

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.04.09	(73) Titular(es): BIOGENERIX AG	
(30) Prioridade(s): 2003.04.09 US 410897	JANDERSTRASSE 3 68199 MANNHEIM	DE
2003.04.09 US 410913		
2003.04.09 US 410930	(72) Inventor(es):	
2003.04.09 US 410945	SHAWN DE FREES	US
2003.04.09 US 410962	DAVID ZOPF	US
	ROBERT BAYER	US
(43) Data de publicação do pedido: 2006.01.18	CARYN BOWE	US
	DAVID HAKES	US
(45) Data e BPI da concessão: 2011.09.28	(74) Mandatário:	
242/2011	ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS	
	RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

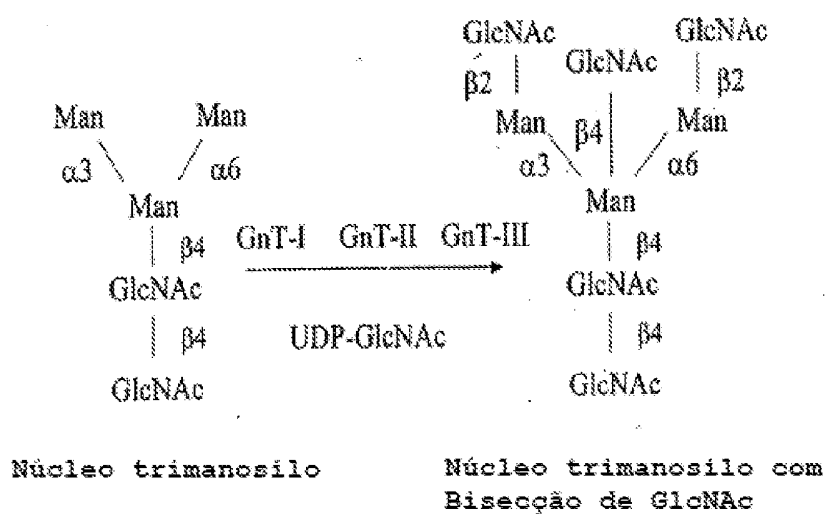
(54) Epígrafe: **MÉTODOS DE GLICOPEGUILAÇÃO E PROTEÍNAS/PÉPTIDOS PRODUZIDOS POR ESSES MÉTODOS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO INCLUI MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA REMODELAR UMA MOLÉCULA DE PÉPTIDO, INCLUINDO A ADIÇÃO OU DELEÇÃO DE UM OU MAIS GRUPOS GLICOSILO A UM PÉPTIDO E/OU A ADIÇÃO DE UM GRUPO A UM PÉPTIDO.

RESUMO

"MÉTODOS DE GLICOPEGUILAÇÃO E PROTEÍNAS/PÉPTIDOS PRODUZIDOS
POR ESSES MÉTODOS"



A invenção inclui métodos e composições para remodelar uma molécula de péptido, incluindo a adição ou deleção de um ou mais grupos glicosilo a um péptido e/ou a adição de um grupo a um péptido.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS DE GLICOPEGUILAÇÃO E PROTEÍNAS/PÉPTIDOS PRODUZIDOS POR ESSES MÉTODOS"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A maioria dos péptidos que ocorrem naturalmente contêm unidades de hidratos de carbono ligados ao péptido através de ligações específicas a um número seleccionado de aminoácidos ao longo do comprimento da cadeia do péptido primário. Assim, muitos péptidos que ocorrem naturalmente são denominados "glicopéptidos." A variabilidade do padrão de glicosilação de qualquer péptido dado possui enormes implicações para a função desse péptido. Por exemplo, a estrutura dos glicanos ligados a N num péptido pode ter impacto em várias características do péptido, incluindo a susceptibilidade à protease, o tráfego intracelular, secreção, direccionamento para o tecido, semi-vida biológica e antigenicidade do péptido numa célula ou organismo. A alteração de uma ou mais destas características afecta fortemente a eficácia de um péptido no seu estabelecimento natural, e também afecta a eficácia do péptido como um agente terapêutico em situações nas quais o péptido foi criado para este objectivo.

A estrutura de hidrato de carbono ligada à cadeia

de péptido é conhecida com uma molécula de "glicano". A estrutura de glicano específica presente num péptido afecta as características de solubilidade e de agregação do péptido, a dobragem da cadeia de péptido primário e por isso a sua actividade funcional ou enzimática, a resistência do péptido ao ataque proteolítico e o controlo da proteólise que conduz à conversão das formas inactivas do péptido para formas activas. Facto importante, os resíduos de ácido siálico terminal presentes na molécula de glicano afectam a duração da semi-vida do péptido no sistema circulatório de mamíferos. Os péptidos cujos glicanos não contêm resíduos terminais de ácido siálico são rapidamente removidos da circulação pelo fígado, um evento que nega qualquer benefício terapêutico potencial do péptido.

As estruturas de glicano que se encontram em glicopéptidos que ocorrem naturalmente são tipicamente divididas em duas classes, glicanos ligado em N e glicanos ligados em O.

Os péptidos expressos em células eucarióticas são tipicamente N-glicosilados em resíduos de asparagina nos sítios na estrutura de péptido primário contendo a sequência asparagina-X-serina/treonina em que X pode ser qualquer aminoácido excepto prolina e ácido aspártico. A porção de hidratos de carbono desses péptidos é conhecida como um glicano ligado em N. Os eventos anteriores da N-glicosilação ocorre no retículo endoplásmico (ER) e são

idênticos em mamíferos, plantas, insectos e outros eucariotas superiores. Primeiro, uma cadeia de oligossacáridos compreendendo catorze resíduos de açúcar é construída numa molécula de veículo de lípido. Como o péptido nascente é traduzido e translocado no RE, a cadeia de oligossacáridos inteira é transferida para o grupo amida do resíduo de asparagina numa reacção catalisada por uma enzima de glicosiltransferase ligada à membrana. O glicano ligado em N é ainda processado no RE e no aparelho de Golgi. O processamento posterior engloba, de um modo geral a remoção de alguns dos resíduos de açúcar e a adição de outros resíduos de açúcar em reacções catalisadas pelas glicosidases e glicosiltransferases específicas para os resíduos de açúcar removidos e adicionado.

Tipicamente, as estruturas finais dos glicanos ligados a N são dependentes do organismo no qual o péptido é produzido. Por exemplo, em general, os péptidos produzidos nas bactérias são completamente não glicosilados. Os péptidos expressos em células de insectos contêm cadeias de oligossacáridos ligadas em N de manose elevada e de manose "paunci", entre outras. Os péptidos produzidos na cultura de células de mamíferos são normalmente glicosilados diferentemente dependendo, *e.g.*, da espécie e das condições das culturas de células. Mesmo na mesma espécie e nas mesmas condições, é por vezes encontrada uma certa quantidade de heterogeneidade nas mesmas cadeias de glicosilo. Além disso, os péptidos produzidos em células vegetais que compreendem estruturas de glicano que diferem

significativamente daquelas produzidas em células animais. O dilema na técnica da produção de péptidos recombinantes, particularmente quando os péptidos se destinam a utilização como agentes terapêuticos, é ser capaz de criar péptidos que são glicosilados correctamente, *i.e.*, ser capaz de criar um péptido possuindo uma estrutura de glicano que se assemelha a, ou é idêntica à que está presente na forma do péptido que ocorre naturalmente. A maioria dos péptidos produzidos por meios recombinantes significa compreender estruturas de glicano que são diferentes dos glicanos que ocorrem naturalmente.

Foi proposta uma variedade de métodos na técnica para personalizar o padrão de glicosilação de um péptido incluindo aqueles descritos em in WO 99/22764, WO 98/58964, WO 99/54342 e Patente U.S. Nº 5 047 335, entre outros. Essencialmente, muitas das enzimas necessárias para a glicosilação *in vitro* dos péptidos foram clonadas e sequenciadas. Em alguns casos, estas enzimas foram utilizadas *in vitro* para adicionar açúcares específicos a uma molécula incompleta de glicano num péptido. Noutros casos, foram modificadas geneticamente células para expressar uma combinação de enzimas e péptidos desejados, de modo a que essa adição de uma unidade de açúcar desejada para um péptido exposto ocorra na célula.

Os péptidos também podem ser modificados através da adição de glicanos ligados em O, também denominados glicanos do tipo mucina devido à sua prevalência no

glicopéptido mucinoso. Ao contrário dos N-glicanos que são ligados aos resíduos de asparagina e são formados por uma transferência em bloco dos oligossacáridos de intermediários ligados a lípidos, Os O-glicanos são ligados primariamente aos resíduos de serina e de treonina e são formados pela adição passo-a-passo de açúcares aos açúcares dos nucleótidos (Tanner *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 906:81-91 (1987); e Hounsell *et al.*, *Glycoconj. J.* 13:19-26 (1996)). A função do péptido pode ser afectada pela estrutura dos glicanos ligados a O aí presentes. Por exemplo, a actividade do ligando à P-selectina é afectada pela estrutura de glicano ligado em O aí presente. Para uma revisão de estruturas de glicano ligadas em O, ver Schachter e Brockhausen, *The Biosynthesis of Branched O-Linked Glycans*, 1989, Society for Experimental Biology, pp. 1-26 (Grã Bretanha). São formados outros padrões de glicosilação através da ligação de glicosilfosfatidilinositol ao grupo carboxilo do terminal carboxilo da proteína (Takeda *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* 20:367-371 (1995); e Udenfriend *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 64:593-591 (1995)).

Embora existam, presentemente, várias técnicas para modificar os glicanos ligados ao N dos péptidos, existe na técnica a necessidade de um método, de um modo geral aplicável, de produzir péptidos que possuem um padrão de glicosilação desejado, *i.e.*, personalizado. Existe uma necessidade particular na técnica para a glicosilação de péptidos personalizada *in vitro*, em que o péptido

resultante pode ser produzido à escala industrial. Esta e outras necessidades são alcançadas pela presente invenção.

A administração de péptidos glicosilados e não glicosilados para produzir uma resposta fisiológica particular é bem conhecida nas técnicas medicinais. Entre os péptidos mais bem conhecidos utilizados para este objectivo está a insulina, que é utilizada para tratar a diabetes. As enzimas também têm sido utilizadas em relação aos seus benefícios terapêuticos. Um factor principal, que tem limitado a utilização de péptidos terapêuticos é a natureza imunogénica da maioria dos péptidos. Num doente, uma resposta imunogénica a um péptido administrado pode neutralizar o péptido e/ou conduzir ao desenvolvimento de uma resposta alérgica no doente. Outras deficiências de péptidos terapêuticos incluem potência sub-ótima e taxas de eliminação rápidas. Os problemas inerentes às terapêuticas com péptidos são reconhecidos na técnica, e têm sido investigados vários métodos de eliminação destes problemas. Para proporcionar terapêuticas de péptidos solúveis, foram ligados à estrutura de péptidos polímeros sintéticos.

O Poli(etilenoglicol) ("PEG") é um polímero exemplar que tem sido conjugado com péptidos: A utilização de PEG a terapêuticas de derivados de péptidos em demonstrado reduzir a imunogenicidade dos péptidos e prolongar o tempo de eliminação da circulação. Por exemplo, a Pat U.S. N°. 4 179 337 (Davis et al.) refere-se a

péptidos não imunogénicos, tais como enzimas e hormonas peptídicas acopladas a polietilenoglicol (PEG) ou polipropilenoglicol. São utilizadas entre 10 e 100 moles de polímero por mole de péptido e pelo menos 15% da actividade fisiológica é mantida.

WO 93/15189 (Veronese *et al.*) refere-se a um método para manter a actividade de enzimas proteolíticas modificadas por polietilenoglicol através da ligação da enzima proteolítica a um inibidor macromolecularizado. Os conjugados destinam-se a aplicações médicas.

O principal modo de ligação de PEG, e seus derivados, a péptidos é uma ligação não específica através de um resíduo de aminoácidos peptídicos. Por exemplo, a Patente U.S. N°. 4 088 538 revela um conjugado polímero enzimaticamente activo-enzima de uma enzima ligada covalentemente a PEG. De um modo semelhante, a Patente U.S. N°. 4 496 689 revela um complexo ligado covalentemente do inibidor da protease α -1 com um polímero tal como PEG ou metoxipoli(etilenoglicol) ("mPEG"). Abuchowski *et al.* (*J. Biol. Chem.* 252: 3578 (1977) revela a ligação covalente de mPEG a um grupo amina da albumina do soro bovino. A Patente U.S. N°. 4 414 147 revela um método de tornar o interferão menos hidrofóbico através da sua conjugação a um anidrido de um ácido dicarboxílico, tal como poli(anidrido de etilenossuccínico). A PCT WO 87/00056 revela a conjugação de PEG e polióis poli(oxietilados) a essas proteínas como o interferão- β , interleuquina-2 e imunotoxinas. EP 154 316

revela e reivindica as linfoquinas modificadas quimicamente, tal como IL-2 contendo PEG ligado directamente a pelo menos um grupo amino primário da linfoquina. A Patente U.S. N°. 4 055 635 revela composições farmacêuticas de um complexo solúvel em água de uma enzima proteolítica ligada covalentemente a uma substância polimérica, tal como um polissacárido.

Outro modo de ligar PEG aos péptidos é através da oxidação não específica de resíduos de glicosilo num péptido. O açúcar oxidado é utilizado como um locus para atingir uma unidade de PEG ao péptido. Por exemplo, M'Timkulu (WO 94/05332) revela a utilização de uma hidrazina- ou amino-PEG para adicionar PEG a uma glicoproteína. As unidades de glicosilo são oxidadas de forma aleatória aos aldeídos correspondentes, que são subsequentemente acopladas ao amino-PEG. Ver também, Bona *et al.* (WO 96/40731), na qual o PEG é adicionado a uma molécula de imunoglobulina através da oxidação enzimática de um glicano na imunoglobulina e depois colocam em contacto o glicano com uma molécula de amino-PEG.

Em cada um dos métodos acima descritos, o poli(etilenoglicol) é adicionado de um modo aleatório, não específico aos resíduos reactivos numa estrutura peptídica. Para a produção de péptidos terapêuticos, é claramente desejável utilizar uma estratégia de derivatização que resulte na formação de um produto marcado especificamente, rapidamente caracterizável, essencialmente homogéneo.

São utilizadas duas classes principais de enzimas na síntese de hidratos de carbono, glicosiltransferases (e.g., sialiltransferases, oligosaccariltransferases, N-acetilglucosaminiltransferases), e glicosidases. As glicosidases são ainda classificadas como exoglicosidases (e.g., β -manosidase, β -glucosidase), e endoglicosidases (e.g., Endo-A, Endo-M). Cada uma destas classes de enzimas foi utilizada com sucesso sinteticamente para preparar hidratos de carbono. Para uma revisão geral, ver, Crout et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 98-111 (1998).

As glicosiltransferases modificam as estruturas de oligossacáridos em péptidos. As glicosiltransferases são eficazes para a produção de produtos específicos com bom controlo estereoquímico e regioquímico. As glicosiltransferases têm sido utilizadas para preparar oligossacáridos e para modificar a estrutura de hidrato de carbonos do terminal N- e ligados a O, particularmente em péptidos produzidos em células de mamíferos. Por exemplo, os oligossacáridos terminais de glicopéptidos foram completamente sialilados e/ou fucosilados para proporcionar estruturas de açúcar mais consistentes, que melhoram a farmacodinâmica do glicopéptido e uma variedade de outras propriedades biológicas. Por exemplo, a β -1,4-galactosiltransferase é utilizada para sintetizar lactosamina, uma ilustração da utilidade de glicosiltransferases na síntese de hidratos de carbono (ver, e.g., Wong et al., *J. Org. Chem.* 47: 5416-5418 (1982)). Para além disso, numerosos processos sinté-

ticos fizeram uso de β -sialiltransferases para transferir ácido siálico a partir de ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico para o 3-OH ou 6-OH da galactose (ver, e.g., Kevin et al., *Chem. Eur. J.* 2: 1359-1362 (1996)). As fucosiltransferases são utilizadas nas vias sintéticas para transferir uma unidade de fucose a partir de guanosina-5'-difosfofucose para um hidroxilo específico de um aceitador de sacarídeo. Por exemplo, Ichikawa preparou sialil Lewis-X por um método que envolve a fucosilação de lactosamina sialilada com uma fucosiltransferase clonada (Ichikawa et al., *J. Am. Chem. Soc.* 114: 9283-9298 (1992)). Para uma discussão sobre os avanços recentes na síntese de glico-conjugados para utilização terapêutica ver, Koeller et al., *Nature Biotechnology* 18: 835-841 (2000). Ver também, a Patente U.S. N°. 5 876 80; 6 030 815; 5 728 554; 5 922 577; e WO/9831826.

As glicosidases também podem ser utilizadas para preparar sacáridos. As glicosidases catalisam normalmente a hidrólise de uma ligação glicosídica. Contudo, em condições apropriadas, elas podem ser utilizadas para formar esta ligação. A maioria das glicosidases utilizadas para a síntese de hidratos de carbono são exoglicosidases; a transferência de glicosilo ocorre no terminal de não redução do substrato. A glicosidase liga-se a um dador de glicosilo num intermediário glicosil-enzima que é interceptado por água para produzir o produto de hidrólise, ou por um aceitador, para criar um novo glicósido ou oligossacárido. Uma via exemplar utilizando uma exoglicosidase é a síntese

do núcleo de trissacáridos de todos os glicopéptidos ligados a N, incluindo a ligação de β -manósido, que é formada pela acção da β -manosidase (Singh *et al.*, *Chem. Commun.* 993-994 (1996)).

Noutra aplicação exemplar da utilização de uma glicosidase para formar uma ligação glicosídica, foi preparada uma glicosidase mutante na qual o aminoácido nucleofílico normal no sítio activo é alterado para um aminoácido não nucleofílico. A enzima mutante não hidrolisa ligações glicosídicas, mas ainda as pode formar. Uma tal glicosidase mutante é utilizada para preparar oligossacáridos utilizando um dador de fluoreto de α -glicosilo e uma molécula aceitadora de glicósido (Withers *et al.*, Patente U.S. N°. 5 716 812).

Embora a sua utilização seja menos comum do que a das exoglicosidases, as endoglicosidases são também utilizadas para preparar hidratos de carbono. Os métodos baseados na utilização de endoglicosidases têm a vantagem de ser transferido um oligossacárido, em vez de um monossacárido. Foram adicionados fragmentos de oligossacáridos aos substratos utilizando endo- β -N-acetilglucosaminas tais como endo-F, endo-M (Wang *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 37: 1975-1978); e Haneda *et al.*, *Carbohydr. Res.* 292: 61-70 (1996)).

Adicionalmente à sua utilização na preparação de hidratos de carbono, as enzimas discutidas acima são também

aplicadas à síntese de glicopéptidos. A síntese de uma glicoforma homogênea da ribonuclease B foi publicada (Witte K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 119: 2114-2118 (1997)). O núcleo de manose elevada da ribonuclease B foi clivada pelo tratamento do glicopéptido com endoglicosidase H. A clivagem ocorreu especificamente entre os dois núcleos dos resíduos GlcNAc. Um tetrassacárido de sialil Lewis X foi então enzimaticamente reconstruído no sítio âncora GlcNAc restante na proteína agora homogênea pela utilização sequencial de β -1,4-galactosiltransferase, α -2,3-sialiltransferase e β -1,3-fucosiltransferase V. Contudo, embora cada passo catalisado enzimaticamente prosseguiu num rendimento excelente, esses processos não foram adaptados para a criação de glicopéptidos a uma escala industrial.

Os métodos que combinam elementos químicos e enzimáticos sintéticos são também conhecidos na técnica. Por exemplo, Yamamoto e colaboradores (*Carbohydr. Res.* 305: 415-422 (1998)) relataram a síntese quimioenzimática do glicopéptido, péptido T glicosilado, utilizando uma endoglicosidase. O péptido N-acetilglucosaminilo foi sintetizado através de meios puramente químicos. O péptido foi subsequentemente elaborado enzimaticamente com o oligossacárido do péptido da transferrina humano. A porção de sacárido foi adicionada ao péptido tratando-o com uma endo- β -N-acetilglucosaminidase. O péptido glicosilado resultante era altamente estável e era resistente à proteólise quando comparado com o péptido T e o péptido T N-acetilglucosaminilo.

A utilização das glicosiltransferases para modificar a estrutura do péptido com grupos repórter foi explorada. Por exemplo, Brossmer *et al.* (Patente U.S. N°. 5 405 753) revela a formação de um monofosfato de citidina ("CMP") marcado com fluorescência derivado de ácido siálico e a utilização do glicósido fluorescente num ensaio para a actividade de sialil transferase e para a marcação com fluorescência de superfícies celulares, glicoproteínas e péptidos. Gross *et al.* (*Analyt. Biochem.* 186: 127 (1990)) descreve um ensaio semelhante. Bean *et al.* (Patente U.S. N°. 5 432 059) revela um ensaio para a glicosilação de distúrbio deficientes utilizando reglicosilação de uma proteína deficientemente glicosilada. A proteína deficiente é reglicosilada com um glicósido CMP marcado com fluorescência. Cada um dos derivados de ácido siálico fluorescente é substituído por uma unidade fluorescente na 9-posição ou na amina que é normalmente acetilada em ácido siálico. Os métodos que utilizam os derivados de ácido siálico fluorescente são ensaiados quanto à presença de glicosiltransferases ou para glicoproteínas não glicosiladas ou indevidamente glicosiladas. Os ensaios são realizados em pequenas quantidades de enzima ou glicoproteína numa amostra de origem biológica. A derivatização enzimática de um péptido glicosilado ou não glicosilado a uma escala preparativa ou industrial utilizando um ácido siálico modificado não foi revelado ou sugerido na técnica anterior.

Também tem sido dirigido esforço considerável em direcção à modificação de superfícies celulares através da alteração de resíduos de glicosilo apresentados por estas superfícies. Por exemplo, Fukuda e colaboradores desenvolveram um método para ligar glicósidos de estrutura definida nas superfícies celulares. O método explora a especificidade do substrato relaxada de uma fucosiltransferase que pode transferir fucose e análogos da fucose que contêm diversos substratos de glicosilo (Tsuboi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 27213 (1996)).

Também foram utilizados métodos enzimáticos para activar resíduos glicosilo num glicopéptido em direcção à subsequente elaboração química. Os resíduos de glicosilo são tipicamente activados utilizando oxidase de galactose, que converte um resíduo de galactose terminal no aldeído correspondente. O aldeído é subsequentemente acoplado a um grupo de modificação contendo amina. Por exemplo, Casares *et al.* (*Nature Biotech.* 19: 142 (2001)) ligaram doxorubicina aos resíduos de galactose oxidada de uma quimera MHCII recombinante-péptido.

Foram também modificados resíduos de glicosilo de modo a conterem os grupos cetona. Por exemplo, Mahal e colaboradores (*Science* 276: 1125 (1997)) prepararam N-levulinilmanosamina ("ManLev"), que possui uma funcionalidade de cetona na posição normalmente ocupada pelo grupo acetil no substrato natural. As células foram tratadas com o ManLev, incorporando desse modo um grupo cetona na

superfície celular. Ver, também Saxon *et al.*, *Science* 287: 2007 (2000); Hang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 123: 1242 (2001); Yarema *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 31168 (1998); e Charter *et al.*, *Glycobiology* 10: 1049 (2000).

Os métodos de modificação de superfícies celulares não foram aplicados na ausência de uma célula para modificar um péptido glicosilado ou não glicosilado. Para além disso, os métodos de modificação da superfície celular não são utilizados para a incorporação enzimática pré-formada modificaram a unidade dadora de glicosilo num péptido. Para além disso, nenhum dos métodos de modificação da superfície celular são práticos para a produção de péptidos modificados com glicosilo numa escala industrial.

Apesar dos esforços dirigidos para a elaboração enzimática de estruturas de sacárido, permanece ainda uma necessidade para um método industrialmente prático para a modificação de péptidos glicosilados e não glicosilados com grupos modificados tal como polímeros solúveis em água, unidades terapêuticas, biomoléculas e semelhantes. De particular interesse são métodos nos quais o péptido modificado possui propriedades melhoradas, que aumentam a sua utilização como um agente terapêutico ou de diagnóstico. A presente invenção preenche estas e outras necessidades.

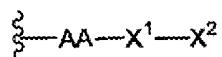
SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção inclui uma multitude de métodos de

remodelação de um péptido para possuir uma estrutura de glicano específica ligada a este. Embora sejam aqui descritas estruturas de glicano específicas, a invenção não deve ser encarada como estando limitada por qualquer estrutura particular. Adicionalmente, embora sejam aqui descritos péptidos específicos, a invenção não deve ser limitada pela natureza do péptido descrito, mas deve em vez disso compreender qualquer um e todos os péptidos adequados e suas variações.

A descrição que se segue revela as formas de realização preferidas da invenção e proporciona uma descrição escrita das reivindicações aqui anexas. A invenção compreende qualquer uma e todas as variações destas formas de realização que são, ou se tornam, óbvias após uma leitura da present especificação.

A invenção inclui a um método sem células, *in vitro*, de remodelação de um péptido compreendendo poli(etilenoglicol), possuindo o péptido a fórmula:



em que

AA é um resíduo de aminoácido terminal ou interno do péptido;

X¹-X² é um sacárido ligado covalentemente a AA, em que

X¹ é um primeiro resíduo glicosilo; e

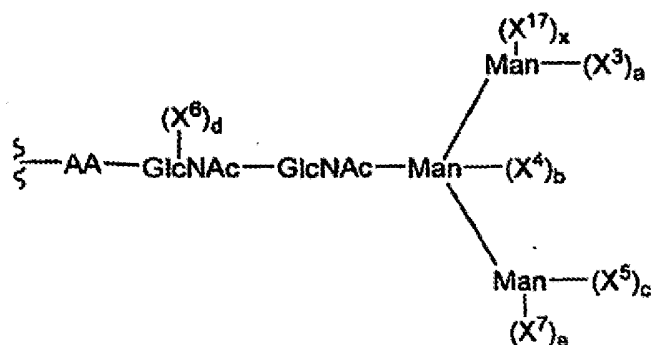
X² é um segundo resíduo glicosilo ligado covalente-

mente a X^1 , em que X^1 e X^2 são seleccionados a partir de resíduos de monossacarilo e oligossacarilo; compreendendo o método:

(a) remover X^2 ou uma sua subunidade sacarilo a partir do péptido, formando desse modo um glicano truncado.

É também revelada a formação de um glicano truncado através da remoção de um resíduo Sia.

Numa forma de realização da invenção, um péptido possui a fórmula:



em que

X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 , e X^{17} , são independentemente resíduos monossacarilo ou oligossacarilo seleccionados; e

a, b, c, d, e, e x são independentemente seleccionados dos inteiros 0, 1 e 2.

Num aspecto da invenção, um resíduo de oligossacarilo é um membro seleccionado a partir de GlcNAc-Gal-Sia e GlcNAc-Gal. Noutro aspecto, pelo menos um membro oligossacárido é seleccionado a partir de a, b, c, d, e e x

A invenção inclui um método de remodelação de um péptido em que X^3 , X^5 e X^7 são membros independentemente seleccionados a partir de (manose)^z e (manose)^z-(X⁸) em que

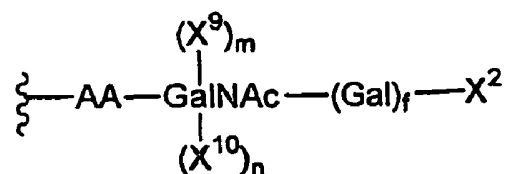
Num aspecto, X^4 é seleccionado a partir do grupo consistindo em GlcNAc e xilose. Noutro aspecto, X^3 , X^5 e X^7 são $(\text{manose})_u$, em que u é seleccionado a partir dos inteiros entre 1 e 20, e quando u é 3 ou superior, cada $(\text{manose})_u$ é seleccionada independentemente a partir das estruturas lineares e ramificadas.

$$\begin{array}{c} \text{Man}-(\text{GlcNAc})_6 \\ \diagup \\ \text{AA}-(\text{Fuc})_r-\text{GlcNAc}-\text{GlcNAc}-\text{Man} \\ \diagdown \\ \text{Man}-(\text{GlcNAc})_6 \end{array}$$

em que

r, s, e t são inteiros seleccionados independentemente a partir de 0 e 1.

