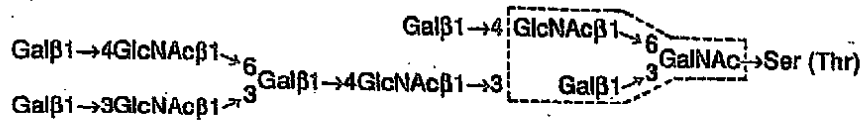
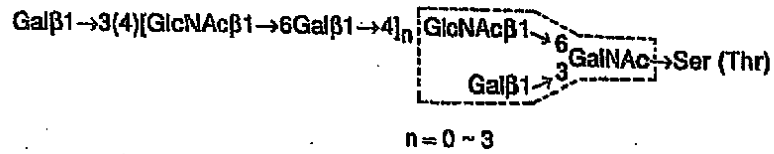
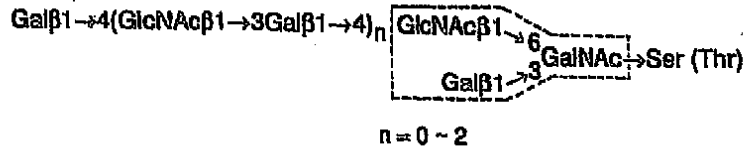


FIG. 10

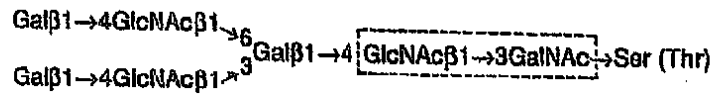
Núcleo 1



Núcleo 2



Núcleo 3



Núcleo 4

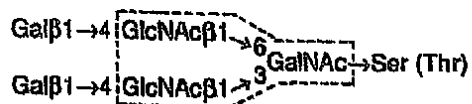


FIG. 12

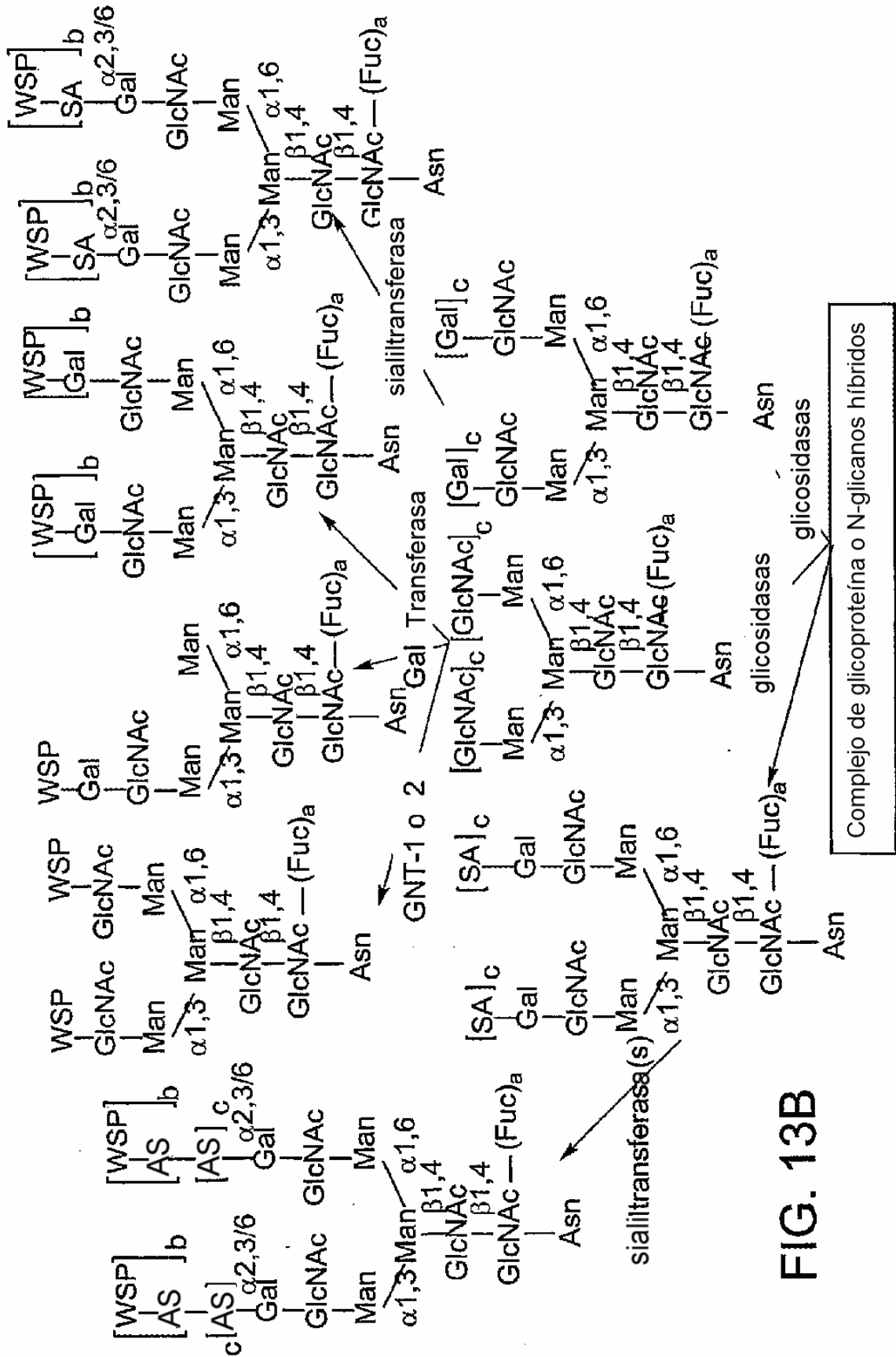


FIG. 13B

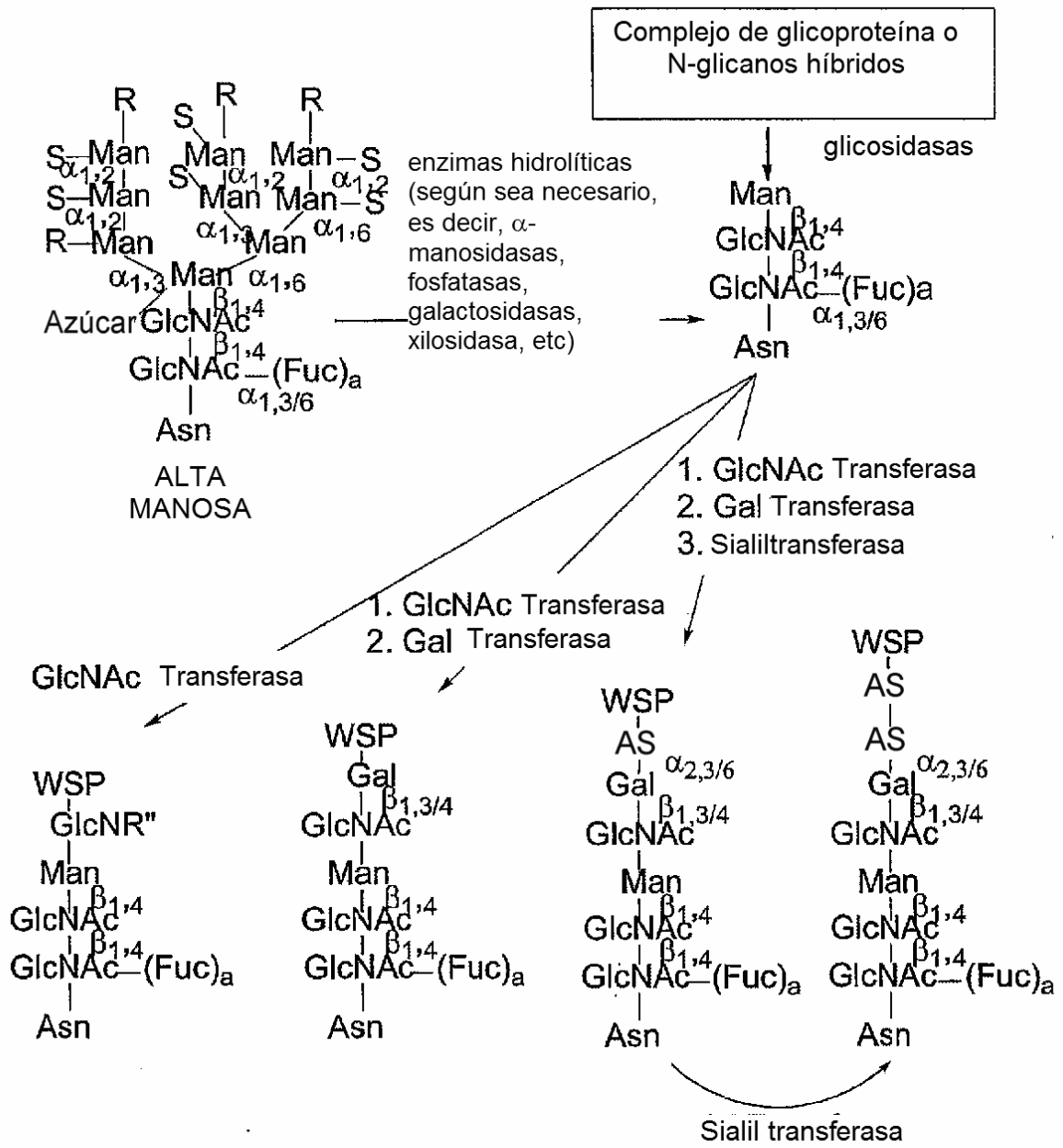


FIG. 14

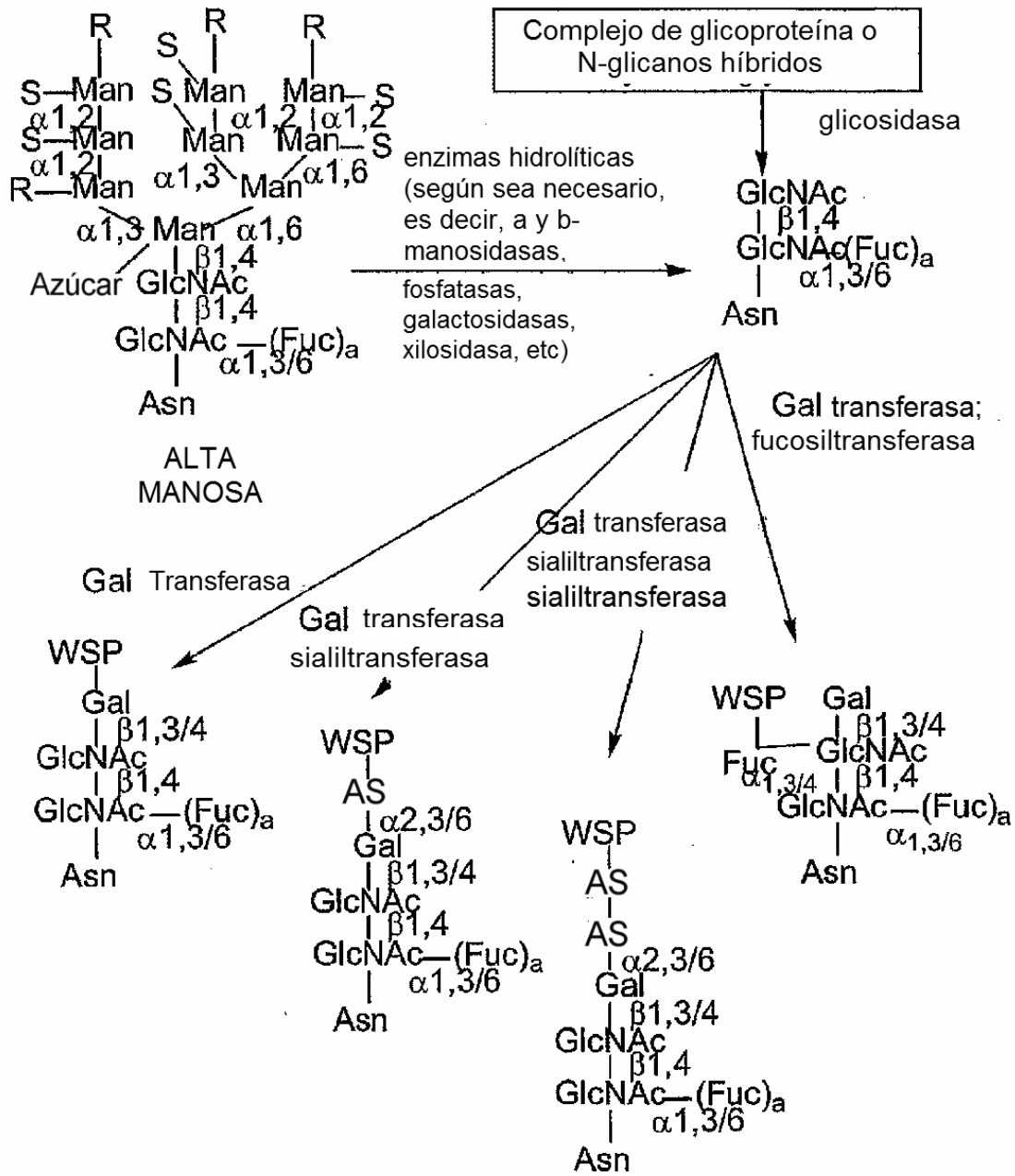


FIG. 15

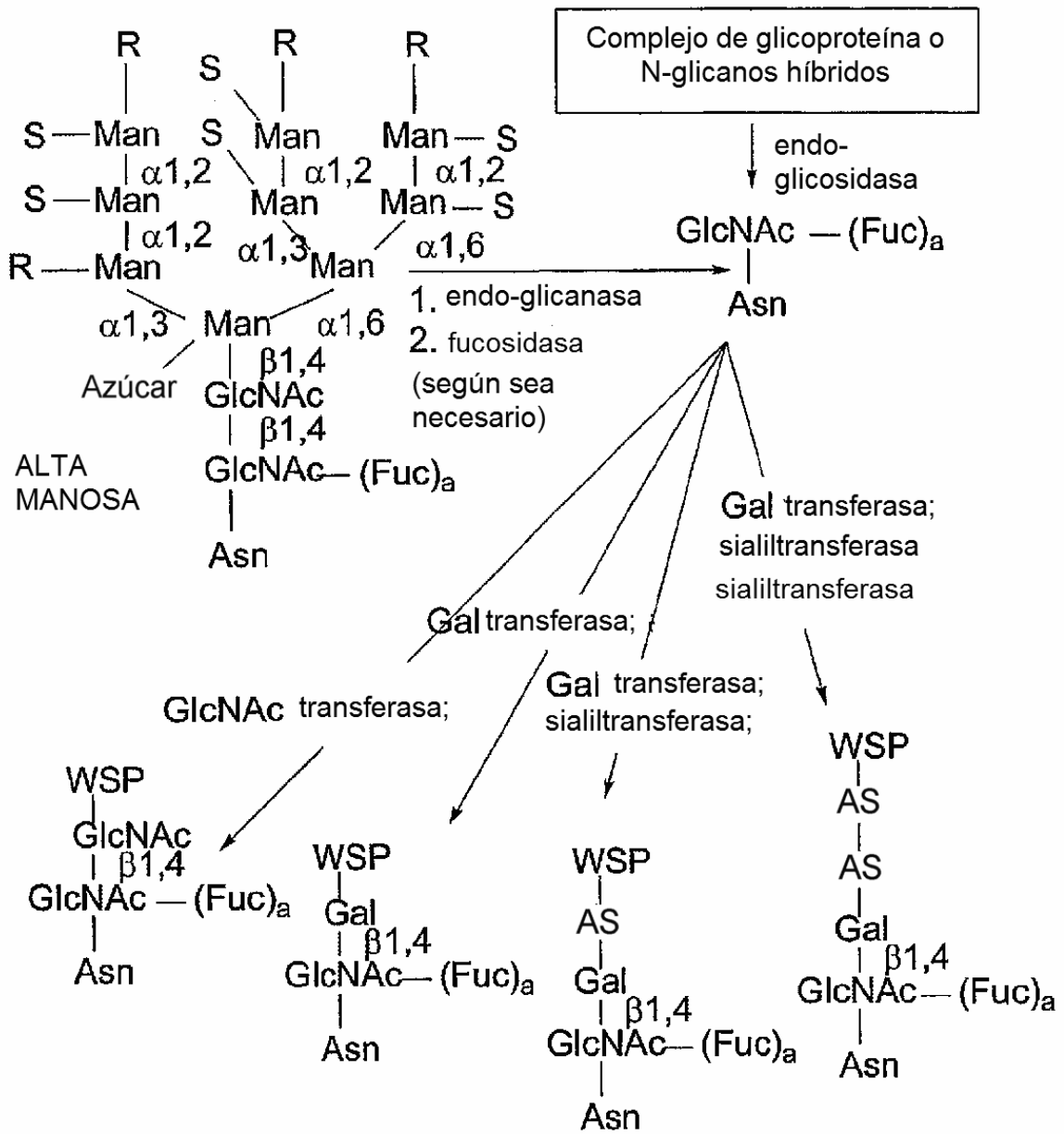
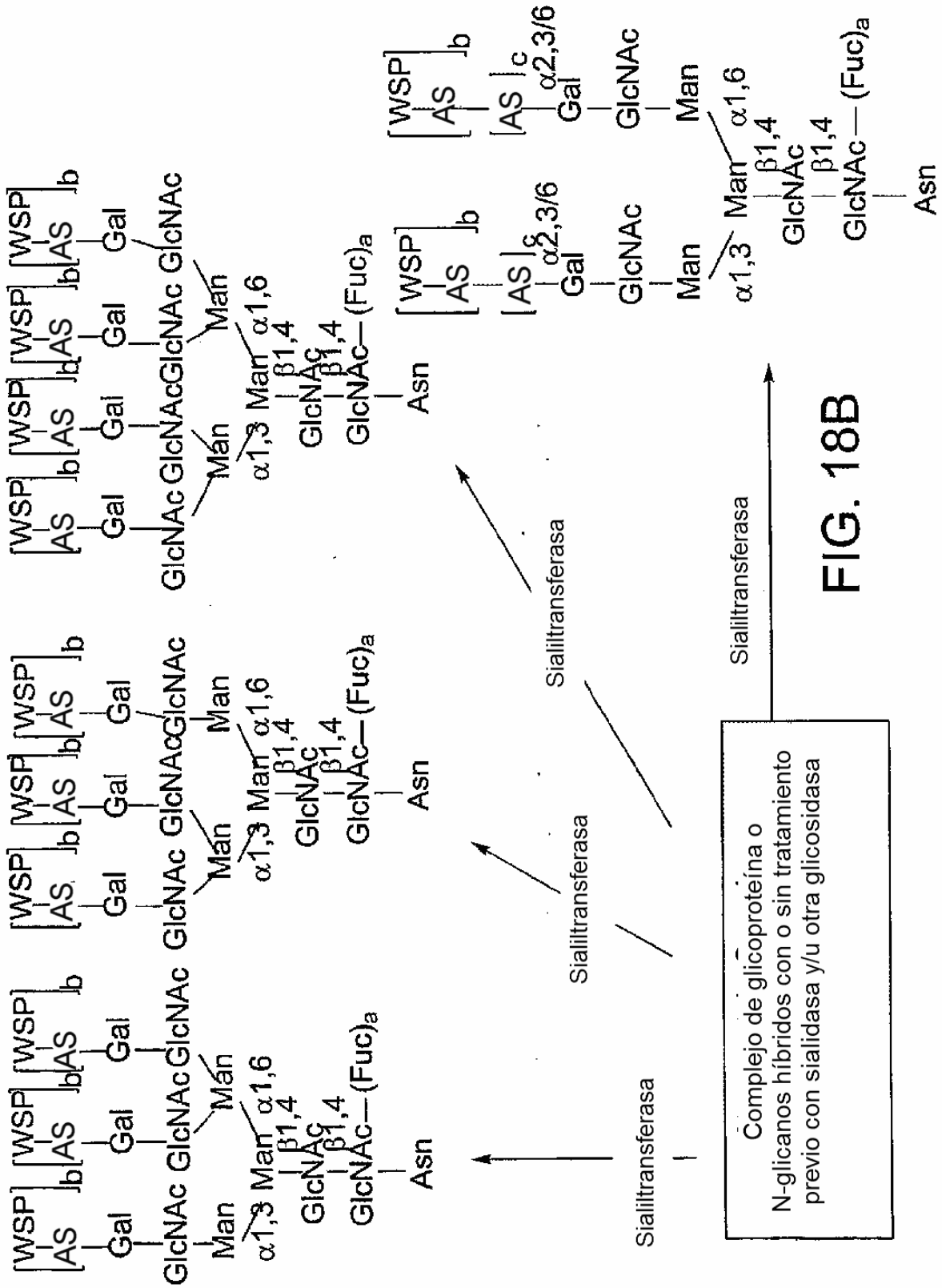