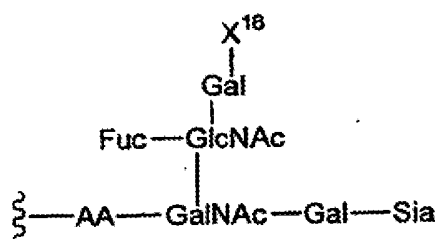
Numa forma de realização da revelação, um péptido possui a fórmula:



em que

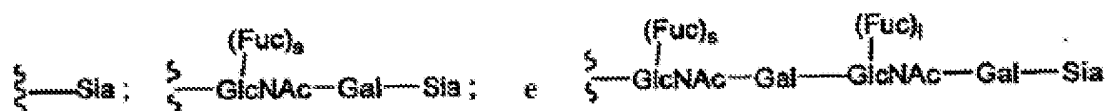
X^9 e X^{10} são resíduos de monossacarilo ou oligossacarilo seleccionados independentemente e m, n e f são inteiros seleccionados independentemente a partir de 0 e 1.

É também revelado um péptido possuindo a fórmula:



em que

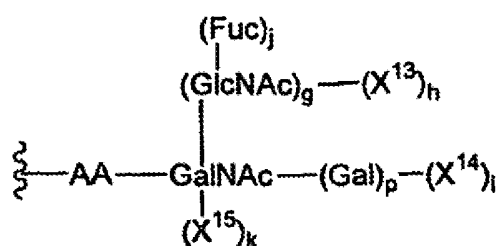
X^{16} é um membro seleccionado a partir de:



em que

s e i são inteiros seleccionados independentemente a partir de 0 e 1.

Noutro aspecto, um péptido possui a fórmula:



em que

X^{13} , X^{14} , e X^{15} são resíduos glicosil seleccionados independentemente; e

g, h, i, j, k, e p são seleccionados independentemente a partir dos inteiros 0 e 1.

Ainda noutro aspecto, pelo menos um de g, h, i, j, k e p é 1. Noutro aspecto, X^{14} e X^{15} são membros independentemente seleccionados a partir de GlcNAc e Sia e i e k são seleccionados independentemente a partir dos inteiros 0 e 1. Ainda noutro aspecto, pelo menos um de i e k é 1, e se k é 1, g, h, e j são 0.

A invenção também inclui um método de remodelação de um péptido, em que o método compreende contactar o glicano truncado com pelo menos uma glicosiltransferase e pelo menos um dador glicosil em condições adequadas para

transferir pelo menos um dador glicosilo ao glicano truncado, remodelando desse modo o péptido que compreende poli(etilenoglicol).

Num aspecto, um dador glicosilo compreende um grupo de modificação ligado covalentemente a este.

A invenção também inclui um método de remodelação de um péptido, compreendendo o método remover X^1 , expondo desse modo AA. Num aspecto, um método inclui colocar em contacto AA com pelo menos uma glicosiltransferase e pelo menos um dador de glicosilo em condições adequadas para transferir o referido pelo menos um dador de glicosilo a AA, remodelando desse modo o referido péptido compreendendo poli(etilenoglicol).

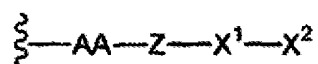
Num aspecto, pelo menos um dador de glicosilo compreende um grupo de modificação ligado covalentemente a este. Noutro aspecto, um grupo de modificação é o poli(etilenoglicol). Numa forma de realização, um poli(etilenoglicol) possui uma distribuição de peso molecular que é essencialmente homodispersa.

A invenção inclui um método de remodelação de um péptido, em que, antes e colocar em contacto o glicano truncado com pelo menos uma glicosiltransferase e pelo menos um dador de glicosilo em condições adequadas para transferir pelo menos um dador de glicosilo ao glicano truncado, remodelando desse modo o péptido, que compreende

poli(etilenoglicol), um grupo adicionado ao sacárido durante a modificação pós-tradução, é removido.

Num aspecto, um grupo removido é um membro seleccionado a partir de fosfato, sulfato, carboxilato e seus ésteres.

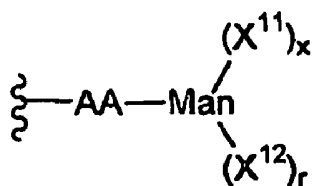
A invenção inclui um método de remodelação de um péptido em que um péptido possui a fórmula:



em que

Z é um membro seleccionado a partir de O S, NH e um agente de ligação reticulada.

É também revelado um método de remodelação de um péptido, em que o péptido possui a fórmula:



em que

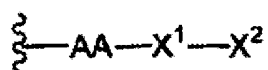
X^{11} e X^{12} são independentemente seleccionados a partir de unidades glicosilo; e

r e x são inteiros independentemente seleccio-

nados a partir de 0 e 1.

Num aspecto da revelação X^{11} e X^{12} são $(\text{manose})_q$, em que q é seleccionado a partir dos inteiros entre 1 e 20, e em que q é três ou superior, $(\text{manose})_q$ é seleccionado a partir de estruturas lineares e ramificadas.

A invenção inclui uma composição farmacêutica compreendendo um diluente farmacêuticamente aceitável e um péptido remodelado de acordo com um método sem células, *in vitro* de remodelação de um péptido compreendendo poli(etilenoglicol), possuindo o péptido a fórmula:



em que

AA é um resíduo de aminoácidos terminal ou interno do péptido;

$\text{X}^1\text{---}\text{X}^2$ é um sacárido ligado covalentemente ao AA, em que

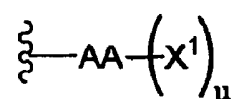
X^1 é um primeiro resíduo de glicosilo; e

X^2 é um segundo resíduo de glicosilo ligado covalentemente a X^1 , em que X^1 e X^2 são seleccionados a partir dos resíduos de monossacarilo e oligossacarilo;

compreendendo o método:

(a) remover X^2 ou uma sua subunidade sacarilo do péptido, formando desse modo um glicano truncado.

A invenção também inclui um método isento de células, *in vitro* de remodelar um péptido G-CSF compreendendo poli(etilenoglicol), possuindo o péptido a fórmula:



em que

AA é um resíduo terminal ou interno de aminoácido do péptido;

X^1 é um resíduo de monossacarilo ligado covalentemente a AA; e

u é um inteiro seleccionado a partir de 0 e 1,

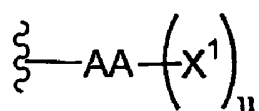
compreendendo o método:

colocar em contacto o péptido com pelo menos uma glicosiltransferase e pelo menos um dador de glicosilo compreendendo poli(etileno)glicol possuindo um peso molecular de 20 kDa ligado covalentemente a este em condições adequadas para transferir pelo menos um dador de glicosilo ao péptido.

Num aspecto, pelo menos um dador de glicosilo compreende um grupo de modificação ligado covalentemente a este. Noutro aspecto, o grupo de modificação é poli-

(etilenoglicol). Ainda noutro aspecto, o poli(etilenoglicol) possui uma distribuição de peso molecular que é essencialmente homodispersa.

A invenção também inclui uma composição farmacêutica compreendendo um diluente farmacêuticamente aceitável e um péptido remodelado de acordo com um método sem células, *in vitro* de remodelação de um péptido compreendendo poli(etilenoglicol), possuindo o péptido a fórmula:



em que

AA é um resíduo terminal ou interno de aminoácido do péptido;

X¹ é um resíduo de glicosilo ligado covalentemente ao AA, seleccionado a partir dos resíduos de monossacarilo e oligossacarilo; e

u é um inteiro seleccionado a partir de 0 e 1,

compreendendo o método:

colocar em contacto o péptido com pelo menos uma glicosiltransferase e pelo menos um dador de glicosilo em condições adequadas para transferir pelo menos um dador de glicosilo ao glicano truncado, remodelando desse modo o péptido.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Com o objectivo de ilustrar a invenção, são apresentadas nos desenhos certas formas de realização da invenção. Contudo, a invenção não está limitada aos arranjos precisos e aos instrumentos das formas de realização apresentadas nos desenhos.

A Figura 1 é um esquema apresentando um núcleo trimanosilo de glicano (lado esquerdo) e o processo enzimático para a criação de um glicano possuindo uma bifurcação GlcNAc (lado direito).

A Figura 2 é um esquema apresentado uma estrutura nuclear trimanosilo elementar e cadeias complexas em vários graus de realização. É apresentada a criação enzimática *in vitro* de uma estrutura nuclear elementar de trimanosilo a partir de uma estrutura complexa de glicano de hidratos de carbono que não contém um resíduo em bifurcação GlcNAc, como é a criação de uma estrutura de glicano a partir desta que contém um GlcNAc em bifurcação. Símbolos: quadrados: GlcNAc; círculos claros: Man; círculos escuros: Gal; triângulos: NeuAc.

A Figura 3 é um esquema para a criação enzimática de uma estrutura de glicano sialilada (lado direito) começando com um glicano possuindo um núcleo trimanosilo e um GlcNAc bifurcado (lado esquerdo).

A Figura 4 é um esquema de uma manose elevada típica contendo estrutura de glicano (lado esquerdo) e o processo enzimático para a redução desta estrutura para uma estrutura de núcleo trimanosilo elementar. Neste esquema, X é manose como um monossacárido, um oligossacárido ou a polissacárido.

A Figura 5 é um diagrama de uma estrutura de glicano ligado em N contendo fucose e xilose tipicamente produzida em células vegetais.

A Figura 6 é um diagrama de uma estrutura de glicano ligado em N contendo fucose tipicamente produzida em células de insecto. Note-se que o glicano pode não ter núcleo de fucose, pode possuir um núcleo único de fucose com uma ligação, ou pode possuir um núcleo único de fucose possuindo uma preponderância de uma ligação.

A Figura 7 é um esquema apresentando uma variedade de vias para o aparamento de uma estrutura de manose elevada e a síntese de cadeias de açúcar complexas daí. Símbolos: quadrados: GlcNAc; círculos: Man; losangos: fucose; pentágono: xilose.

A Figura 8 é um esquema apresentando estratégias *in vitro* para a síntese de estruturas complexas de uma estrutura nuclear de trimanosilo elementar. Símbolos: Quadrados: GlcNAc; círculos claros: Man; círculos escuros: Gal; triângulos escuros: NeuAc; GnT: N-acetil glucosaminiltransfera-

se; GalT: galactosiltransferase; ST: sialiltransferase.

A Figura 9 é um esquema apresentando duas estratégias *in vitro* para a síntese de glicanos monoantenários, e a glicoPEGuilação opcional dos mesmos. Quadrados escuros: GlcNAc; círculos escuros: Man; círculos claros: Gal; triângulos escuros: ácido siálico.

A Figura 10 é um esquema apresentando duas estratégias *in vitro* para a síntese de glicanos monoantenários, e a glicoPEGuilação opcional do mesmo. Quadrados escuros: GlcNAc; círculos escuros: Man; círculos claros: Gal; triângulos claros: ácido siálico.

A Figura 11 é um esquema apresentando várias estruturas complexas, que podem ser sintetizadas a partir de um estrutura nuclear trimanosilo elementar. Símbolos: Quadrados: GlcNAc; círculos claros: Man; círculos escuros: Gal; triângulos: NeuAc; losangos: fucose; FT e FucT: fucosiltransferase; GalT: galactosiltransferase; ST: sialiltransferase; Le: antigénio de Lewis; SLe: anti-génio de Lewis sialilado.

A Figura 12 é um esquema exemplar para preparar glicopéptidos ligados em O, originando com serina ou treonina. Opcionalmente, um polímero solúvel em água (WSP) tal como poli(etilenoglicol) é adicionado à estrutura de glicano final.

A Figura 13 é uma série de diagramas apresentando

os quatro tipos de estruturas de O-glicano, denominados núcleos 1 até 4. A estrutura nuclear é sublinhada em linhas ponteadas.

A Figura 14, compreendendo a Figura 14A e a Figura 14B, é uma série de esquemas que apresentam uma forma de realização exemplar da invenção na qual os resíduos de hidratos de carbono compreendendo uma estrutura complexa de hidratos de carbono e/ou estruturas de manose elevada são aparadas de novo para a estrutura biantenária da primeira geração. Opcionalmente, a fucose é adicionada apenas após reacção com GnT I. Um açúcar modificado contendo um polímero solúvel em água (WSP) é então conjugado a um ou mais dos resíduos de açúcar expostos pelo processo de aparar de volta.

A Figura 15 é um esquema semelhante aquele apresentado na Figura 4, no qual uma estrutura de manose elevada ou estrutura complexa é "aparada de volta" para o núcleo ligado em beta à manose e um açúcar modificado contendo um polímero solúvel em água é então conjugado com um ou mais dos resíduos de açúcar expostos pelo processo de aparar de volta. Os açúcares são adicionados sequencialmente utilizando glicosiltransferases. A Figura 16 é um esquema semelhante ao apresentado na Figura 4, no qual uma manose elevada ou estrutura complexa é aparada de volta ao GlcNAc ao qual a primeira manose é ligada, e um açúcar

modificado contendo um polímero solúvel em água é então conjugado com um ou mais dos resíduos de açúcar expostos pelo processo de aparar de volta. Os açúcares são adicionados sequencialmente utilizando glicosiltransferases. A Figura 17 é um esquema semelhante ao apresentado na Figura 4, no qual uma manose elevada ou estrutura complexa é aparada de volta para o primeiro GlcNAc ligado ao Asn do péptido, após o qual um polímero solúvel em água é conjugado com um ou mais resíduos de açúcar que foram subsequentemente. Os açúcares são adicionados sequencialmente utilizando glicosiltransferases.

A Figura 18, compreendendo a Figura 18A e a 18B, é um esquema no qual um hidrato de carbono ligado a N é opcionalmente aparado de volta a partir de uma manose elevada ou estrutura complexa, e subsequentemente derivada com uma unidade de açúcar modificado (Gal ou GlcNAc) contendo um polímero solúvel em água.

A Figura 19, compreendendo a Figura 19A e a 19B, é um esquema no qual um hidrato de carbono ligado em N é aparado de volta a partir de uma manose elevada ou estrutura complexa e subsequentemente derivado com uma unidade de ácido siálico contendo um polímero solúvel em água. Os açúcares são adicionados sequencialmente utilizando glicosiltransferases.

A Figura 20 é um esquema no qual um hidrato de

carbono ligado a N é opcionalmente aparado de volta a partir de uma manose elevada ou estrutura complexa e subsequentemente derivado com uma ou mais unidades de ácido siálico, e terminado com um ácido siálico derivado com um polímero solúvel em água. Os açúcares são adicionados sequencialmente utilizando glicosiltransferases. A Figura 21 é um esquema no qual um sacárido ligado em O é "aparado de volta" e subsequentemente conjugado com um açúcar modificado contendo um polímero solúvel em água. No esquema exemplar, a unidade de hidratos de carbono é "aparada de volta" para a primeira geração da estrutura biantenária.

A Figura 22 é um esquema exemplar para aparar de volta a unidade de hidrato de carbono de um glicopéptido ligado em O para produzir uma manose disponível para conjugação com um açúcar modificado possuindo um polímero solúvel em água ligado a este.

A Figura 23, compreendendo a Figura 23A até à Figura 23C, é uma série de esquemas exemplares.

A Figura 23A é um esquema que ilustra a adição de um açúcar PEGuilado, seguido pela adição de um açúcar não modificado. A Figura 23B é um esquema que ilustra a adição de mais do que um tipo de açúcar modificado para um glicano. A Figura 23C é um esquema que ilustra a adição de diferentes açúcares modificados a glicanos ligados a O e glicanos ligados em N.

A Figura 24 é um diagrama de vários métodos de melhoramento da função terapêutica de um péptido por remodelação de glicano, incluindo a conjugação.

A Figura 25 é um conjunto de esquemas para a remodelação de glicano de um péptido terapêutico para tratar a Doença de Gaucher.

A Figura 26 é um esquema para remodelar glicano para criar glicanos possuindo uma unidade terminal de manose-6-fosfato.

A Figura 27 é um diagrama ilustrando a sequência de estruturas de glicano encontradas em glucocerebrosidase (Cerezyme [™]) produzida em CHO após sialilação.

A Figura 28, compreendendo a Figura 28A até à Figura 28Z e a Figura 28AA até à Figura 28CC, é uma lista de péptidos úteis nos métodos da invenção.

A Figura 29, compreendendo as Figuras 29A até 29G, proporciona esquemas exemplares para remodelar estruturas de glicano no factor de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF). A Figura 29A é um diagrama apresentando o péptido G-CSF indicando o resíduo de aminoácidos aos quais um glicano se liga, e uma fórmula de glicano exemplar ligada a este.

A Figura 29B até 29G são diagramas de passos de remodelação contemplados do glicano do péptido na Figura 29A com base no tipo de célula onde o

péptido é expresso e na estrutura de glicano remodelado desejada.

A Figura 58, compreendendo as Figuras 58A e 58B, é uma sequência de nucleótidos exemplar e sequência de aminoácidos correspondente do factor de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF) (SEQ ID N°S: 1 e 2, respectivamente).

A Figura 181 é um esquema apresentando a conversão de N-glicanos de manose elevada em N-glicanos híbridos. A enzima 1 é α 1,2-manosidase, de *Trichoderma reesei* ou *Aspergillus saitoi*. A enzima 2 é GnT-I β -1,2-N-acetil glucosaminil transferase I). A enzima 3 é GalT-I (β 1,4-galactosiltransferase 1). A enzima 4 é α 2,3-sialiltransferase ou α 2,6-sialiltransferase.

A Figura 188 é uma série de esquemas apresentando a conversão de N-glicanos de manose elevada em N-glicanos complexos. A enzima 1 é α 1,2-manosidase de *Trichoderma reesei* ou *Aspergillus saitoi*. A enzima 2 é GnT-I. A enzima 3 é GAIT 1. A enzima 4 é α 2,3-sialiltransferase ou α 2,6-sialiltransferase. A enzima 5 é α -manosidase II. A enzima 6 é α -manosidase. A enzima 7 é GnT-II. A enzima 8 é α 1,6-manosidase. A enzima 9 é α 1,3-manosidase.

A Figura 189 é um diagrama da ligação catalisada pela N-acetilglucosaminiltransferase I até VI (GnT I-VI). R = GlcNAcV β 1,4GlcNAc-Asn-X.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção inclui métodos e composições para a adição e/ou deleção, sem células *in vitro*, de açúcares a ou de uma molécula peptídica de modo a proporcionar uma molécula de glicopéptido possuindo um padrão de glicosilação específico personalizado ou desejado, em que o glicopéptido é produzido a uma escala industrial. Numa forma de realização preferida da invenção, o glicopéptido assim produzido tem ligado a ele um açúcar modificado que foi adicionado ao péptido através de uma reacção enzimática. Uma característica chave da invenção é receber um péptido produzido por qualquer tipo de célula e criar uma estrutura de núcleo de glicano no péptido, após o qual a estrutura de glicano é então remodelada *in vitro* para criar um glicopéptido possuindo um padrão de glicosilação adequado par a utilização terapêutica num mamífero. Mais especificamente, é possível, de acordo com a presente invenção, preparar uma molécula de glicopéptido possuindo uma molécula de açúcar modificado ou outro composto conjugado com esta, de modo a que a molécula conjugada confira uma propriedade benéfica ao péptido. De acordo com a presente invenção, a molécula conjugada é adicionada ao péptido enzimaticamente porque a adição à base de enzima das moléculas do conjugado aos péptidos possui a vantagem de regiosselectividade e estereoselectividade. O glicoconjugado pode ser adicionado ao glicano num péptido antes ou após a glicosilação ter sido completada. Por outras palavras, a ordem de glicosilação em

relação à glicoconjugação pode ser variada como aqui descrito noutra local. É por isso possível, utilizando os métodos e composições aqui proporcionadas, para remodelar um péptido para conferir a esse péptido uma estrutura de glicano desejada, preferencialmente possuindo um açúcar modificado ligado a este. É também possível, utilizando os métodos e composições da invenção criar moléculas de péptido possuindo estruturas de glicano desejadas e ou modificadas a uma escala industrial, assim, pela primeira vez, proporcionando a técnica com uma solução prática para a produção eficiente de péptidos terapêuticos melhorados.

Definições

Salvo definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem geralmente o mesmo significado que o normalmente compreendido por alguém com experiência normal na técnica à qual esta invenção pertence. De um modo geral, a nomenclatura aqui utilizada e os processos laboratoriais em cultura de células, genética molecular, química orgânica, e química de ácidos nucleicos e hibridação são aqueles que são bem conhecidos e normalmente empregues na técnica. São utilizadas técnicas convencionais para a síntese de ácidos nucleicos e de péptidos. As técnicas e processos são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais na técnica e várias referências gerais (e.g., Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), que são

fornecidos ao longo deste documento. A nomenclatura utilizada aqui e os processos laboratoriais utilizados na química analítica e na síntese orgânica descritos abaixo são aqueles bem conhecidos e normalmente empregues na técnica. Técnicas convencionais ou modificações destas, são utilizadas para a síntese química e para análises químicas.

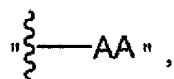
Os artigos "um" e "uma" são aqui utilizados para referir a um ou a mais do que um (*i.e.* a pelo menos um) dos objectos gramaticais do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais do que um elemento.

O termo "anticorpo", como aqui utilizado, refere-se a uma molécula de imunoglobulina que é capaz de se ligar especificamente a um epitopo específico num antigénio. Os anticorpos podem ser imunoglobulinas intactas derivadas de fontes naturais ou de fontes recombinantes e podem ser porções imunorreactivas de imunoglobulinas intactas. Os anticorpos são tipicamente tetrâmeros de moléculas de imunoglobulina. Os anticorpos na presente invenção podem existir numa variedade de formas incluindo, por exemplo, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, Fv, Fab e F(ab)₂, assim como anticorpos de cadeia simples e anticorpos humanizados (Harlow *et al.*, 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow *et al.*, 1989, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426).

Pelo termo "anticorpo sintético", como aqui utilizado, entende-se um anticorpo que é criado utilizando a tecnologia do DNA recombinante, tal como, por exemplo, um anticorpo expresso por um bacteriófago, como aqui descrito. O termo também deve ser entendido como significando um anticorpo que foi criado através da síntese de uma molécula de DNA que codifica o anticorpo e cuja molécula de DNA expressa uma proteína de anticorpo, ou uma sequência de aminoácidos especificando o anticorpo, em que o DNA ou a sequência de aminoácidos tinha sido obtida utilizando DNA sintético ou a tecnologia de sequências de aminoácidos que está disponível e é bem conhecida na técnica.

Como aqui utilizado, uma molécula biológica "funcional" é uma molécula biológica numa forma em que apresenta uma propriedade pela qual é caracterizada. Uma enzima funcional, por exemplo, é uma que apresenta a actividade catalítica característica pela qual a enzima é caracterizada.

Como aqui utilizado, a estrutura



é o ponto de ligação entre um aminoácido ou uma cadeia lateral de aminoácidos na cadeia peptídica e a estrutura de glicano.

Oligossacáridos "ligados a N" são aqueles oligossacáridos que estão ligados a uma estrutura de péptido através de asparagina, por meio de uma ligação asparagina-N-acetilglucosamina. Os oligossacáridos ligados em N são também denominados "N-glicanos." Todos os oligossacáridos ligados em N possuem um núcleo de pentasacáridos comum de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Eles diferem na presença de, e no número de ramificações (também denominadas antenas) de açúcares periféricos, tais como N-acetilglucosamina, galactose, N-acetilgalactosamina, fucose e ácido siálico. Opcionalmente, esta estrutura também pode conter uma molécula do núcleo de fucose e/ou uma molécula de xilose.

Uma "estrutura nuclear de trimanosilo elementar" refere-se a uma unidade de glicano compreendendo unicamente uma estrutura nuclear de trimanosilo, sem açúcares adicionais ligados a esta. Quando o termo "elementar" não está incluído na descrição da "estrutura nuclear de trimanosilo", então o glicano compreende a estrutura nuclear de trimanosilo com açúcares adicionais ligados a esta. Opcionalmente, esta estrutura também poder conter uma molécula nuclear de fucose e/ou uma molécula de xilose.

O termo "glicopéptido nuclear de trimanosilo elementar" é aqui utilizado para se referir a um glicopéptido possuindo estruturas de glicano compreendidas principalmente por uma estrutura nuclear de trimanosilo

elementar. Opcionalmente, esta estrutura também pode conter uma molécula de fucose nuclear e/ou uma molécula de xilose.

Os oligossacáridos "ligados em O" são os oligossacáridos que estão ligados a uma estrutura de péptidos através de treonina, serina, hidroxiprolina, tirosina, ou outros aminoácidos contendo hidroxilo.

Todos os oligossacáridos aqui descritos são descritos com o nome ou a abreviatura para o sacárido de não redução (*i.e.*, Gal), seguido pela configuração da ligação glicosídica (α ou β), a ligação em anel (1 ou 2), a posição no anel do sacárido de redução envolvido na ligação (2, 3, 4, 6 ou 8), e depois o nome ou abreviatura do sacárido de redução (*i.e.*, GlcNAc). Cada sacárido é preferencialmente uma piranose. Para uma revisão da nomenclatura de glicobiologia convencional ver, *Essentials of Glycobiology* Varki *et al.* eds., 1999, CSHL Press.

O termo "ácido siálico" refere-se a qualquer membro de uma família de açúcares carboxilados de nove carbonos. O membro mais comum da família do ácido siálico é o ácido N-acetil-neuramínico (2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-ónico (frequentemente abreviado como Neu5Ac, NeuAc, ou NANA). Um segundo membro da família é o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc ou NeuGc), no qual o grupo N-acetil de NeuAc é hidroxilado. Um terceiro membro da família do ácido siálico é o 2-ceto-3-desoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano *et al.* (1986) *J. Biol.*

Chem. 261: 11550-11557; Kanamori *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 21811-21819 (1990)). São também incluídos ácidos siálicos substituídos em 9, tal como um 9-O-C₁-C₆ acil-Neu5Ac como o 9-O-lactil-Neu5Ac ou o 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-fluoro-Neu5Ac e 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para revisão da família do ácido siálico, ver, *e.g.*, Varki, *Glycobiology* 2: 25-40 (1992); Sialic acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992)). A síntese e a utilização de compostos de ácido siálico num processo de sialilação é revelado no Pedido International WO 92/16640, publicado em 1 de Outubro de 1992.

Um péptido possuindo a "glicosilação desejada", como aqui utilizado, é um péptido que compreende uma ou mais moléculas de oligossacárido que são necessárias para a actividade biológica eficiente do péptido.

Uma "doença" é um estado de saúde de um animal em que o animal não pode manter a homeostasia, e em que se a doença não for melhorada, então a saúde do animal continua a deteriorar-se.

A "área debaixo da curva" ou "AUC", como aqui utilizada no contexto de administrar um fármaco de péptidos a um doente, é definida como a área total debaixo da curva que descreve a concentração do fármaco na circulação sistémica no doente como uma função do tempo desde o zero até ao infinito.

O termo "semi-vida" ou " $t_{1/2}$ ", como aqui utilizado no contexto de administrar um fármaco de péptido a um doente, é definido como o tempo necessário para a concentração no plasma de um fármaco num doente para ser reduzida a metade. Pode haver mais do que uma semi-vida associada com o fármaco de péptido dependendo de múltiplos mecanismos de eliminação, redistribuição, e outros mecanismos bem conhecidos na técnica. Normalmente, as semi-vidas alfa e beta são definidas de modo a que a fase alfa é associada com a redistribuição, e a fase beta está associada com a eliminação. Contudo, com fármacos de proteína que estão, na sua maior parte, confinados à corrente sanguínea, podem existir pelo menos duas semi-vidas de eliminação. Para alguns péptidos glicosilados, a eliminação da fase beta rápida pode ser mediada através dos receptores nos macrófagos, ou células endoteliais que reconhecem a galactose terminal, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manose, ou fucose. A eliminação mais lenta da fase beta pode ocorrer através da filtração glomerular renal para moléculas com um raio eficaz < 2 nm (aproximadamente 68 kD) e/ou incorporação específica ou não específica e metabolismo nos tecidos. A GlicoPEGuilação pode proteger os açúcares terminais (e.g. galactose ou N-acetilgalactosamina) e por esse modo bloquear a eliminação na fase rápida alfa através de receptores que reconhecem estes açúcares. Pode também conferir um maior raio eficaz e desse modo diminuir o volume de distribuição e incorporação de tecido, prolongando desse modo a fase beta tardia. Assim, o

impacto preciso da glicosilação nas semi-vidas da fase alfa e da fase beta irá variar dependendo do tamanho, estado de glicosilação, e outros parâmetros, como é bem conhecido na técnica. Outra explicação de "semi-vida" é encontrada em Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin e RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdão, pp 101-120).