FIG. 16



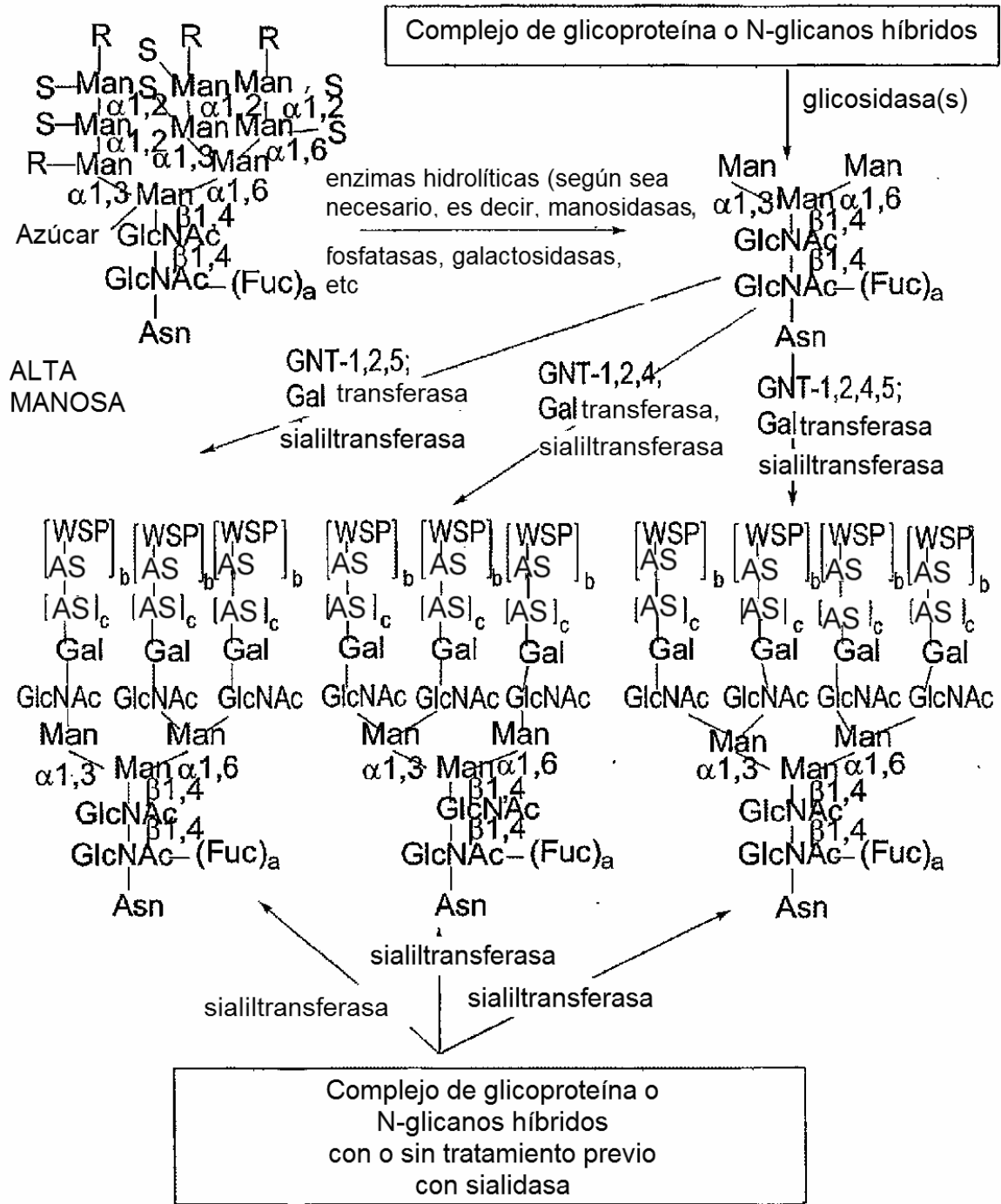
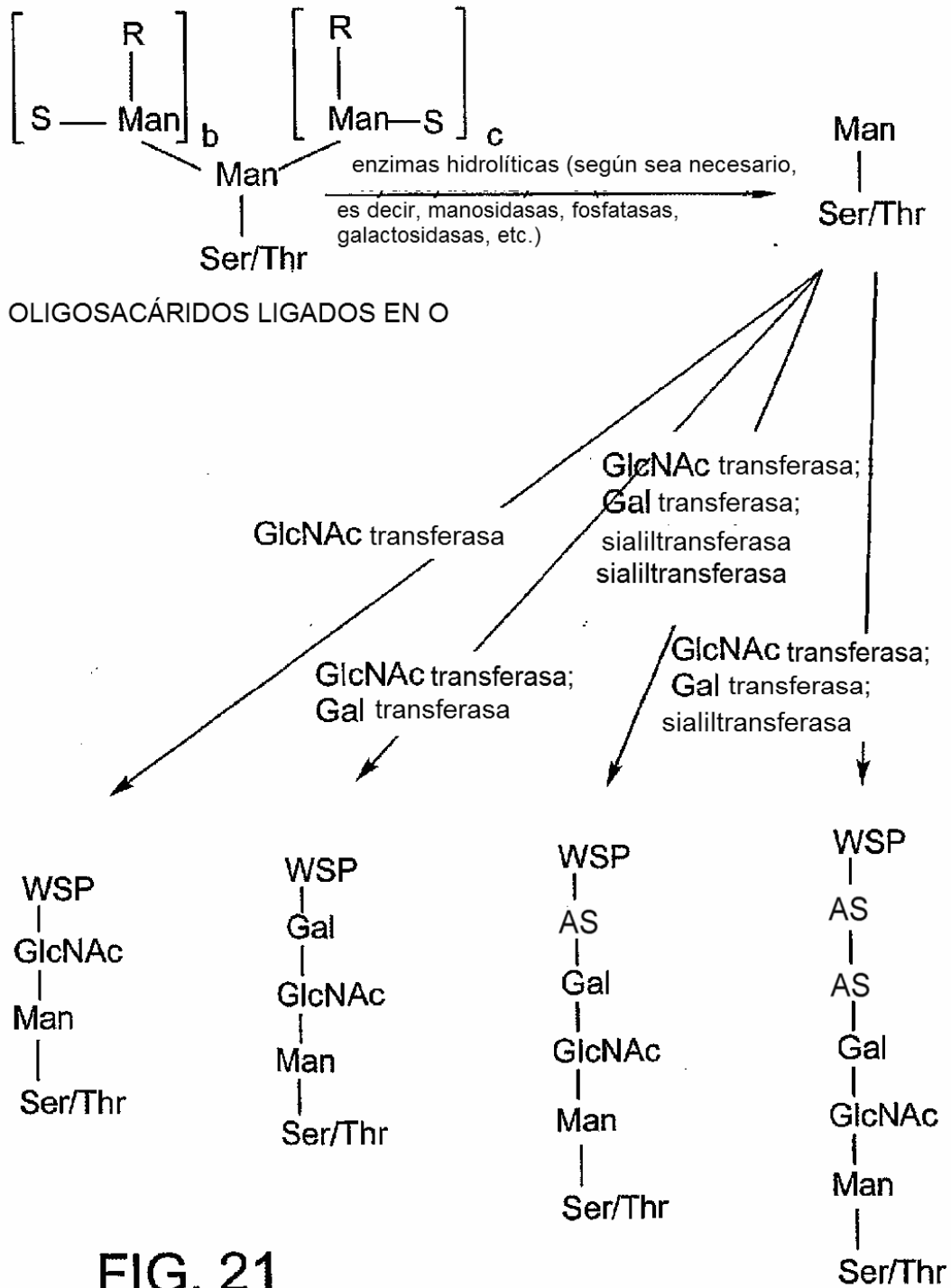


FIG. 19



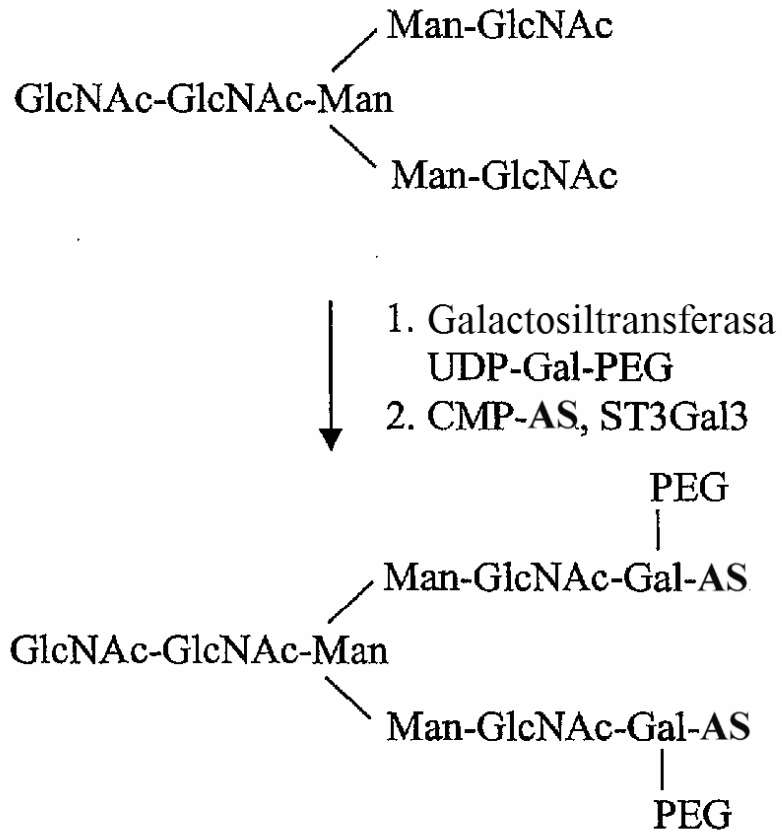


FIG. 22A

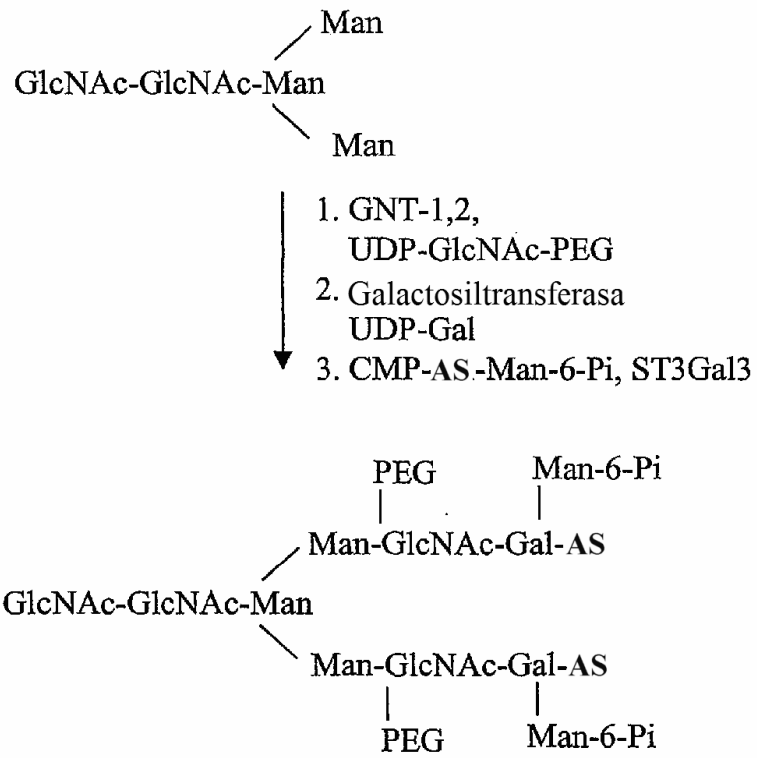


FIG. 22B

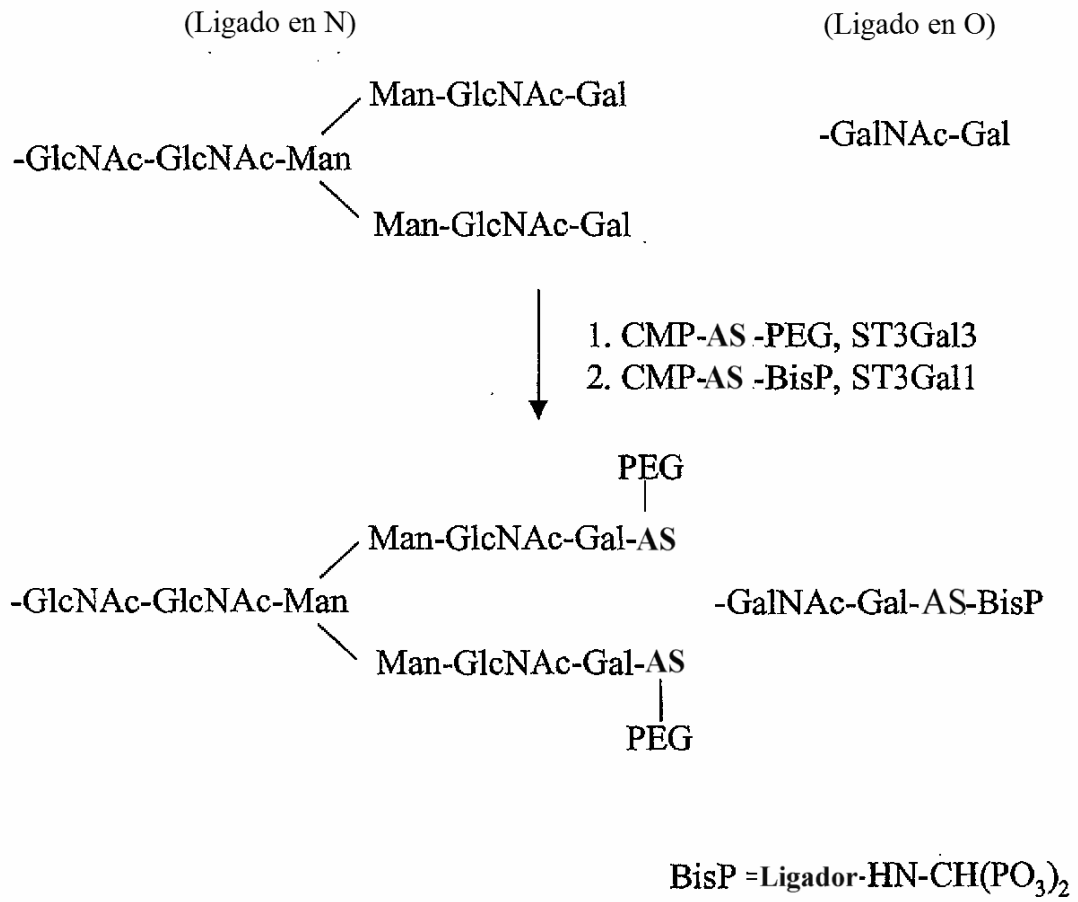


FIG. 22C

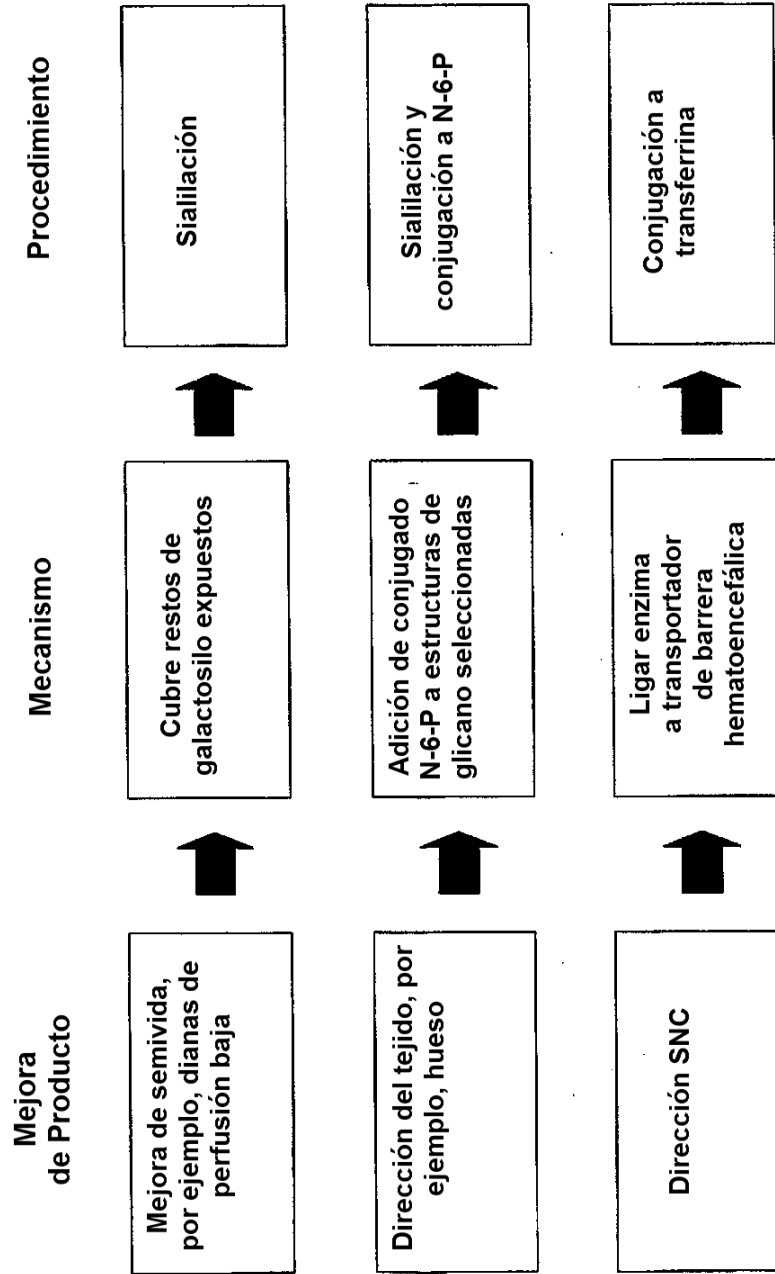


FIG. 23

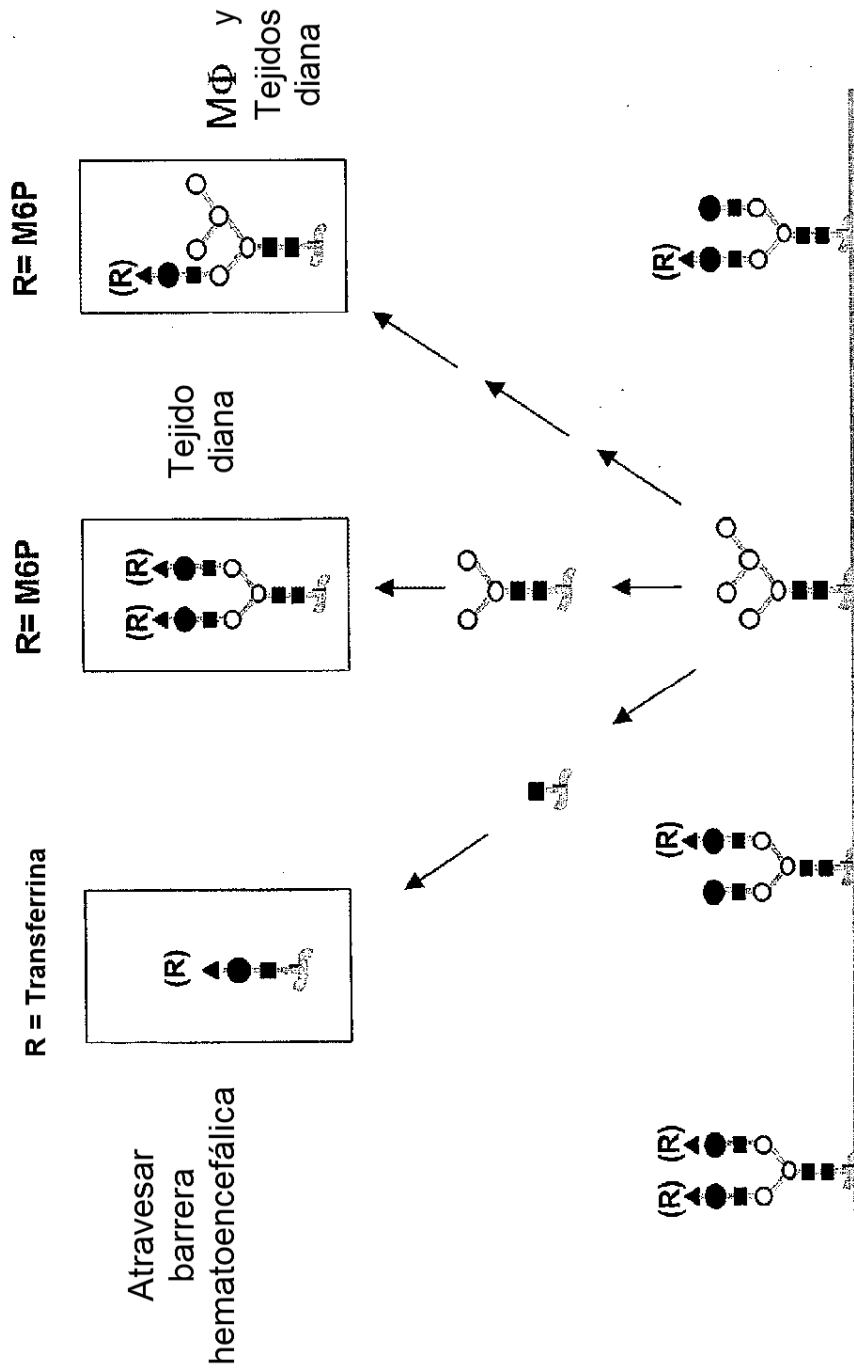


FIG. 24

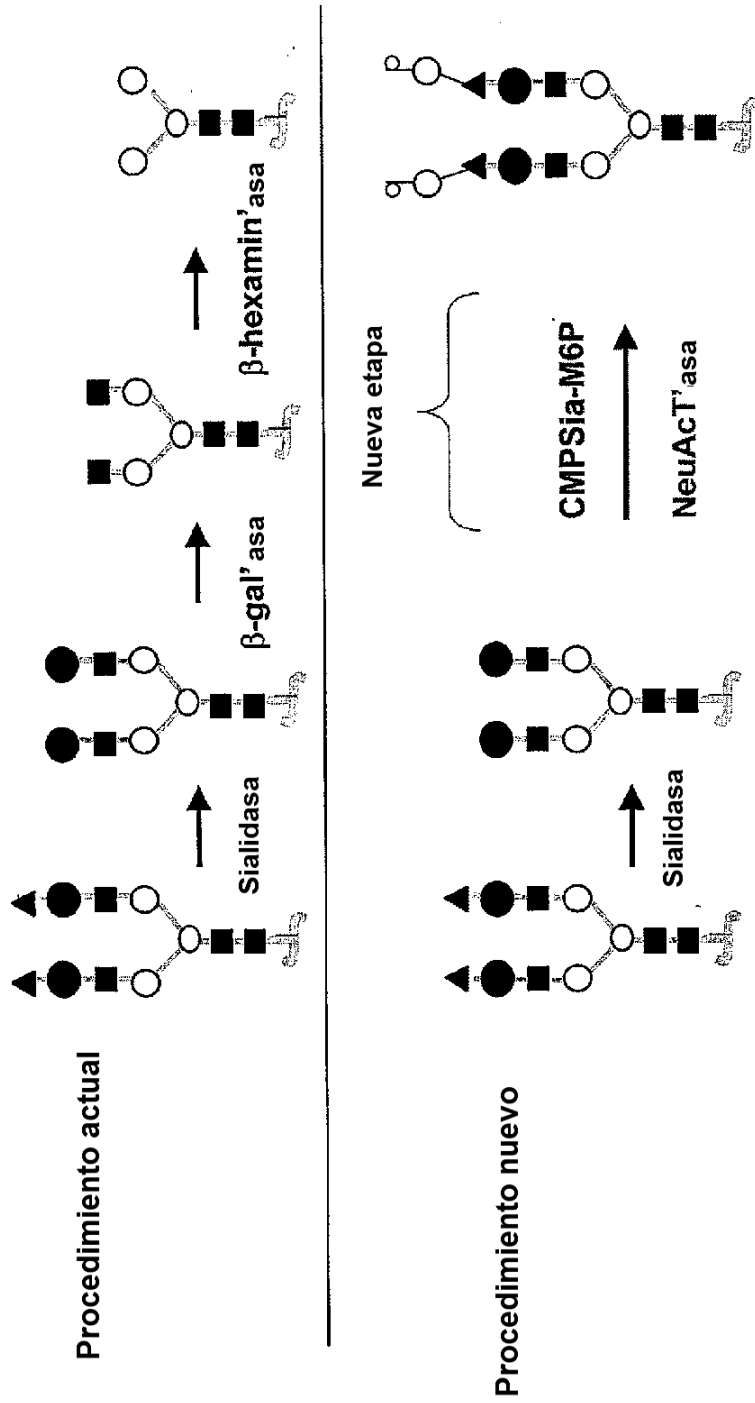


FIG. 25

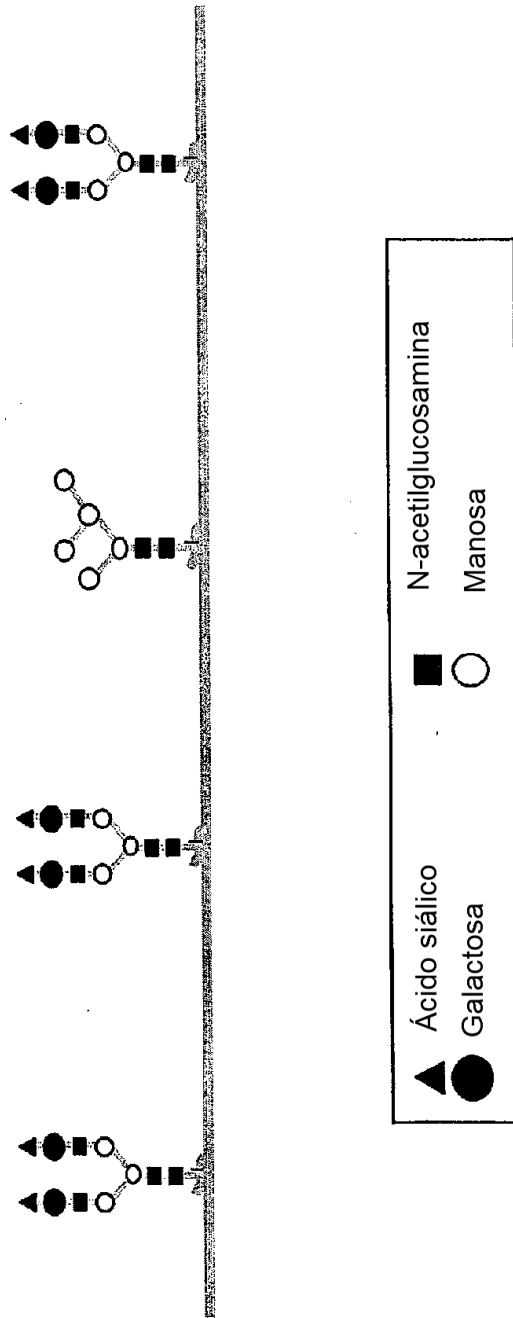


FIG. 26

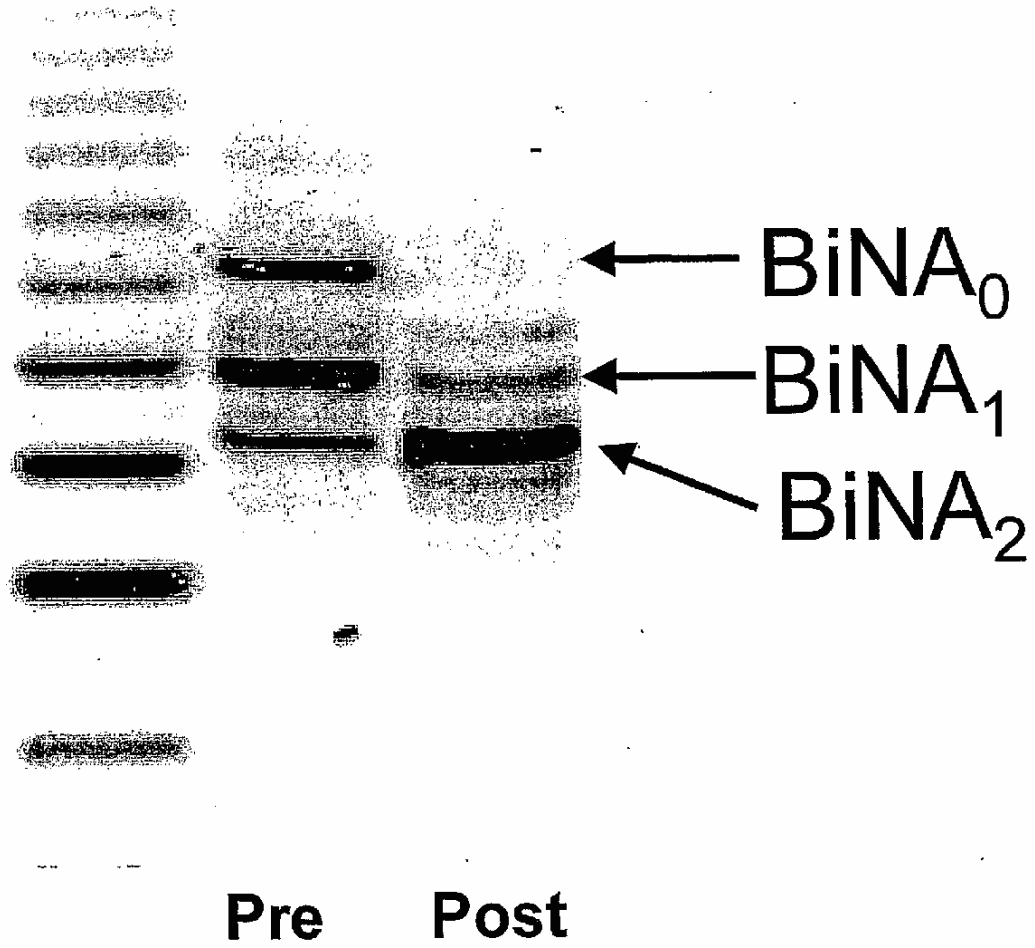


FIG. 27