O termo "tempo de residência", como aqui utilizado no contexto de administrar um péptido fármaco ao doente, é definido como o tempo médio que o fármaco se mantém no corpo do doente após dosagem.

Um "ácido nucleico isolado" refere-se a um segmento ou fragmento de ácido nucleico que foi separado das sequências que o flanqueiam num estado que ocorre naturalmente, *e.g.*, um fragmento de DNA que foi removido das sequências que estão normalmente adjacentes ao fragmento, *e.g.*, as sequências adjacentes ao fragmento num genoma no qual ocorre naturalmente. O termo também se aplica aos ácidos nucleicos que foram substancialmente purificados de outros componentes que acompanham naturalmente o ácido nucleico, *e.g.*, RNA ou DNA ou proteínas, que o acompanham naturalmente na célula. O termo inclui por isso, por exemplo, um DNA recombinante que é incorporado num vector, num plasmídeo ou vírus que se replica autonomamente, ou no DNA genómico de um procariota ou eucariota, ou que existe com uma molécula separada (*e.g.*, como um cDNA ou um fragmento genómico ou de cDNA produzido por PCR ou por

digestão com enzimas de restrição) independente de outras sequências. Também inclui um DNA recombinante que é parte de um ácido nucleico híbrido que codifica a sequência de péptidos adicional.

Um "polinucleótido" significa uma cadeia simples ou cadeias paralela e anti-paralela de um ácido nucleico. Assim, um polinucleótido pode ser um ácido nucleico de cadeia simples ou de cadeia dupla.

O termo "ácido nucleico" refere-se tipicamente a grandes polinucleótidos. O termo "oligonucleótido" refere-se tipicamente a polinucleótidos curtos, geralmente não maiores do que cerca de 50 nucleótidos.

A notação convencional é aqui utilizada para descrever sequências de polinucleótidos: a extremidade do lado esquerdo de uma sequência de polinucleótidos de cadeia simples é a extremidade 5'; e a direcção do lado esquerdo de uma sequência de polinucleótidos de cadeia dupla é referida como a direcção 5'. A adição dos nucleótidos da direcção de 5' para 3' para os transcritos nascentes de RNA é referida como a direcção da transcrição. A cadeia de DNA que possui a mesma sequência como um mRNA é referida como a "cadeia codificante"; as sequências na cadeia de DNA que estão localizadas em 5' em relação a um ponto de referência no DNA são referidas como "sequências a montante"; as sequências na cadeia de DNA que estão a 3' de um ponto de referência no DNA são referidas como "sequências a jusante".

"Codificante" refere-se à propriedade inerente de sequências de nucleótidos específicas num polinucleótido, tal como um gene, um cDNA, ou um mRNA, para servir como moldes para a síntese de outros polímeros e macromoléculas em processos biológicos que possuem uma sequência de nucleótidos definida (*i.e.*, rRNA, tRNA e mRNA) ou uma sequência de aminoácidos definida e as propriedades biológicas que daí resultam. Assim, uma sequência de ácido nucleico codifica uma proteína se a transcrição e tradução do mRNA correspondente a esse ácido nucleico produz a proteína numa célula ou outro sistema biológico. Tanto a cadeia codificante, a sequência de nucleótidos da qual é idêntica à sequência de mRNA e é normalmente proporcionada nas listagens de sequências, e a cadeia não codificante, utilizada como o molde para a transcrição de um gene ou cDNA, pode ser referido como codificando a proteína ou outro produto desse ácido nucleico ou cDNA.

Salvo especificação em contrário, uma "sequência de nucleótidos que codifica uma sequência de aminoácidos" inclui todas as sequências de nucleótidos que são versões degeneradas umas das outras e que codificam para a mesma sequência de aminoácidos. As sequências de nucleótidos que codificam proteínas e RNA podem incluir intrões.

"Homólogo" como aqui utilizado, refere-se à sequência da subunidade de um modo semelhante entre duas moléculas poliméricas, *e.g.*, entre duas moléculas de ácido

nucleico, e.g., duas moléculas de DNA ou duas moléculas de RNA, ou entre duas moléculas de péptido. Quando uma posição de subunidade em ambas as moléculas é ocupada pela mesma subunidade monomérica, e.g., se uma posição em cada uma das duas moléculas de DNA é ocupada por adenina, então são homólogas nessa posição. A homologia entre duas sequências é uma função directa do número de posições emparelhadas ou homólogas, e.g., se metade (e.g., cinco posições num polímero de dez subunidades de comprimento) das posições em duas sequências de composto são homólogos então as duas sequências são 50% homólogas, se 90% das posições, e.g., 9 de 10, são emparelhadas ou homólogas, as duas sequências partilham 90% de homologia. A título de exemplo, as sequências de DNA 3'ATTGCC5' e 3'TATGGC partilham 50% de homologia.

Como aqui utilizado, "homologia" é utilizado como sinónimo de "identidade".

A determinação da percentagem de identidade entre duas sequências de nucleótidos ou de aminoácidos podem ser realizadas utilizando um algoritmo matemático. Por exemplo, um algoritmo matemático útil para comparar duas sequências é o algoritmo de Karlin e Altschul (1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268), modificado como em Karlin e Altschul (1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877). Este algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST de Altschul, et al. (1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410), e pode ser acedido, por exemplo no National Center for

Biotechnology Information (NCBI) no sítio da *world wide web* possuindo o localizador de recursos universal "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov-BLAST/>". As pesquisas de nucleótidos com BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST (designado "blastn" no sítio do NCBI na rede), utilizando os seguintes parâmetros: penalização para intervalos (gap) = 5; penalização da extensão do intervalo (gap) = 2; penalização para desemparelhamento = 3; recompensa de emparelhamento = 1; valor de expectativa 10,0; e tamanho da palavra = 11 para obter sequências de nucleótidos homólogas a um ácido nucleico aqui descrito. As pesquisas de BLAST de proteína podem ser realizadas com o programa XBLAST (designado "blastn" no sítio do NCBI na rede) ou o programa "blastp" do NCBI, utilizando os seguintes parâmetros: valor de expectativa 10,0, matriz de classificação BLOSUM62 para obter sequências de aminoácidos homólogas para uma molécula de proteína aí descrita. Para obter alinhamentos com intervalos para efeitos de comparação, pode ser utilizado o Gapped BLAST como descrito em Altschul *et al.* (1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Alternativamente, podem ser utilizados PSI-Blast ou PHI-Blast para realizar uma pesquisa iterada que detecta relações distantes entre moléculas (Id.) e relações entre moléculas que partilham um padrão comum. Quando se utilizam os programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast, e PHI-Blast, podem ser utilizados os parâmetros por defeito dos respectivos programas (*e.g.*, XBLAST e NBLAST). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

A percentagem de identidade entre duas sequências

pode ser determinada utilizando técnicas semelhantes às descritas acima, com ou sem permissão de intervalos. Ao calcular a percentagem de identidade, foram contados os emparelhamentos tipicamente exactos.

Uma "unidade de expressão de ácido nucleico heterólogo" que codifica um péptido é definida como um ácido nucleico possuindo uma sequência codificante para um péptido de interesse ligado operacionalmente a uma ou mais sequências de controlo de expressão tais como sequências de promotores e/ou repressores em que pelo menos uma das sequências é heteróloga, *i.e.*, não encontrado normalmente na célula hospedeira.

Ao descrever dois polinucleótidos como "ligados operacionalmente" entende-se que uma unidade de ácido nucleico de cadeia simples ou de cadeia dupla compreende os dois polinucleótidos dispostos na unidade do ácido nucleico de modo a que pelo menos um dos dois polinucleótidos seja capaz de exercer um efeito fisiológico através do qual é caracterizado sobre o outro. A título de exemplo, um promotor ligado operacionalmente à região codificante de um ácido nucleico é capaz de promover a transcrição da região codificante.

Como aqui utilizado, o termo "sequência de promotor/regulador" significa uma sequência de ácido nucleico que é necessária para a expressão de um produto genético ligado operacionalmente à sequência de promotor/regulador.

Em alguns casos, esta sequência pode ser a sequência de promotor nuclear e noutros casos, esta sequência pode também incluir uma sequência intensificadora e outros elementos reguladores que são necessários para a expressão do produto genético. A sequência do promotor/reguladora pode, por exemplo, ser uma que expresse o produto genético de um modo específico para o tecido.

Um "promotor constitutivo" é um promotor que conduz à expressão de um gene ao qual está ligado operacionalmente, de um modo constante numa célula. A título de exemplo, os promotores que conduzem à expressão de genes domésticos celulares são considerados como sendo promotores constitutivos.

Um promotor "indutível" é uma sequência de nucleótidos que, quando ligado operacionalmente com um polinucleótido que codifica ou especifica um produto genético, faz com que o produto genético seja produzido numa célula viva substancialmente apenas quando um indutor que corresponde ao promotor está presente na célula.

Um promotor "específico para o tecido" é uma sequência de nucleótidos que, quando ligada operacionalmente a um polinucleótido que codifica ou especifica um produto genético, faz com que o produto genético seja produzido numa célula viva substancialmente apenas se a célula é uma célula do tipo de tecido que corresponde ao promotor.

Um "vector" é uma composição de matéria que compreende um ácido nucleico isolado e que pode ser utilizado para distribuir o ácido nucleico isolado para o interior de uma célula. São conhecidos na técnica numerosos vectores incluindo, mas não limitados a, polinucleótidos lineares, polinucleótidos associados a compostos iónicos ou anfifílicos, plasmídeos, e vírus. Assim, o termo "vector" inclui um plasmídeo ou um vírus que se replicam autonomamente. O termo também deve ser encarado como incluindo compostos não plasmídicos e não virais que facilitam a transferência de ácido nucleico para as células, tais como, por exemplo, compostos de polilisina, lipossomas, e semelhantes. Exemplos de vectores virais incluem, mas não estão limitados a, vectores adenovirais, vectores adenoassociados a vírus, vectores retrovirais, e semelhantes.

"Vector de expressão" refere-se a um vector compreendendo um polinucleótido recombinante compreendendo sequências de controlo de expressão ligadas operacionalmente a uma sequência de nucleótidos que se quer expressar. Um vector de expressão compreende elementos de actuação *cis* suficientes para a expressão; outros elementos para expressão podem ser fornecidos pela célula hospedeira ou num sistema de expressão *in vitro*. Vectores de expressão incluem todos aqueles conhecidos na técnica, tais como cosmídeos, plasmídeos (e.g., nus ou contidos em lipossomas) e vírus que incorporam o polinucleótido recombinante.

Uma célula "geneticamente modificada" ou "recombinante" é uma célula que possui uma ou mais modificações em relação ao material genético da célula. Essas modificações incluem, mas não estão limitados a, inserções de material genético, deleções de material genético e inserção de material genético que é extracromossômico quer esse material seja mantido de uma forma estável ou não.

Um "péptido" é um oligopéptido, polipéptido, péptido, proteína ou glicoproteína. A utilização do termo "péptido" neste contexto inclui um péptido possuindo uma molécula de açúcar ligada a este quando uma molécula de açúcar está ligada a este.

Como aqui utilizada, "forma nativa" significa a forma do péptido quando produzida pelas células e/ou organismos na qual se encontra na natureza. Quando o péptido é produzido por uma pluralidade de células e/ou organismos, o péptido pode possuir uma variedade de formas nativas.

"Péptido" refere-se a um polímero no qual os monómeros são aminoácidos estão unidos em conjunto através de ligações amida, alternativamente referido com um péptido. Adicionalmente, são também incluídos aminoácidos não naturais, por exemplo, β -alanina, fenilglicina e homoarginina. Também podem ser utilizados na presente invenção aminoácidos que não são codificados por ácido nucleico. Para além disso, os aminoácidos que foram modifi-

cados de modo a incluir grupos reactivos, sítios de glicosilação, polímeros, unidades terapêuticas, biomoléculas e semelhantes também podem ser utilizados na invenção. Todos os aminoácidos utilizados na presente invenção podem ser o seu isómero D - ou L. O L-isómero é geralmente preferido. Adicionalmente, podem também ser utilizados na presente invenção outros peptidomiméticos. Como aqui utilizado, o "péptido" refere-se a péptidos glicosilados e não glicosilados. São também incluídos péptidos que estão incompletamente glicosilados por um sistema que expressa o péptido. Para uma revisão geral, ver, Spatola, A. F., em CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983).

O termo "conjugado peptídico", refere-se a uma espécie da invenção na qual um péptido é conjugado com um açúcar modificado como aqui apresentado.

O termo "aminoácido" refere-se a aminoácidos que ocorrem naturalmente e sintéticos, assim como análogos de aminoácidos e miméticos de aminoácidos que funcionam de um modo semelhante aos aminoácidos que ocorrem naturalmente. Os aminoácidos que ocorrem naturalmente são aqueles codificados pelo código genético, assim como os aminoácidos que são mais tarde modificados, e.g., hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, e O-fosfoserina. Os análogos de aminoácidos referem-se a compostos que possuem a mesma estrutura química básica como um aminoácido que ocorre naturalmente,

i.e., um carbono α que está ligado a um hidrogénio, um grupo carboxilo, um grupo amino, e um grupo R, *e.g.*, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfónio de metionina. Esses análogos possuem grupos R modificados R (*e.g.*, norleucina) ou estruturas de péptidos modificados, mas retêm a mesma estrutura química básica que o aminoácido que ocorre naturalmente. Miméticos de aminoácidos referem-se a compostos químicos que possuem uma estrutura que é diferente da estrutura química geral de um aminoácido, mas que funcionam de um modo semelhante ao de um aminoácido que ocorre naturalmente.

Como aqui utilizado, os aminoácidos são representados pelo seu nome completo, pelo código de três letras que lhe corresponde, ou pelo código de uma letra correspondente, como indicado na Tabela 1 apresentada a seguir:

Tabela 1. Aminoácidos, e códigos de três letras e de uma letra.

Nome completo	Código de três letras	Código de uma letra
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	Y
Cisteína	Cys	C

(continuação)

Nome completo	Código de três letras	Código de uma letra
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	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
Triptofano	Trp	W

A presente invenção também proporciona análogos de proteínas ou péptidos que compreendem uma proteína como identificada acima. Os análogos podem diferir das proteínas ou péptidos que ocorrem naturalmente pelas diferenças nas sequências de aminoácido conservadoras ou através de modificações que não afectam a sequência, ou por ambas. Por exemplo, podem ser feitas alterações de aminoácido conservadoras, que embora alterem a sequência primária da proteína ou péptido, não alteram normalmente a sua função. As substituições de aminoácidos conservadoras incluem tipicamente substituições nos seguintes grupos:

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

As modificações (que não alteram normalmente a sequência primária) incluem *in vivo*, ou *in vitro*, a derivatização química dos péptidos, e.g., acetilação, ou carboxilação. São também incluídas modificações de glicosilação, e.g., aquelas realizadas modificando os padrões de glicosilação de um péptido durante a sua síntese e processamento ou noutros passos do processamento; e.g., expondo o péptido a enzimas que afectam a glicosilação, e.g., enzimas de glicosilação ou de desglicosilação de mamíferos. Estão também contempladas sequências que possuem resíduos de aminoácidos fosforilados, e.g., fosfotirosina, fosfoserina, ou fosfotreonina.

Será entendido, certamente, que os péptidos podem incorporar resíduos de aminoácidos que são modificados sem afectar a actividade. Por exemplo, os terminais podem ser derivatizados para incluir grupos bloqueadores, i.e. substituintes químicos adequados para proteger e/ou estabilizar os terminais N- e C- da "degradação indesejável", um termo que pretende compreender qualquer tipo de degradação enzimática, química ou bioquímica do composto nos seus

terminais que irão provavelmente afectar a função do composto, *i.e.* degradação sequencial do composto numa sua extremidade terminal.

Grupos bloqueadores incluem grupos de protecção utilizados convencionalmente na técnica da química de péptidos que não irá afectar adversamente as actividades do péptido *in vivo*. Por exemplo, podem ser introduzidos grupos bloqueadores N-terminal adequados através de alquilação ou acilação do terminal N. Exemplos de grupos bloqueadores N-terminal adequados incluem grupos alquilo C₁-C₅ ramificados ou não ramificados, grupos acilo tais como grupos formilo e acetilo, assim como suas formas substituídas, tais como os grupos acetamidometilo (Acm), Fmoc ou Boc. Os análogos desamino de aminoácidos também são grupos bloqueadores N-terminal úteis, e podem ser acoplados ao terminal N- do péptido ou utilizados no lugar do resíduo N-terminal. Grupos bloqueadores C-terminal adequados, nos quais o grupo carboxilo do terminal C- é incorporado ou não, incluem ésteres, cetonas ou amidas. Grupos alquilo que formam ésteres ou cetonas, particularmente grupos alquilo inferior, tais como metilo, etilo e propilo, e grupo aminos que formam amida, tais como aminas primárias (-NH₂), e grupos mono- e di-alquilamino tais como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino e semelhantes são exemplos de grupos bloqueadores C-terminal. Análogos de aminoácidos descarboxilados, tais como agmatina são também grupos bloqueadores C-terminal úteis e podem ser acoplados ao resíduo C-terminal do péptido ou utilizados no seu

lugar. Além disso, será entendido que os grupos amino e carboxilo livres nos terminais podem ser removidos no seu conjunto a partir do péptido para produzir as suas formas desamino e descarboxiladas sem afectar a actividade do péptido.

Também podem ser incorporadas outras modificações podem também sem afectar adversamente a actividade e estas incluem, mas não estão limitadas a, substituição de um ou mais dos aminoácidos na forma L-isomérica natural com aminoácidos na forma D-isomérica. Assim, o péptido pode incluir um ou mais resíduos de D-aminoácido, ou pode compreender os aminoácidos que estão todos na forma D. As formas retro-inversas dos péptidos de acordo com a presente invenção também estão contempladas, por exemplo, péptidos invertidos nos quais todos os aminoácidos estão substituídos com formas de D-aminoácido.

Estão também contemplados sais de adição ácida da presente invenção como equivalentes funcionais. Assim, um péptido de acordo com a presente invenção tratado com um ácido inorgânico, tal como clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, e semelhantes, ou um ácido orgânico, tal como um acético, propiónico, glicólico, pirúvico, oxálico, málico, malónico, succínico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzóico, cinâmico, mandélico, metanosulfónico, etanossulfónico, p-toluenossulfónico, salicílico e semelhantes, para proporcionar um sal do péptido solúvel em água é adequado para utilização na invenção.

Estão também incluídos péptidos que foram modificados utilizando técnicas comuns de biologia molecular de modo a melhorar a sua resistência à degradação proteolítica ou para otimizar as propriedades de solubilidade ou para os tornar mais adequados como um agente terapêutico. Os análogos desses péptidos incluem aqueles que contêm resíduos diferentes dos L-aminoácidos que ocorrem naturalmente, *e.g.*, D-aminoácidos ou aminoácidos sintéticos que não ocorrem naturalmente. Os péptidos da invenção não estão limitados a produtos de qualquer um dos processos específicos exemplares aqui listados.

Como aqui utilizado, o termo "MALDI" é uma abreviatura para Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Ionização de Desabsorção a Laser Assistida por uma Matriz. Durante a ionização, o SA-PEG (ácido siálico-poli(etileno-glicol)) pode ser parcialmente eliminado da estrutura de N-glicano da glicoproteína.

Como aqui utilizado, o termo "glicosil-transferase", refere-se a qualquer enzima/proteína que possui a capacidade para transferir um açúcar dador para uma unidade aceitadora.

Como aqui utilizado, o termo "açúcar modificado", refere-se a um hidrato de carbono que ocorre naturalmente ou não naturalmente que é adicionado enzimaticamente a um resíduo de aminoácido ou glicosilo de um péptido num

processo da invenção. O açúcar modificado é seleccionado a partir de um número de substratos de enzima incluindo, mas não limitados a nucleótidos de açúcar (mono-, di-, e trifosfatos), açúcares activados (e.g., haletos de glicosilo, mesilatos de glicosilo) e açúcares que não são activados nem nucleótidos.

O "açúcar modificado" está funcionalizado covalentemente com um "grupo de modificação". Grupos de modificação úteis incluem, mas não estão limitados a, polímeros solúveis em água, unidades terapêuticas, unidades de diagnóstico, biomoléculas e semelhantes. O locus de funcionalização com o grupo de modificação é seleccionado de modo a que não evite que o "açúcar modificado" seja adicionado enzimaticamente a um péptido.

O termo "solúvel em água" refere-se a unidades que possuem algum grau de solubilidade em água detectável. São bem conhecidos na técnica métodos para detectar e/ou quantificar a solubilidade em água. Polímeros solúveis em água exemplares incluem péptidos, sacáridos, poli(éteres), poli(aminas), poli(ácidos carboxílicos) e semelhantes. Os péptidos podem ter sequências mistas ou ser compostos por um único aminoácido, e.g. poli(lisina). De um modo semelhante, os sacáridos podem ser de sequências mistas ou compostas por uma única subunidade de sacárido, e.g., dextrano, amilose, quitosana, e poli(ácido siálico). Um poli(éter) exemplar é o poli(etilenoglicol). A poli(etileno imina) é uma poliamina exemplar, e o ácido poli(aspártico) é um poli(ácido carboxílico) representativo.

"Poli(óxido de alquilenos)" refere-se a um género de compostos possuindo uma estrutura de poliéter. A espécie de poli(óxido de alquilenos) de utilização na presente invenção inclui, por exemplo, espécies de cadeia linear- e ramificada-. Para além disso, espécies exemplares de poli(óxido de alquilenos) podem terminar em um ou mais grupos reactivos, activáveis, ou inertes. Por exemplo, o poli(etilenoglicol) é um poli(óxido de alquilenos) que consiste na repetição de subunidades de óxido de etileno, que pode ou não incluir unidades adicionais reactivas, activáveis ou inertes em qualquer um dos terminais. Espécies de poli(óxido de alquilenos) úteis incluem aquelas em que um terminal é "protegido" por um grupo inerte, e.g., monometoxi-poli(óxido de alquilenos). Quando a molécula é uma espécie ramificada, pode incluir grupos múltiplos reactivos, activáveis ou inertes nos terminais das cadeias de óxido de alquilenos e os grupos reactivos podem ser iguais ou diferentes. Também são conhecidos na técnica derivativos de espécies de poli(óxido de alquilenos) de cadeia simples que são heterobifuncionais.

O termo, "grupo de ligação glicosilo", como aqui utilizado refere-se a um resíduo de glicosilo ao qual está ligado covalentemente um agente (e.g., polímero solúvel em água, unidade terapêutica, biomolécula). Nos métodos da invenção, o "grupo de ligação a glicosilo" torna-se ligado covalentemente a um péptido glicosilado ou não glicosilado, ligando desse modo o agente a um resíduo de aminoácido e/ou

glicosilo no péptido. Um "grupo de ligação a glicosilo" é geralmente derivado de um "açúcar modificado" pela ligação enzimática do "açúcar modificado" a um resíduo de aminoácido e/ou glicosilo do péptido. Mais especificamente, um "grupo de ligação a glicosilo," como aqui utilizado, refere-se a uma unidade que une covalentemente um "grupo de modificação", como aqui discutido, e um resíduo de aminoácido de um péptido. O aduto grupo de ligação a glicosilo-grupo de modificação possui uma estrutura que é um substrato para uma enzima. As enzimas para as quais o aduto grupo de ligação a glicosilo-grupo de modificação são substratos são geralmente aquelas que são capazes de transferir uma unidade sacarilo num resíduo de aminoácido de um péptido, *e.g.*, uma glicosiltransferase, amidase, glicosidase, trans-sialidase, etc. O "grupo de ligação a glicosilo" é interposto entre, e liga covalentemente um "grupo de modificação" e um resíduo de aminoácido de um péptido.

Um "grupo de ligação a glicosilo intacto" refere-se a um grupo de ligação que é derivado de uma unidade glicosilo na qual o monómero de sacárido individual que liga o conjugado não é degradado, *e.g.*, oxidado, *e.g.*, por metaperiodato de sódio. O "grupo de ligação a glicosilos intacto" da invenção pode ser derivado de um oligossacárido que ocorre naturalmente através da adição de unidade(s) glicosilo ou remoção de uma ou mais unidades glicosilo de uma estrutura de sacárido parental. Um "grupo de ligação a glicosilo intacto" exemplar inclui pelo menos uma unidade

de sacarilo intacta, e.g., não degradada, que está ligada covalentemente a um resíduo de aminoácido num péptido. O restante do "grupo de ligação" pode possuir substancialmente qualquer estrutura. Por exemplo, o grupo de modificação está ligado opcionalmente directamente à unidade de sacarilo intacta. Alternativamente, o grupo de modificação está ligado à unidade de sacarilo intacta através de um braço ligante. O braço ligante pode possuir substancialmente qualquer estrutura determinada como sendo útil na forma de realização seleccionada. Numa forma de realização exemplar, o braço ligante é uma ou mais unidades de sacarilo intactos, i.e. "o grupo de ligação a glicosilo intacto" assemelha-se a um oligossacárido. Outro grupo de ligação a glicosilo intacto exemplar é aquele no qual uma unidade de sacarilo ligada, directamente ou indirectamente, à unidade de sacarilo intacta é degradada e derivatizada (e.g., oxidação de periodato seguida por aminação reductiva). Ainda um outro braço ligante inclui o grupo de modificação ligado à unidade de sacarilo intacta, directamente ou indirectamente, através de um ligante de ligação reticulada, tal como aqueles aqui descritos ou seus análogos.

"Degradação", como aqui utilizado, refere-se à remoção de um ou mais átomos de carbono a partir de uma unidade de sacarilo.

Os termos "unidade de direccionamento" e "agente de direccionamento", como aqui utilizado, refere-se a

espécies que se irão localizar selectivamente num tecido ou região particular do corpo. A localização é mediada pelo reconhecimento específico de determinantes moleculares, tamanho molecular do agente de direccionamento ou conjugado, interacções iónicas, interacções hidrofóbicas e semelhantes. São conhecidos dos especialistas na técnica outros mecanismos de direccionamento de um agente para um tecido ou região particular.

Como aqui utilizado, "unidade terapêutica" significa qualquer agente útil para terapia incluindo, mas não limitado a, antibióticos, agentes anti-inflamatórios, fármacos anti-tumorais, citotoxinas, e agentes radioactivos. "Unidade terapêutica" inclui pró-fármacos de agentes bioactivos, construções nas quais mais do que uma unidade terapêutica está ligada a um veículo, e.g., agentes multivalentes. Unidade terapêutica também inclui péptidos, e construções que incluem péptidos. Péptidos exemplares incluem aqueles revelados na Figura 28 e nas Tabelas 6 e 7, aqui apresentadas. "Unidade terapêutica" significa por isso qualquer agente útil para terapia incluindo, mas não limitado a, antibióticos, agentes anti-inflamatórios, fármacos anti-tumor, citotoxinas, e agentes radioactivos. "Unidade terapêutica" inclui pró-fármacos de agentes bioactivos, construções nas quais mais do que uma unidade terapêutica está ligada a um veículo, e.g., agentes multivalentes.

Como aqui utilizado, "fármaco anti-tumor" significa qualquer agente útil para combater o cancro incluindo,

mas não limitado a, citotoxinas e agentes, tais como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, agentes antimitóticos, procarbazona, hidroximetilureia, asparaginase, corticosteróides, interferões e agentes radioactivos. Estão também englobados dentro do âmbito do termo "fármaco anti-tumor," conjugados de péptidos com actividade anti-tumoral, e.g. TNF- α . Os conjugados incluem, mas não estão limitados aos formados entre uma proteína terapêutica e uma glicoproteína da invenção. Um conjugado representativo é aquele formado entre PSGL-1 e TNF- α .

Como aqui utilizado, "uma citotoxina ou agente citotóxico" significa qualquer agente que é prejudicial para as células. Exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puomicina e seus análogos ou homólogos. Outras toxinas incluem, por exemplo, rícino, CC-1065 e análogos, as duocarmicinas. Ainda outras toxinas incluem a toxina da difteria, e veneno de cobra (e.g., veneno de cobra).