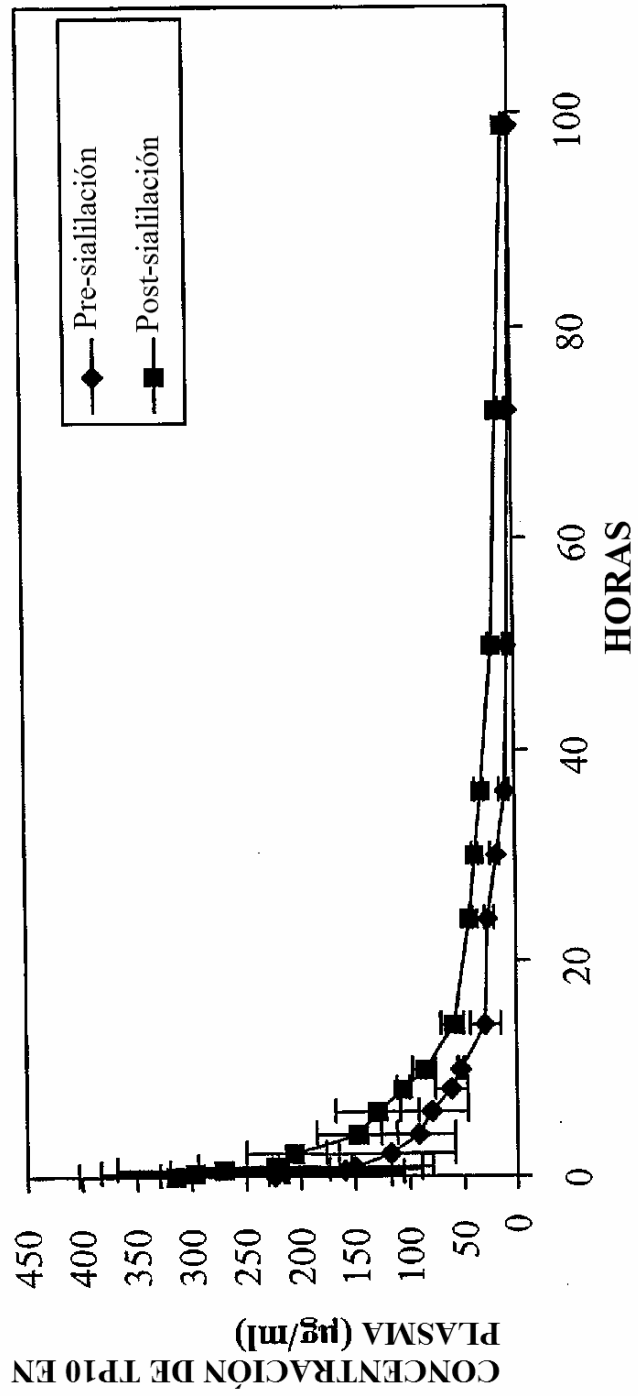


FIG. 28

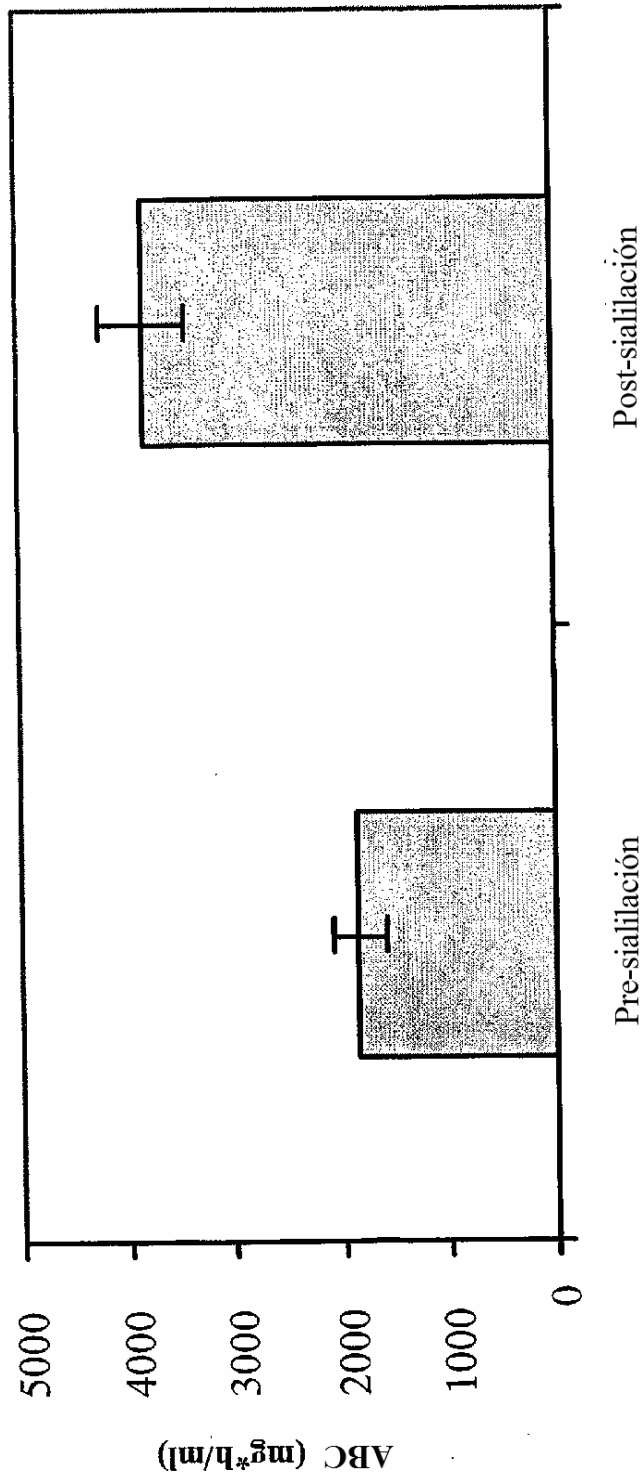


FIG. 29

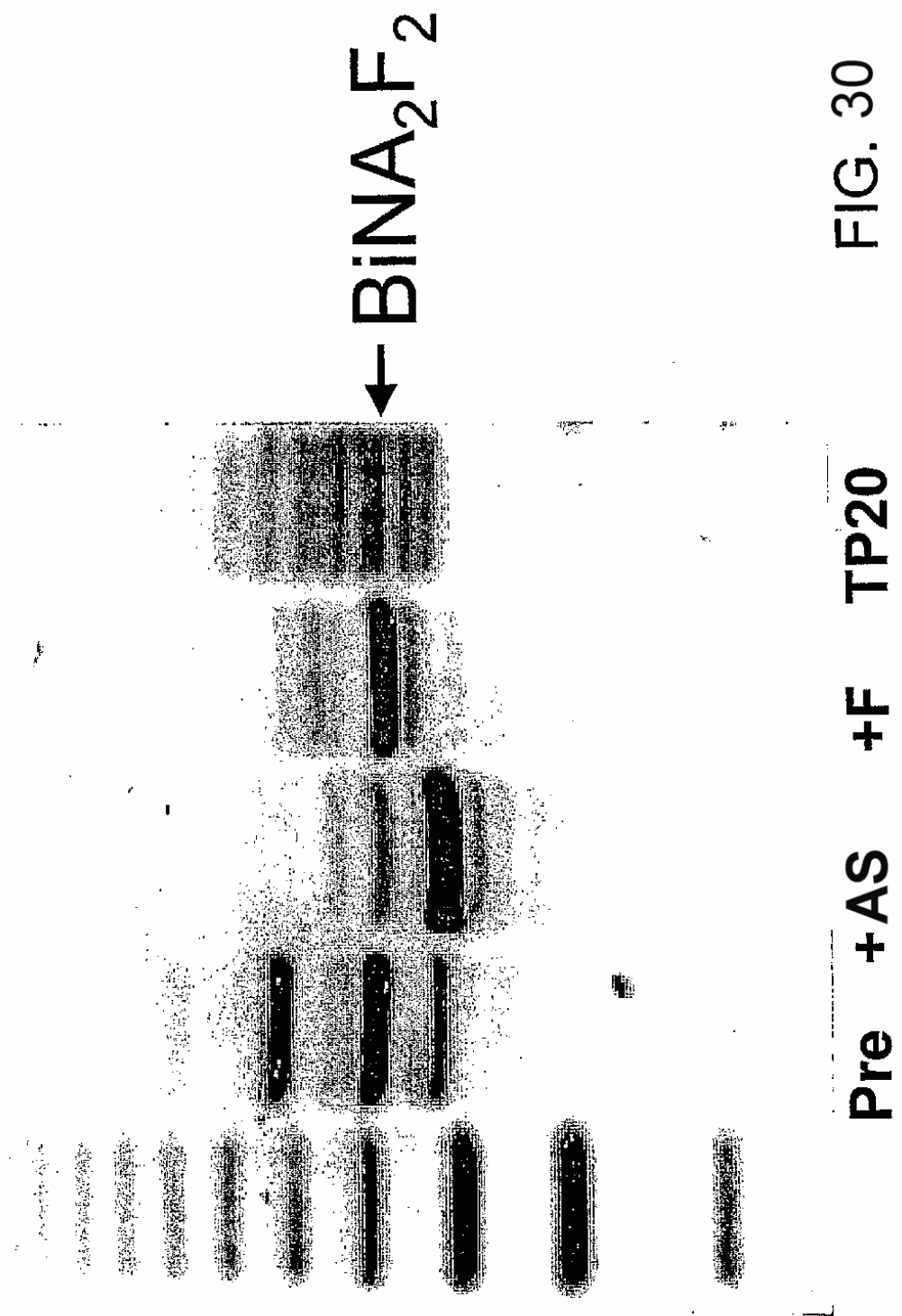


FIG. 30

Pre +AS +F TP20

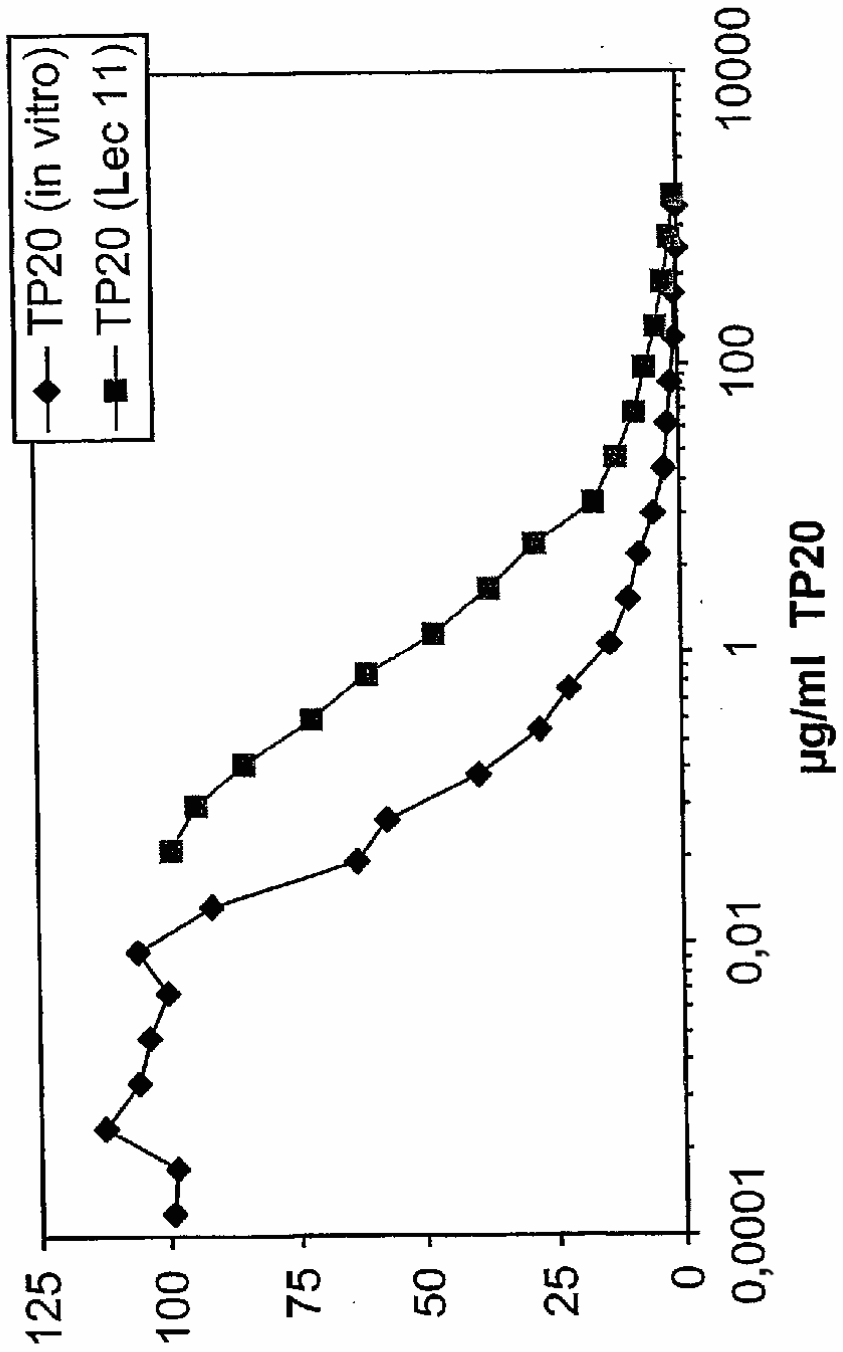


FIG. 31

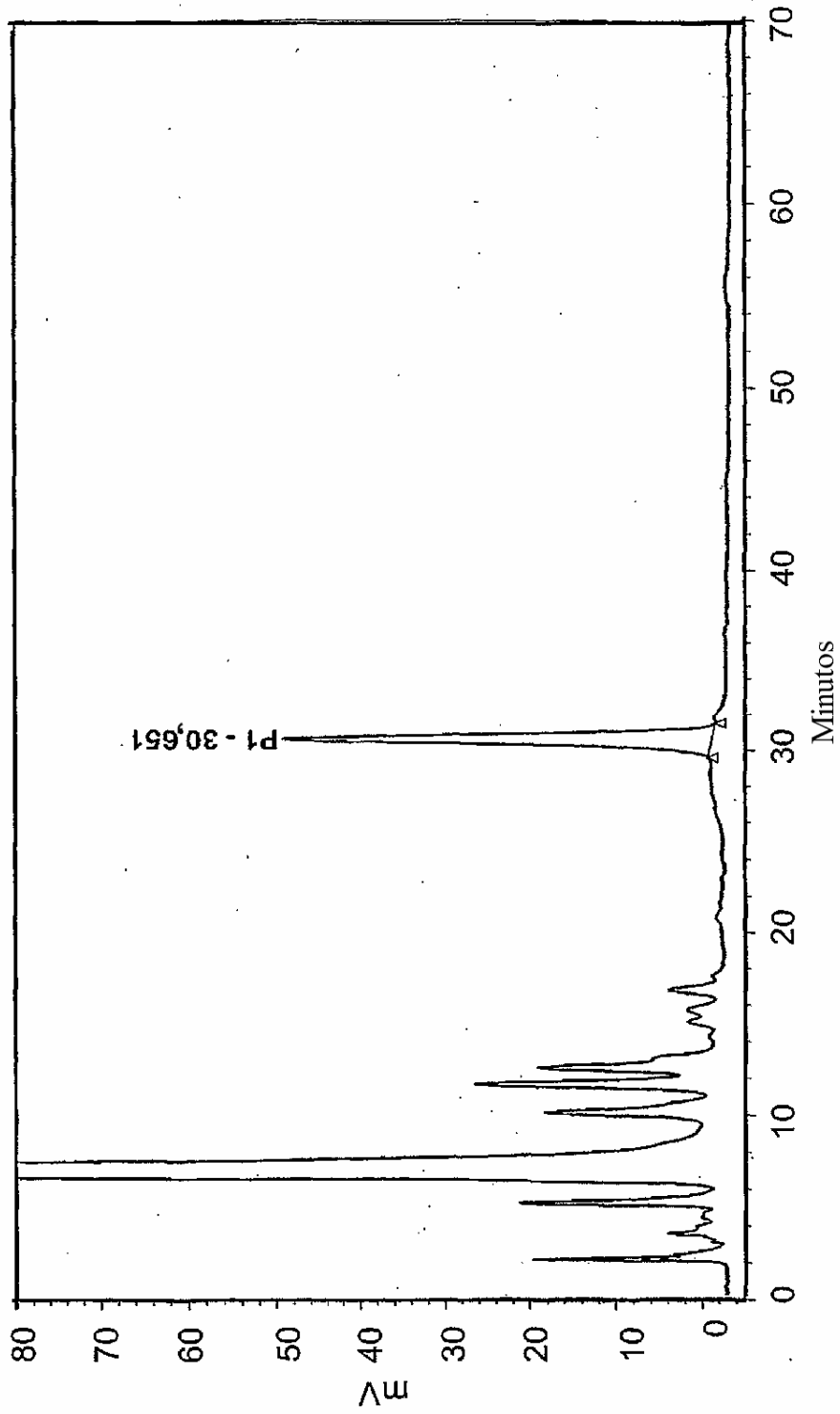


FIG. 32

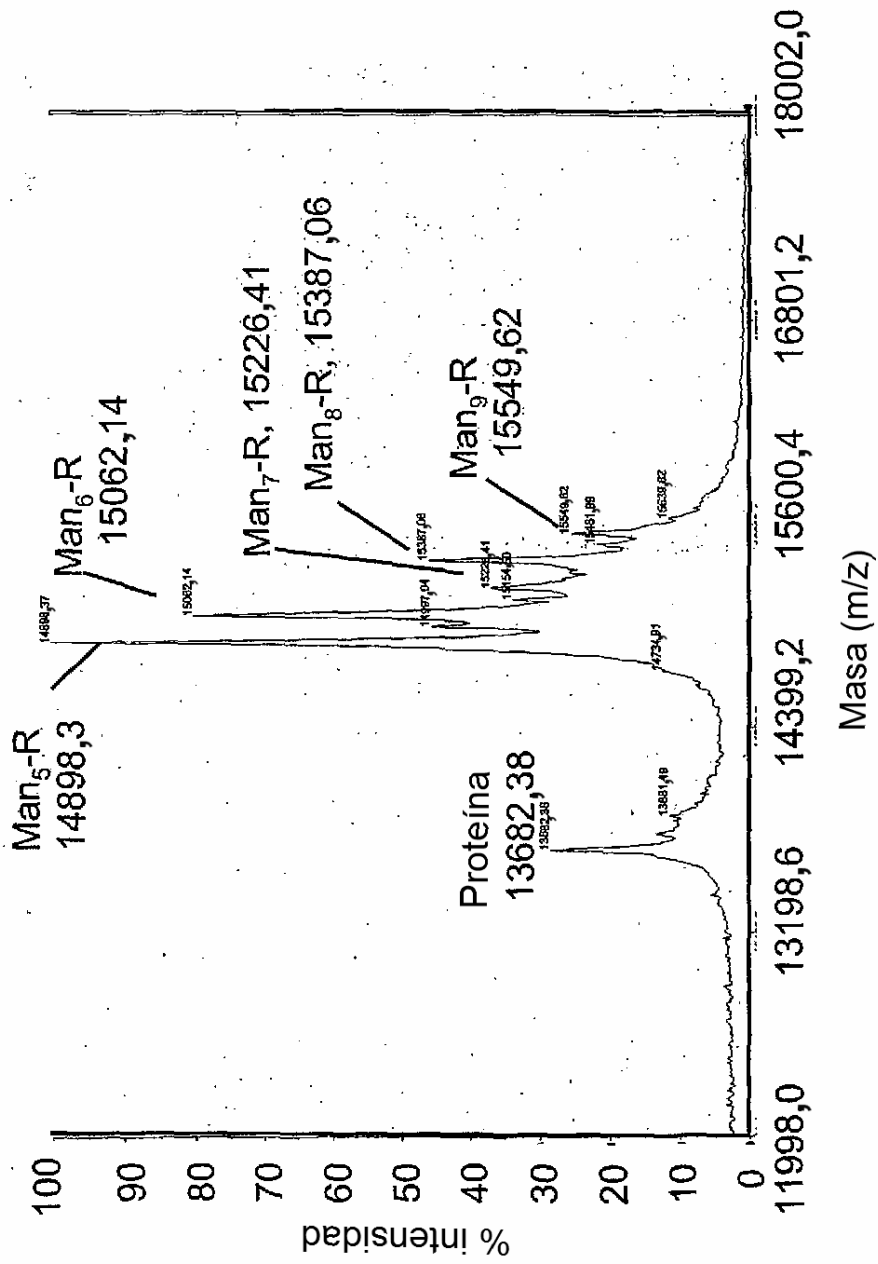


FIG. 33A

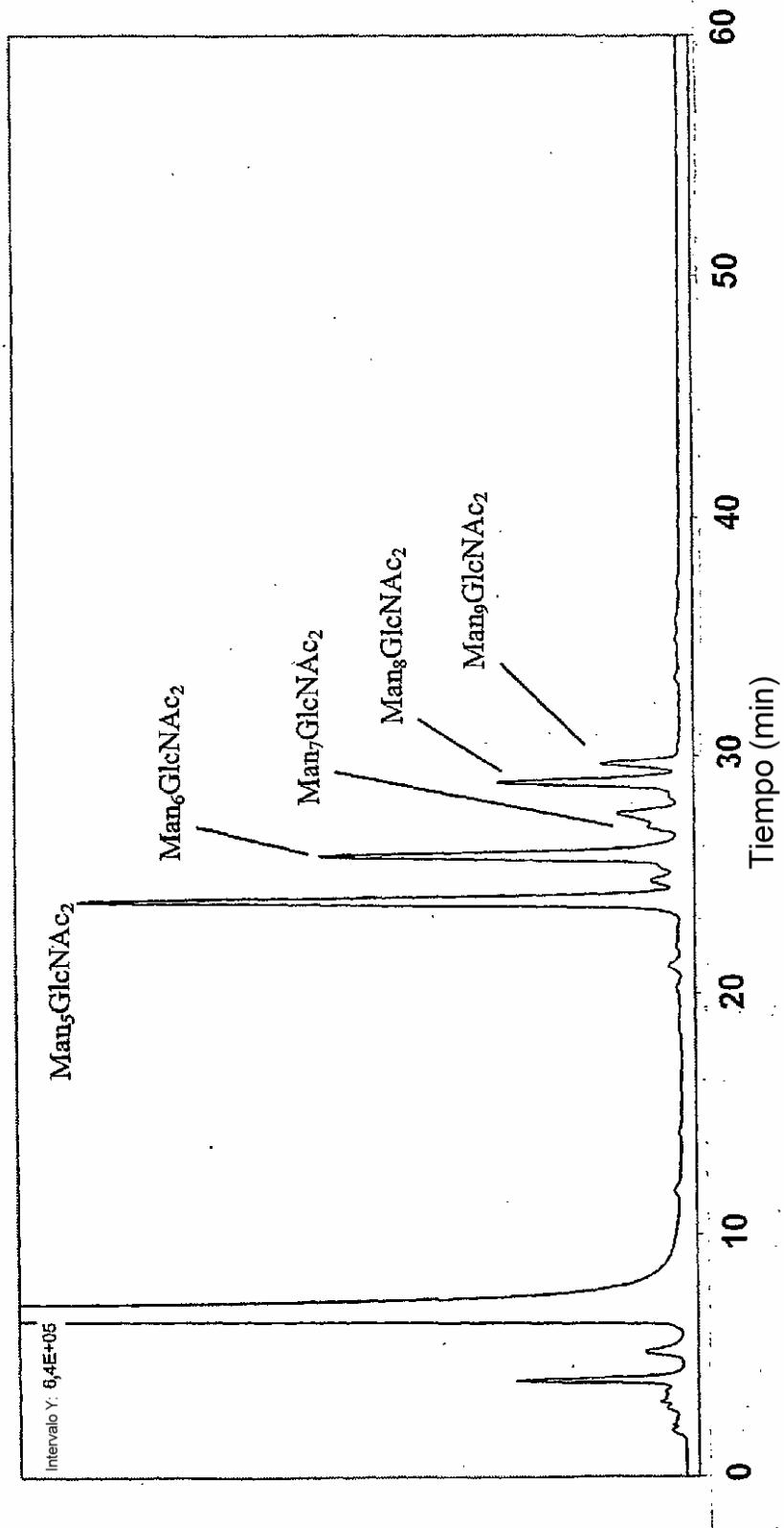


FIG. 33B

N-glicanos híbridos
bisetritz

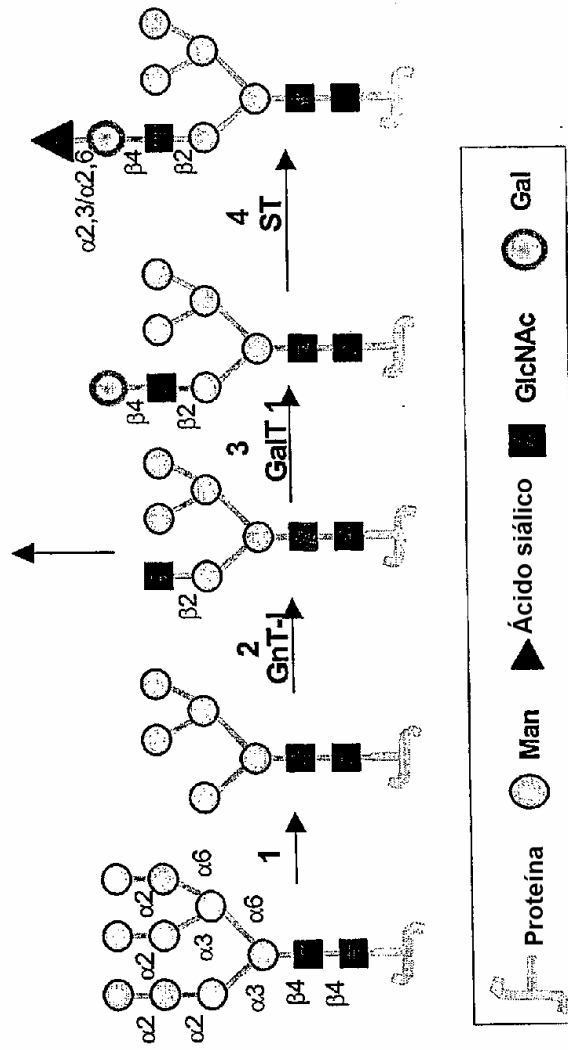


FIG. 34

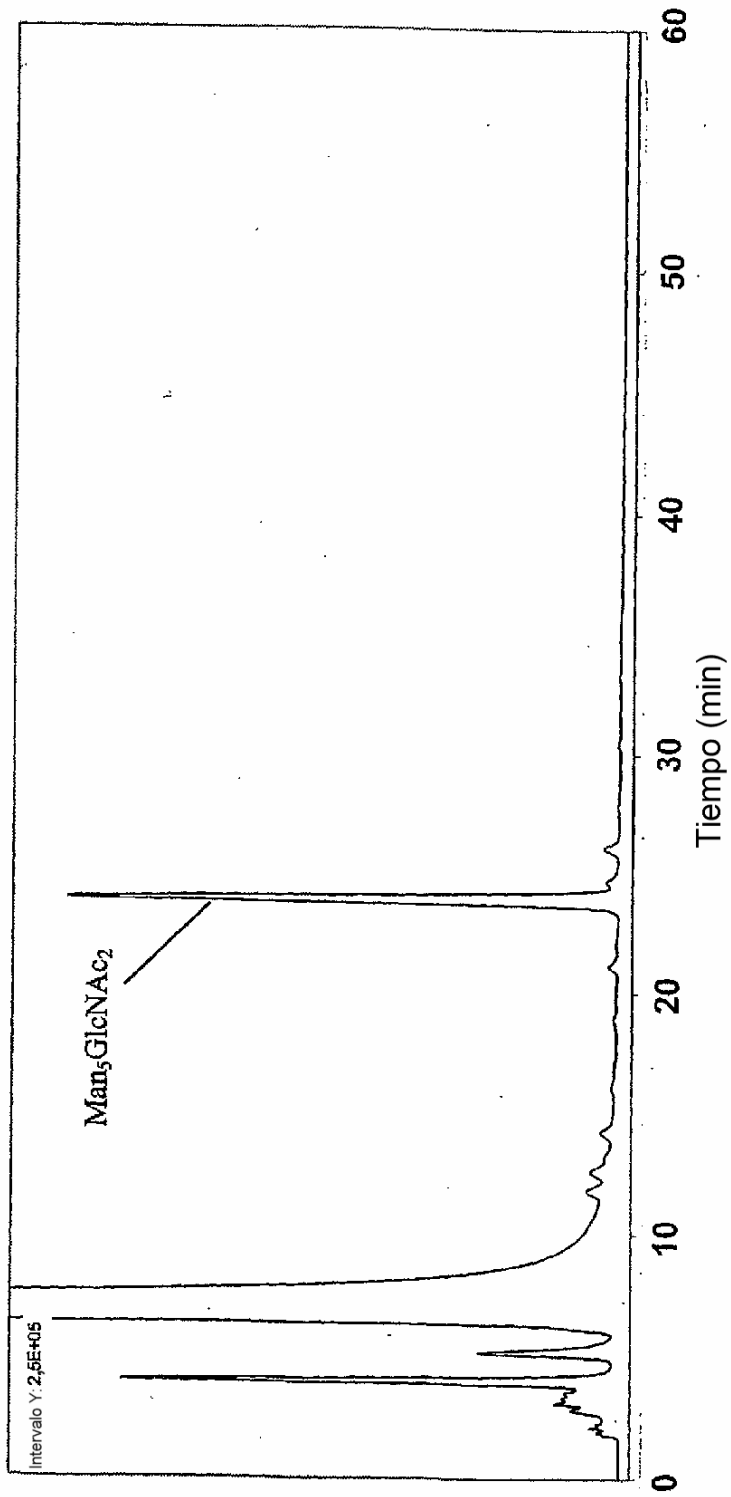


FIG. 35B

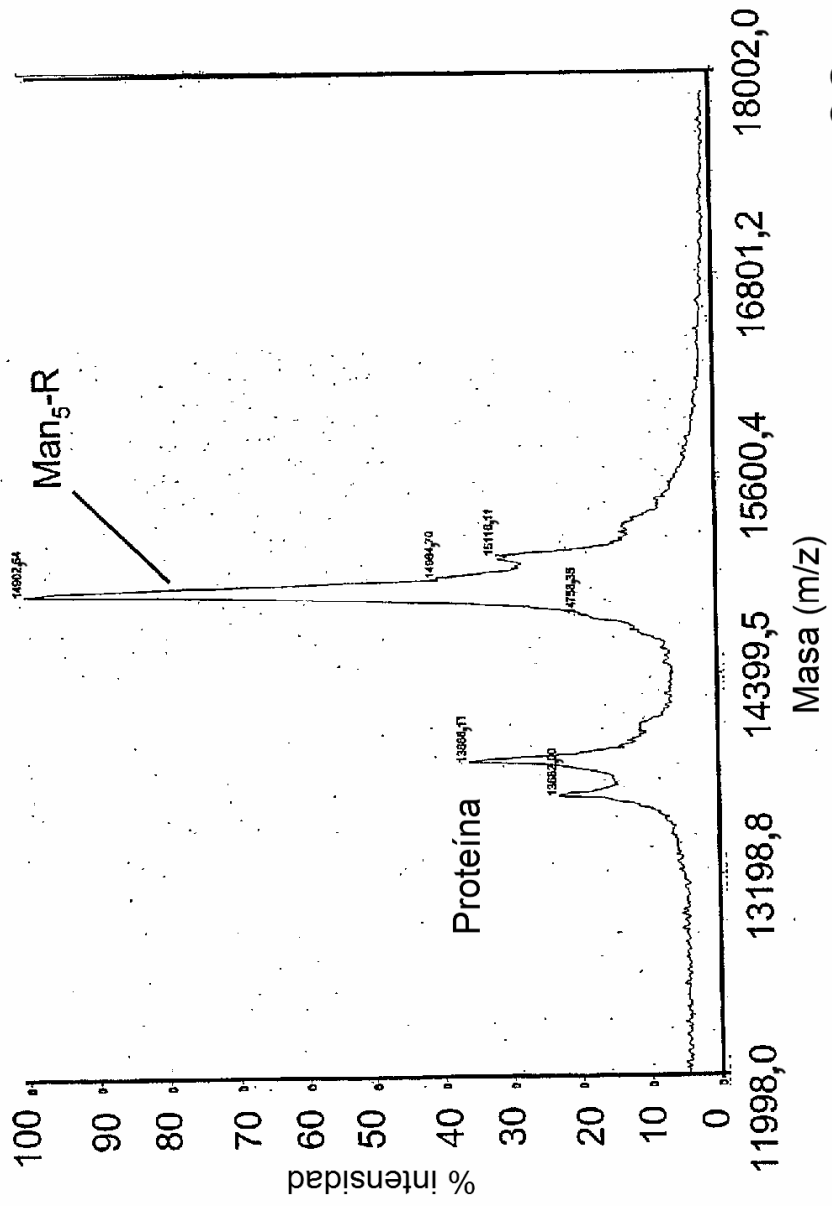


FIG. 36

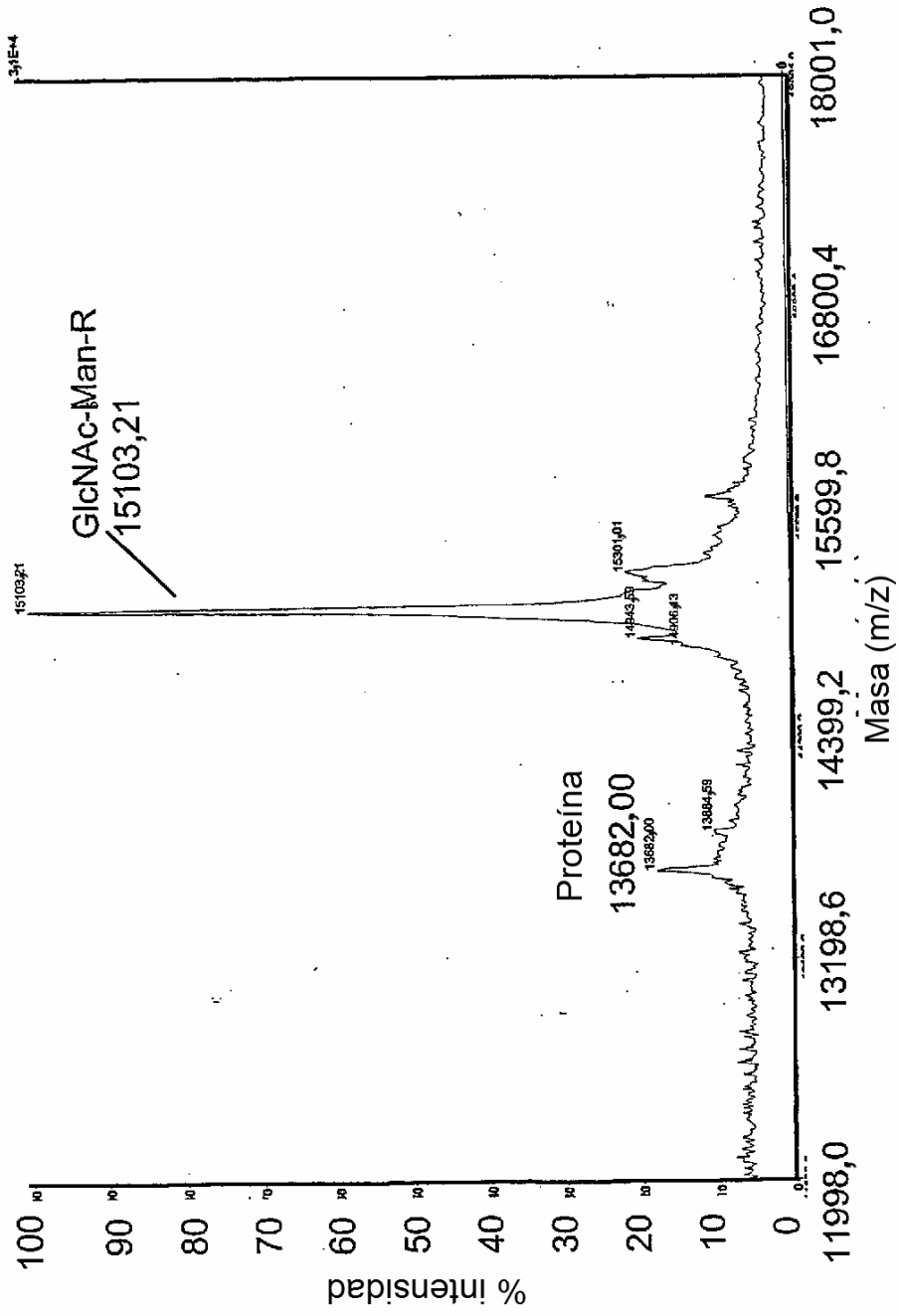


FIG. 37

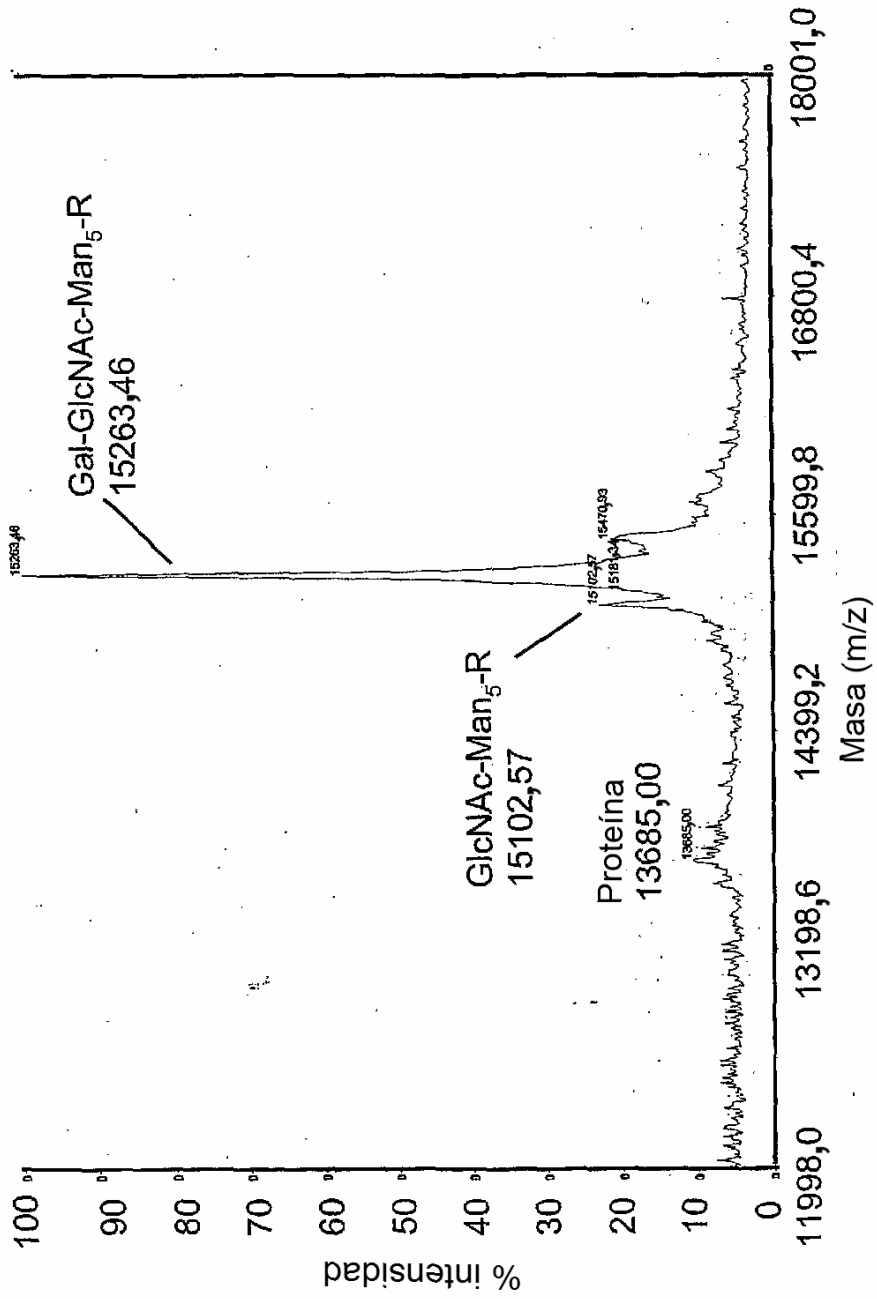


FIG. 38

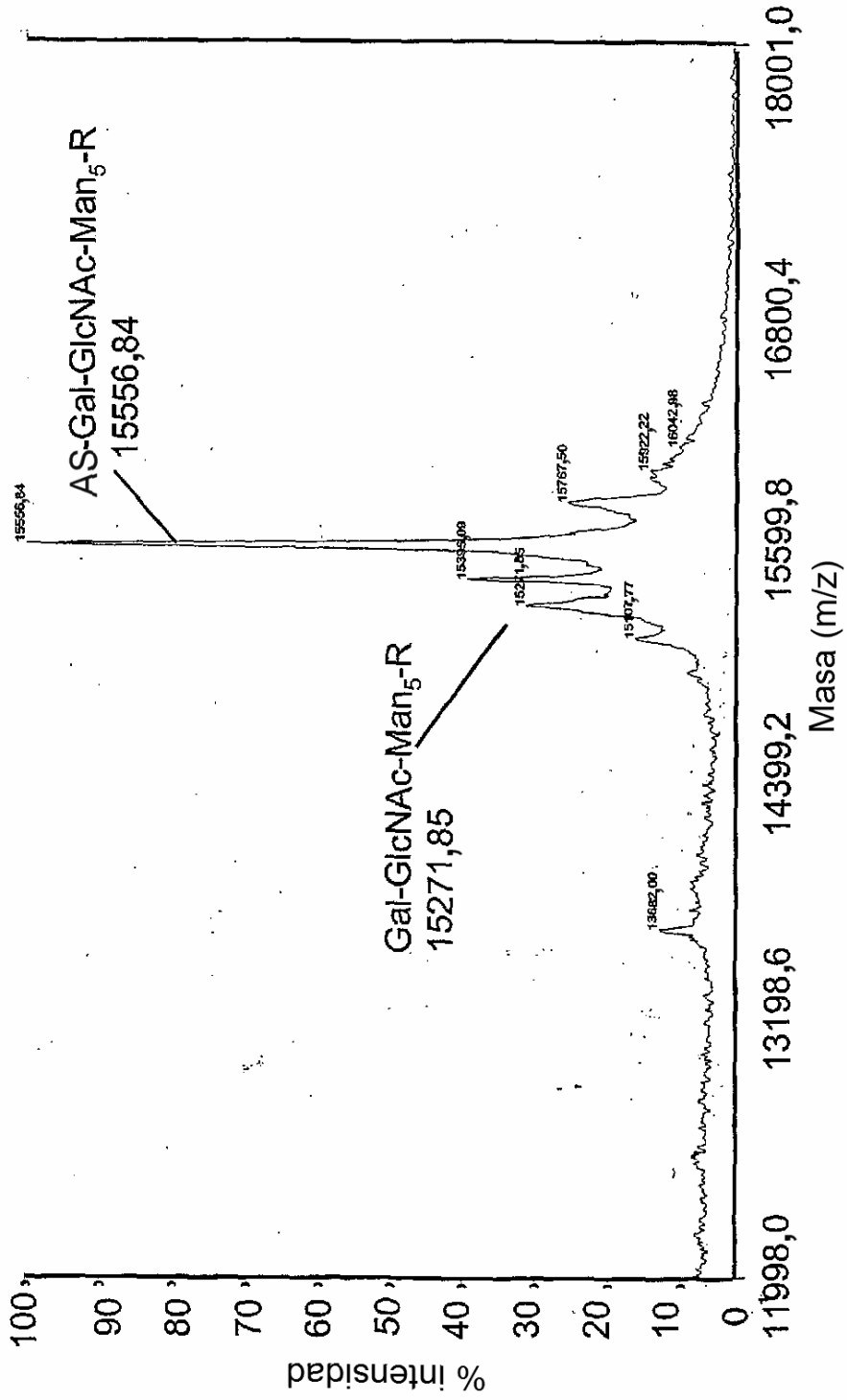


FIG. 39

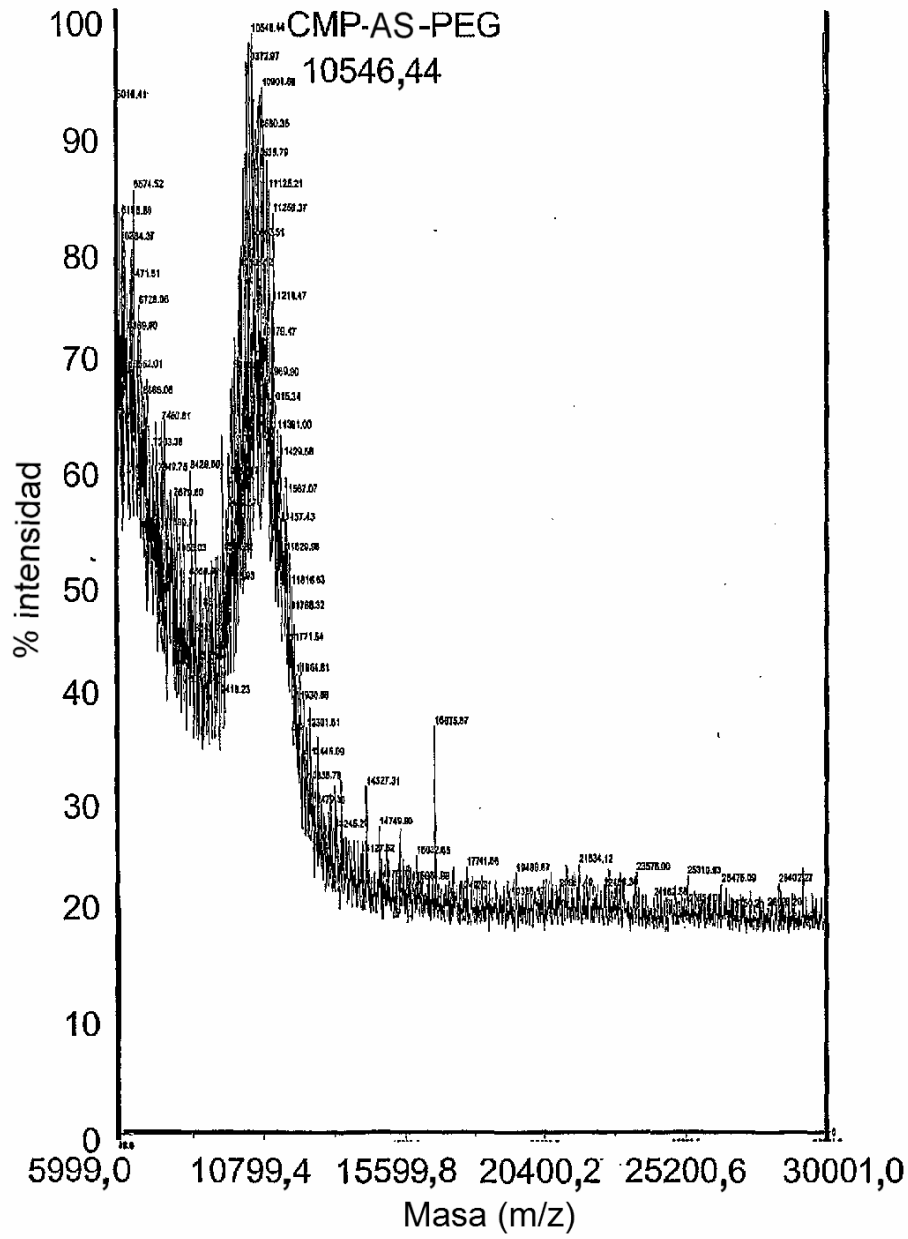


FIG. 40B

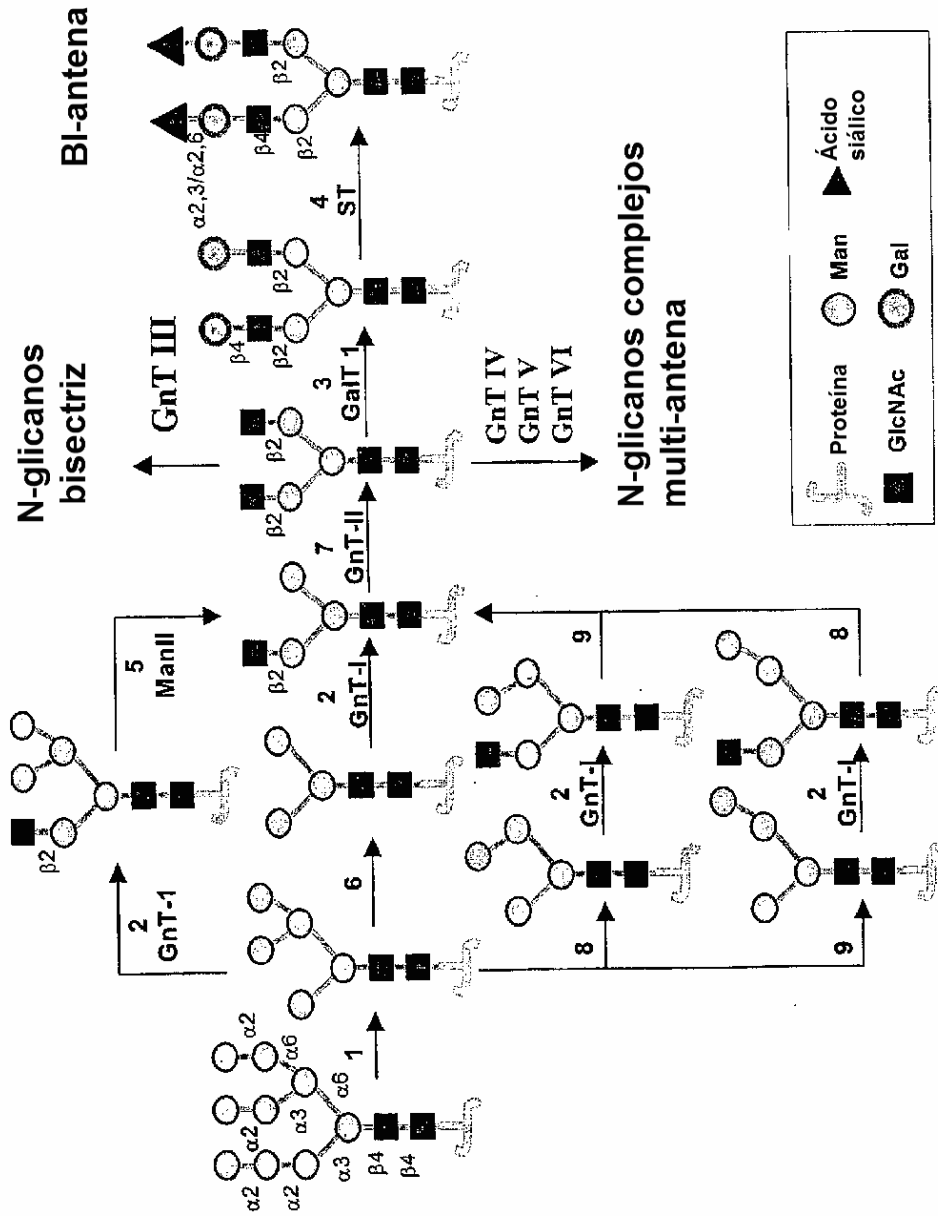


FIG.41

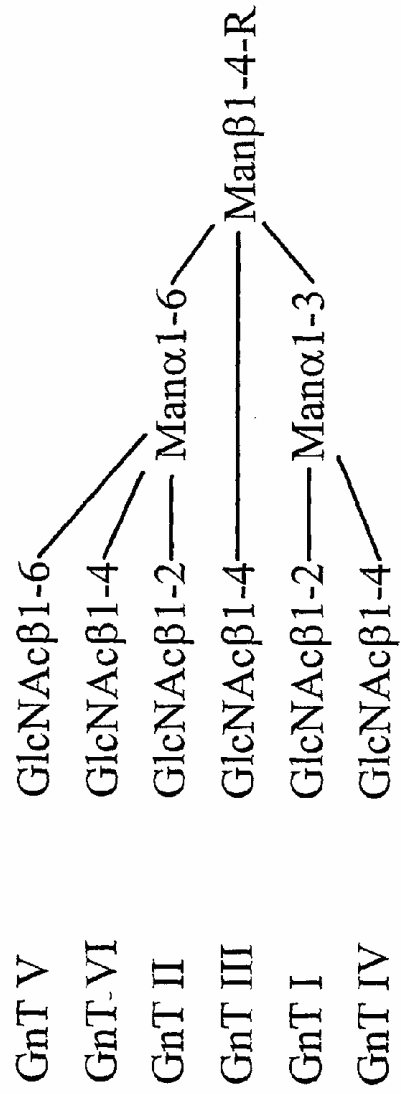