Como aqui utilizado, "um agente radioactivo" inclui qualquer radioisótopo que é eficaz no diagnóstico ou destruição de um tumor. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, Índio-111, Cobalto-60 e Tecnécio. Adicional-

mente, os elementos radioactivos que ocorrem naturalmente, tal como o urânio, rádio, e tório, que representam tipicamente misturas de radioisótopos, são exemplos adequados de um agente radioactivo. Os iões metálicos são tipicamente quelados com uma unidade quelante orgânica.

Muitos grupos quelantes úteis, éteres de coroa, criptandos e semelhantes são conhecidos na técnica e podem ser incorporados nos compostos da invenção (e.g. EDTA, DTPA, DOTA, NTA, HDTA, etc. e seus análogos fosfonato, tal como DTPP, EDTP, HDTP, NTP, etc). Ver, por exemplo, Pitt *et al.*, "The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload," In, INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE; Martell, Ed.; American Chemical Society, Washington, D.C., 1980, pp. 279-312; Lindoy, THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES; Cambridge University Press, Cambridge, 1989; Dugas, BIOORGANIC CHEMISTRY; Springer-Verlag, New York, 1989, e as referências aí contidas.

Adicionalmente, está disponível para o especialista na técnica uma quantidade de vias que permitem a ligação de agentes quelantes, éteres de coroa e ciclo-dextrinas para outras moléculas. Ver, por exemplo, Meares *et al.*, "Properties of *In vivo* Chelate-Tagged proteins and Polipeptides." In, MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS;" Feeney, *et al.*, Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., 1982, pp. 370-387; Kasina *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 9: 108-117 (1998); Song *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 8: 249-255 (1997).

Como aqui utilizado, "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer material, que quando combinado com o conjugado retém a actividade da actividade do conjugado e é não reactiva com o sistema imunitário de um indivíduo. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, qualquer um dos veículos farmacêuticos convencionais, tais como uma solução salina tamponada com fosfato, água, emulsões, tais como emulsão óleo/água, e vários tipos de agentes humidificantes. Outros veículos também podem incluir soluções estéreis, comprimidos que incluem comprimidos e cápsulas revestidas. Tipicamente, esses veículos contêm excipientes tais como amido, leite, açúcar, certos tipos de argila, gelatina, ácido esteárico ou seus sais, estearato de magnésio ou cálcio, talco, gorduras vegetais ou óleos, gomas, glicóis, ou outros excipientes conhecidos. Esses veículos também podem incluir aditivos aromatizantes e corantes ou outros ingredientes. Composições compreendendo esses veículos são formulados através de métodos bem conhecidos convencionais.

Como aqui utilizado, "administrar" significa administração oral, administração como um supositório, contacto tópico, administração intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal ou subcutânea, intratecal, ou a implantação de um dispositivo de libertação lenta, e.g., uma bomba mini-osmótica, ao indivíduo.

O termo "isolado" refere-se a um material que é

substancialmente ou essencialmente isento dos componentes, que são utilizados para produzir o material. Para os conjugados peptídicos da invenção, o termo "isolado" refere-se a material que é substancialmente ou essencialmente isento dos componentes, que normalmente acompanham o material na mistura utilizada para preparar o conjugado peptídico. "Isolado" e "puro" são utilizados indistintamente. Tipicamente, os conjugados peptídicos isolados da invenção possuem um nível de pureza preferencialmente expresso como um intervalo. A extremidade inferior do intervalo de pureza para os conjugados peptídicos é de cerca de 60%, cerca de 70% ou cerca de 80% e a extremidade superior do intervalo de pureza é de cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90% ou mais de cerca de 90%.

Quando os conjugados peptídicos são mais do que cerca de 90% puros, as suas purezas são também preferencialmente expressos como um intervalo. A extremidade inferior do intervalo de pureza é de cerca de 90%, cerca de 92%, cerca de 94%, cerca de 96% ou cerca de 98%. A extremidade superior do intervalo de pureza é de cerca de 92%, cerca de 94%, cerca de 96%, cerca de 98% ou cerca de 100% de pureza.

A pureza é determinada através de qualquer método de análise reconhecida na técnica (e.g., intensidade de banda num gel corado com prata, electroforese em gel de poliacrilamida, HPLC, ou um meio semelhante).

"Escala comercial", como aqui utilizado, significa cerca de um ou mais gramas do produto final produzido no método.

"Essencialmente cada membro da população", como aqui utilizado, descreve uma característica de uma população de conjugados peptídicos da invenção nos quais uma percentagem seleccionada dos açúcares modificados adicionados a um péptido são adicionados a sítios múltiplos, aceitadores idênticos no péptido. "Essencialmente cada membro da população" fala sobre a "homogeneidade" dos sítios no péptido conjugado a um açúcar modificado e refere-se a conjugados da invenção, que são pelo menos cerca de 80%, preferencialmente pelo menos cerca de 90% e mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% homogénos.

"Homogeneidade", refere-se à consistência estrutural ao longo de uma população de unidades aceitadores com as quais os açúcares modificados são conjugados. Assim, num conjugado peptídico da invenção em que cada unidade de açúcar modificado é conjugada com um sítio aceitador possuindo a mesma estrutura que o sítio aceitador ao qual cada um dos outros açúcares modificados é conjugado, diz-se que o conjugado peptídico está cerca de 100% homogéneo. A homogeneidade é expressa tipicamente como um intervalo. A extremidade inferior do intervalo de homogeneidade para os conjugados peptídicos é de cerca de 60%, cerca de 70% ou cerca de 80% e a extremidade superior do intervalo de pureza é de cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90% ou mais do que cerca de 90%.

Quando os conjugados peptídicos são mais do que ou iguais a cerca de 90% homogêneos, a sua homogeneidade é também preferencialmente expressa como um intervalo. A extremidade inferior do intervalo de homogeneidade é de cerca de 90%, cerca de 92%, cerca de 94%, cerca de 96% ou cerca de 98%. A extremidade superior do intervalo de pureza é de cerca de 92%, cerca de 94%, cerca de 96%, cerca de 98% ou cerca de 100% de homogeneidade. A pureza dos conjugados peptídicos é tipicamente determinada por um ou mais métodos conhecidos dos especialistas na técnica, *e.g.*, cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS), matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF)/espectrometria de massa de tempo de voo de desabsorção com laser assistido por matriz, electroforese capilar, e semelhantes.

"Glicoforma substancialmente uniforme" ou um "padrão de glicosilação substancialmente uniforme", quando se refere a uma espécie de glicopéptido, refere-se à percentagem de unidades aceitadoras que são glicosiladas pela glicosiltransferase de interesse (*e.g.*, fucosiltransferase). Por exemplo, no caso de uma α 1,2 fucosiltransferase, existe um padrão de fucosilação substancialmente uniforme se substancialmente todos os (como definido abaixo) de Gal β 1, 4-GlcNAc-R e seus análogos sialilados são fucosilados num conjugado peptídico da invenção. Será compreendido por um especialista na técnica, que o material de partida pode conter unidades aceitadoras glicosiladas

(e.g., unidades Gal β 1,4-GlcNAc-R glicosiladas). Desse modo, a percentagem de glicosilação calculada irá incluir unidades aceitadoras que são glicosiladas através dos métodos da invenção, assim como as unidades aceitadoras já glicosiladas no material de partida.

O termo "substancialmente" nas definições acima de "substancialmente uniforme" significa geralmente pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, ou mais preferencialmente pelo menos cerca de 90%, e ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% das unidades aceitadoras para uma glicosiltransferase particular são glicosiladas.

Descrição da invenção

I. Método para Remodelar Cadeias de Glicano

A presente invenção inclui métodos e composições para a adição e/ou deleção *in vitro* de açúcares para ou de uma molécula de glicopéptido de modo a proporcionar uma molécula de péptido possuindo um padrão de glicosilação específico personalizado ou desejado, preferencialmente incluindo a adição de um açúcar modificado a esta. Uma característica chave da invenção é por isso pegar num péptido produzido por qualquer tipo de célula e criar uma estrutura nuclear de glicano no péptido, após a qual a estrutura de glicano é então remodelada *in vitro* para criar um péptido possuindo um padrão de glicosilação adequado para utilização terapêutica num mamífero.

A importância do padrão de glicosilação de um péptido é bem conhecida na técnica, com o são as limitações dos actuais métodos *in vivo* para a produção de péptidos apropriadamente glicosilados, particularmente quando estes péptidos são produzidos utilizando a metodologia do DNA recombinante. Para além disso, até à presente invenção, não foi possível gerar glicopéptidos possuindo neles uma estrutura de glicano desejada, em que o péptido pode ser produzido numa escala industrial.

Na presente invenção, um péptido produzido por uma célula é tratado enzimaticamente *in vitro* pela adição sistemática das suas enzimas e substratos apropriados, de modo a que as unidades de açúcar que não deviam estar presentes no péptido sejam removidas, e as unidades de açúcar, opcionalmente incluindo açúcares modificados, que devem ser adicionados ao péptido, são adicionados de modo a proporcionar um glicopéptido possuindo "glicosilação desejada", como aqui definido noutro local.

A. Método para remodelar glicanos ligados a N

Num aspecto, a presente invenção tira vantagem do facto de a maioria dos péptidos de interesse comercial ou farmacêutico compreender uma estrutura de cinco açúcares comuns aqui referida como o núcleo de trimanosilo, que N está ligado a asparagina na sequência Asn-X-Ser/Thr numa cadeia peptídica. O núcleo elementar de trimanosilo consis-

te essencialmente em dois resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e três resíduos de manose (Man) ligados a um péptido, *i.e.*, compreende estes cinco resíduos de açúcar e sem açúcares adicionais, excepto que pode incluir opcionalmente um resíduo de fucose. O primeiro GlcNAc está ligado ao grupo amida da asparagina e o segundo GlcNAc está ligado ao primeiro através de uma ligação β 1,4. Um resíduo de manose é ligado ao segundo GlcNAc através de uma ligação β 1,4 e dois resíduos de manose são ligados a esta manose através de uma ligação α 1,3 e uma ligação α 1,6, respectivamente. É apresentada na Figura 1 uma representação esquemática de uma estrutura nuclear de trimanosilo, no lado esquerdo. Embora seja o caso, estas estruturas de glicano na maioria dos péptidos compreende outros açúcares adicionalmente ao núcleo de trimanosilo, a estrutura nuclear de trimanosilo representa uma característica essencial de glicanos ligados a N em péptidos de mamíferos.

A presente invenção inclui a criação de um péptido possuindo a estrutura nuclear de trimanosilo como um elemento fundamental da estrutura das moléculas de glicano aí contidas. Dada a variedade de sistemas celulares utilizados para produzir péptidos, independentemente de os sistemas serem eles próprios sistemas que ocorrem naturalmente ou se envolvem metodologia de DNA recombinante, a presente invenção proporciona métodos pelos quais uma molécula de glicano num péptido produzido em qualquer tipo de célula pode ser reduzida a uma estrutura nuclear de trimanosilo elementar. Assim que a estrutura nuclear ele-

mentar de trimanosilo tenha sido criada, então é possível utilizar os métodos aqui descritos, para criar *in vitro*, uma estrutura de glicano desejada no péptido que confere no péptido uma ou mais propriedades que aumentam a eficiência terapêutica do péptido.

Deve ser claro, a partir da discussão aqui realizada, que o termo "núcleo de trimanosilo" é utilizado para descrever a estrutura de glicano apresentada na Figura 1, no lado esquerdo. Os glicopéptidos possuindo uma estrutura nuclear de trimanosilo também pode possuir açúcares adicionais adicionados a esta, e na maior parte, possuem estruturas adicionais adicionadas a ela, independentemente se os açúcares dão origem a um péptido possuindo uma estrutura de glicano desejada. O termo "estrutura nuclear de trimanosilo elementar" é aqui definida noutro local. Quando o termo "elementar" não está incluído na descrição da "estrutura nuclear de trimanosilo", então o glicano compreende a estrutura nuclear de trimanosilo com açúcares adicionais ligada aos açúcares de manose.

O termo "glicopéptido nuclear de trimanosilo elementar" é aqui utilizado para se referir a um glicopéptido possuindo estruturas de glicano compreendidas principalmente numa estrutura nuclear de trimanosilo elementar. Contudo, também pode conter opcionalmente um resíduo de fucose ligado a esta. Como aqui discutido, glicopéptidos do núcleo de trimanosilo elementar são um material de partida óptimo, e por isso preferido, para o processo de remodelação de glicano da invenção.

Outro material de partida óptimo para o processo de remodelação de glicano da invenção é uma estrutura de glicano possuindo um núcleo de trimanosilo em que um ou dois resíduos de GlcNAc adicionais são adicionados a cada um dos resíduos de manose $\alpha 1,3$ e $\alpha 1,6$ (ver por exemplo, a estrutura na segunda linha da Figura 2, segunda estrutura a contra da esquerda na figura). Esta estrutura é aqui referida como "Man3GlcNAc4." Quando a estrutura é monoantennária, a estrutura é aqui referida como "Man3GlcNAc3." Opcionalmente, esta estrutura pode também conter uma molécula nuclear de fucose. Assim, que a estrutura Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4 foi criada então é possível utilizando os métodos aqui descritos, para criar *in vitro*, uma estrutura de glicano desejada no glicopéptido que confere ao glicopéptido uma ou mais propriedades que aumentam a eficiência terapêutica do péptido.

Na sua forma nativa, os glicopéptidos ligados em N da invenção, e particularmente os glicopéptidos de mamíferos e humanos úteis na presente invenção, são glicosilados ligados em N- com uma estrutura nuclear de trimanosilo e um ou mais açúcares ligados a esta.

Os termos "glicopéptido" e "glicopolipéptido" são aqui utilizados como sinónimos para se referirem a cadeias peptídicas possuindo unidades de açúcar ligadas a estas. Não é aqui feita distinção para diferenciar glicopolipéptidos pequenos ou glicopéptidos de glicopolipéptidos ou

glicopéptidos grandes. Por isso, moléculas de hormonas que possuem muito poucos aminoácidos na sua cadeia peptídica (e.g., frequentemente tão poucos como três aminoácidos) e outros péptidos muito maiores são incluídos nos termos gerais "glicopolipéptido" e "glicopéptido", desde que possuam unidades de açúcar ligadas a este. Contudo, a utilização do termo "péptido" não impede que o péptido seja um glicopéptido.

Um exemplo de um glicopéptido ligado em N possuindo glicosilação desejada é um péptido possuindo um glicano ligado em N possuindo um núcleo de trimanosilo com pelo menos um resíduo de GlcNAc ligado a este. Este resíduo é adicionado ao núcleo de trimanosilo utilizando N-acetil glucosaminiltransferase I (GnT-I). Se for adicionado um segundo resíduo de GlcNAc, é utilizada a N-acetil glucosaminiltransferase II (GnT-II). Opcionalmente, podem ser adicionados resíduos de GlcNAc adicionais com GnT-IV e/ou GnT-V, e pode ser ligado um terceiro resíduo de GlcNAc à manose β 1,4 do núcleo de trimanosilo utilizando N-acetil glucosaminiltransferase III (GnT-III). Opcionalmente, esta estrutura pode ser estendida através do tratamento com β 1,4 galactosiltransferase para adicionar um resíduo de galactose a cada GlcNAc não bifurcado, e ainda mais opcionalmente, utilizando as enzimas α 2,3 ou α 2,6-sialiltransferase, podem ser adicionados resíduos de ácido siálico a cada resíduo de galactose. A adição de um GlcNAc bifurcado ao glicano não é necessário para a subsequente adição de resíduos de galactose e ácido siálico; contudo,

em relação à afinidade para o substrato das enzimas GnT-III de rato e humana, a presença de um ou mais dos resíduos de galactose no glicano impede a adição do GlcNAc bifurcado em que o glicano contendo galactose não é um substrato para estas formas de GnT-III. Assim, nos momentos em que a presença do GlcNAc bifurcado é desejada e estas formas de GnT-III são utilizadas, é importante que o glicano contenha resíduos adicionados de galactose e/ou siálicos, que eles sejam removidos antes da adição do GlcNAc bifurcado. Outras formas de GnT-III podem não necessitar desta ordem específica de substratos para a sua actividade. Na reacção mais preferida, é adicionada à mistura de reacção uma mistura de GnT-I, GnT-II e GnT-III de modo a que os resíduos de GlcNAc possam ser adicionados nessa ordem.

Exemplos de estruturas de glicano que representam os vários aspectos dos péptidos possuindo "glicosilação desejada" são apresentados nos desenhos aqui fornecidos. Os processos precisos para a criação *in vitro* de um péptido possuindo a "glicosilação desejada" são aqui descritos noutro local. Contudo, a invenção não deve de modo algum ser encarada como estando limitada unicamente a qualquer estrutura de glicano aqui revelada. Em vez disso, a invenção deve ser encarada como incluindo qualquer uma e todas as estruturas de glicano que podem ser preparadas utilizando a metodologia aqui fornecida.

Em alguns casos, um núcleo de trimanosilo elementar, isoladamente, pode constituir a glicosilação

desejada de um péptido. Por exemplo, foi demonstrado que um péptido possuindo apenas um núcleo de trimanosilo é um componente útil de uma enzima empregue para tratar a doença de Gaucher (Mistry *et al.*, 1966, *Lancet* 348: 1555-1559; Bijsterbosch *et al.*, 1996, *Eur. J. Biochem.* 237: 344-349).

De acordo com a presente invenção, os seguintes processos para a criação de péptidos possuindo a glicosilação desejada tornam-se óbvios.

a) Começando com um glicopéptido possuindo uma ou mais moléculas de glicano que possuem como uma característica comum uma estrutura nuclear de trimanosilo e pelo menos um ou mais de uma mistura heterogénea ou homogénea de um ou mais açúcares adicionados a esta, é possível aumentar a proporção de glicopéptidos possuindo uma estrutura nuclear elementar de trimanosilo como a única estrutura de glicano ou que possuem Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4 como a única estrutura de glicano. Isto é realizado *in vitro* através da adição sistemática ao glicopéptido de um número de enzimas apropriado numa sequência apropriada que cliva a mistura heterogénea ou homogénea de açúcares na estrutura de glicano até ser reduzida a um estrutura nuclear elementar de trimanosilo ou Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4. Exemplos específicos sobre como isto pode ser realizado irá depender de uma variedade de factores incluindo em grande

parte o tipo de célula na qual o péptido é produzido e consequentemente o grau de complexidade da(s) estrutura(s) de glicano presente(s) no péptido inicialmente produzido pela célula. Exemplos como uma estrutura complexa de glicano pode ser reduzida a uma estrutura elementar nuclear de trimanosilo ou de Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4 são apresentados na Figura 2 ou são aqui descritos em detalhe noutra local.

b) É possível criar um péptido possuindo uma estrutura nuclear elementar de trimanosilo como a única estrutura de glicano no péptido isolando uma célula que ocorre naturalmente cuja maquinaria de glicosilação produz um tal péptido. O DNA que codifica um péptido de selecção é então transfectado para a célula em que o DNA é transcrito, traduzido e glicosilado de modo a que o péptido de selecção possua uma estrutura nuclear elementar de trimanosilo como a única estrutura de glicano aí presente. Por exemplo, uma célula que não tem uma enzima GnT-I funcional irá produzir vários tipos de glicopéptidos. Em alguns casos, estes serão glicopéptidos não possuindo açúcares adicionais ligados ao núcleo de trimanosilo. Contudo, noutros casos, os péptidos produzidos podem possuir dois resíduos de manose adicionais ligados ao núcleo de trimanosilo, resultando num glicano Man5. Este é também um material de partida desejado para o

processo de remodelação da presente invenção. Exemplos específicos da criação dessas estruturas de glicano são aqui descritos.

c) Alternativamente, é possível modificar geneticamente uma célula para a converter numa maquinaria de glicosilação específica de modo a que seja produzido um péptido possuindo uma estrutura de núcleo elementar de trimanosilo ou Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4 como a única estrutura de glicano no péptido. O DNA que codifica um péptido de selecção é então transfectado para a célula em que o DNA é transcrito, traduzido e glicosilado, de modo a que o péptido de selecção possua um número aumentado de glicanos compreendendo unicamente uma estrutura nuclear de trimanosilo elementar. Por exemplo, certos tipos de células que são modificadas geneticamente para não terem GnT-I, podem produzir um glicano possuindo uma estrutura nuclear de trimanosilo elementar, ou, dependendo da célula, podem produzir um glicano possuindo um núcleo de trimanosilo mais dois resíduos de manose adicionais ligados a esta (Man5). Quando a célula produz uma estrutura de glicano Man5, a célula pode ser ainda modificada geneticamente para expressar manosidase 3 que remove por clivagem os dois resíduos de manose adicionais para criar o núcleo de trimanosilo. Alternativamente, o glicano Man5 pode ser incubado *in vitro* com manosidase 3 para possuir o mesmo efeito.

d) Quando um péptido é expresso numa célula de insecto, o glicano no péptido compreende uma cadeia parcialmente complexa. As células de insectos também expressam hexosaminidase nas células que apara a cadeia parcialmente complexa de volta para a estrutura nuclear de trimanosilo que pode ser então remodelada como aqui descrito.

e) É imediatamente óbvio a partir da discussão em b), c) e d) que não é necessário que as células produzam apenas péptidos que possuam um núcleo elementar de estruturas de trimanosilo ou Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4 ligadas a estes. Em vez disso, a menos que as células descritas em b) e c) produzam péptidos possuindo 100% de estruturas nucleares de trimanosilo elementares (i.e., não possuindo açúcares adicionais ligados a esta) ou 100% de estruturas Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4, as células de facto produzem uma mistura heterogénea de péptidos possuindo, em combinação, estruturas nucleares de trimanosilo elementares, ou estruturas Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4, como uma única estrutura de glicano adicionalmente a estas estruturas possuindo açúcares adicionais ligados a esta. A proporção de péptidos que possuem um núcleo de estruturas de trimanosilo ou Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4 que possuem açúcares adicionais ligados a este, em oposição às que possuem uma estrutura, irá variar

dependendo da célula que as produz. A complexidade dos glicanos (*i.e.* quais e quantos açúcares são ligados ao núcleo de trimanosilo) irá também variar dependendo da célula que os produz.

f) Assim que um glicopéptido possuindo um núcleo elementar de trimanosilo ou a núcleo de trimanosilo com um ou dois resíduos de GlcNAc ligados a esta é produzido pelos seguintes a), b) ou c) acima, de acordo com a presente invenção, são adicionadas moléculas de açúcar adicionais *in vitro* à estrutura nuclear de trimanosilo para criar um péptido possuindo a glicosilação desejada (*i.e.*, um péptido possuindo uma estrutura de glicano personalizada *in vitro*).

g) Contudo, quando é o caso de ser produzido um péptido possuindo um núcleo elementar de estrutura de trimanosilo ou Man3GlcNAc4 com alguns mas não todos os açúcares desejados ligados a esta, então é apenas necessário adicionar quaisquer açúcares desejados restantes sem reduzir a estrutura de glicano a uma estrutura elementar do núcleo de trimanosilo ou Man3GlcNAc4. Por isso, em alguns casos, a péptido possuindo uma estrutura de glicano possuindo uma estrutura nuclear de trimanosilo com açúcares adicionais ligados a esta, será um substrato adequado para remodelar.

Isolamento de um glicopéptido com núcleo de trimanosilo elementar.

Os glicopéptidos com núcleo elementar de trimanosilo ou Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4 da invenção podem ser isolados e purificados, se necessário, utilizando técnicas bem conhecidas na técnica da purificação de péptidos. Técnicas adequadas incluem técnicas cromatográficas, técnicas de focagem isoelétrica, técnicas de ultrafiltração e semelhantes. Utilizando qualquer uma destas técnicas, pode ser preparada uma composição da invenção na qual os glicopéptidos da invenção são isolados a partir de outros péptidos e de outros componentes normalmente encontrados num meio de cultura de células. O grau de purificação pode ser, por exemplo, 90% em relação a outros péptidos ou 95%, ou mesmo superior, e.g., 98%. Ver, e.g., Deutscher *et al.* (ed., 1990, Guide to Protein Purification, Harcourt Brace Jovanovich, San Diego).

A heterogeneidade dos glicanos ligados a N presentes nos glicopéptidos produzidos pela metodologia da técnica anterior geralmente permite apenas o isolamento de uma pequena porção dos glicopéptidos alvo que podem ser modificados para produzir os glicopéptidos desejados. Nos presentes métodos, podem ser produzidas grandes quantidades de glicopéptidos de núcleo de trimanosilo elementar e outros glicopéptidos desejados, incluindo glicanos Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4, que podem ser então ainda mais modificados para criar grandes quantidades de péptidos possuindo a glicosilação desejada.

O enriquecimento específico de qualquer tipo particular de glicano ligado a um péptido pode ser conseguido utilizando lectinas que possuem uma afinidade para o glicano desejado. Essas técnicas são bem conhecidas na técnica da glicobiologia.

Uma característica chave da invenção que é descrita em maior detalhe abaixo, é que assim que é criada uma estrutura nuclear de glicano em qualquer péptido, a estrutura de glicano é então remodelada *in vitro* para criar um péptido possuindo a glicosilação desejada que melhorou a utilização terapêutica num mamífero. O mamífero pode ser qualquer tipo de mamífero adequado, e é preferencialmente um humano.

Os vários cenários e os métodos e composições precisos para criar péptidos com a glicosilação desejada tornar-se-ão evidentes a partir da revelação que se segue.

O objectivo final da produção de péptidos para utilização terapêutica em mamíferos é que os péptidos devem compreender estruturas de glicano que facilitam, em vez de impedir, o benefício terapêutico do péptido. Como revelado ao longo da presente especificação, os péptidos produzidos nas células podem ser tratados *in vitro* com uma variedade de enzimas que catalisam a clivagem de açúcares que não devem estar presentes no glicano e a adição de açúcares que deve estar presente no glicano de modo a que o péptido que

possui a glicosilação desejada e por isso adequada para utilização terapêutica em mamíferos seja criado. A criação de diferentes glicoformas de péptidos em células é descrita acima. É agora descrita uma variedade de mecanismos para a criação de péptidos possuindo a glicosilação desejada, em que o material de partida *i.e.*, o péptido produzido por uma célula pode diferir de um tipo de célula para outro. Como se tornará óbvio a partir da presente revelação, É necessário que o material de partida seja uniforme em relação à sua composição de glicano. Contudo, é preferível que o material de partida seja enriquecido para certas glicoformas de modo a que sejam produzidas grandes quantidades de produto final, *i.e.*, péptidos correctamente glicosilados.

Numa forma de realização preferida, de acordo com a presente invenção, os eventos de degradação e de síntese que resultam num péptido possuindo a glicosilação desejada envolvem em algum momento, a criação de uma estrutura nuclear elementar de trimanosilo ou uma estrutura de Man3GlcNAc3 ou Man3GlcNAc4 no péptido.

A presente invenção também proporciona meios de adicionar um ou mais resíduos glicosilo seleccionados a um péptido, após os que um açúcar modificado é conjugado com pelo menos um dos resíduos glicosilo seleccionados do péptido. A presente forma de realização é útil, por exemplo, quando se deseja conjugar o açúcar modificado a um resíduo glicosilo seleccionado que não está presente num

péptido ou não está presente numa quantidade desejada. Assim, antes de acoplar um açúcar modificado a um péptido, o resíduo glicosilo seleccionado é conjugado com o péptido por acoplamento enzimático ou químico. Noutra forma de realização, o padrão de glicosilação de um péptido é alterada antes da conjugação do açúcar modificado pela remoção de um resíduo de hidratos de carbono do péptido. Ver por exemplo WO 98/31826.

A adição ou remoção de quaisquer unidades de hidrato de carbono presentes no péptido é realizada quer quimicamente ou enzimaticamente. A desglicosilação química é preferencialmente realizada através da exposição da variante do péptido ao composto de ácido trifluorometanosulfónico, ou um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da maioria ou de todos os açúcares excepto o açúcar de ligação (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), embora deixando o péptido intacto. A desglicosilação química é descrita por Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 e por Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118: 131. A clivagem enzimática de unidades de hidratos de carbono nas variantes do péptido pode ser alcançada através da utilização de uma variedade de endo- e exo-glicosidases, como descrito por Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138: 350.