FIG. 42

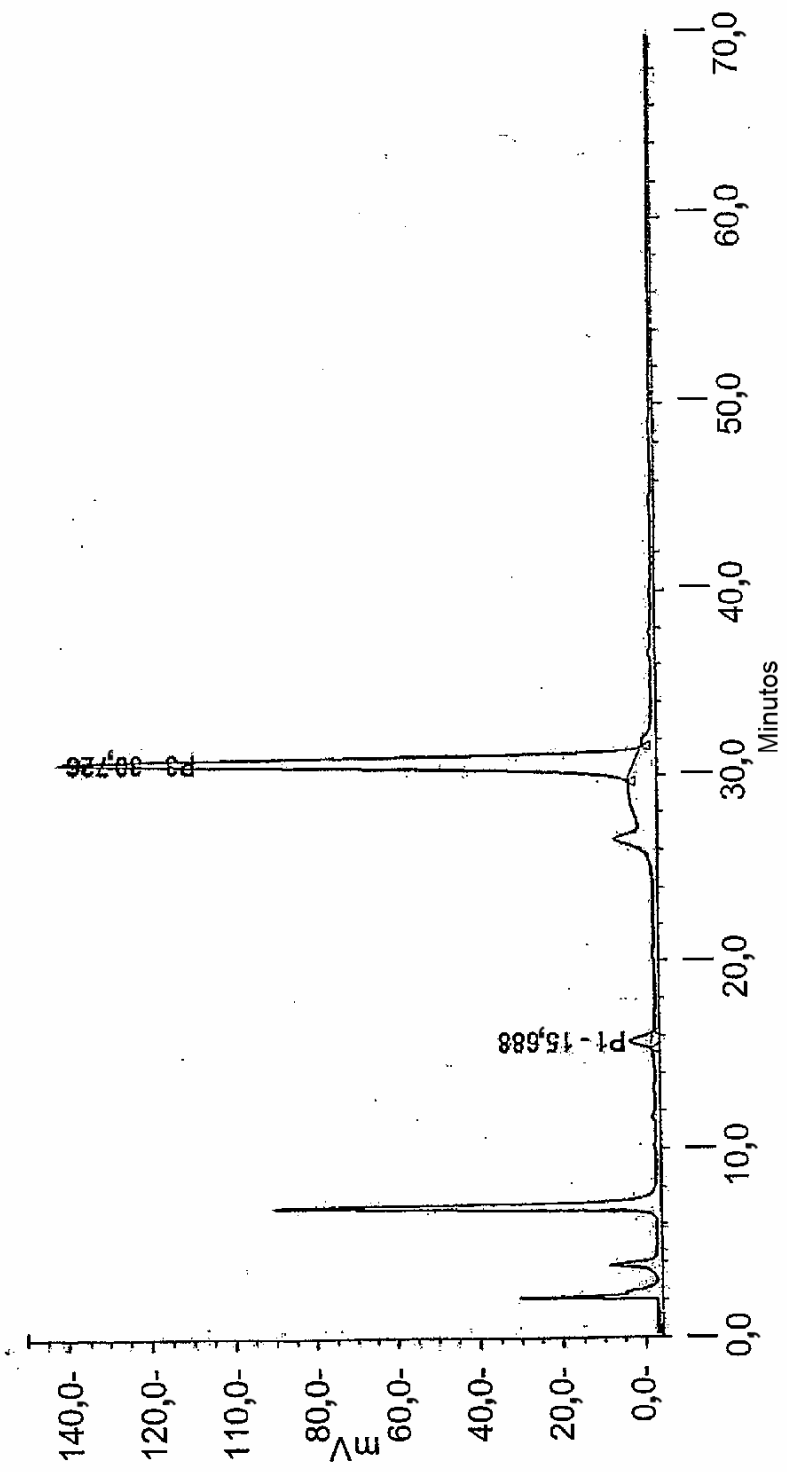


FIG. 43A

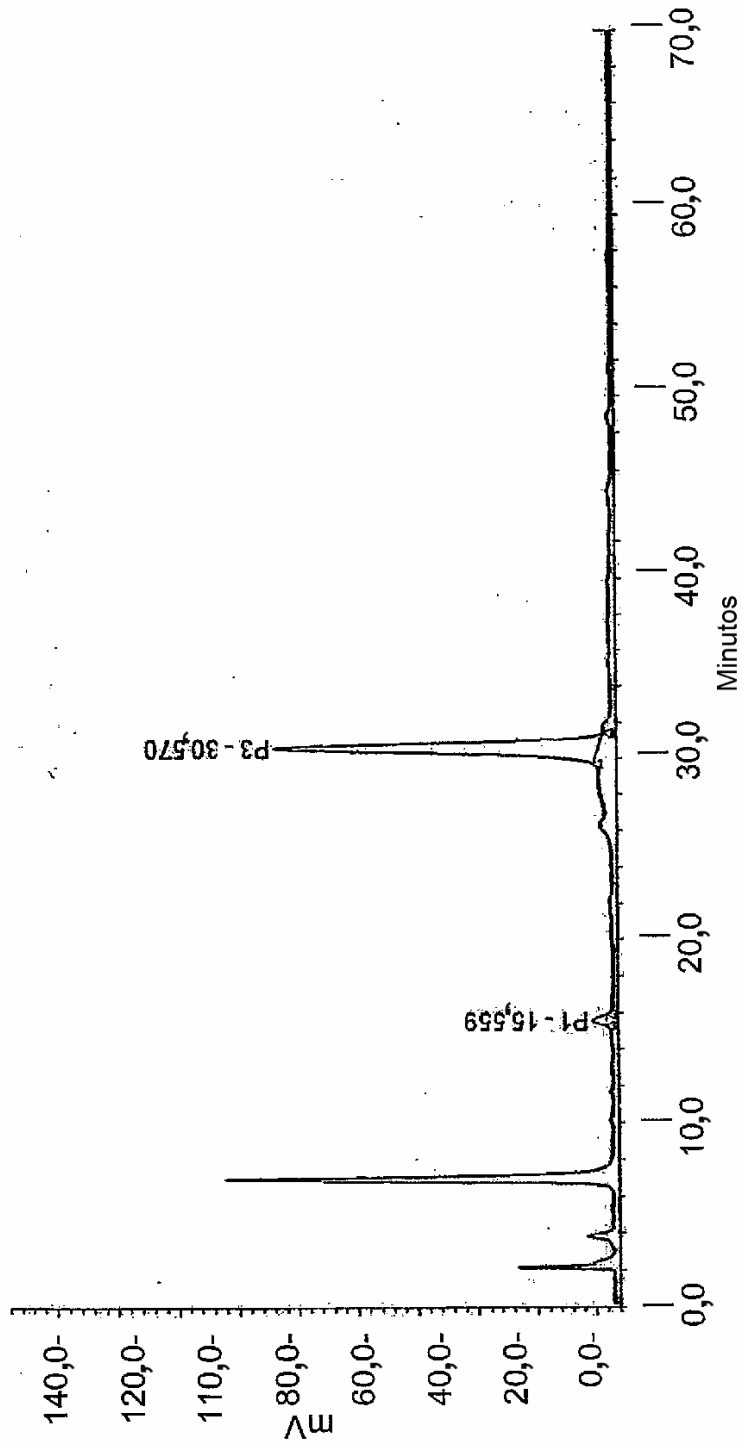


FIG. 43B

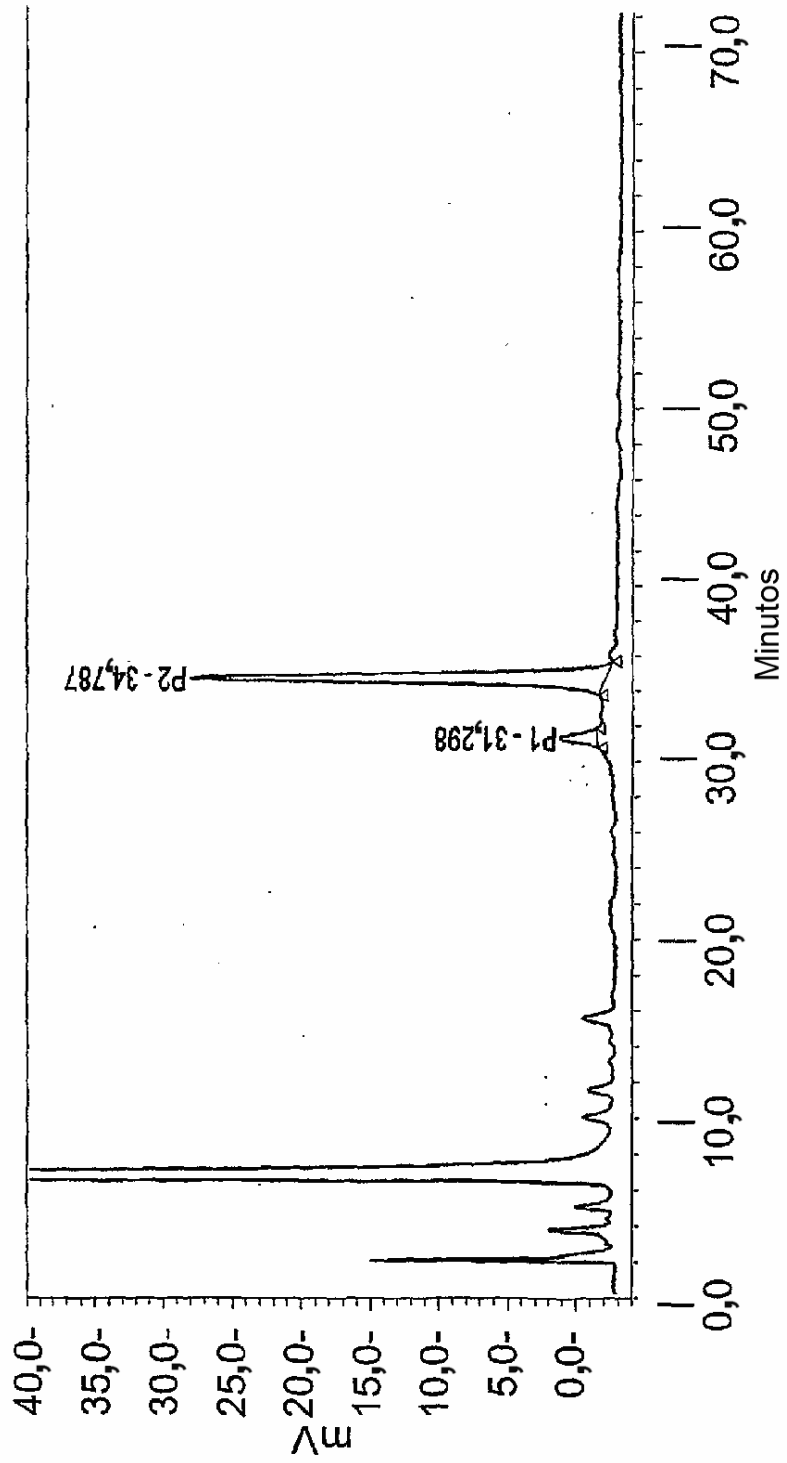


FIG. 44

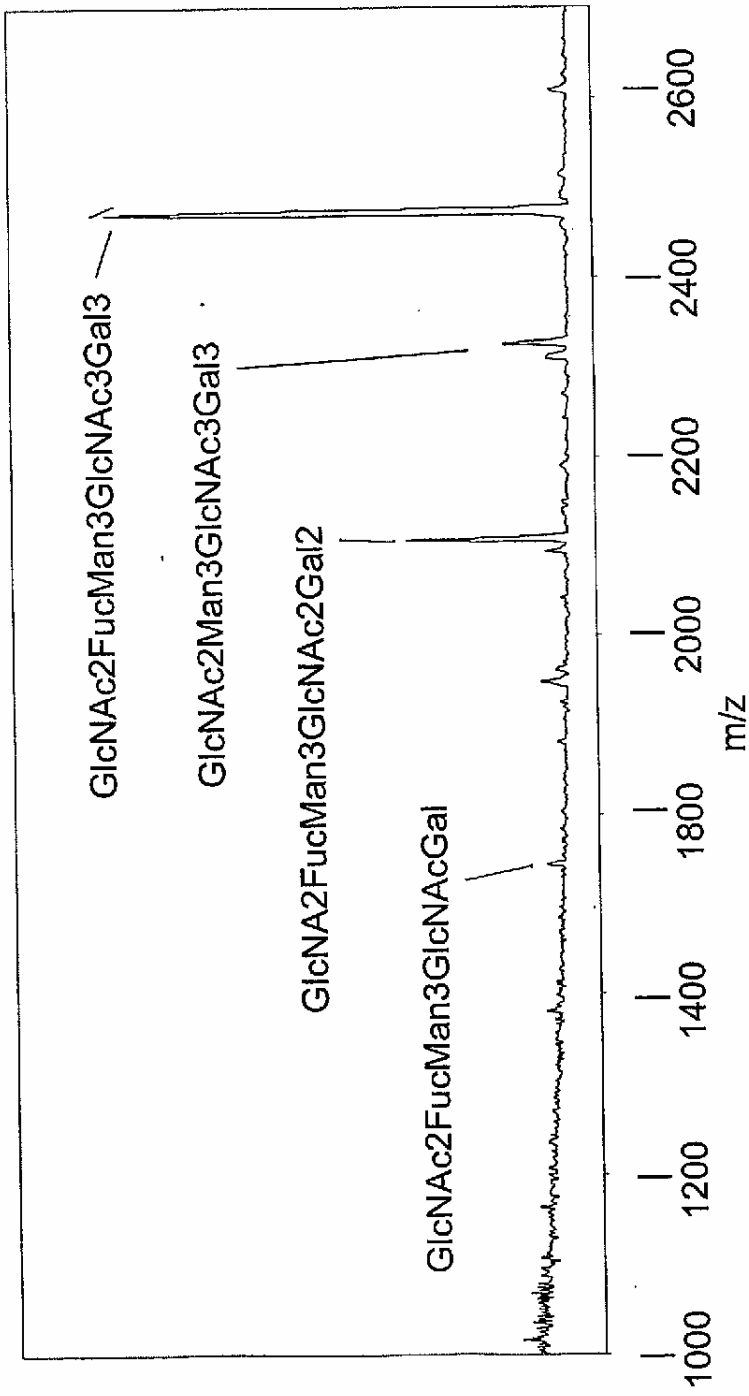


FIG. 45



FIG. 46

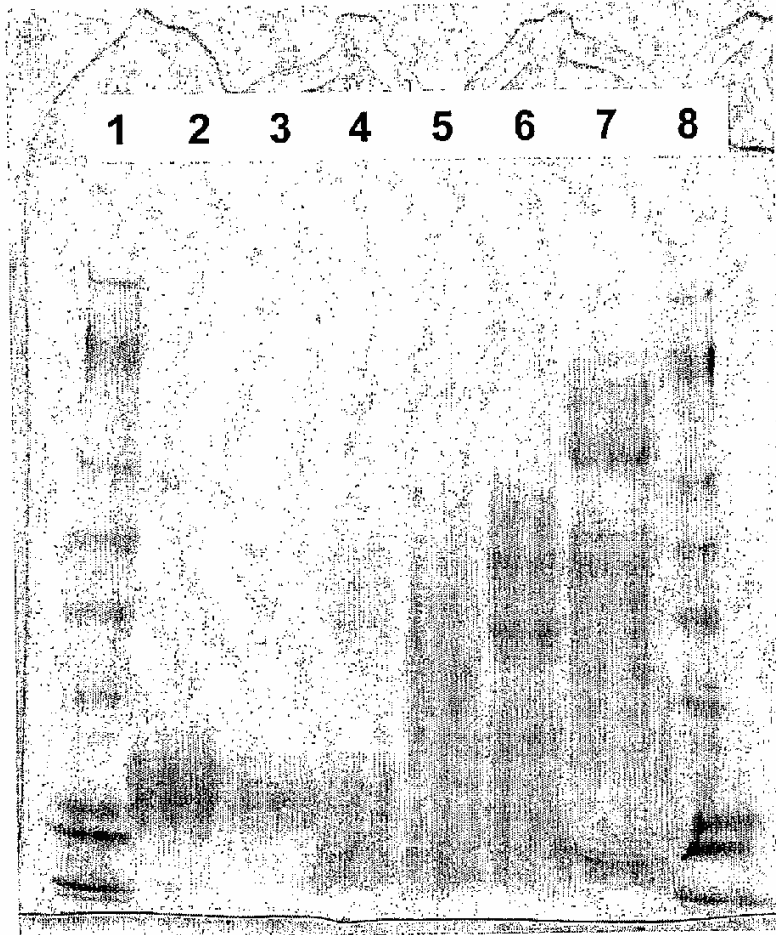


FIG. 47

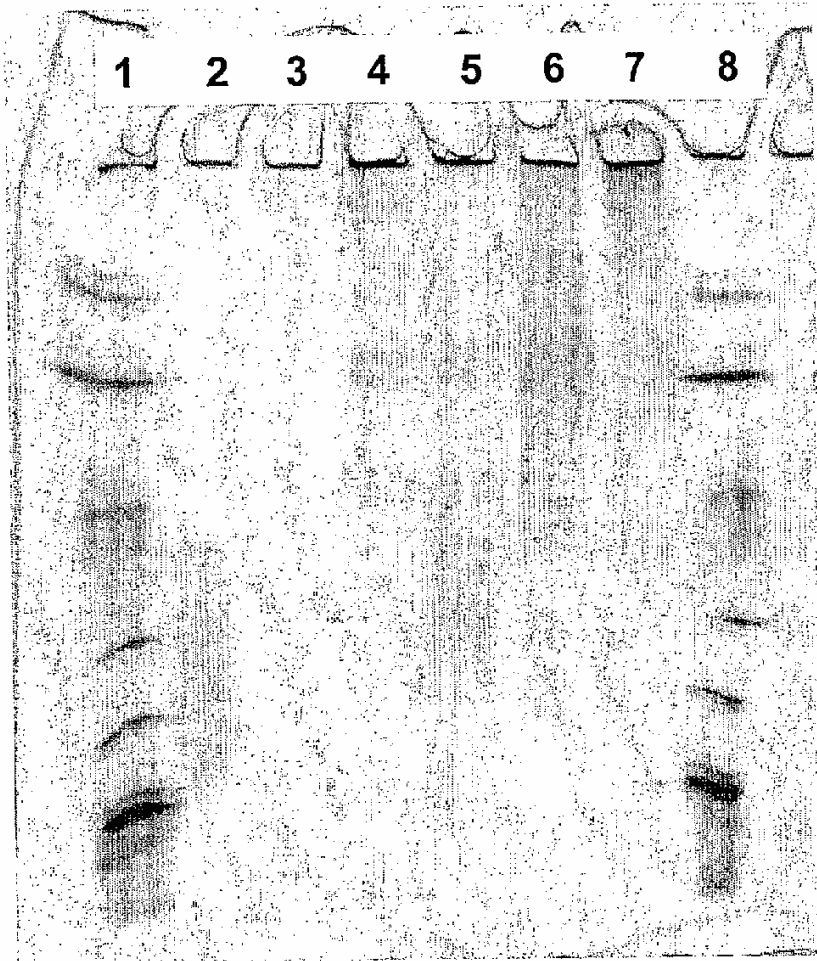


FIG. 48

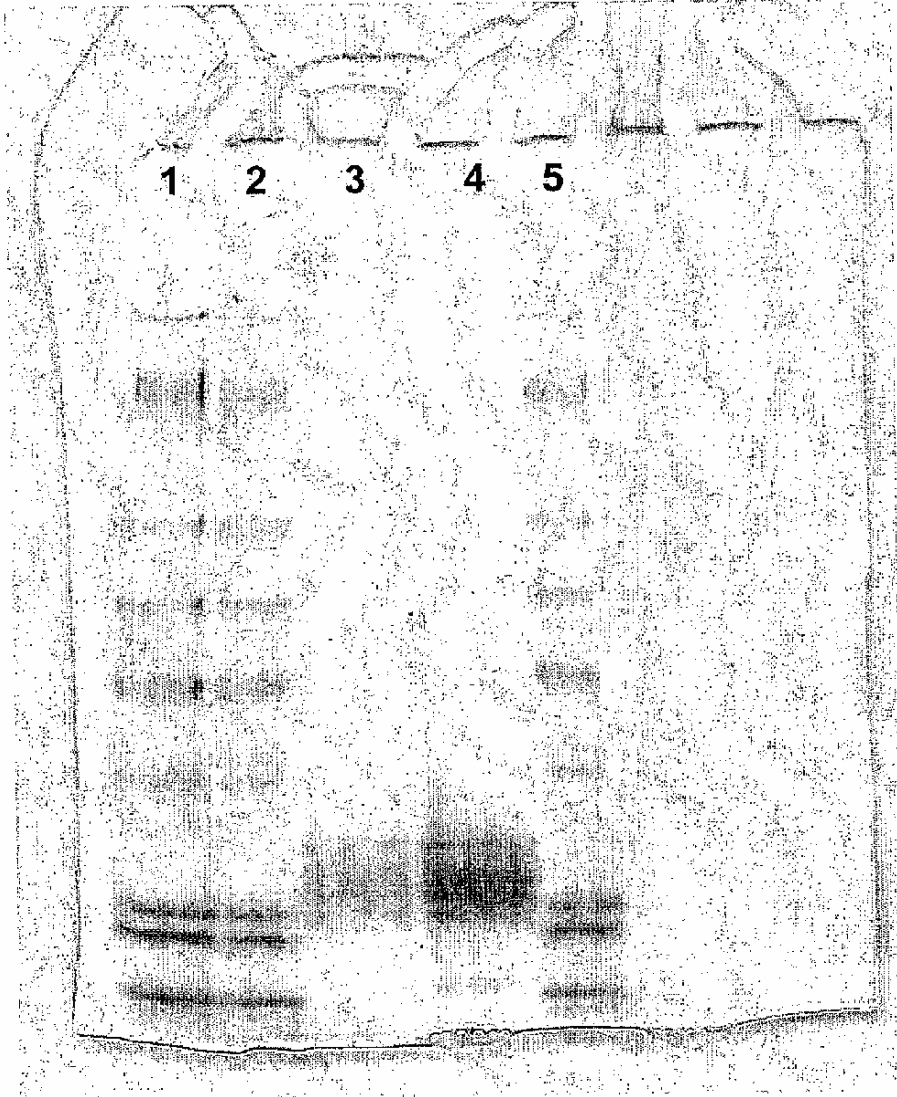


FIG. 49

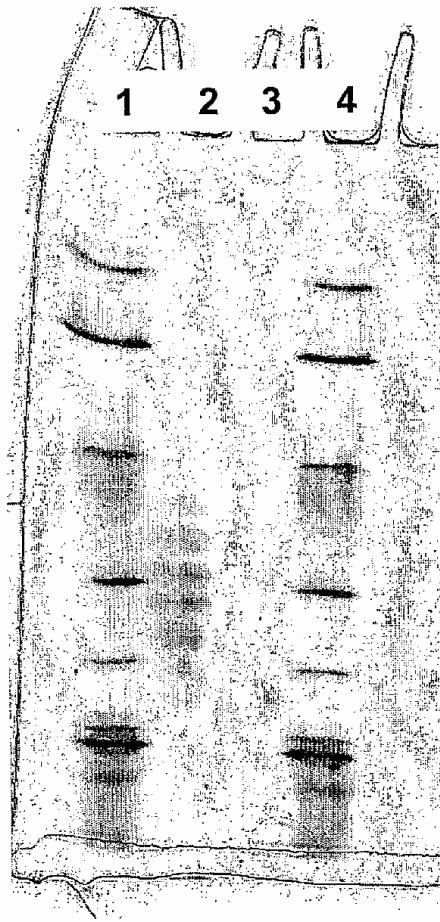


FIG. 50

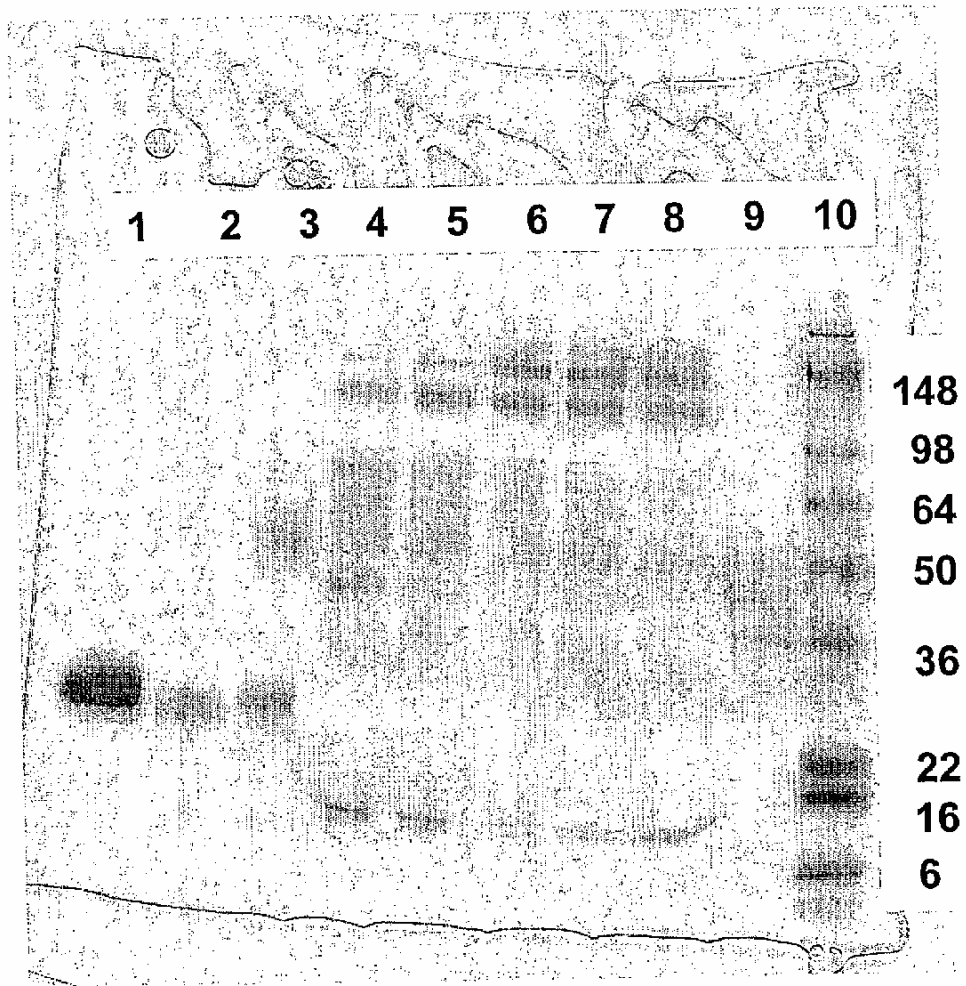


FIG. 51

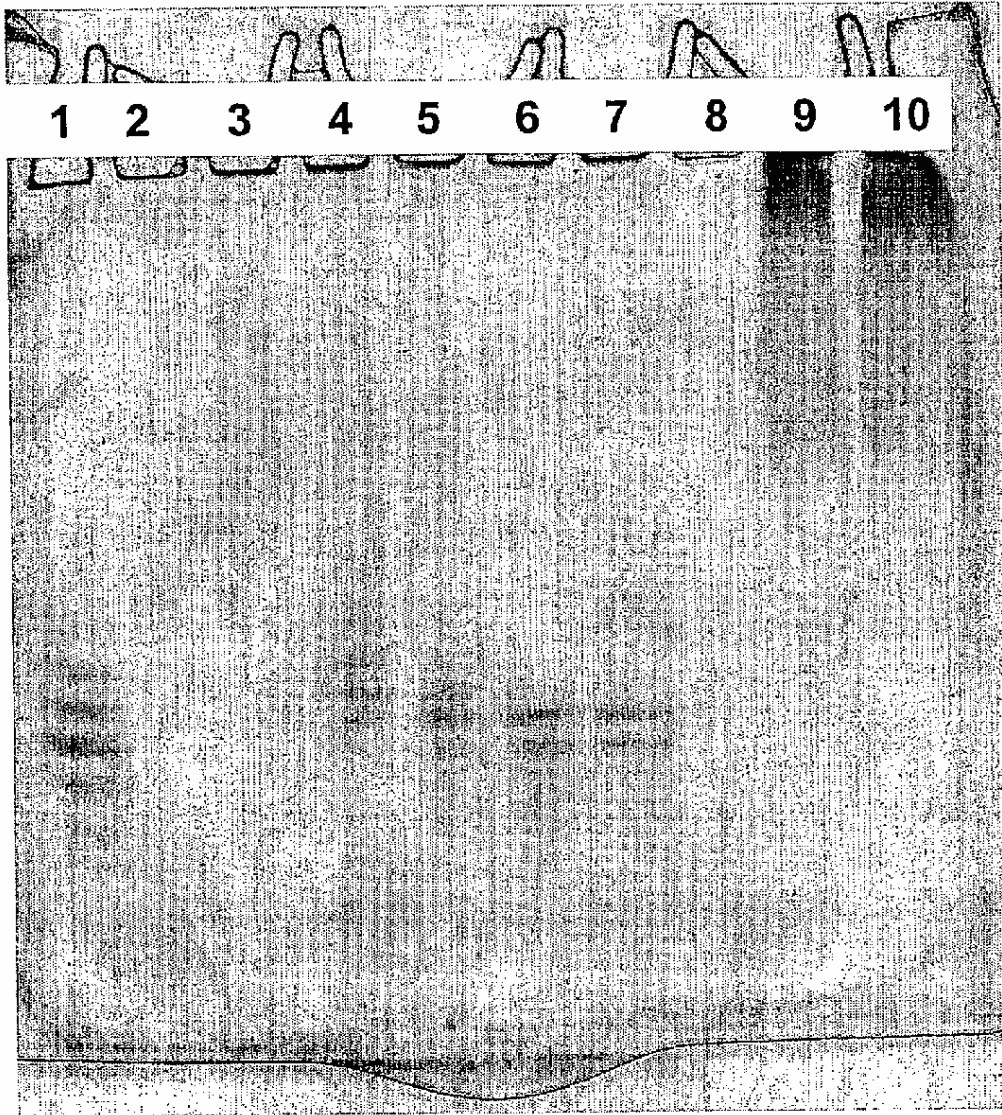


FIG. 52

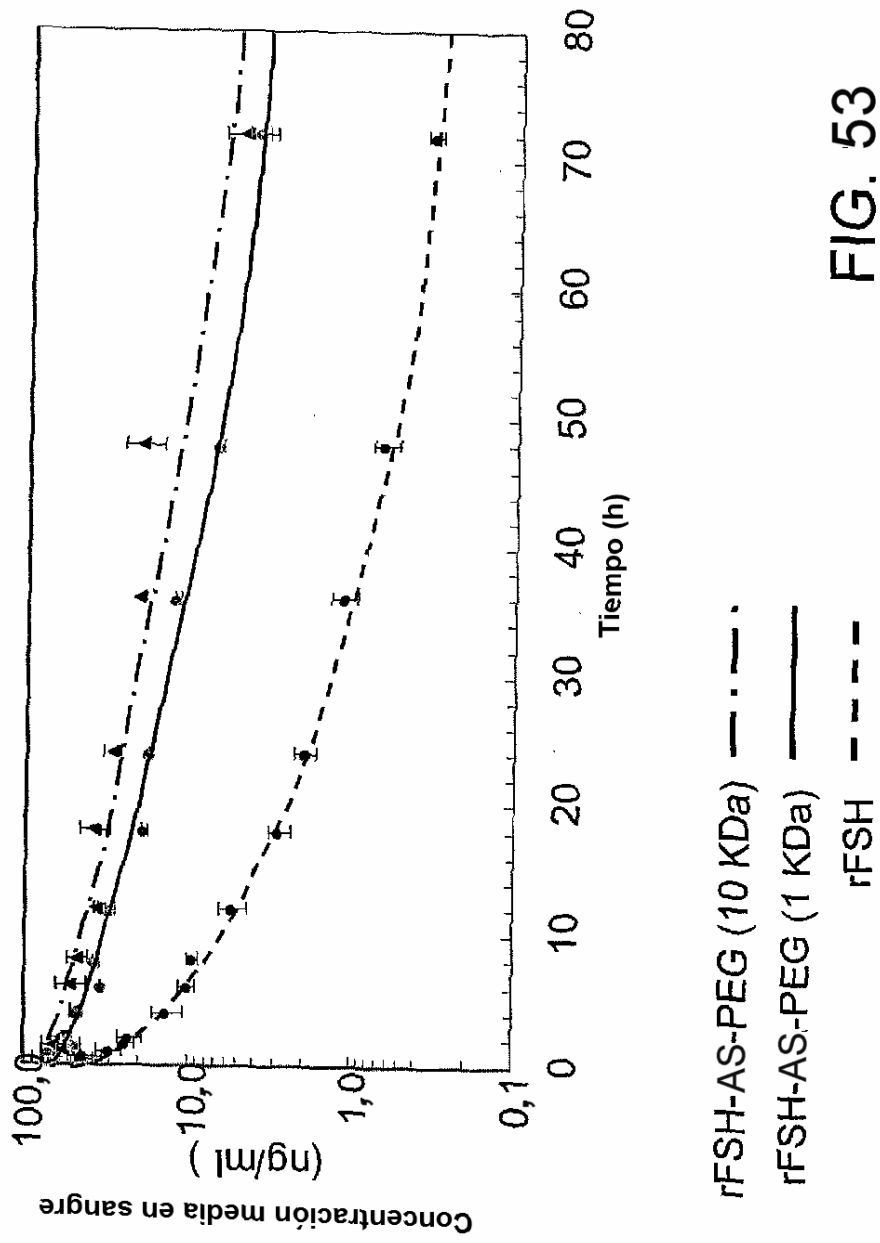


FIG. 53

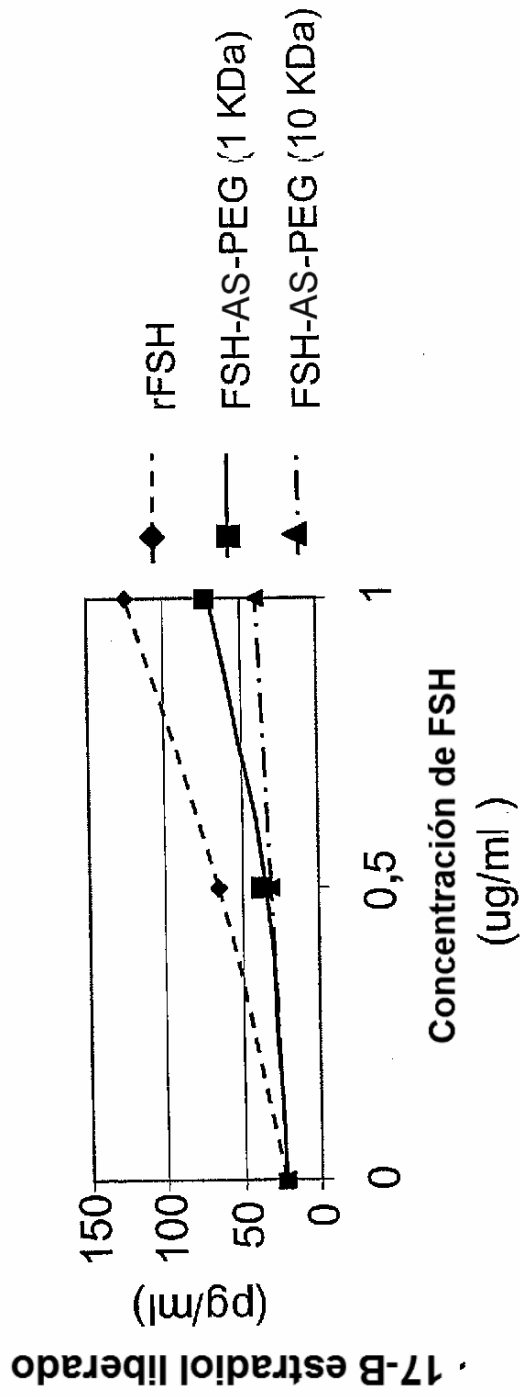


FIG. 54

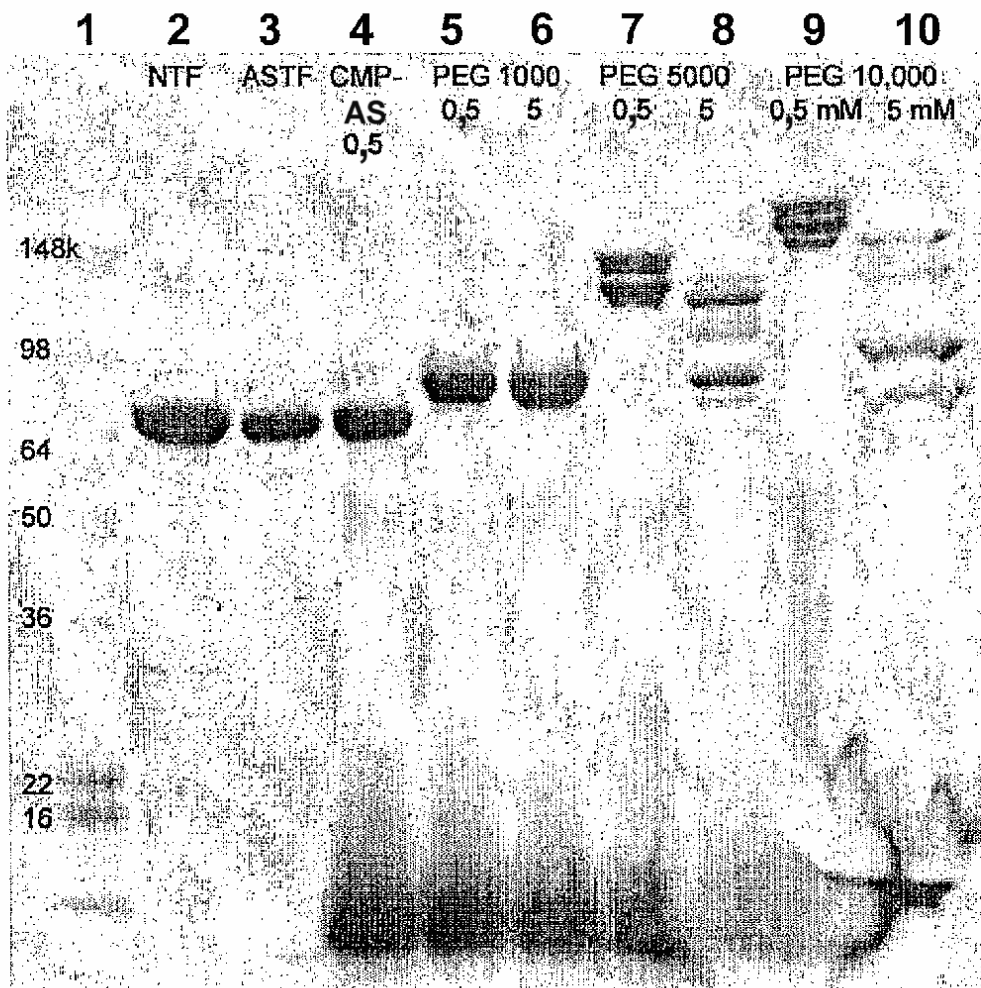


FIG. 55

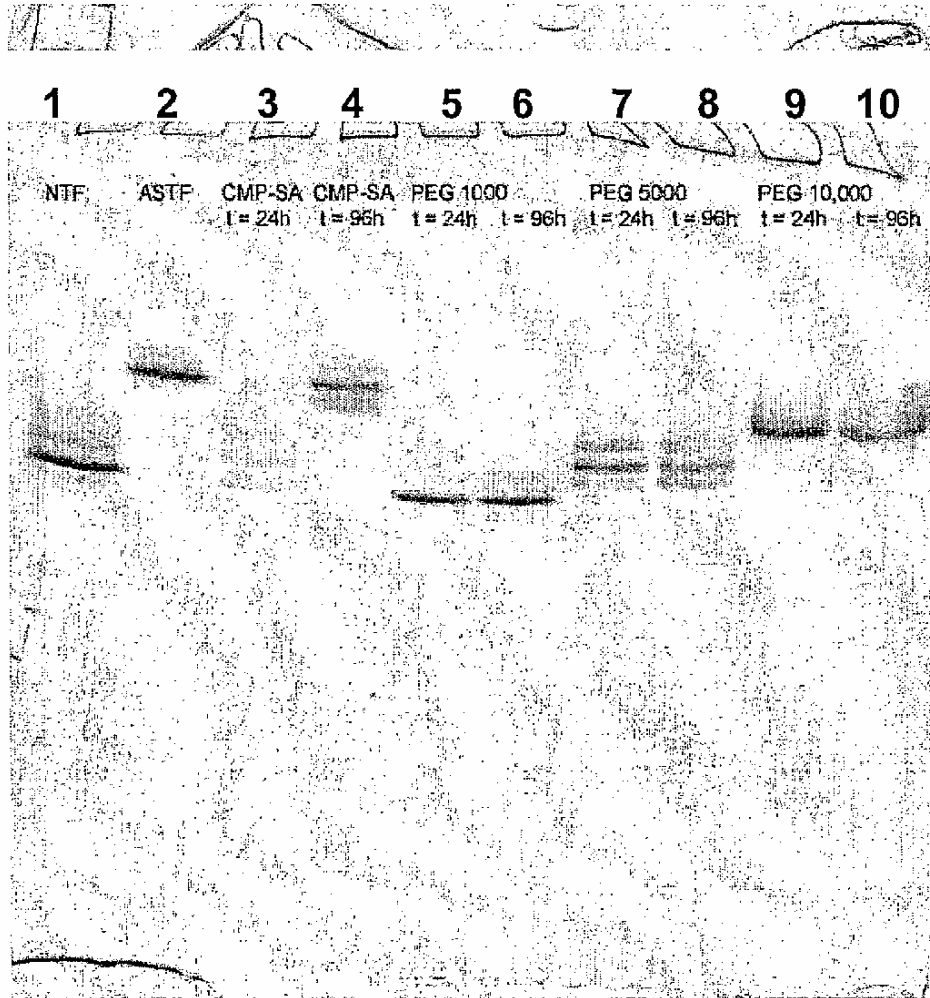


FIG. 56

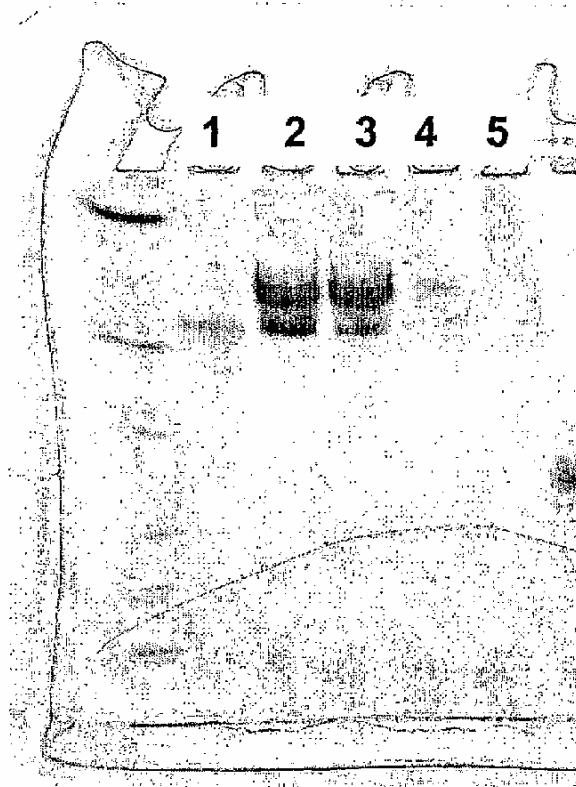
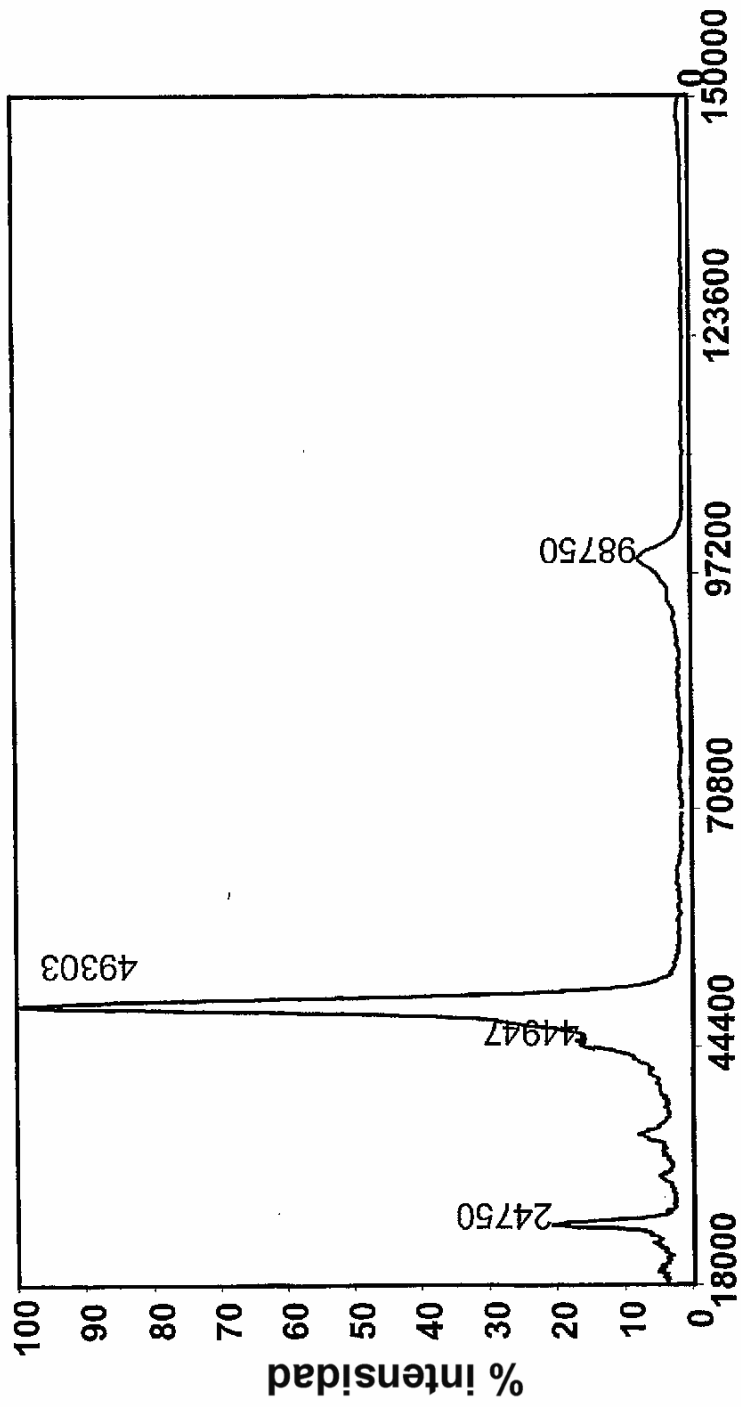