A adição química de unidades glicosilo é realizada através de qualquer método reconhecido na técnica. A adição enzimática de unidades de açúcar é preferencialmente

alcançada utilizando uma modificação dos métodos aqui estabelecidos, substituindo unidades glicosilo nativas para os açúcares modificados utilizados na invenção. Outros métodos de adicionar unidades de açúcar são revelados nas Patentes U.S. N°. 5 876 980, 6 030 815, 5 728 554, e 5 922 577.

Pontos de ligação exemplares para o resíduo glicosilo seleccionado incluem, mas não estão limitados a: (a) sítios para N- e O-glicosilação; (b) unidades glicosilo terminais que são aceitadores para uma glicosiltransferase; (c) arginina, asparagina e histidina; (d) grupos carboxilo livres; (e) grupos sulfidrilo livres, tais como os de cisteína; (f) grupos hidroxilo livres, tais como os de serina, treonina, ou hidroxiprolina; (g) resíduos aromáticos, tais como os de fenilalanina, tirosina, ou triptofano; ou (h) o grupo amida de glutamina. Métodos exemplares de utilização na presente invenção são descritos em WO 87/05330 publicado em 11 de Set. de 1987, e em Aplin e Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Trabalhando especificamente com os exemplos apresentados em várias das figuras aqui fornecidas, uma descrição da sequência das reacções enzimáticas *in vitro* para a produção de estruturas de glicano desejadas em péptidos é agora apresentada. As condições de reacção precisas para cada uma das conversões enzimáticas reveladas abaixo são bem conhecidas dos especialistas na técnica da glicobiologia e por isso não são aqui repetidas. Para uma

revisão das condições de reacção para estes tipos de reacções, ver Sadler *et al.*, 1982, *Methods in Enzymology* 83:458-514 e referências aí citadas.

Na Figura 1 é apresentada a estrutura de um glicano de núcleo elementar de trimanosilo no lado esquerdo. É possível converter esta estrutura numa estrutura de glicano completa possuindo um GlcNAc bifurcado incubando a estrutura nuclear elementar de trimanosilo na presença de GnT-I, seguido por GnT-II, e ainda seguido por GnT-III, e um dador de açúcar compreendendo UDP-GlcNAc, em que o GlcNAc é adicionado sequencialmente à estrutura nuclear elementar de trimanosilo para criar um núcleo de trimanosilo possuindo um GlcNAc bifurcado. Em alguns casos, por exemplo quando se remodelam glicanos Fc como aqui descrito, a ordem de adição de GnT-I, GnT-II e GnT-III pode ser contrária à relatada na literatura. A estrutura do GlcNAc bifurcado pode ser produzida adicionando a mistura de GnT-I, GnT-II e GnT-III e UDP-GlcNAc à mistura de reacção.

Na Figura 3 não é apresentada a conversão de um GlcNAc bifurcado contendo o núcleo de trimanosilo glicano numa estrutura complexa de glicano compreendendo galactose e ácido N-acetil neuramínico. O GlcNAc bifurcado contendo o glicano de núcleo de trimanosilo é primeiro incubado com galactosiltransferase e UDP-Gal como uma molécula dadora, em que os dois resíduos de galactose são adicionados aos resíduos GlcNAc periféricos na molécula. A enzima NeuAc-

transferase é então utilizada para adicionar dois resíduos NeuAc uma para cada um dos resíduos de galactose.

Na Figura 4 é apresentada a conversão de uma estrutura de glicano de manose elevada num glicano elementar de núcleo de trimanosilo. O glicano de manose elevada (Man9) é incubado sequencialmente na presença da manosidase 1 para criar uma estrutura Man5 e depois na presença de manosidase 3, em que todos menos três resíduos de manose são removidos do glicano. Alternativamente, a incubação da estrutura Man9 pode ser aparada de volta para a estrutura nuclear de trimanosilo unicamente por incubação na presença de manosidase 3. De acordo com os esquemas apresentados nas Figuras 1 e 3 acima, a conversão deste glicano elementar de núcleo de trimanosilo numa molécula de glicano complexa é então possível.

Na Figura 5 é apresentado uma estrutura de glicano complexo típico ligado em N produzida em células vegetais. É importante notar que quando as células vegetais são deficientes na actividade enzimática de GnT-I, não podem ser adicionados xilose e fucose ao glicano. Assim, a utilização de células com GnT-I desactivado proporciona uma vantagem particular na presente invenção na qual estas células produzem péptidos possuindo um núcleo de trimanosilo elementar no qual os açúcares adicionais podem ser adicionados sem realizar quaisquer reacções de "aparar de volta". De um modo semelhante, nos casos em que a estrutura produzida numa célula vegetal pode ser da

variedade Man5 de glicano, se GnT-I estiver ausente nestas células, a xilose e a fucose não podem ser adicionadas a esta estrutura. Neste caso, a estrutura Man5 pode ser aparada de volta para um núcleo elementar de trimanosilo (Man3) utilizando manosidase 3. De acordo com os métodos aqui fornecidos, é agora possível adicionar unidades de açúcar desejadas ao núcleo de trimanosilo para criar uma estrutura de glicano desejada.

Na Figura 6 é apresentado uma estrutura de complexo típico de glicano ligado em N produzida em células de insectos. Como é evidente, açúcares adicionais, tais como, por exemplo, fucose também podem estar presentes. Além disso, embora não seja aqui apresentado, as células de insecto podem produzir glicanos de manose elevada possuindo tantos quantos nove resíduos de manose e podem possuir açúcares adicionais ligados a estes. É também o caso em células de insecto nas quais células com GnT-I desactivado previnem a adição de resíduos de fucose ao glicano. Assim, a produção de um péptido em células de insectos podem preferencialmente ser acompanhados numa célula com GnT-I desactivado. O glicano assim produzido pode ser então aparado de volta *in vitro* se necessário utilizando qualquer um dos métodos e esquemas aqui descritos, e podem ser adicionados a este açúcares adicionais *in vitro*, também utilizando os métodos e esquemas aqui fornecidos.

Na Figura 2 são apresentadas estruturas de glicano em vários estágios de realização. Especificamente,

é apresentada a criação enzimática *in vitro* de uma estrutura nuclear elementar de trimanosilo a partir de uma estrutura de glicano complexa de hidratos de carbono, que não contém um resíduo de GlcNAc bifurcado. É também apresentada a criação de uma estrutura de glicano a partir deste que contém um GlcNAc bifurcado. São apresentadas várias estruturas de glicano intermédias que podem ser produzidas. Estas estruturas podem ser produzidas por células, ou podem ser produzidas nas reacções de aparar de volta *in vitro* aqui descritas. Podem ser adicionadas unidades de açúcar *in vitro* à estrutura nuclear de trimanosilo elementar, ou a qualquer estrutura intermédia adequada, de modo a que seja produzido um glicano desejado.

Na Figura 7 é apresentada uma série de possíveis reacções *in vitro* que podem ser realizadas para aparar de volta e adicionar em glicanos começando com uma estrutura de manose elevada. Por exemplo, pode ser aparado um glicano Man9 utilizando manosidase 1 para criar um glicano Man5, ou pode ser aparado para um núcleo de trimanosilo utilizando manosidase 3 ou um ou mais manosidases microbianas. Podem ser então utilizadas GnT-I e ou GnT-II para transferir resíduos GlcNAc adicionais ao glicano. Para além disso, é apresentada a situação que não ocorreria quando a molécula de glicano é produzida numa célula que não possui GnT-I (ver caixa sombreada). Por exemplo, podem ser adicionados fucose e xilose a um glicano apenas quando a GnT-I está activa e facilita a transferência de um GlcNAc à molécula.

A Figura 8 apresenta estratégias bem conhecidas para a síntese de estruturas biantenárias, triantenárias e mesmo tetra-antenárias de glicano começando com a estrutura nuclear de trimanosilo. De acordo com os métodos da invenção, é possível sintetizar cada uma destas estruturas *in vitro* utilizando as enzimas e as condições de reacção apropriadas bem conhecidas na técnica da glicobiologia.

A Figura 9 apresenta dois métodos para a síntese de uma estrutura de glicano monoantenária começando por estruturas de glicano de uma manose elevada (6 a 9 unidades de manose). Pode ser adicionada uma unidade terminal de ácido siálico-PEG em vez da unidade de ácido siálico de acordo com a metodologia de glicoPEGuilação aqui descrita. No primeiro método, é utilizado endo-H para clivar a estrutura de glicano no péptido de volta para o primeiro resíduo de GlcNAc. É então adicionada galactose utilizando galactosiltransferase e PEG sialilado como aqui descrito noutro local. No segundo método, a manosidase I é utilizada para clivar os resíduos manose da estrutura de glicano no péptido. É adicionado um resíduo de galactose a um braço dos restantes resíduos de manose que foram removidos por clivagem do glicano utilizando α -manosidade de feijão-de-porco. É então adicionado PEG sialilado a esta estrutura, como indicado.

A Figura 10 apresenta dois métodos adicionais para a síntese de estruturas de glicano monoantenárias começando em estrutura de glicano de manose elevada (6 a 9

unidades de manose). Como na Figura 9, pode ser adicionada uma unidade terminal de ácido siálico-PEG em vez da unidade de ácido siálico, de acordo com a metodologia de glicoPEGuilação aqui descrita. Na situação aqui descrita, alguns dos resíduos de manose do braço ao qual o PEG sialilado não é adicionado, são removidos.

Na Figura 11 é apresentado um esquema para a síntese de estrutura de hidrato de carbonos ainda mais complexa começando com uma estrutura nuclear de trimanossilo. Por exemplo, é apresentado um esquema para a produção *in vitro* de estruturas de antigénio de Lewis x e Lewis a, que podem ser ou não sialiladas. Essas estruturas quando estão presentes num péptido podem conferir ao péptido vantagens imunológicas para regulação positiva ou regulação negativa da resposta imunitária. Adicionalmente, essas estruturas são úteis para direccionar o péptido para células específicas, nestes tipos de estruturas estão envolvidas na ligação a péptidos de adesão à célula e semelhantes.

A Figura 12 é um esquema exemplar para preparar uma sequência de péptidos ligados em O originando com serina ou treonina.

A Figura 13 é uma série de diagramas que apresentam os quatro tipos de estrutura de glicano ligada a O, denominados núcleos 1 até 4. A estrutura de núcleo é delineada nas linhas ponteadas. Os açúcares que também

podem ser incluídos nesta estrutura incluem resíduos de ácido siálico adicionados aos resíduos de galactose, e resíduos de fucose adicionados aos resíduos GlcNAc.

Assim, em formas de realização preferidas, a presente invenção proporciona um método de produção de um glicopéptido glicosilado ligado a N- proporcionando um glicopéptido isolado e purificado ao qual se liga um núcleo elementar de trimanosilo ou uma estrutura Man3GlcNAc4, colocando em contacto o glicopéptido com uma enzima glicosiltransferase e uma molécula dadora possuindo uma unidade glicosilo em condições adequadas para transferir a unidade glicosilo ao glicopéptido. A personalização de um glicopéptido de núcleo de trimanosilo ou glicopéptido Man3GlcNAc4 para produzir um péptido possuindo um padrão de glicosilação desejado é então realizado pela adição sequencial das unidades de açúcar desejadas, utilizando técnicas bem conhecidas na especialidade.

Determinação da Estrutura Primária de Glicano

Quando um glicopéptido ligado em N é produzido por uma célula, como aqui referido noutro local, pode compreender uma mistura heterogénea de estruturas de glicano que devem ser reduzidas a um núcleo comum geralmente elementar de trimanosilo, ou estrutura Man3GlcNAc4, antes de adicionar outras unidades de açúcar a este. De modo a determinar exactamente que açúcares devem ser removidos de qualquer estrutura de glicano particular, é

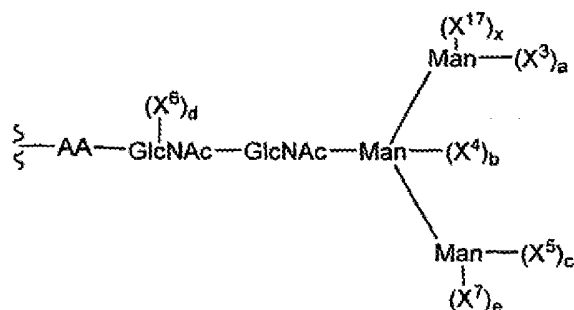
por vezes necessário que a estrutura primária e glicano seja identificada. São bem conhecidas na especialidade técnicas para a determinação da estrutura primária do glicano e são descritas em detalhe, por exemplo, em Montreuil, "Structure e Biosynthesis of Glycopeptides" em Polysaccharides in Medicinal Applications, pp. 273-327, 1996, Eds. Severian Damitriu, Marcel Dekker, NY. É por isso uma matéria simples para um especialista na técnica de glicobiologia isolar uma população de péptidos produzidos por uma célula e determinar a(s) estrutura(s) dos glicanos ligados a esta. Por exemplo, estão disponíveis métodos eficientes para (i) uma separação de ligações glicosídicas quer por clivagem química, tal como hidrólise, acetólise, hidrazinólise, ou por desaminação nitrosa; (ii) metilação completa seguida por hidrólise ou metanólise e por cromatografia gás-líquido e espectroscopia de massa dos monossacáridos parcialmente metilados; e (iii) a definição de ligações anoméricas entre monossacáridos utilizando exoglicosidases, que também proporcionam conhecimento na estrutura primária de glicano por degradação sequencial. Em particular, foram utilizadas com sucesso as técnicas de espectroscopia de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), especialmente NMR de campo elevado para determinar a estrutura primária de glicano.

Estão também disponíveis comercialmente kits e equipamentos para a análise de hidratos de carbono. Está disponível Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE®) de Glyko, Inc. (Novato, CA). Na análise por

FACE, são libertados glicoconjugados do péptido com Endo H ou N-glicanase (PNGase F) para glicanos ligados em N, ou hidrazina para glicanos ligados em Ser/Thr. O glicano é então marcado na extremidade de redução com um fluoróforo de um modo não discriminativo da estrutura. Os glicanos marcados com fluoróforo são então separados em géis de poliacrilamida com base na proporção carga/massa do sacárido assim como o volume hidrodinâmico. São retiradas imagens do gel sob luz UV e a composição dos glicanos são determinados pela distância de migração em comparação com os padrões. Os oligossacáridos podem ser sequenciados deste modo através da análise de desvios de migração devido à remoção sequencial de sacáridos por digestão de exoglicosidase.

Formas de realização exemplificativas

A remodelação da glicosilação ligada a N é melhor ilustrada com referência à fórmula 1:



em que X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 e X^{17} são (seleccionados independentemente) resíduos de monossacárido ou oligossacárido; e

a, b, c, d, e e x são (seleccionados independentemente) 0, 1 ou 2, com a condição de pelo menos um membro seleccionado a partir de a, b, c, d, e e x são 1 ou 2.

A fórmula 1 descreve a estrutura de glicano compreendendo o núcleo de tri-manosilo, que está preferencialmente ligado covalentemente a um resíduo de asparagina numa estrutura peptídica. Sistemas de expressão preferidos irão expressar e secretar péptidos exógenos com glicanos ligados a N compreendendo o núcleo de trimanosilo. Utilizando o método de remodelação da invenção, as estruturas de glicano nestes péptidos podem ser remodelados convenientemente em qualquer estrutura de glicano desejada. Condições de reacção exemplares são encontradas ao longo dos exemplos e na literatura.

Em formas de realização preferidas, as estruturas de glicano são remodeladas de modo a que a estrutura descrita na fórmula 1 possua determinantes específicos. A estrutura do glicano pode ser seleccionada para aumentar a actividade biológica do péptido, dar ao péptido uma nova actividade biológica, remover a actividade biológica do péptido, ou aproximar melhor o padrão de glicosilação do péptido nativo, entre outros.

Na primeira forma de realização preferida, os glicanos de péptido ligados a N são remodelados para melhor aproximar o padrão de glicosilação de proteínas nativas

humanas. Nesta forma de realização, a estrutura de glicano descrita na fórmula 1 é remodelada para possuir as seguintes unidades:



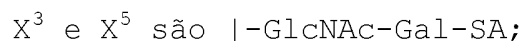
a e c=1;

d= 0 ou 1;

b,e e x=0.

Esta forma de realização é particularmente vantajosa para péptidos humanos expressos em sistemas de expressão celular heterólogos. Ao remodelar as estruturas de glicano ligadas a N para esta configuração, o péptido pode ser tornado menos imunogénico num doente humano, e/ou mais estável, entre outros.

Na segunda forma de realização preferida, os glicanos de péptido ligados a N são remodelados para possuírem um resíduo de GlcNAc no núcleo de trimanosilo. Nesta forma de realização, a estrutura de glicano descrita na fórmula 1 é remodelada para possuir as seguintes unidades:



a e c= 1;

X⁴ é GlcNAc;

b=1;

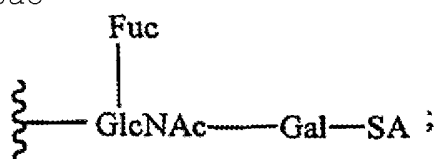
$d = 0$ ou 1 ;

e e $x = 0$.

Esta forma de realização é particularmente vantajosa para moléculas de anticorpo recombinante expressas em sistemas celulares heterólogos. Quando a molécula de anticorpo inclui uma citotoxicidade celular mediada por Fc, é conhecido que a presença de oligossacáridos bifurcados ligados ao domínio Fc aumentaram dramaticamente a citotoxicidade celular dependente do anticorpo.

Numa terceira forma de realização preferida, os glicanos de péptido ligados a N são remodelados para possuírem uma unidade sialilada de Lewis X. Nesta forma de realização, a estrutura de glicano descrita na fórmula 1 é remodelada para possuir as seguintes unidades:

X^3 e X^5 são



$a, c, d = 1$;

b, e e $x = 0$;

$X^6 =$ fucose.

Esta forma de realização é particularmente vantajosa quando o péptido que está a ser remodelado pretende ser dirigida a moléculas de selectina e a células que as apresentam.

Numa quarta forma de realização preferida, os péptidoglicanos ligados a N são remodelados para possuírem uma unidade conjugada. Uma unidade conjugada pode ser uma molécula de PEG, outro péptido, uma molécula pequena, tal como um fármaco, entre outros. Nesta forma de realização, a estrutura de glicano descrita na fórmula 1 é remodelada para possuir as seguintes unidades:

X^3 e X^5 são $|-GlcNAc-Gal-SA-R;$

a e $c = 1$ ou $2;$

$d = 0$ ou $1;$

b, d, e e $x = 0;$

em que $R =$ grupo conjugado.

A unidade conjugada pode ser uma molécula de PEG, outro péptido, uma pequena molécula tal como um fármaco, entre outros. Esta forma de realização é por isso útil para conjugar o péptido com moléculas de PEG que irão abrandar a eliminação do péptido a partir da corrente sanguínea do doente, a péptidos que irão direccionar ambos os péptidos para um tecido ou célula específica, ou para outro péptido de utilização terapêutica complementar.

Será claro para um especialista na técnica que a invenção não está limitada às moléculas de glicano preferidas descritas acima. As formas de realização preferidas são apenas algumas das moléculas de glicano muito úteis que

podem ser realizadas pelo método de remodelação da invenção. Os especialistas na técnica saberão como construir outros glicanos úteis.

Nas primeiras formas de realização exemplares, o péptido é expresso numa CHO (linha celular de ovário de hamster chinês) de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Quando um péptido com glicano ligado em sítios de consenso N é expresso e secretado a partir de células CHO, os glicanos ligados a N terão as estruturas apresentadas na fila de cima da Figura 2, mas também compreendendo um núcleo de fucose. Embora todas estas estruturas possam estar presentes, de longe as estruturas mais comuns são as duas do lado direito. Nos termos da fórmula 1,

X^3 e X^5 são $|-GlcNAc-Gal-(SA);$

a e $c = 1;$

b, e e $x = 0,$ e

$d=0$ ou $1.$

Por isso, numa forma de realização exemplar, os glicanos ligados a N dos péptidos expressos em células CHO são remodelados para o glicano humanizado preferido colocando em contacto os péptidos com uma glicosiltransferase que é específica para uma molécula aceitadora de galactose e uma molécula dadora de ácido siálico. Este processo é ilustrado na Figura 2 e no Exemplo 17. Noutra forma de realização exemplar, os glicanos ligados a N de um péptido

expresso e secretado a partir das células CHO são remodelados para serem as estruturas PEGuiladas preferidas. O péptido é primeiro colocado em contacto com uma glicosidase específica para o ácido siálico para remover a unidade SA terminal, e depois contactado com uma glicosiltransferase específica para uma unidade aceitadora de galactose e uma unidade aceitadora de ácido siálico, na presença de moléculas dadoras de PEG- ácido siálico-nucleótido. Opcionalmente, o péptido pode ser então colocado em contacto com uma glicosiltransferase específica para uma unidade aceitadora de galactose e uma unidade aceitadora de ácido siálico, na presença de moléculas dadoras de ácido siálico-nucleótido para assegurar a protecção completa de SA de todas as moléculas de glicano.

Noutras formas de realização exemplares, o péptido é expresso em células de insecto, tais como a linha celular sf9, de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Quando um péptido com glicano ligado em N em sítios de consenso é expresso e secretado a partir de células sf9, os glicanos ligados a N terão frequentemente as estruturas apresentadas na linha de cima da Figura 6. Nos termos da fórmula 1:

X^3 e X^5 são $|- \text{GlcNAc}$;

a e c=0 ou 1;

b=0; X^6 é fucose,

d = 0, 1 ou 2; e

e e x=0.

O núcleo de trimanose está presente na vasta maioria dos glicanos ligados a N produzidos pelas células de insecto, e por vezes estão também presentes resíduos antenários de GlcNAc e/ou. Note-se que o glicano pode não possuir núcleo de fucose, pode possuir um único núcleo de fucose possuindo ligação, ou pode possuir um único núcleo de fucose com uma preponderância de uma ligação simples. Numa forma de realização exemplar, os glicanos ligados a N de um péptido expresso e secretado a partir de células de insecto são remodelados para a forma de glicano humanizado preferida primeiro colocando em contacto os glicanos com uma glicosidase específica para as moléculas de fucose, depois colocando em contacto os glicanos com uma glicosiltransferase específica para a molécula aceitadora de manose em cada antenário do núcleo de trimanose, uma molécula dadora de GlcNAc na presença de moléculas de nucleótido-GlcNAc; depois colocando em contacto os glicanos com uma glicosiltransferase específica para uma molécula aceitadora de GlcNAc, uma molécula dadora de Gal na presença de moléculas de nucleótido-Gal; e depois colocando em contacto os glicanos com uma glicosiltransferase específica para uma molécula aceitadora de galactose, a molécula dadora do ácido siálico na presença de moléculas nucleótido-SA. Um especialista na técnica irá entender que as moléculas de fucose, se existirem, podem ser removidas em qualquer momento durante o processo, e se o núcleo de fucose é da mesma ligação alfa 1,6 que se encontra nos glicanos humanos, podem ser deixadas intactas. Noutra forma

de realização exemplar, o glicano humanizado do exemplo anterior é ainda remodelado no glicano sialilado Lewis X colocando em contacto o glicano ainda com uma glicosil-transferase específica para uma molécula aceitadora de GlcNAc, uma molécula dadora de fucose na presença de moléculas de nucleótido-fucose. Este processo é ilustrado na Figura 11 e no Exemplo 39.

Ainda noutras formas de realização exemplares, o péptido é expresso em leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Quando um péptido com glicano ligado em sítios de consenso N é expresso e secretado a partir de células de *S. cerevisiae*, os glicanos ligados a N possuirão as estruturas apresentadas à esquerda na Figura 4. Os glicanos ligados em N possuirão sempre o núcleo de trimanosilo, que será frequentemente elaborado com manose ou polissacáridos relacionados até 1000 resíduos. Nos termos da fórmula 1:

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

$$a \text{ e } c = 1 \text{ ou } 2;$$

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

Numa forma de realização exemplar, os glicanos ligados a N de um péptido expresso e secretado a partir de células de leveduras são remodelados para o núcleo de trimanose elementar colocando primeiro em contacto os glicanos com uma glicosidase específica com moléculas de $\alpha 2$

manose, depois colocando em contacto os glicanos com uma glicosidase específica para moléculas de $\alpha 6$ manose. Este processo é ilustrado na Figura 4 e no Exemplo 38.

Noutra forma de realização exemplar, os glicanos ligados a N são ainda remodelados para tornar um glicano adequado para um anticorpo recombinante com função de toxicidade celular mediada por Fc colocando em contacto os glicanos do núcleo de trimanose elementar com uma glicosiltransferase específica para a molécula aceitadora de manose em cada antenário do núcleo de trimanose e uma molécula dadora de GlcNAc na presença de moléculas de nucleótido-GlcNAc. Então, os glicanos são colocados em contacto com uma glicosiltransferase específica para a molécula aceitadora de manose no meio do núcleo de trimanose, uma molécula dadora de GlcNAc na presença de moléculas de nucleótido-GlcNAc e colocar ainda em contacto os glicanos com uma glicosiltransferase específica para uma molécula aceitadora de GlcNAc, uma molécula dadora de Gal na presença de moléculas de nucleótido-Gal; e depois colocar em contacto opcionalmente os glicanos com uma glicosiltransferase específica com uma molécula aceitadora de galactose e ainda opcionalmente uma molécula dadora de ácido siálico na presença de moléculas de nucleótido-SA. Este processo é ilustrado nas Figuras 1, 2 e 3.

Noutra forma de realização exemplar, o péptido é expresso em células bacterianas, em particular células de *E. coli*, de acordo com métodos bem conhecidos na técnica.

Quando um péptido com glicanos ligados a N com sítios de consenso é expresso em células de *E. coli*, os sítios de consenso ligados a N não serão glicosilados. Numa forma de realização exemplar, uma molécula de glicano humanizada é construída a partir da estrutura do péptido colocando em contacto os péptidos com uma glicosiltransferase específica para um sítio de consenso ligado a N e uma molécula dadora de GlcNAc na presença de nucleótido-GlcNAc; e ainda sequencialmente colocar em contacto os glicanos em crescimento com glicosiltransferases específicas para as unidades aceitadoras e dadora no presente da unidade dadora necessária até que a estrutura de glicano desejada seja completada. Quando um péptido com glicanos ligados a N é expresso em células eucarióticas mas sem as sequências líder apropriadas que dirigem o péptido nascente para o aparelho de golgi, o péptido maduro provavelmente não será glicosilado. Neste caso, também, podem ser fornecida ao péptido glicosilação ligada em N, construindo a partir do sítio de consenso ligado a N do péptido, como acima mencionado. Quando uma proteína é quimicamente modificada com uma unidade de açúcar, pode ser construída como acima mencionado.

Estes exemplos pretendem ilustrar a invenção, e não limitá-la. Um especialista na técnica irá apreciar que os passos tomados em cada exemplo pode, em algumas circunstâncias, podem ser realizadas numa ordem diferente para produzir o mesmo resultado. Um especialista na técnica também entenderá que um conjunto diferente de passos pode

também produzir o mesmo glicano resultante. O glicano remodelado preferido não é de forma alguma específico para o sistema de expressão no qual o péptido é expresso. Os glicanos remodelados são apenas ilustrativos e um especialista na técnica saberá como retirar os princípios destes exemplos e aplicá-los aos péptidos produzidos em diferentes sistemas de expressão para produzir glicanos não especificamente aqui descritos.

B. Método para remodelar glicanos ligados em O

A O-glicosilação é caracterizada pela ligação de uma variedade de monossacáridos numa ligação O-glicosídica a aminoácidos hidroxilo. A O-glicosilação é uma modificação pós-tradução muito espalhada nos reinos animal e vegetal. A complexidade estrutural dos glicanos ligados em O a proteínas excede vastamente a dos glicanos ligados em N. Os resíduos de serina ou treonina de um péptido traduzido de novo tornam-se modificados em virtude de uma peptidil GalNAc transferase nos compartimentos cis para trans do Golgi. O sítio de O-glicosilação é determinado não apenas pela especificidade da sequência da glicosiltransferase, mas também pela regulação epigenética mediada pela competição entre diferentes sítios de substrato e competição com outras glicosiltransferases responsáveis pela formação do glicano.

O glicano ligado em O tem sido definido arbitrariamente como possuindo três regiões: o núcleo, a região de

esqueleto e a região periférica. A região do "núcleo" de um glicano ligado em O é constituída pelos dois ou três açúcares mais internos da cadeia de glicano proximal em relação ao péptido. A região de esqueleto contribui principalmente para o comprimento da cadeia de glicano formada por alongamento uniforme. A região periférica apresenta um grau elevado de complexidade estrutural. A complexidade estrutural dos glicanos ligados em O começa com a estrutura do núcleo. Na maioria dos casos, o primeiro resíduo de açúcar adicionado ao glicano ligado em O em sítio de consenso é o GaINAc; contudo o açúcar pode também ser GlcNAc, glucose, manose, galactose ou fucose, entre outros. A Figura 12 é um diagrama de algumas das estruturas de núcleo de glicano ligado em O conhecidas e das enzimas responsáveis pela sua síntese *in vivo*.

Em células de mamíferos, são encontradas pelo menos oito estruturas de núcleo ligadas em O diferentes, todas baseadas num resíduo núcleo-a-GalNAc. As quatro estruturas de núcleo apresentadas na Figura 13 são a mais comum. O núcleo 1 e o núcleo 2 são as estruturas mais abundantes em células de mamíferos, e o núcleo 3 e o núcleo 4 são encontrados em sistemas de expressão característicos para os órgãos mais restritos. Os glicanos ligados em O são revistos em Montreuil, Structure and Synthesis of Glycopeptides, em Polysaccharides in Medicinal Applications, pp. 273-327, 1996, Eds. Severian Damitriu, Marcel Dekker, NY, e em Schachter e Brockhausen, The Biosynthesis of Branched O-Linked Glycans, 1989, Society for Experimental Biology, pp. 1-26 (Great Britain).

Será óbvio a partir da present revelação que a estrutura de glicano de péptidos O-glicosilados podem ser remodelados utilizando técnicas semelhantes às descritas para glicanos ligados em N. Os O-glicanos diferem dos N-glicanos na medida em que estão ligados a um resíduo de serina ou treonina em vez de um resíduo de asparagina. Como aqui descrito em relação à remodelação de N-glicano, as enzimas hidrolíticas podem ser utilizadas para clivar unidades de açúcar indesejadas num glicano ligado em O e podem ser adicionados a este açúcares adicionais desejados, para construir uma estrutura de O-glicano personalizada no péptido (Ver Figuras 12 e 13).

O passo inicial da O-glicosilação em células de mamíferos é a ligação de N-acetilgalactosamina (GalNAc) utilizando qualquer uma de uma família de pelo menos onze α -N-acetilgalactosaminiltransferases conhecidas, cada uma das quais possui uma especificidade para o péptido aceitador restrito. Geralmente, o péptido aceitador reconhecido por cada enzima constitui uma sequência de pelo menos dez aminoácidos. Os péptidos que contêm a sequência de aminoácidos reconhecida por uma GalNAc-transferase particular tornam-se O-glicosilados no sítio aceitador se forem expressos numa célula que expressa a enzima e se forem localizados apropriadamente para o aparelho de Golgi no qual UDP-GalNAc também está presente.

Contudo, no caso de proteínas recombinantes, a

ligação inicial da GalNAc pode não ocorrer. A enzima α -N-acetilgalactosaminiltransferase nativa para a célula que expressa pode possuir uma especificidade da sequência de consenso que difere daquela do péptido recombinante a ser expresso.

O péptido recombinante desejado pode ser expresso numa célula bacteriana, tal como *E. coli*, que não sintetiza cadeias de glicano. Nestes casos, é vantajoso adicionar a unidade inicial GalNAc *in vitro*. A unidade GalNAc pode ser introduzida *in vitro* no péptido uma vez que o péptido recombinante foi recuperado numa forma solúvel, colocando o contacto o péptido com a GalNAc transferase apropriada na presença de UDP-GalNAc.

Numa forma de realização, pode estar presente uma sequência de aminoácidos adicional que constitui um aceitador eficaz para transferência de um açúcar ligado em O. Uma tal sequência de aminoácidos é codificada por uma sequência de DNA fundida em grelha com a sequência codificante do péptido, ou alternativamente, pode ser introduzida por meios químicos. O péptido pode, por outro lado, não ter cadeias de glicano. Alternativamente, o péptido pode possuir cadeias de glicano ligadas em N- e/ou em O mas requer um sítio de glicosilação adicional, por exemplo, quando é desejado um substituinte de glicano adicional.

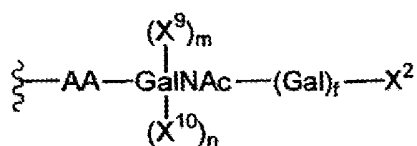
Numa forma de realização exemplar, a sequência de

aminoácidos PTTTK-COOH, que é a sequência aceitadora de GalNAc natural na mucina humana MUC-1, é adicionada como uma etiqueta de fusão. A proteína de fusão é então expressa em *E. coli* e purificada. O péptido é então colocado em contacto com GalNAc-transferases recombinantes humanas T3 ou T6 na presença de UDPGalNAc para transferir um resíduo de GalNAc para o péptido *in vitro*.

Esta cadeia de glicano no péptido pode ser então ainda alongada utilizando os métodos descritos na referência aos glicanos ligados em N ou em O aqui referidos. Alternativamente, a reacção da GalNAc transferase pode ser realizada na presença de UDP-GalNAc para o qual o PEG é covalentemente substituído nas posições O-3, 4, ou 6 ou na posição N-2. A glicosilação é aqui descrita em detalhe noutro local. Qualquer antigenicidade introduzida no péptido pela nova sequência peptídica pode ser convenientemente mascarada por PEGuilação do glicano associado. A técnica de fusão do sítio aceitador pode ser utilizada para introduzir não apenas uma unidade PEG, mas para introduzir outras unidades de glicano e de não glicano, incluindo, mas não limitados a, toxinas, anti-infecciosos, agentes citotóxicos, quelantes para radionucleótidos, e glicanos com outras funcionalidades, tal como direccionamento para o tecido.

Formas de realização exemplificativas

A remodelação da glicosilação ligada em O é melhor ilustrada com referência à fórmula 2:



A fórmula 2 descreve uma estrutura de glicano compreendendo um GalNAc que está ligado covalentemente preferencialmente a um resíduo de serina ou treonina numa estrutura de péptido. Embora esta estrutura seja utilizada para ilustrar as formas mais comuns de glicanos ligados em O, não deve ser encarada como limitante da invenção unicamente para esses glicanos ligados em O. São ilustradas na Figura 12 outras formas de glicanos ligados em O. Sistemas de expressão preferidos úteis na presente invenção expressam e secretam péptidos exógenos possuindo glicanos ligados em O compreendendo o resíduo GalNAc. Utilizando os métodos de remodelação da invenção, as estruturas de glicano nestes péptidos podem ser remodeladas convenientemente para criar qualquer estrutura de glicano desejada. Um especialista na técnica irá entender que os glicanos ligados em O podem ser remodelados utilizando os mesmos princípios, enzimas e condições de reacção que aqueles disponíveis na técnica uma vez munidos com a presente revelação. Condições de reacção exemplares podem ser encontradas ao longo dos Exemplos.

Em formas de realização preferidas, as estruturas de glicano são remodeladas de modo a que a estrutura descrita na fórmula 2 possua unidades específicas. A

estrutura do glicano pode ser escolhida para aumentar a actividade biológica do péptido, conferir ao péptido uma nova actividade biológica, remover ou alterar a actividade biológica do péptido, ou aproximar melhor o padrão de glicosilação do péptido nativo, entre outros.

Na primeira forma de realização preferida, os glicanos de péptido ligados em O são remodelados para melhor aproximar o padrão de glicosilação das proteínas nativas humanas. Nesta forma de realização, a estrutura de glicano descrita na fórmula 2 é remodelada para possuir as seguintes unidades:

X^2 é $|-SA$; ou $|-SA-SA$;

f e $n=0$ ou 1 ;

X^{10} é SA ;

$m = 0$.

Esta forma de realização é particularmente vantajosa para péptidos humanos expressos em sistemas de expressão celular heterólogos. Ao remodelar as estruturas de glicano ligadas em O para terem esta configuração, o péptido pode ser tornado menos imunogénico num doente humano e/ou mais estável.

Na outra forma de realização preferida, os glicanos de péptido ligados em O são remodelados para apresentar um antigénio sialilado Lewis X. Nesta forma de

realização, a estrutura de glicano descrita na fórmula 2 é remodelada para possuir as seguintes unidades:

$$X^2 \text{ é } |-SA;$$

$$X^{10} \text{ é Fuc ou } |-GlcNAc(Fuc)Gal-SA;$$

$$F \text{ e } n = 1;$$

$$m = 0..$$

Esta forma de realização é particularmente vantajosa quando o péptido que está a ser remodelado é mais eficaz quando direccionado para uma molécula de selectina e as células a apresentam.

Ainda noutra forma de realização preferida, os glicanos de péptido ligados em O são remodelados para conter uma unidade conjugada. A unidade conjugada pode ser uma molécula de PEG, outro péptido, uma molécula pequena tal como um fármaco, entre outros. Nesta forma de realização, a estrutura de glicano descrita na fórmula 2 é remodelada para possuir as seguintes unidades:

$$X^2 \text{ é } |-SA-R,$$

$$f = 1;$$

$$nandm=0; \text{ em que } R \text{ é o grupo conjugado.}$$

Esta forma de realização é útil para conjugar o

péptido com moléculas de PEG que irão retardar a eliminação do péptido da corrente sanguínea do doente, para péptidos que irão direccionar ambos os péptidos para um tecido ou célula específica ou para outro péptido de utilidade terapêutica complementar.

Será claro para um especialista na técnica que a invenção não está limitada às moléculas de glicano preferidas descritas acima. As formas de realização preferidas são apenas algumas das moléculas de glicano muito úteis que podem ser preparadas utilizando os métodos de remodelação da invenção. Os especialistas na técnica saberão como preparar outros glicanos úteis uma vez munidos com a presente invenção.

Na primeira forma de realização exemplar, o péptido é expresso em CHO (linha de células de hamster chinês) de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Quando é expresso e secretado um péptido com glicano ligado em sítios de consenso O, a partir de células CHO, a maioria dos glicanos ligados em O irá possuir frequentemente a estrutura, nos termos de fórmula 2,

$$X^2 = \text{— SA};$$

$$f=1;$$

$$m \text{ e } n=0.$$

Por isso, a maioria dos glicanos em células CHO

não necessitam de remodelação para serem aceitáveis para utilização num doente humano. Numa forma de realização exemplar, os glicanos ligados em O de um péptido expresso e secretado a partir de uma célula CHO são remodelados para conterem uma estrutura sialilada de Lewis X colocando em contacto os glicanos com uma glicosiltransferase específica para a unidade aceitadora de GalNAc e a unidade dadora de fucose na presença de nucleótido-fucose. Este processo é ilustrado em glicanos ligados a N na Figura 11 e no Exemplo 39.

Noutras formas de realização exemplares, o péptido é expresso em células de insecto tais como sf9 de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Quando um péptido possuindo glicano ligado em sítios de consenso de O é expresso e secretado a partir da maioria das células sf9, a maioria dos glicanos ligados em O possuem a estrutura, nos termos da fórmula 2:

$$X^2 = H;$$

$$f = 0 \text{ ou } 1;$$

$$n \text{ e } m = 0.$$

Ver, por exemplo, Marchal *et al.*, (2001, *Biol. Chem.* 382:151-159). Numa forma de realização exemplar, o glicano ligado em O num péptido expresso numa célula de insecto é remodelado num glicano humanizado colocando em contacto os glicanos com uma glicosiltransferase específica

para uma molécula aceitadora de GalNAc e uma molécula dadora de galactose na presença de nucleótido-Gal; e depois colocar em contacto os glicanos com uma glicosiltransferase específica para uma molécula aceitadora de Gal e uma molécula dadora de SA na presença de nucleótido-SA. Noutra forma de realização exemplar, os glicanos ligados em O são ainda remodelados a partir da forma humanizada para a forma sialilada de Lewis X colocando ainda em contacto os glicanos com uma glicosiltransferase específica para uma molécula aceitadora de GalNAc e uma molécula dadora de fucose na presença de nucleótido-fucose.

Ainda noutra forma de realização exemplar, o péptido é expresso em células de fungos, em particular células de *S. cerevisiae*, de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Quando um péptido com glicanos ligados em sítios de consenso de O é expresso e secretado a partir de células de *S. cerevisiae*, a maioria dos glicanos ligados em O possuem a estrutura:



Ver Gemmill e Trimble (1999, *Biochim. Biophys. Acta* 1426:227-237). De modo a remodelar estes glicanos ligados em O para utilização em humanos, é preferível que o glicano seja clivado ao nível do aminoácido e reconstruído a partir daí.

Numa forma de realização exemplar, o glicano é o

glicano ligado em O num péptido expresso numa célula de fungos e é remodelada para um glicano humanizado colocando em contacto o glicano com uma endoglicosilase específica para uma ligação aminoácido - GalNAc; e depois colocar em contacto o glicano com uma glicosiltransferase específica para um sítio de consenso ligado em O e uma molécula dadora de GalNAc na presença de nucleótido-GalNAc; colocar em contacto o glicano com uma glicosiltransferase específica para uma molécula aceitadora de GalNAc e uma molécula dadora de galactose na presença de nucleótido-Gal; e depois colocar em contacto os glicanos com uma glicosiltransferase específica para uma molécula aceitadora de Gal e uma molécula dadora de SA na presença de nucleótido-SA.

Alternativamente, noutra forma de realização exemplar, o glicano é o glicano ligado em O num péptido expresso numa célula de fungos e é remodelada para um glicano humanizado colocando em contacto o glicano com uma proteína O-manose β -1,2-Nacetilglucosaminiltransferase (POMGnTI) na presença de GlcNAc-nucleótido; depois colocar em contacto o glicano com uma galactosiltransferase na presença de nucleótido-Gal; e depois contactar o glicano com uma sialiltransferase na presença de nucleótido-SA.

Nutra forma de realização exemplar, o péptido é expresso em células bacterianas, em particular células de *E. coli*, de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Quando um péptido com um glicano ligado no sítio de consenso em O é expresso em células de *E. coli*, O sítio de

consenso ligado a O não será glicosilado. Neste caso, a molécula de glicano desejada deve ser construída a partir da estrutura do péptido de um modo semelhante ao descrito para expressão em *S. cerevisiae* acima. Para além disso, quando um péptido possuindo um glicano ligado em O é expresso numa célula eucariota sem as sequências líder apropriadas para dirigir o péptido nascente para o aparelho de golgi, o péptido maduro provavelmente não será glicosilado. Também neste caso, pode ser adicionada uma estrutura glicosilo ligada em O ao péptido construindo o glicano directamente a partir do sítio de consenso do péptido ligado a O. Além disso, quando uma proteína é modificada quimicamente com uma unidade de açúcar, pode ser também remodelada como aqui descrito.

Estes exemplos pretendem ilustrar a invenção, e não limitá-la de forma alguma. Um especialista na técnica entenderá que os passos dados em cada exemplo podem, em certas circunstâncias, ser realizadas numa ordem diferente para alcançar o mesmo resultado. Um especialista na técnica também entenderá que um conjunto diferente de passos pode também produzir o mesmo glicano resultante. Além disso, o glicano remodelado preferido não é de forma alguma específico para o sistema de expressão no qual o péptido é expresso. Os glicanos remodelados são apenas ilustrativos e um especialista na técnica saberá como retirar os princípios destes exemplos e aplicá-los aos péptidos produzidos em diferentes sistemas de expressão para criar glicanos não descritos aqui especificamente.

C. Glicoconjugação, em geral

A invenção proporciona métodos de preparação de um conjugado de um péptido glicosilado ou um não glicosilado. Os conjugados da invenção são formados entre péptidos e diversas espécies, tais como polímeros solúveis em água, unidades terapêuticas, unidades de diagnóstico, unidades de direccionamento e semelhantes. São também proporcionados conjugados que incluem dois ou mais péptidos ligados em conjunto através de um braço ligante, *i.e.*, conjugados multifuncionais. Os conjugados multifuncionais da invenção podem incluir duas ou mais cópias do mesmo péptido ou uma colecção de diversos péptidos com diferentes estruturas, e/ou propriedades.

Os conjugados da invenção são formados através da ligação enzimática de um açúcar modificado ao péptido glicosilado ou não glicosilado. O açúcar modificado, quando colocado intercalado entre o péptido e o grupo de modificação no açúcar torna-se naquilo que é aqui referido como "um grupo de ligação a glicosilo intacto". Utilizando uma selectividade única de enzimas, tais como glicosiltransferases, o presente método proporciona péptidos que contêm um grupo desejado em um ou mais locais específicos. Assim, de acordo com a presente invenção, é ligado um açúcar modificado directamente ao locus seleccionado na cadeia peptídica ou, alternativamente, o açúcar modificado é anexo numa unidade de hidratos de carbono de um péptido.

Os péptidos nos quais os açúcares modificados estão ligados a um hidrato de carbono do péptido e directamente a um resíduo de aminoácidos da estrutura do péptido estão também dentro do âmbito da presente invenção.

Em contraste com estratégias químicas e enzimáticas conhecidas da elaboração de péptidos, os métodos da invenção tornam possível montar péptidos e glicopéptidos que possuem um padrão de derivatização substancialmente homogéneo; as enzimas utilizadas na invenção são geralmente selectivas para um resíduo de aminoácido particular ou combinação de resíduos de aminoácidos do péptido ou estrutura de glicano particular. Os métodos são também práticos para a produção em grande escala de péptidos e glicopéptidos modificados. Deste modo, os métodos da invenção proporcionam um meio prático para a preparação em grande escala de péptidos possuindo padrões de derivatização pré-seleccionados, substancialmente uniformes. Os métodos são particularmente bem adequados para modificação de péptidos terapêuticos, incluindo mas não limitados a, péptidos que são incompletamente glicosilados durante a produção em células de cultura de células (e.g., células de mamíferos, células de insecto, células vegetais, células de fungos, células de leveduras, ou células procarióticas) ou plantas ou animais transgénicos.

Os métodos da invenção também proporcionam conjugados de péptidos glicosilados e não glicosilados com semi-vida terapêutica aumentada devido a, por exemplo, taxa de

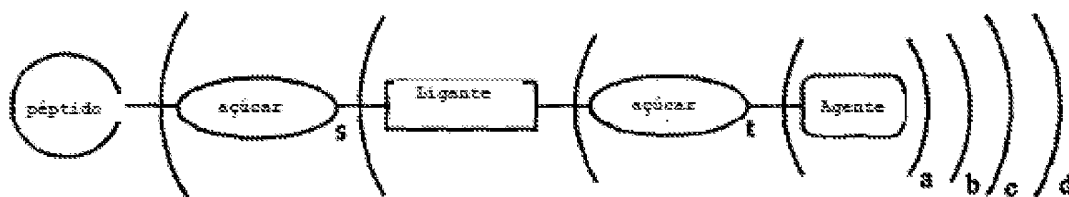
eliminação reduzida, ou taxa reduzida de incorporação pelo sistema imunitário ou reticulo endotelial (RES). Para além disso, os métodos da invenção proporcionam um meio para mascarar determinantes antigénicos em péptidos, reduzindo desse modo ou eliminando uma resposta imunitária do hospedeiro contra o péptido. A ligação selectiva dos agentes de direccionamento também pode ser utilizada para dirigir um péptido a um tecido ou receptor de superfície celular particular que é específico para o agente de direccionamento particular. Para além disso, é proporcionada uma classe de péptidos que são especificamente modificados com uma unidade terapêutica.

1. Os conjugados

Num primeiro aspecto, a presente invenção proporciona um conjugado entre um péptido e uma unidade seleccionada. A ligação entre o péptido e a unidade seleccionada inclui um grupo de ligação a glicosilo intacto interposto entre o péptido e a unidade seleccionada. Como aqui discutido, a unidade seleccionada é essencialmente qualquer espécie que possa ser ligada a uma unidade de sacárido, resultando num "açúcar modificado" que é reconhecido por uma enzima transferase apropriada, que anexa o açúcar modificado no péptido. O componente de sacárido do açúcar modificado, quando interposto entre o péptido e uma unidade seleccionada, torna-se um "grupo de ligação a glicosilo intacto". O grupo de ligação a glicosilo é formado a partir de qualquer mono- ou oligo-sacárido que, após modificação

com uma unidade seleccionada, é um substrato para uma transferase apropriada.

Os conjugados da invenção corresponderão tipicamente à estrutura geral:



na qual os símbolos a, b, c, d e s representam um inteiro positivo, diferente de zero; e t é 0 ou um inteiro positivo. O "agente" é um agente terapêutico, um agente bioactivo, um marcador detectável, unidade solúvel em água ou semelhantes. O "agente" pode ser um péptido, e.g., enzima, anticorpo, antigénio, etc. O ligante pode ser qualquer um de uma vasta sequência de grupos de ligação, *infra*. Alternativamente, o ligante pode ser uma ligação simples ou um "ligante de ordem zero". A identidade do péptido não tem limitação. São fornecidos péptidos exemplares na Figura 28.

Numa forma de realização exemplar, a unidade seleccionada é um polímero solúvel em água. O polímero solúvel em água está ligado covalentemente ao péptido através de um grupo de ligação glicosilo intacto. O grupo de ligação a glicosilo é ligado covalentemente a um resíduo de aminoácido ou um resíduo glicosilo do péptido.

Alternativamente, o grupo de ligação a glicosilo é ligado a uma ou mais unidades glicosilo de um glicopéptido. A invenção também proporciona conjugados nos quais o grupo de ligação a glicosilo é ligado a um resíduo de aminoácido e a um resíduo glicosilo.

Adicionalmente a proporcionar conjugados que são formados através de um grupo de ligação a glicosilo intacto adicionado enzimaticamente, a presente invenção proporciona conjugados que são altamente homogêneos nos seus padrões de substituição. Utilizando os métodos da invenção, é possível formar conjugados peptídicos nos quais essencialmente todas as unidades de açúcar modificado ao longo de uma população de conjugados da invenção estão ligadas a múltiplas cópias de um resíduo de aminoácido ou glicosilo estruturalmente idêntico. Assim, num segundo aspecto, a invenção proporciona um conjugado peptídico possuindo uma população de unidades de polímero solúvel em água, que estão ligadas covalentemente ao péptido através de um grupo de ligação a glicosilo intacto. Num conjugado preferido da invenção, essencialmente cada membro da população está ligado através de um grupo de ligação a glicosilo a um resíduo de glicosilo do péptido, e cada resíduo de glicosilo do péptido ao qual o grupo de ligação a glicosilo está ligado possui a mesma estrutura.

É também proporcionado um conjugado peptídico possuindo uma população de unidades de polímero solúvel em água ligado covalentemente este através de um grupo de

ligação a glicosilo intacto. Numa forma de realização preferida, essencialmente cada membro da população de unidades de polímero solúvel em água está ligado a um resíduo de aminoácido do péptido através de um grupo de ligação a glicosilo intacto, e cada resíduo de aminoácido possuindo um grupo de ligação a glicosilo intacto ligados a esta possui a mesma estrutura.

A presente invenção também proporciona conjugados análogos aos descritos acima, nos quais o péptido é conjugado com uma unidade terapêutica, unidade de diagnóstico, unidade de direccionamento, unidade de toxina ou semelhantes, através de um grupo de ligação a glicosilo intacto. Cada uma das unidades acima referidas pode ser uma molécula pequena, polímero natural (e.g., péptido) ou polímero sintético.

Como apresentado nas Figuras anexas a este documento, os conjugados da invenção podem incluir grupos de ligação a glicosilo intactos que são mono- ou multivalentes (e.g., estruturas antenárias), ver, Figuras 14-22. Os conjugados da invenção também incluem grupos de ligação a glicosilo que são glicanos ligados em O com origem numa serina ou treonina (Figura 11). Assim, os conjugados da invenção incluem ambas as espécies nas quais uma unidade seleccionada é ligada a um péptido através de um grupo de ligação a glicosilo monovalente. Estão também incluídos na invenção conjugados nos quais mais do que uma unidade seleccionada é ligada a um péptido através de um grupo de

ligação multivalente. Uma ou mais proteínas pode ser conjugada em conjunto para tirar vantagem das suas e propriedades biofísicas biológicas.

Ainda noutra forma de realização, a invenção proporciona conjugados que se localizam selectivamente num tecido particular devido à presença de um agente de direccionamento como um componente do conjugado. Numa forma de realização exemplar, o agente de direccionamento é uma proteína, em particular.

Adicionalmente aos conjugados discutidos acima, a presente invenção proporciona métodos para preparar estes e outros conjugados. Assim, num outro aspecto, a invenção proporciona um método de formação de um conjugado covalente entre uma unidade seleccionada e um péptido. Adicionalmente, a invenção proporciona métodos para direccionar os conjugados da invenção para um tecido ou região particular do corpo.

Em formas de realização exemplares, o conjugado é formado entre um polímero solúvel em água, uma unidade terapêutica, unidade de direccionamento ou uma biomolécula, e um péptido glicosilado ou não glicosilado. O polímero, unidade terapêutica ou biomolécula é conjugado com o péptido através de um grupo de ligação a glicosilo intacto, que é intercalado entre, e ligado covalentemente a, o péptido e o grupo de modificação (e.g., polímero solúvel em água). O método inclui colocar em contacto o péptido com

uma mistura que contém um açúcar modificado e uma glicosiltransferase para a qual o açúcar modificado é um substrato. A reacção é realizada em condições suficientes para formar uma ligação covalente entre o açúcar modificado e o péptido. A unidade de açúcar do açúcar modificado é preferencialmente seleccionada dos açúcares de nucleótido, açúcares activados e açúcares, que não são nem de nucleótidos nem activados.

Numa forma de realização, a invenção proporciona um método para ligar dois ou mais péptidos através de um grupo de ligação. O grupo de ligação é de qualquer estrutura útil e pode ser seleccionado a partir de estruturas de cadeia simples e ramificada. Preferencialmente, cada terminal do ligante, que é ligado a um péptido, inclui um açúcar modificado (*i.e.*, um grupo de ligação a glicosilo intacto nascente).

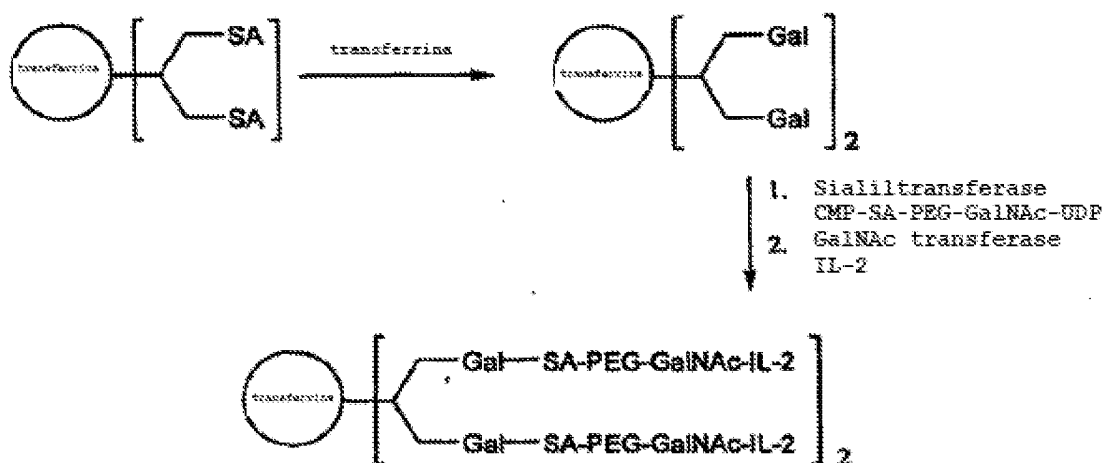
Num método da invenção exemplar, são ligados em conjunto dois péptidos através de uma unidade ligante que inclui um ligante PEG. A construção está de acordo com a estrutura geral apresentada na figura acima. Como aqui descrita, a construção da invenção inclui dois grupos de ligação a glicosilo intactos (*i.e.*, $s + t = 1$). O foco sobre um ligante PEG que inclui dois grupos glicosilo é para objectivos de clareza e não deve ser interpretado como limitante da identidade dos braços do ligante da utilização nesta forma de realização da invenção.