FIG. 57



Masa (m/z)
FIG. 58

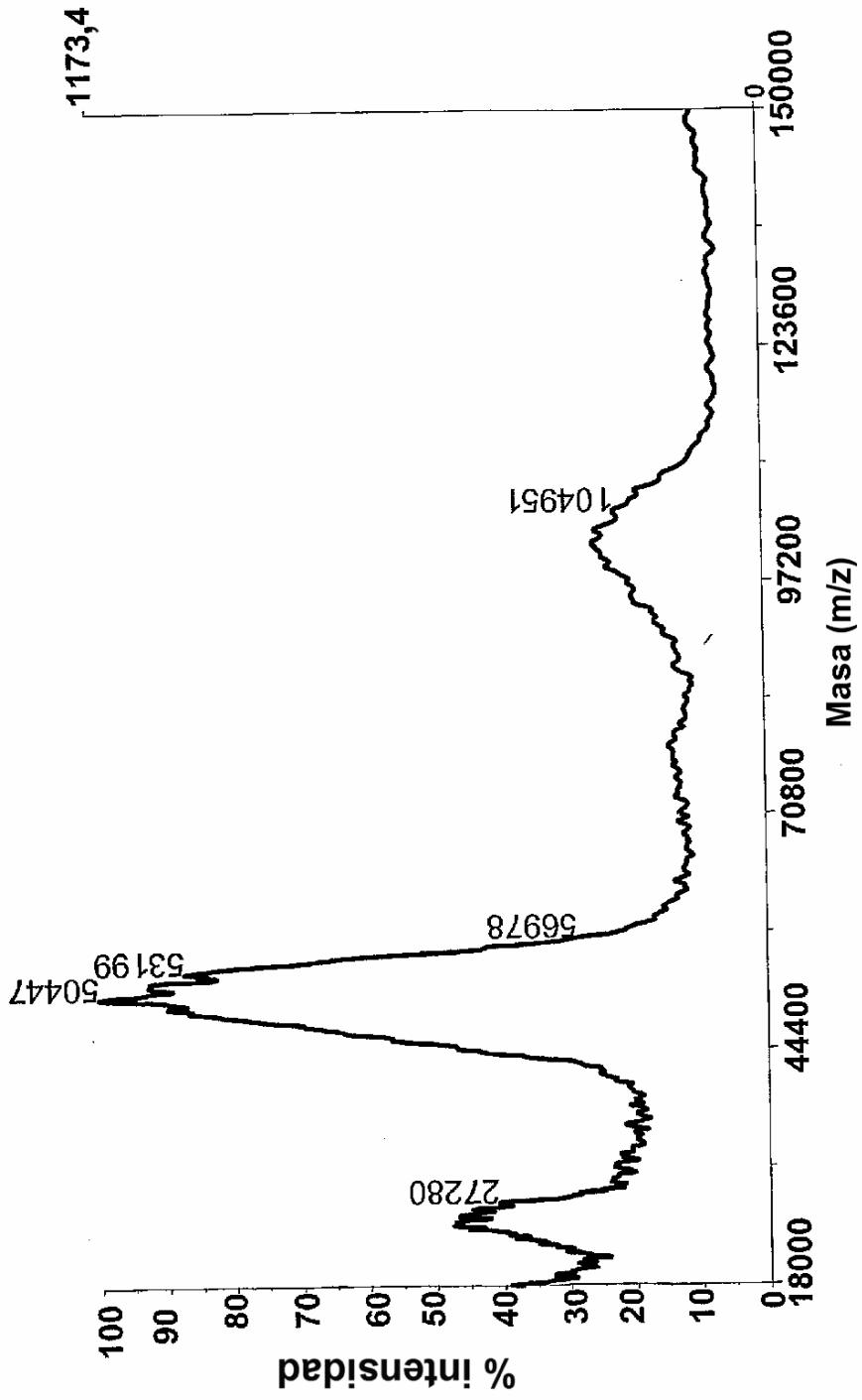


FIG. 59

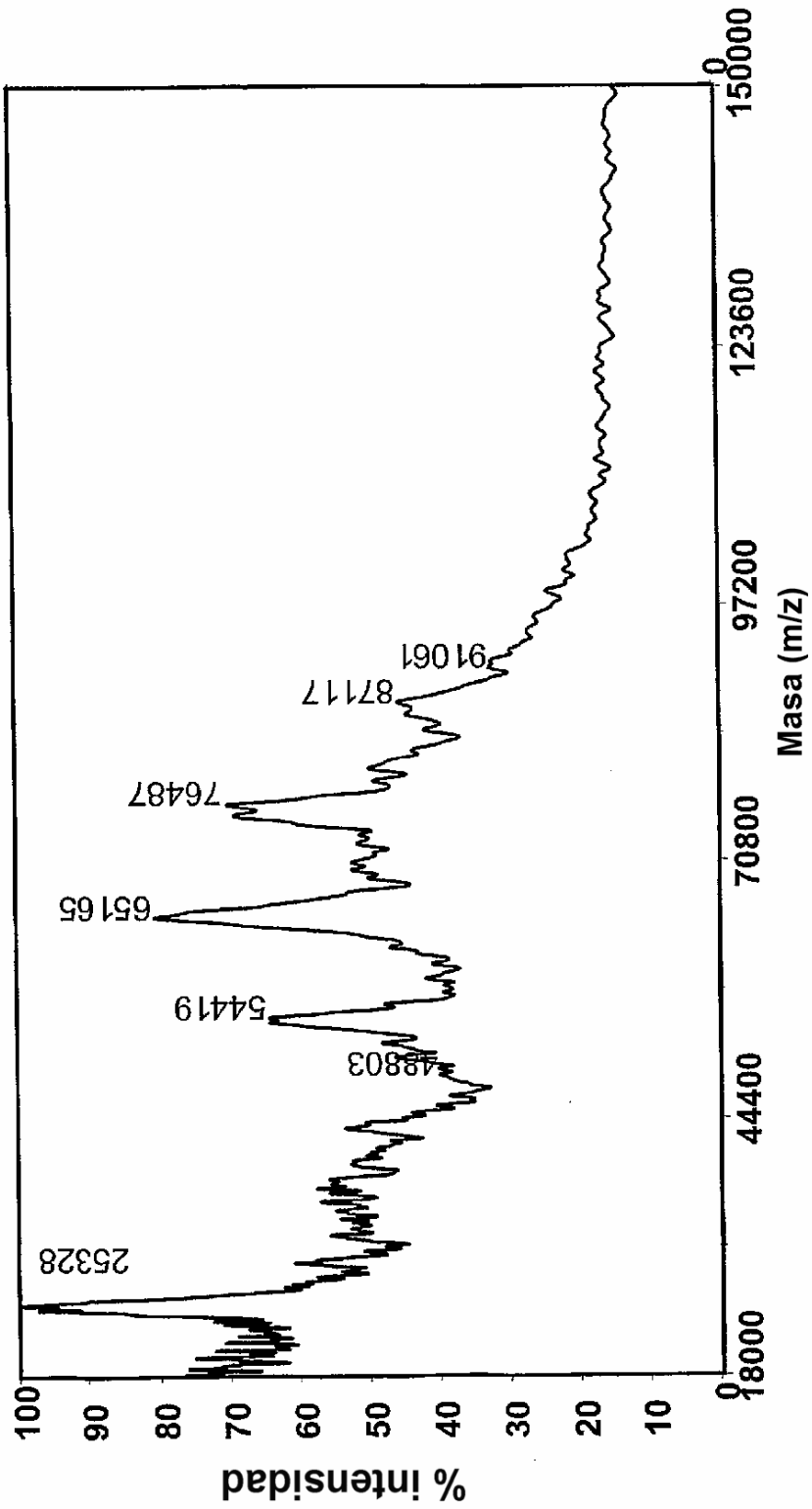


FIG. 60

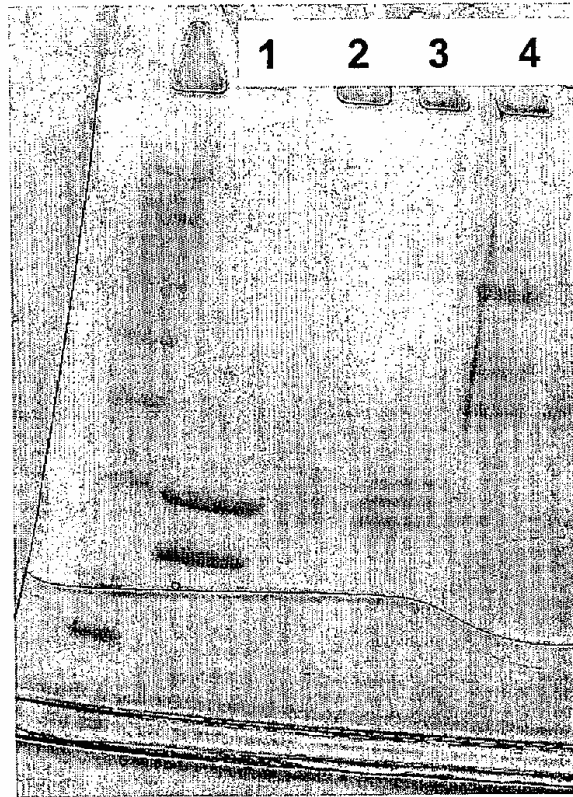


FIG. 61



FIG. 62



FIG. 63

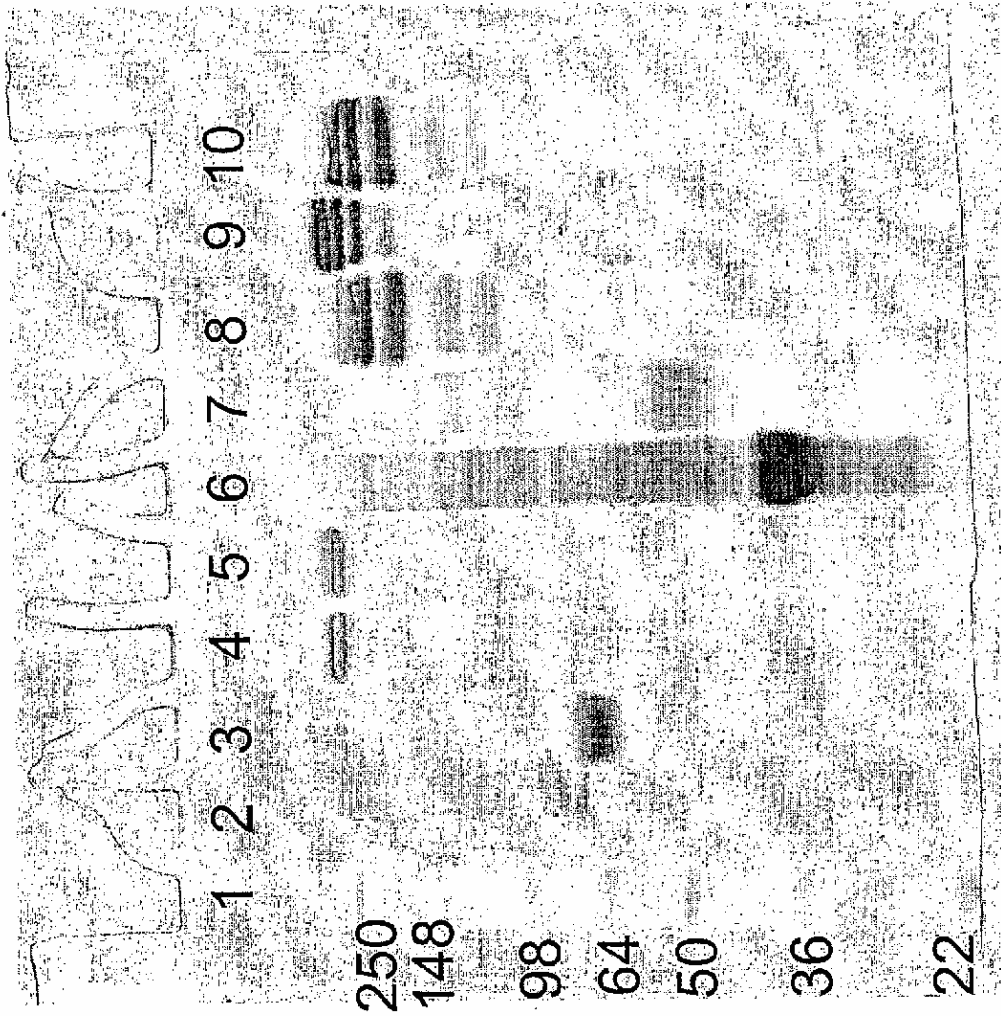


FIG. 64

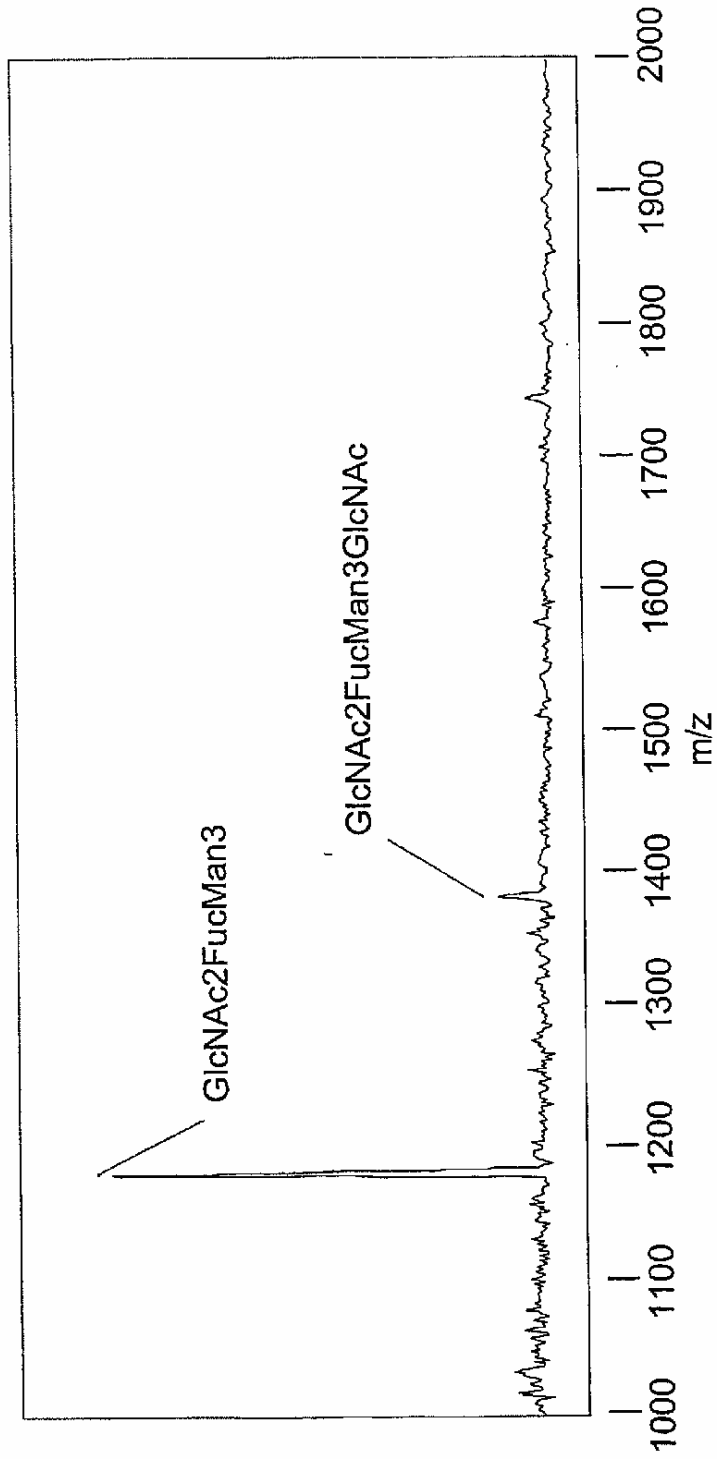


FIG. 65

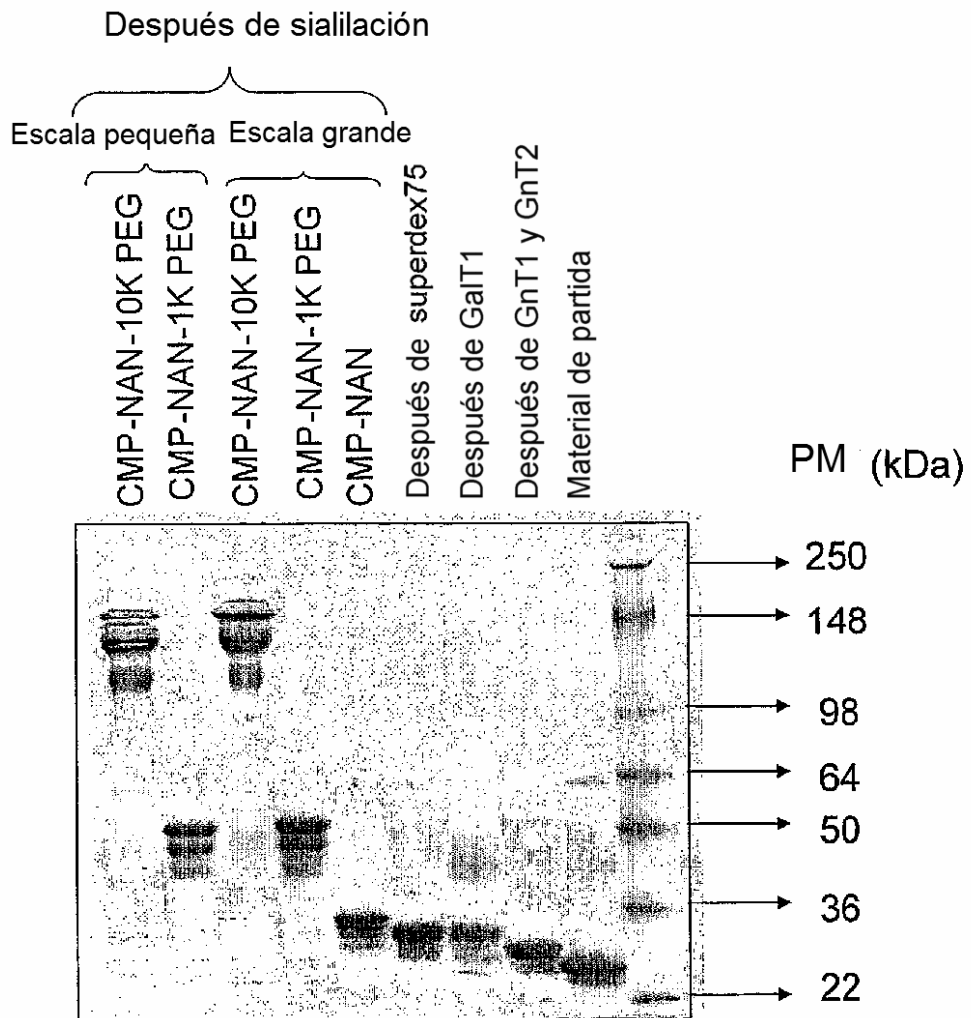


FIG. 66

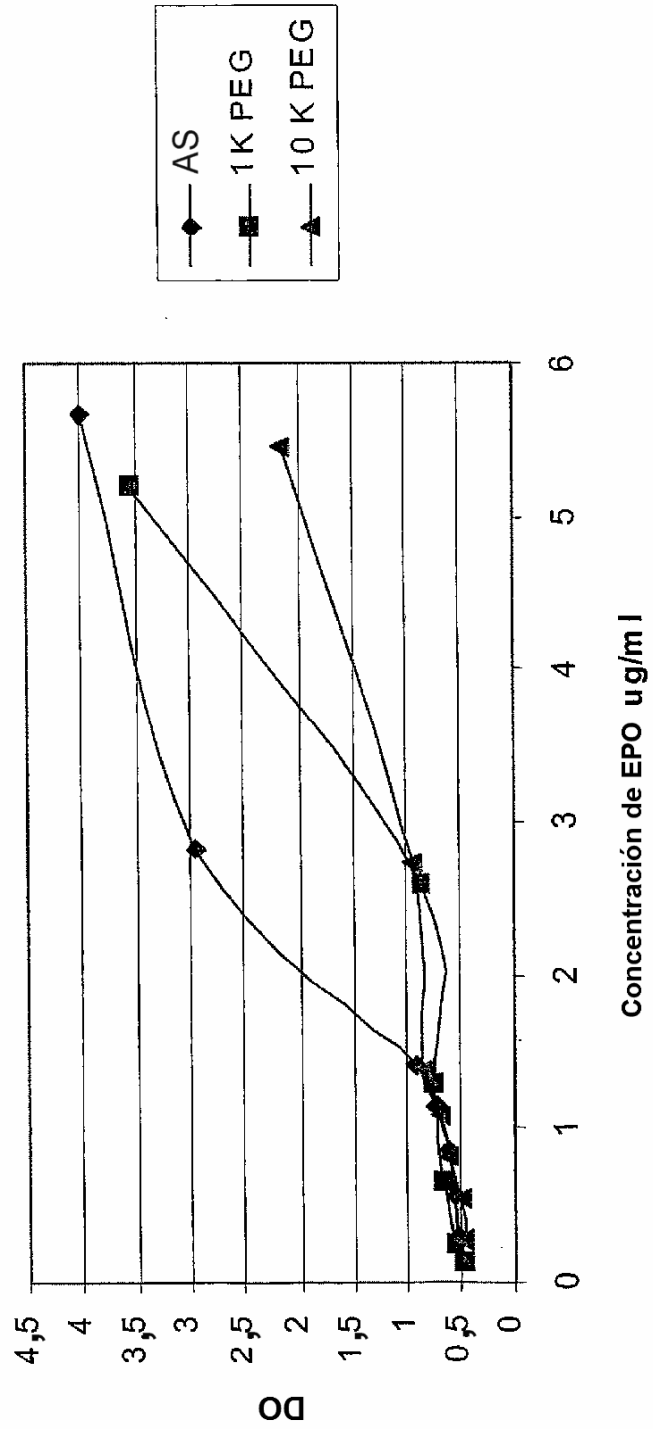


FIG. 67