Assim, a unidade de PEG é funcionalizada num primeiro terminal com uma primeira unidade glicosilo num segundo terminal com uma segunda unidade glicosilo. As primeira e segunda unidades de glicosilo são preferencialmente substratos para diferentes transferases, permitindo a ligação ortogonal do primeiro e segundo péptidos à primeira e segunda unidades glicosilo, respectivamente. Na prática, o ligante $(\text{glicosil})^1\text{-PEG-}(\text{glicosil})^2$ é colocado em contacto com o primeiro péptido e uma primeira transferase para a qual a primeira unidade de glicosilo é um substrato, formando desse modo o $(\text{péptido})^1\text{-(glicosil)}^1\text{-PEG-}(\text{glicosil})^2$. A primeira transferase e/ou péptido não reagido é então removido opcionalmente a partir da mistura de reacção. O segundo péptido e uma segunda transferase a qual a segunda unidade de glicosilo e um substrato são adicionados ao $(\text{péptido})^1\text{-(glicosil)}^1\text{-PEG-}(\text{glicosil})^2$ conjugado, formando o $(\text{péptido})^1\text{-(glicosil)}^1\text{-PEG-}(\text{glicosil})^2\text{-(péptido)}^2$. Os especialistas na técnica entenderão que o método delineado acima é também aplicável para formar conjugados entre mais do que dois péptidos através de, por exemplo, a utilização de um PEG ramificado, dendrímero, poli(aminoácido), polissacárido ou semelhantes.

Como um exemplo referenciado, a interleuquina-2 (IL-2) é conjugada para transferência através de um ligante bifuncional que inclui um grupo de ligação a glicosilo intacto em cada terminal da unidade de PEG (Esquema 1). O conjugado IL-2 possui uma semi-vida *in vivo* que é aumentada em relação à de IL-2 isoladamente em virtude do tamanho

molecular maior do conjugado. Para além disso, a conjugação de IL-2 para a transferrina serve para direccionar selectivamente o conjugado para o cérebro. Por exemplo, um terminal do ligante PEG é funcionalizado com um CMP-ácido siálico e o outro é funcionalizado com um UDP-GalNac. O ligante é combinado com IL-2 na presença de uma GalNac transferase, resultando na ligação do GalNac do braço ligante a um resíduo de serina e/ou treonina em IL-2.

Esquema 1

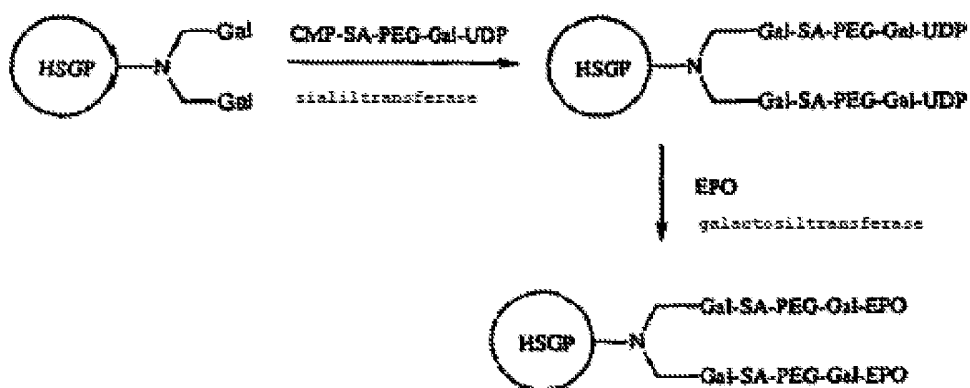


Os processos descritos acima podem ser realizados através de tantos ciclos quantos os desejados, e não estão limitados à formação de um conjugado entre dois péptidos com um único ligante. Para além disso, os especialistas na técnica irão entender que as reacções que funcionalizam os grupos de ligação a glicosilo intacto nos terminais do ligante PEG (ou outro) com o péptido pode ocorrer simultaneamente no mesmo recipiente de reacção, ou podem ser realizados de um modo passo a passo. Quando as reacções

são realizadas de um modo passo a passo, o conjugado produzido em cada passo é purificado opcionalmente a partir de um ou mais componentes de reacção (e.g., enzimas, péptidos).

Ainda outra forma de realização exemplar é apresentada no Esquema 2. O Esquema 2 apresenta um método de preparação de um conjugado que direcciona uma proteína seleccionada para o osso e aumenta a semi-vida em circulação da proteína seleccionada.

Esquema 2

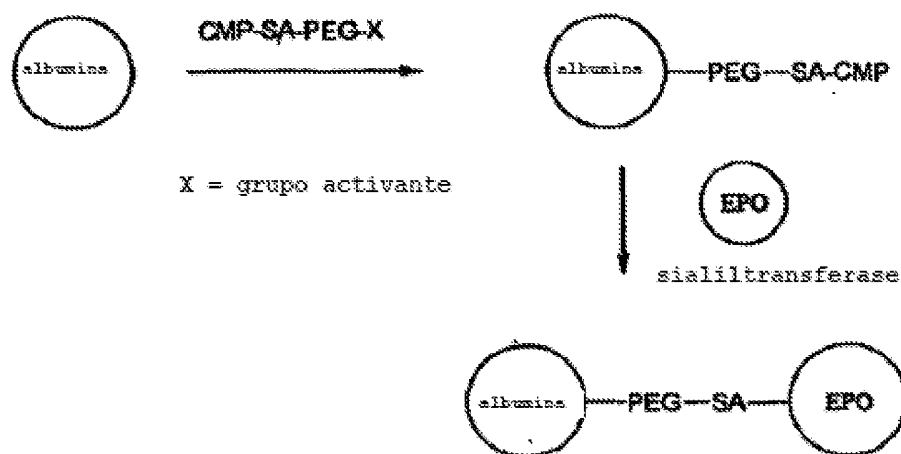


A utilização de derivados reactivos de PEG (ou outros ligantes) para ligação a uma ou mais unidades de péptido ao ligante está dentro do âmbito da presente invenção. A invenção não está limitada pela identidade do análogo reactivo do PEG. Muitos derivados activados do poli(etilenoglicol) estão disponíveis comercialmente e na literatura. Está bem dentro das capacidades de um especialista para escolher, e sintetizar, se necessário, um

derivado de PEG activado apropriado com o qual se prepara um substrato útil na presente invenção. Ver, Abuchowski et al. *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984); Abuchowski et al., *J. Biol. Chem.*, 252: 3582-3586 (1977); Jackson et al., *Anal. Biochem.*, 165: 114-127 (1987); Koide et al., *Biochem Biophys. Res. Common.*, 111: 659-667 (1983)), tresilato (Nilsson et al., *Methods Enzymol.*, 104: 56-69 (1984); Delgado et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12: 119-128 (1990)); ésteres activos derivados de N-hidroxissuccinimida (Buckmann et al., *Makromol. Chem.*, 182: 1379-1384 (1981); Joppich et al., *Makromol. Chem.*, 180: 1381-1384 (1979); Abuchowski et al., *Cancer Biochem. Biophys.*, 7: 175-186 (1984); Katre et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 1487-1491 (1987); Kitamura et al., *Cancer Res.*, 51: 4310-4315 (1991); Boccu et al., *Z. Naturforsch.*, 38C: 94-99 (1983), carbonatos (Zalipsky et al., *POLI(ETILENOGLICOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS*, Harris, Ed., Plenum Press, New York, 1992, pp. 347-370; Zalipsky et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15: 100-114 (1992); Veronese et al., *Appl. Biochem. Biotech.*, 11: 141-152 (1985)), formatos de imidazolilo (Beauchamp et al., *Anal. Biochem.*, 131: 25-33 (1983); Berger et al., *Blood*, 71: 1641-1647 (1988)), 4-ditiopiridinas (Woghiren et al., *Bioconjugate Chem.*, 4: 314-318 (1993)), isocianatos (Byun et al., *ASAIO Journal*, M649-M-653 (1992)) e epóxidos (Pat. U.S. N°. 4 806 595, emitido em Noishiki et al., (1989). Outros grupos de ligação incluem a ligação de uretano entre grupos amino e PEG activado. Ver, Veronese, et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11: 141-152 (1985).

Noutro exemplo de referência no qual é utilizado um PEG reactivo, a invenção proporciona um método para estender uma semi-vida na circulação sanguínea de um péptido seleccionado, na essência direccionando o péptido para a mistura sanguínea, conjugando o péptido a um polímero sintético ou natural de um tamanho suficiente para retardar a filtração da proteína pelo glomérulo (e.g., albumina). Esta forma de realização da invenção é ilustrada no esquema 3 no qual a eritropoietina (EPO) é conjugada com a albumina através de um ligante PEG utilizando uma combinação de modificação química e enzimática.

Esquema 3



Deste modo, como é apresentado no esquema 3, um resíduo de aminoácido da albumina é modificado com um derivado de PEG reactivo, tal como X-PEG-(CMP-ácido siálico), em que X é um grupo de activação (e.g., éster activo, isotiocianato, etc). O derivativo de PEG e EPO são

combinados e colocados em contacto com a transferase para os quais o CMP-ácido siálico é um substrato. Numa outra forma de realização ilustrativa, uma ϵ -amina de lisina é feita reagir com o éster da N-hidroxissuccinimida do PEG-ligante para formar o conjugado da albumina. O CMP-ácido siálico do ligante é enzimaticamente conjugado para um resíduo apropriado em EPO, e.g., Gal, formando desse modo o conjugado. Os especialistas entenderão que o método acima descrito não está limitado aos parceiros da reacção apresentados. Para além disso, o método pode ser praticado para formar conjugados que incluem mais do que duas unidades de proteína através de, por exemplo, utilizando um ligante ramificado possuindo mais do que dois terminais.

2. Açúcares Modificados

A espécie dadora de glicosilo modificado ("açúcares modificados") são seleccionados preferencialmente a partir de açúcar de nucleótidos modificados, açúcares modificados activados e açúcares modificados que são sacáridos simples que não são nucleótidos nem activados. Qualquer estrutura desejada de hidrato de carbono pode ser adicionada a um péptido utilizando os métodos da invenção. Tipicamente, a estrutura será um monossacárido, mas a presente invenção não está limitada à utilização de açúcares monossacáridos modificados; oligossacáridos e polisacáridos são também úteis.

O grupo de modificação é ligado a uma unidade de

açúcar por meios enzimáticos, meios químicos ou uma combinação destes, produzindo desse modo um açúcar modificado. Os açúcares são substituídos em qualquer posição que permite a ligação da unidade modificadora, mesmo assim ainda permite que o açúcar funcione como um substrato para a enzima utilizada para ligar o açúcar modificado ao péptido. Numa forma de realização preferida, quando o ácido siálico é o açúcar, o ácido siálico é substituído com o grupo de modificação na posição 9 na cadeia lateral piruvilo ou na posição 5 na unidade amina que é normalmente acetilada em ácido siálico.

Em certas formas de realização da presente invenção, um açúcar de nucleótido modificado é utilizado para adicionar o açúcar modificado ao péptido. Os nucleótidos de açúcar exemplares que são utilizados na presente invenção na sua forma modificada incluem mono-, di- ou trifosfatos de nucleótido ou seus análogos. Numa forma de realização preferida, o açúcar de nucleótido modificado é seleccionado a partir de uma UDP-glicosida, CMP-glicosida, ou uma GDP-glicosida. Ainda mais preferencialmente, o açúcar de nucleótido modificado é seleccionado a partir de uma UDP-galactose, UDP-galactosamina, UDP-glucose, UDP-glucosamina, GDP-manose, GDP-fucose, CMP-ácido siálico, ou CMP-NeuAc. Os derivados de N-acetilamina do açúcar de nucleótidos são também de utilização no método da invenção.

A invenção também proporciona métodos para

sintetizar um péptido modificado utilizando um açúcar modificado, e.g., galactose modificada, -fucose, e -ácido siálico. Quando é utilizado um ácido siálico modificado, pode ser utilizada nestes métodos uma sialiltransferase ou uma trans-sialidase (apenas para ácido siálico ligado a $\alpha 2,3$).

Noutras formas de realização, o açúcar modificado é um açúcar activado. Açúcares modificados activados, que são úteis na presente invenção são tipicamente glicósidos que foram alterados sinteticamente para incluir um grupo de saída activado. Como aqui utilizado, o termo "grupo de saída activado" refere-se às unidades, que são facilmente deslocadas em reacções de substituição nucleofílica regulada por enzimas. São conhecidos na técnica muitos açúcares activados. Ver, por exemplo, Vocadlo *et al.*, em CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOLOGY, Vol. 2, Ernst *et al.* Ed., Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Alemanha, 2000; Kodama *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 34: 6419 (1993); Loughheed, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 37717 (1999)).

Exemplos de grupos de activação (grupos de saída) incluem flúor, cloro, bromo, éster de tosilato, éster de mesilato, éster de triflato e semelhantes. Grupos de saída activados preferidos, para utilização na presente invenção, são aqueles não dificultam estericamente significativamente a transferência enzimática do glicósido para o aceitador. Consequentemente, formas de realização preferidas dos derivados de glicósido activados incluem fluoretos de

glicosilo e mesilatos de glicosilo, sendo os fluoretos de glicosilo particularmente preferidos. Entre os fluoretos de glicosilo, fluoreto de α -galactosilo, fluoreto de α -manosilo, fluoreto de α -glucosilo, fluoreto de α -fucosilo, fluoreto de α -xilosilo, fluoreto de α -sialilo, fluoreto de α -N-acetilglucosaminilo, fluoreto de α -N-acetilgalactosaminilo, fluoreto de β -galactosilo, fluoreto de β -manosilo, fluoreto de β -glucosilo, fluoreto de β -fucosilo, fluoreto de β -xilosilo, fluoreto de β -sialilo, fluoreto de β -N-acetilglucosaminilo e fluoreto de β -N-acetilgalactosaminilo são mais preferidos.

A título de ilustração, os fluoretos de glicosilo podem ser preparados a partir de açúcar livre acetilando primeiro o açúcar e depois tratando-o com HF/piridina. Isto cria o anómero termodinamicamente mais estável do fluoreto de glicosilo protegido (acetilado) (*i.e.*, o fluoreto de α -glicosilo). Se o anómero menos estável (*i.e.*, o fluoreto de β -glicosilo) é desejado, pode ser preparado convertendo o açúcar peracetilado com HBr/HOAc ou com HCl para criar o brometo ou cloreto anomérico. Este intermediário é reagido com um sal de fluoreto, tal como fluoreto de prata para criar o fluoreto de glicosilo. Os fluoretos de glicosilo acetilado podem ser desprotegidos pela reacção com base suave (catalítica) em metanol (*e.g.* NaOMe/MeOH). Adicionalmente, muitos fluoretos de glicosilo estão disponíveis comercialmente.

Outros derivados de glicosilo activados podem ser

preparados utilizando métodos convencionais conhecidos dos especialistas na técnica. Por exemplo, mesilatos de glicosilo podem ser preparados pelo tratamento da forma hemiacetal totalmente benzilada do açúcar com cloreto de mesilo, seguido por hidrogenação catalítica para remover os grupos benzilo.

Numa outra forma de realização exemplar, o açúcar modificado é um oligossacárido possuindo uma estrutura antenária. Numa forma de realização preferida, um ou mais dos terminais das antenas contêm a unidade modificada. Quando mais do que uma unidade modificante é ligada a um oligossacárido possuindo uma estrutura antenária, o oligossacárido é útil para "amplificar" a unidade modificadora; cada unidade de oligossacárido conjugada com o péptido liga múltiplas cópias do grupo de modificação para o péptido. A estrutura geral de um quelante típico da invenção, como apresentado no desenho acima, compreende espécies multivalentes resultando da preparação de um conjugado da invenção utilizando uma estrutura antenária. Muitas estruturas de sacárido antenárias são conhecidas na técnica, e o presente método pode ser praticado com elas sem limitação.

Grupos de modificação exemplares são discutidos abaixo. Os grupos de modificação podem ser seleccionados para uma ou mais propriedades desejáveis. Propriedades exemplares incluem, mas não estão limitados a, farmacocinética aumentada, farmacodinâmica aumentada, biodistribuição melhorada, proporcionando uma espécie polivalente,

solubilidade em água melhorada, lipofilicidade aumentada ou diminuída, e direccionamento para o tecido.

D. Conjugados Peptídico

a) Polímeros Solúveis em Água

A hidrofiliabilidade de um péptido seleccionado é aumentada pela conjugação com moléculas polares, tais como moléculas contendo amina-, éster-, hidroxil- e poli-hidroxil-. Exemplos representativos incluem, mas não estão limitados a, polilisina, polietilenoimina, poli(etilenoglicol) e poli(propilenoglicol). Polímeros solúveis em água preferidos são essencialmente não fluorescentes, ou emitem uma tal quantidade mínima de fluorescência que são inapropriados para utilização como um marcador fluorescente num ensaio. Os polímeros que não são açúcares que ocorrem naturalmente podem ser utilizados. Adicionalmente, a utilização de um açúcar que, em tudo o resto ocorre naturalmente que é modificado por ligação covalente de outra entidade (e.g., poli(etilenoglicol), poli(propilenoglicol), poli(aspartato), biomolécula, unidade terapêutica, unidade de diagnóstico, etc.) está também contemplada. Noutra forma de realização exemplar, uma unidade de açúcar terapêutico é conjugada com um braço ligante e o açúcar-braço do ligante é subsequentemente conjugado com um péptido através de um método da invenção.

Os métodos e a química para activação de

polímeros e sacáridos solúveis em água assim como métodos para conjugar sacáridos e polímeros com várias espécies são descritos na literatura. Métodos normalmente utilizados para activação de polímeros incluem a activação de grupos funcionais com brometo de cianogénio, periodato, glutaraldeído, biepóxidos, epicloro-hidrina, divinilsulfona, carbodiimida, haletos de sulfonilo, triclorotriazina, etc. (ver, 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 *et al.*, (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L., *et al.*, Eds. POLIMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

Vias para preparar moléculas de PEG reactivas e que formam conjugados utilizando as moléculas reactivas são conhecidas na técnica. Por exemplo, a Patente U.S. N°. 5 672 62 revela um conjugado solúvel em água e isolável de um éster activo de um polímero ácido seleccionado a partir de poli(óxidos de alquilenos) lineares ou ramificados, poli(polióis oxietilados), poli(álcoois olefínicos), e poli(acrilomorfolina) lineares ou ramificados, em que o polímero possui cerca de 44 ou mais unidade recorrentes.

A Patente U.S. N°. 6 376 604 apresenta um método para preparar um éster de 1-benzotriazolilcarbonato solúvel em água de um polímero solúvel em água e não peptídico

através da reacção com um terminal hidroxilo do polímero com di(1-benzotriazoil)carbonato num solvente orgânico. O éster activo é utilizado para formar conjugados com um agente biologicamente activo, tal como uma proteína ou péptido.

WO 99/45964 descreve um conjugado compreendendo um agente biologicamente activo e um polímero activado solúvel em água compreendendo uma estrutura de polímero possuindo pelo menos um terminal ligado à estrutura de polímero através de uma ligação estável, em que pelo menos um terminal compreende uma unidade ramificante possuindo grupos reactivos proximais ligados à unidade ramificante, na qual o agente biologicamente activo está ligado a pelo menos um dos grupos reactivos proximais. São descritos outros poli(etilenoglicóis) ramificados em WO 96/21469, a Patente U.S. N°. 5 932 462 descreve um conjugado formado com uma molécula de PEG ramificada que inclui um terminal ramificado que inclui grupos funcionais reactivos. Os grupos reactivos livres estão disponíveis para reagir com uma espécie biologicamente activa, tal como uma proteína ou péptido, formando conjugados entre o poli(etilenoglicol) e as espécies biologicamente activas. A Patente U.S. N°. 5 446 090 descreve um ligante de PEG bifuncional e a sua utilização na formação de conjugados possuindo um péptido em cada um dos terminais de ligante de PEG.

Os conjugados que incluem ligações de PEG degradáveis são descritos em WO 99/34833; e WO 99/14259,

assim como na Patente U.S. N°. 6 348 558. Essas ligações degradáveis são aplicáveis na presente invenção.

Embora ambos os derivados reactivos de PEG e os conjugados formados utilizando os derivados sejam conhecidos na técnica, até à presente invenção, não foi reconhecido que possa ser formado um conjugado entre PEG (ou outro polímero) e outra espécie, tal como um péptido ou glicopéptido, através de um grupo de ligação a glicosilo intacto.

São conhecidos dos especialistas na técnica muitos polímeros solúveis em água e são úteis na prática da presente invenção. O termo polímero solúvel em água engloba espécies tais como sacáridos (e.g., dextrano, amilose, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanos, heparinas, etc.); poli (aminoácidos), e.g., poli(ácido glutâmico); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (e.g., poli(ácido acrílico), poli(éteres), e.g., poli(etileno-glicol); péptidos, proteínas, e semelhantes. A presente invenção pode ser praticada com qualquer polímero solúvel em água com a única limitação de o polímero dever incluir um ponto no qual o restante do conjugado se pode ligar.

Também se podem encontrar métodos para activação de polímeros em WO 94/17039, Pat. U.S. N°. 5 324 844, WO 94/18247, WO 94/04193, Pat. U.S. N°: 5,219,564, Pat. U.S. N°. 5 122 614, WO 90/13540, Pat. U.S. N°. 5 281 698, e mais WO 93/15189, e para a conjugação entre polímeros e péptidos

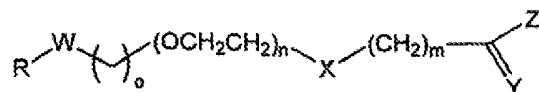
ativados, e.g. Factor VIII de Coagulação (WO 94/15625), hemoglobina (WO 94/09027), molécula de transporte de oxigénio (Pat. U.S. N°. 4 412 989), ribonuclease e superoxide dismutase (Veronese *et al.*, *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-45 (1985)).

Polímeros solúveis em água preferidos são aqueles nos quais uma proporção substancial das moléculas de polímero numa amostra do polímero têm aproximadamente o mesmo peso molecular; esses polímeros estão "homodispersos".

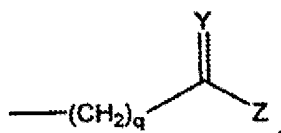
A presente invenção é ainda ilustrada através da referência a um conjugado de poli(etilenoglicol). Estão disponíveis várias revisões e monografias sobre a funcionalização e conjugação de PEG. Ver, por exemplo, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995); e Bhadra, *et al.*, *Pharmazie*, 57:5-29 (2002).

Moléculas de poli(etilenoglicol) adequadas para utilização na invenção incluem, mas não estão limitados a, àquelas descritas pela seguinte fórmula 3:

Fórmula 3



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



- açúcar-nucleótido, proteína, metilo, etilo;

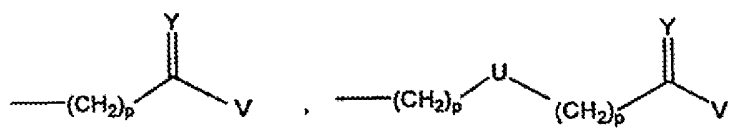
X, Y, W, U (seleccionados independentemente) = O, S, NH, N-R'; R', R'' (seleccionados independentemente) = alquilo, benzilo, arilo, alquilarilo, piridilo, arilo substituído, arilalquilo, acilarilo;

n = 1 até 2000;

m, q, p (seleccionados independentemente) = 0 até 20

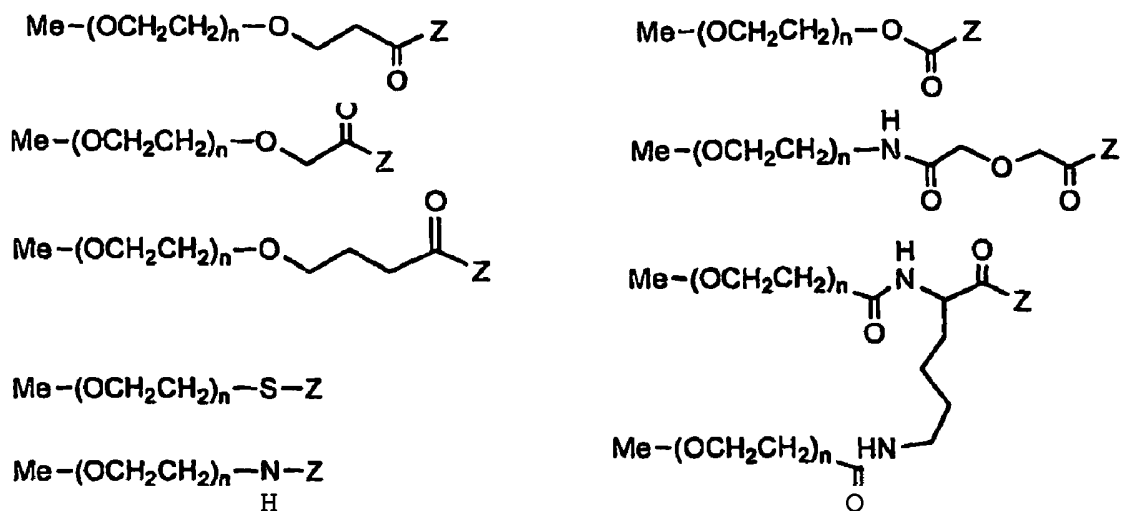
o = 0 até 20;

Z = HO, NH₂, halogénio, S-R'', ésteres activados,



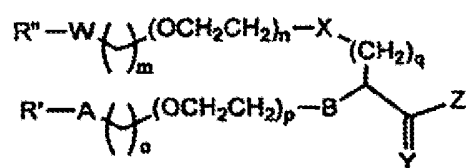
- açúcar-nucleótido, proteína, imidazole, HOBT, tetrazole, haleto; e V = HO, NH₂, halogénio, S-R'', ésteres activados, amidas activadas, -sugar-nucleótido proteína.

Em formas de realização preferidas, a molécula de poli(etilenoglicol) possuindo um peso molecular de 20 kDa é seleccionada a partir dos seguintes:



O poli(etilenoglicol) possuindo um peso molecular de 20 kDa útil na formação do conjugado da invenção é linear ou ramificado. As moléculas de poli(etilenoglicol) ramificadas adequadas para utilização na invenção incluem, mas não estão limitados àqueles descritos pela seguinte fórmula:

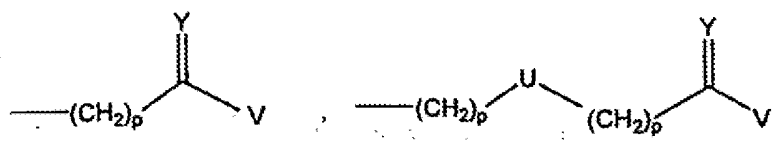
Fórmula 4



R', R'', R''' (seleccionados independentemente) = H, alquilo, benzilo, arilo, acetal, OHC-, H₂N-CH₂CH₂-, HS-CH₂CH₂-, <CH₂>_qCYZ, -açúcar-nucleótido, proteína, metilo, etilo, heteroarilo, acilalquilo, acilarilo, acilalquilarilo;

X, Y, W, A, B (seleccionados independentemente) = O, S, NH, N-R', (CH₂)₁;

n, p (seleccionados independentemente) = 1 até 2000;
 m, q, o (seleccionados independentemente) = 0 até 20;
 Z = HO, NH₂, halogénio, S-R''', ésteres activados,



- açúcar-nucleótido, proteína;

V = HO, NH₂, halogénio, S-R''', ésteres activados,
 amidas activadas,

- açúcar-nucleótido, proteína.

A semi-vida *in vivo*, área debaixo da curva, e/ou tempo de residência dos péptidos terapêuticos também pode ser aumentada com polímeros solúveis em água tais como polietilenoglicol (PEG) e polipropilenoglicol (PPG). Por exemplo, a modificação química de proteínas com PEG (PEGuilação) aumenta o seu tamanho molecular e diminui a sua acessibilidade à superfície e ao grupo funcional, cada um dos quais está dependente do tamanho do PEG ligado à proteína. Isto resulta num melhoramento das semi-vidas no plasma e na estabilidade proteolítica, e numa diminuição da imunogenicidade e incorporação hepática (Chaffee *et al.* *J. Clin. Invest.* 89: 1643-1651 (1992); Pyatak *et al.* *Res. Commun Chem. Pathol Pharmacol* 29: 113-127 (1980)). A PEGuilação da interleuquina-2 foi relatada como aumentando

a sua potência anti-tumoral *in vivo* (Katre *et al.* *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* 84: 1487-1491 (1987)) e a PEGuilação de um F(ab')₂ derivado do anticorpo monoclonal A7 melhorou a sua localização do tumor (Kitamura *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28: 1387-1394 (1990)).

Numa forma de realização preferida, a semi-vida *in vivo* de um péptido derivatizado com um polímero solúvel em água através de um método da invenção é aumentada em relação à semi-vida *in vivo* do péptido não derivatizado. Noutra forma de realização preferida, a área debaixo da curva de um péptido derivatizado com um polímero solúvel em água utilizando um método da invenção é aumentada em relação à área debaixo da curva do péptido não derivatizado. Noutra forma de realização preferida, o tempo de residência de um péptido derivatizado com um polímero solúvel em água utilizando um método da invenção é aumentado em relação ao tempo de residência do péptido não derivatizado. Técnicas para determinar a semi-vida *in vivo*, a área debaixo da curva e o tempo de residência são bem conhecidas na técnica. Descrições dessas técnicas podem ser encontradas em J.G. Wagner, 1993, *Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist*, Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster PA.

O aumento da semi-vida do péptido *in vivo* é melhor expresso como um intervalo de percentagem de aumento nesta quantidade. O aumento da extremidade inferior do intervalo de percentagem é de cerca de 40%, cerca de 60%,

cerca de 80%, cerca de 100%, cerca de 150% ou cerca de 200%. A extremidade superior do intervalo é de cerca de 60%, cerca de 80%, cerca de 100%, cerca de 150%, ou mais do que cerca de 250%.

b) Polímeros solúveis em água

Os conjugados da invenção também podem incluir um ou mais polímeros insolúveis em água. Esta forma de realização da invenção é ilustrada pela utilização do conjugado como um veículo com o qual se distribui um péptido terapêutico de um modo controlado. São conhecidos na técnica sistemas de distribuição de fármaco polimérico. Ver, por exemplo, Dunn *et al.*, Eds. POLIMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Os especialistas na técnica entenderão que substancialmente qualquer sistema de distribuição de fármaco se pode aplicar aos conjugados da presente invenção.

Polímeros insolúveis em água representativos incluem, mas não estão limitados a, polifosfazinas, poli(álcoois vinílicos), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poliacrilamidas, polialquilenoglicóis, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haletos de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos, poli(metil metacrilato), poli(etilmetacrilato), poli(butilmetacrilato), poli(isobutilmetacrilato), poli(he-

xilmetacrilato), poli(isodecilmetacrilato), poli(laurilmetacrilato), poli(fenilmetacrilato), poli(metilacrilato), poli(isopropilacrilato), poli(isobutilacrilato), poli(octadecilacrilato) polietileno, polipropileno, poli(etilenoglicol), poli(óxido de etileno), poli (tereftalato de etileno), poli(acetato de vinilo), cloreto de polivinilo, poli-estireno, polivinil pirrolidona, plurónicos e polivinil-fenol e seus copolímeros.

Polímeros naturais modificados sinteticamente de utilização em conjugados da invenção incluem, mas não estão limitados a, alquilceluloses, hidroxialquilceluloses, éteres de celulose, ésteres de celulose, e nitroceluloses. Membros particularmente preferidos das classes vastas de polímeros naturais modificados sinteticamente incluem, mas não estão limitados a, metilcelulose, etilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxibutilmetilcelulose, acetato de celulose, propionato de celulose, butirato de acetato de celulose, ftalato de acetato de celulose, carboximetil celulose, triacetato de celulose, sal de sulfato de sódio de celulose, e polímeros de ésteres acrílico e metacrílico e ácido algínico.

Estes e os outros polímeros aqui discutidos podem ser rapidamente obtidos a partir de fontes comerciais, tais como Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.), Polisciencas (Warrenton, PA.), Aldrich (Milwaukee, WI.), Fluka (Ronkonkoma, NY), e BioRad (Richmond, CA), ou alternativamente sintetizados a partir de monómeros obtidos a partir destes fornecedores, utilizando técnicas convencionais.

Polímeros biodegradáveis representativos da utilização nos conjugados da invenção incluem, mas não estão limitados a, polilactidos, poliglicólidos e seus copolímeros, poli(etileno tereftalato), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactido-co-caprolactona), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), polianidridos, polior-toésteres, suas misturas e copolímeros. De particular utilização são composições que formam géis, tais como aqueços que incluem colagénio, plurónicos e semelhantes.

Os polímeros de utilização numa invenção incluem polímeros "híbridos" que incluem materiais insolúveis em água possuindo pelo menos uma porção da sua estrutura, uma molécula bio-reabsorvível. Um exemplo de um tal polímero é aquele que inclui um copolímero insolúvel em água, que possui uma região bio-reabsorvível, um região hidrofílica e um conjunto de grupos funcionais de ligação reticulada por cadeia de polímero.

Para os objectivos da presente invenção, "materiais insolúveis em água" incluem materiais que são substancialmente insolúveis em água ou em ambientes que contêm água. Assim, embora certas regiões ou segmentos do co-polímero possam ser hidrofílicas ou mesmo solúveis em água, a molécula de polímero, como um todo, não se dissolve em água, em qualquer medida substancial.

Para os efeitos da presente invenção, o termo

"molécula de bio-reabsorção" inclui uma região que é capaz de ser metabolizada ou degradada e reabsorvida e/ou eliminada através das vias excretoras normais pelo corpo. Esses metabolitos ou produtos da degradação são preferencialmente substancialmente não tóxicos para o corpo.

A região de bio-reabsorção pode ser quer hidrofóbica quer hidrofílica, desde que a composição de copolímero como um todo não seja tornada solúvel em água. Assim, a região de bio-reabsorção é seleccionada com base na preferência de que o polímero, como um todo, permanece insolúvel em água. Consequentemente, as propriedades relativas, *i.e.*, os tipos de grupo funcional nela contidos, e as proporções relativas da região de bio-reabsorção, e a região hidrofílica são seleccionados para assegurar que as úteis composições de bio-reabsorção permanecem insolúveis em água.

Polímeros de reabsorção exemplares incluem, por exemplo, copolímeros em bloco de reabsorção produzidos sinteticamente de poli(ácido α -hidroxi-carboxílico)/poli(oxialquileno), (ver, Cohn *et al.*, Patente U.S. N°. 4 826 945). Estes copolímeros não estão em ligação reticulada e são solúveis em água de modo a que o corpo possa excretar as composições de copolímero em bloco degradadas. Ver, Younes *et al.*, *J Biomed. Mater. Res.* 21: 1301-1316 (1987); e Cohn *et al.*, *J Biomed. Mater. Res.* 22: 993-1009 (1988).

Polímeros de bio-reabsorção presentemente prefe-

ridos incluem um ou mais componentes seleccionados a partir de poli(ésteres), poli (ácidos hidroxilo, poli(lactonas), poli(amidas), poli(éster-amidas), poli(aminoácidos), poli(anidridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(fosfazinas), poli(fosfoésteres), poli(tioésteres), polissacáridos e suas misturas. Ainda mais preferencialmente, o polímero bio-reabsorvível inclui um componente de ácido poli(hidroxi). Dos ácidos poli(hidroxi), são preferidos o ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido policapróico, ácido polibutírico, ácido polivalérico e seus copolímeros e misturas.

Adicionalmente à formação de fragmentos que são absorvidos *in vivo* ("bio-reabsorvidos"), os revertimentos poliméricos preferidos para utilização nos métodos da invenção também podem formar um fragmento excretável e/ou metabolizável.

Também podem ser utilizados copolímeros de ordem superior na presente invenção. Por exemplo, Casey *et al.*, Patente U.S. N°. 4 438 253, que foi emitida em 20 de Março de 1984, revela copolímeros de tri-bloco produzidos a partir da transesterificação de poli (ácido glicólico) e um poli(alquilenoglicol) hidroxilenados. Essas composições são reveladas para utilização como suturas de monofilamento reabsorvíveis. A flexibilidade dessas composições é controlada pela incorporação de um ortocarbonato aromático, tal como tetra-p-tolilortocarbonato na estrutura do copolímero.

Também podem ser utilizados outros revestimentos baseados nos ácidos láctico e/ou glicólico. Por exemplo, Spinu, Patente U.S. N°. 5 202 413, que foi emitida em 13 de Abril de 1993, revela copolímeros biodegradáveis de multi-bloco possuindo blocos ordenados sequencialmente de poli-ácido láctico e/ou poli-ácido glicólico produzidos por polimerização de abertura de anel de ácido láctico e/ou ácido glicólico num diol oligomérico ou um resíduo de diamina seguido por extensão da cadeia com um composto difuncional, tal como, um diisocianato, cloreto de diacilo ou diclorosilano.

Regiões de bio-reabsorção de revestimentos úteis na presente invenção podem ser construídas para serem cliváveis hidroliticamente e/ou enzimaticamente. Para os objectivos da presente invenção, "hidroliticamente clivável" refere-se à susceptibilidade do copolímero, especialmente a região de bio-reabsorção, para hidrólise em água ou um ambiente contendo água. De um modo semelhante, "enzimaticamente clivável", como aqui utilizado refere-se à susceptibilidade do copolímero, especialmente a região de bio-reabsorção, para clivar através de enzimas endógenas ou exógenas.

Quando colocada no corpo, a região hidrofílica pode ser processada em fragmentos excretáveis e/ou metabolizáveis. Desse modo, a região hidrofílica pode incluir, por exemplo, poliéteres, óxidos de polialquilenos, polióis, poli(vinil pirrolidina), poli(álcool vinílico), poli-

(alquioxazolinas), polissacáridos, hidratos de carbono, péptidos, proteínas e copolímeros e misturas destes. Para além disso, a região hidrofílica também pode ser, por exemplo, um óxido de poli(alquileno). Esses óxidos de poli(alquileno) podem incluir, por exemplo, óxido de poli(etileno), óxido de poli(propileno) e suas misturas e copolímeros.

Polímeros que são componentes de hidrogéis são também úteis na presente invenção. Os hidrogéis são materiais poliméricos que são capazes de absover quantidades relativamente grandes de água. Exemplos de compostos de formação de hidrogel incluem, mas não estão limitados a, ácidos poliacrílicos, carboximetilcelulose de sódio, álcool polivinílico, polivinilpirrolidina, gelatina, carragenano e outros polissacáridos, ácido hidroxietilenometacrílico (HEMA), assim como seus derivados, e semelhantes. Podem ser produzidos hidrogéis que são estáveis, biodegradáveis e bio-reabsorvíveis. Para além disso, as composições de hidrogel podem incluir subunidades que apresentam uma ou mais destas propriedades.

Composições de hidrogel biocompatíveis cuja integridade pode ser controlada através de ligação reticulada são conhecidas e são presentemente preferidas para utilização nos métodos da invenção. Por exemplo, Hubbell *et al.*, Patentes U.S. N°s. 5 410 016, que foi emitida em 25 de Abril de 1995 e 5 529 914, que foi emitida em 25 de Junho de 1996, revelam sistemas solúveis em água, que são copo-

límeros de bloco de ligação reticulada possuindo um segmento de bloco central solúvel em água ensanduichado entre duas extensões hidroliticamente lábeis. Esses copolímeros são ainda protegidos na extremidade com funcionalidades de acrilato fotopolimerizável. Quando em ligação reticulada, estes sistemas tornam-se hidrogéis. O bloco central solúvel em água desses copolímeros podem incluir poli (etileno-glicol); enquanto, as extensões hidroliticamente lábeis podem ser um poli(ácido α -hidroxilo), tal como ácido poliglicólico ou ácido poliláctico. Ver, Sawhney et al., *Macromolecules* 26: 581-587 (1993).

Noutra forma de realização preferida, o gel é um gel termoreversível. Os géis termoreversíveis, incluindo componentes, tais como pluronics, colagénio, gelatina, ácido hialourónico, polissacáridos, hidrogel de poliuretano, hidrogel de poliuretaneureia e suas combinações são presentemente preferidas.

É também revelado um conjugado incluindo um componente de um lipossoma. Podem ser preparados lipossomas de acordo com métodos conhecidos dos especialistas na técnica, por exemplo, como descrito em Eppstein et al., Patente U.S. N°. 4 522 811, que foi emitida em 11 de Junho de 1985. Por exemplo, podem ser preparadas formulações de lipossoma dissolvendo lípido(s) apropriado(s) (tais como estearoilfosfatidiletanolamina, estearoilfosfatidilcolina, araca-doilfosfatidilcolina, e colesterol) num solvente inorgânico que é então evaporado, deixando para trás uma película fina

de lípido seco na superfície do recipiente. Uma solução aquosa do composto activo ou do seu sal farmacêuticamente aceitável é então introduzido no recipiente. O recipiente é então agitado em remoinho à mão para libertar o material lipídico dos lados do recipiente e para dispersar agregados lipídicos, formando desse modo a suspensão lipossómica.

As micropartículas e os métodos acima referidos de preparar as micropartículas são oferecidas a título de exemplo e não pretendem definir o âmbito das micropartículas de utilização na presente invenção. Será óbvio para os especialistas na técnica que uma série de micropartículas, fabricadas por diferentes métodos, são de utilização na presente invenção.

c) Biomoléculas

É também revelado uma biomolécula contendo açúcar modificado. A biomolécula pode ser uma proteína funcional, enzima, antigénio, anticorpo, péptido, ácido nucleico (e.g., nucleótidos ou nucleósidos únicos, oligonucleótidos, polinucleótidos e ácidos nucleicos de cadeia simples e superior), lectina, receptor ou uma sua combinação.

Algumas biomoléculas preferidas são essencialmente não fluorescentes, ou emitem uma tal quantidade mínima de fluorescência que os torna inapropriados para utilização como um marcador fluorescente num ensaio. Outras biomoléculas podem ser fluorescentes. A utilização de um açúcar

que de outro modo ocorre naturalmente que é modificado por ligação covalente de outra entidade (*e.g.*, PEG, biomolécula, unidade terapêutica, unidade de diagnóstico, etc.) é apropriada. É também revelada uma unidade de açúcar, que é uma biomolécula, conjugada com um braço ligante e a casete de açúcar-braço ligante é subsequentemente conjugado com um péptido através de um método da invenção.

Biomoléculas úteis na prática da presente invenção podem ser derivadas de qualquer fonte. As biomoléculas podem ser isoladas a partir de fontes naturais ou podem ser produzidas através de métodos sintéticos. Os péptidos podem ser péptidos naturais ou péptidos mutados. As mutações podem ser realizadas através de mutagénese química, mutagénese dirigida para um sítio ou outro meio de induzir mutações conhecidas dos especialistas na técnica. Péptidos úteis na prática da presente invenção incluem, por exemplo, enzimas, antigénios, anticorpos e receptores. Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais; sejam intactos ou fragmentos. Os péptidos são opcionalmente os produtos de um programa de evolução dirigida.

Péptidos derivados naturalmente e sintéticos e ácidos nucleicos são de utilização em conjunção com a presente invenção; estas moléculas podem ser ligadas a um componente de resíduo de açúcar ou um agente de ligação reticulada através de qualquer grupo reactivo disponível. Por exemplo, os péptidos podem ser ligados através de uma amina reactiva, carboxilo, sulfidrílo, ou grupo hidroxilo.

O grupo reactivo pode residir num terminal péptido ou num sítio interno à cadeia peptídica. Os ácidos nucleicos podem ser ligados através de um grupo reactivo numa base (e.g., amina exocíclica) ou um grupo hidroxilo disponível numa unidade de açúcar (e.g., 3'- ou 5'-hidroxilo). O péptido e as cadeias de ácido nucleico podem ser ainda derivatizados em um ou mais sítios para permitir a ligação de grupos reactivos apropriados na cadeia. Ver, Chrisey et al. *Nucleic Acids Res.* 24: 3031-3039 (1996).

É também revelada uma biomolécula que é seleccionada para dirigir o péptido modificado através dos métodos da invenção para um tecido específico, aumentando desse modo a distribuição do péptido para esse tecido em relação à quantidade de péptido não derivatizado que é distribuído ao tecido. Além disso, a quantidade de péptido derivatizado distribuído a um tecido específico dentro de um período de tempo seleccionado pode ser aumentado através da derivatização através de pelo menos cerca de 20%, mais preferencialmente, pelo menos cerca de 40%, e mais preferencialmente ainda, pelo menos cerca de 100%. Presentemente, as biomoléculas preferidas para aplicações de direccionamento incluem anticorpos, hormonas e ligandos para receptores de superfície celular. Biomoléculas de direccionamento exemplares incluem, mas não estão limitados a, um anticorpo específico para o receptor da transferrina para distribuição da molécula ao cérebro (Penichet et al., 1999, *J. Immunol.* 163:4421-44.26; Pardridge, 2002, *Adv. Exp. Med. Biol.* 513:397-430), um péptido que reconhece a

vasculatura da próstata (Arap *et al.*, 2002, *PNAS* 99:1527-1531), e um anticorpo específico para as cavéolas do pulmão (McIntosh *et al.*, 2002, *PNAS* 99:1996-2001).

O grupo de modificação pode ser uma proteína, tal como o interferão. Os interferões são glicoproteínas antivirais que, em humanos, são secretados pelos fibroblastos primários humanos após indução com vírus ou RNA de cadeia dupla. Os interferões são de interesse como agentes terapêuticos, e.g., antivirais e tratamento de esclerose múltipla. Para referências que discutem interferão- β , ver, e.g., Yu, *et al.*, *J. Neuroimmunol.*, 64(1):91-100 (1996); Schmidt, J., *J. Neurosci. Res.*, 65(1):59-67 (2001); Wender, *et al.*, *Folia Neuropathol.*, 39(2):91-93 (2001); Martin, *et al.*, *Springer Semin. Immunopathol.*, 18(1):1-24 (1996); Takane, *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 294(2):746-752 (2000); Sburlati, *et al.*, *Biotechnol. Prog.*, 14:189-192 (1998); Dodd, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 787:183-187 (1984); Edelbaum, *et al.*, *J. Interferon Res.*, 12:449-453 (1992); Conradt, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262(30):14600-14605 (1987); Civas, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 173:311-316 (1988); Demolder, *et al.*, *J. Biotechnol.*, 32:179-189 (1994); Sedmak, *et al.*, *J. Interferon Res.*, 9 (Suppl 1):S61-S65 (1989); Kagawa, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263(33): 17508-17515 (1988); Hershenson, *et al.*, Patente U.S. N°. 4 894 330; Jayaram, *et al.*, *J. Interferon Res.*, 3(2):177-180 (1983); Menge, *et al.*, *Develop. Biol. Standard*, 66:391-401 (1987); Vonk, *et al.*, *J. Interferon Res.*, 3(2):169-175 (1983); e Adolf, *et*

al, *J. Interferon Res.*, 10:255-267 (1990). Para referências relevantes para o interferão- α , ver, Asano, et al., *Eur. J. Cancer*, 27(Suppl 4):521-S25 (1991); Nagy, et al., *Anticancer Research*, 8(3):467-470 (1988); Dron, et al., *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 3(1):13-19 (1989); Habib, et al., *Am. Surg.*, 67(3):257-260 (3/2001); e Sugiyama, et al., *Eur. J. Biochem.*, 217:921-927 (1993).

Num conjugado de interferão exemplar, o interferão P é conjugado com um segundo péptido através de um braço ligante. O braço ligante inclui um grupo de ligação a glicosilo intacto através do qual está ligado ao segundo péptido através de um método da invenção. O braço ligante também inclui opcionalmente um segundo grupo de ligação a glicosilo intacto, através do qual se liga ao interferão.

Numa outra forma de realização exemplar, a invenção proporciona um conjugado de factor de estimulação de colónias de granulócitos humanos (G-CSF). O G-CSF é uma glicoproteína que estimula a proliferação, diferenciação e activação de células progenitoras neutropoiéticas em neutrófilos funcionalmente maduros. O G-CSF injectado é conhecido por ser rapidamente eliminado do corpo. Ver, por exemplo, Nohynek, et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 39:259-266 (1997); Lord, et al., *Clinical Cancer Research*, 7(7):2085-2090 (07/2001); Rotondaro, et al., *Molecular Biotechnology*, 11(2):117-128 (1999); e Böning, et al., *Bone Marrow Transplantation*, 28:259-264 (2001). Um conjugado exemplar de G-CSF é preparada como discutido acima para o

conjugado dos interferões. Um especialista na técnica entenderá que podem ser conjugadas muitas outras proteínas com o interferão utilizando os métodos e composições da invenção, incluindo mas não limitados a, os péptidos listados nas Tabelas 7 e 8 (aqui apresentados noutra local) e na Figura 28, e nas Figuras 29-57, nos quais os esquemas de modificação individual são apresentados.

As ligações contempladas incluem, mas não estão limitados a, proteína-açúcar-ligante-açúcar-proteína, proteína-açúcar-ligante-proteína e suas formas multivalentes, e proteína-açúcar-ligante-fármaco em que o fármaco inclui moléculas pequenas, péptidos, lípidos, entre outros.

A distribuição específica para um sítio e orientada para o alvo de agentes terapêuticos é desejável para o objectivo de tratar uma vasta variedade de doenças humanas, tais como diferentes tipos de malignidades e certos distúrbios neurológicos. Esses processos são acompanhados por menos efeitos colaterais e uma eficácia mais elevada de fármaco. Vários princípios se basearam na concepção destes sistemas de distribuição. Para uma revisão, ver Garnett, *Advanced Drug Delivery Reviews* 53:171-216 (2001).

O conceito de distribuição específica para o tecido de agentes terapêuticos vai para além da interacção entre transferrina e receptor da transferrina ou suas proteínas relacionadas. Por exemplo, foi descrito um sistema de distribuição específico para o osso no qual as proteínas

são conjugadas com um aminobisfosfato de pesquisa de osso para distribuição melhorada de proteínas ao tecido mineralizado. Uludag e Yang, *Biotechnol. Prog.* 18:604-611 (2002). Para uma revisão sobre este tópico, ver Vyas et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System* 18:1-76 (2001).

Pode ser utilizada uma variedade de ligantes no processo de criação de bioconjugados para o objectivo da distribuição específica de agentes terapêuticos,. Ligantes adequados incluem reagentes de ligação reticulada homo- e heterobifuncionais, que podem ser cliváveis através de, e.g., dissociação catalisada por ácido, ou não clivável (ver, e.g., Srinivasachar e Neville, *Biochemistry* 28: 2501-2509 (1989); Wellhoner et al., *The Journal of Biological Chemistry* 266:4309-4314 (1991)). A interacção entre muitos parceiros de ligação conhecidos, tais como biotina e avidina/estreptavidina, também podem ser utilizados como um meio para unir um agente terapêutico e um parceiro conjugado que assegura a distribuição específica e eficaz de um agente terapêutico. Utilizando os métodos da invenção, as proteínas podem ser utilizadas para distribuir moléculas a compartimentos intracelulares como conjugados. Proteínas, péptidos, hormonas, citocinas, pequenas moléculas ou semelhantes que se ligam a receptores da superfície celular específicos que são internalizados após ligação ao ligando podem ser utilizados para direccionamento intracelular de compostos terapêuticos conjugados. Tipicamente, o complexo receptor-ligando é internalizado em

vesículas intracelulares que são distribuídas a compartimentos celulares específicos, incluindo, mas não limitados a, o núcleo, mitocôndria, golgi, RE, lisossoma, e endossoma, dependendo da localização intracelular direccionada pelo receptor. Através da conjugação do ligando do receptor com a molécula desejada, o fármaco será transportado com o complexo receptor-ligando e será distribuído aos compartimentos intracelulares normalmente direccionados pelo receptor. A fármaco pode, por isso, ser distribuído a uma localização intracelular específica na célula onde é necessária para tratar uma doença.

Podem ser utilizadas muitas proteínas para direccionar agentes terapêuticos a tecidos e órgãos específicos. Proteínas direccionadas incluem, mas não estão limitadas a, factores de crescimento (EPO, HGH, EGF, factor de crescimento nervoso, FGF, entre outros), citocinas (GM-CSF, G-CSF, a família do interferão, interleuquinas, entre outros), hormonas (FSH, LH, as famílias de esteróides, estrogénio, corticosteróides, insulina, entre outros), proteínas do soro (albumina, lipoproteínas, fetoproteína, proteínas de soro humano; anticorpos e fragmentos de anticorpos, entre outros), e vitaminas (folato, vitamina C, vitamina A, entre outros). Estão disponíveis agentes de direccionamento que são específicos para receptores na maioria dos tipos de células.

Configurações de ligação contempladas incluem, mas não estão limitadas a, proteína-açúcar-ligante-açúcar-

proteína e suas formas multivalentes, proteína-açúcar-ligante-proteína e suas formas multivalentes, proteína-açúcar-ligante-agente terapêutico, em que o agente terapêutico inclui, mas não está limitado a, moléculas pequenas, péptidos e lípidos. Em algumas formas de realização, é utilizado um ligante hidrolisável que pode ser hidrolisado uma vez internalizado. Pode ser utilizado um ligante ácido lábil com vantagem quando o conjugado de proteína é internalizado nos endossomas ou lisossomas que possuem um pH ácido. Uma vez internalizado no endossoma ou lisossoma, o ligante é hidrolisado e o agente terapêutico é libertado do agente de direccionamento.

E. Unidades Terapêuticas

Noutra forma de realização preferida, o açúcar modificado inclui uma unidade terapêutica. Os especialistas na técnica entenderão que existe uma sobreposição entre a categoria das unidades terapêuticas e biomoléculas; muitas biomoléculas possuem propriedades ou potencial terapêutico.

As unidades terapêuticas podem ser agentes já aceites para utilização clínica ou podem ser fármacos cuja utilização é experimental, ou cuja actividade ou mecanismo de acção está sob investigação. As unidades terapêuticas podem possuir uma acção provada num dado estado de doença ou pode ser apenas colocada a hipótese para mostrar uma acção desejável num dado estado de doença. Numa forma de realização preferida, as unidades terapêuticas são compos-

tos, que estão a ser rastreados quanto à sua capacidade para interagir com um tecido de escolha. Unidades terapêuticas, que são úteis na prática da presente invenção incluem fármacos de uma vasta gama de classes de fármaco possuindo uma variedade de actividades farmacológicas. Em algumas formas de realização, é preferida a utilização de unidades terapêuticas que não são açúcares. Uma excepção a esta preferência é a utilização de um açúcar que é modificado por ligação covalente a outra entidade, tal como um PEG, unidade terapêutica de biomolécula, unidade de diagnóstico e semelhantes. É também revelado uma unidade de ácido nucleico anti-sentido que é conjugada com um braço ligante que é ligado à unidade de direccionamento. Também, uma unidade de açúcar terapêutico pode ser conjugada com um braço ligante e a cassette do açúcar-braço ligante é subsequentemente conjugada com um péptido através de um método da invenção.

Os métodos de conjugação de agentes terapêuticos e de diagnóstico a várias outras espécies são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Ver, por exemplo Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; e Dunn *et al.*, Eds. POLIMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991.

É também revelada uma unidade terapêutica ligada ao açúcar modificado através de uma ligação que é clivada em condições seleccionadas. Condições exemplares incluem,

mas não estão limitadas a, um pH seleccionado (e.g., estômago, intestino, vacúolo endocitótico), a presença de uma enzima activa (e.g., esterase, protease, redutase, oxidase), luz, calor e semelhantes. São conhecidos na técnica muitos grupos cliváveis. Ver, por exemplo, Jung et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 761: 152-162 (1983); Joshi et al., *J. Biol. Chem.*, 265: 14518-14525 (1990); Zarling et al., *J. Immunol.*, 124: 913-920 (1980); Bouizar et al., *Eur. J. Biochem.*, 155: 141-147 (1986); Park et al., *J. Biol. Chem.*, 261: 205-210 (1986); Browning et al., *J. Immunol.*, 143: 1859-1867 (1989).

Classes de unidades terapêuticas úteis incluem, por exemplo, fármacos não esteróides anti-inflamatórios (NSAIDS). Os NSAIDS pode, por exemplo, ser seleccionado a partir das seguintes categorias: (e.g., derivados de ácido propiônico, derivados de ácido acético, derivados de ácido fenâmico, derivados de ácido bifenilcarboxílico e oxica-mos); fármacos esteróides anti-inflamatórios incluindo hidrocortisona e semelhantes; adjuvantes; anti-histamínicos (e.g., clorfeniramina, triprolidina); fármacos anti-tússicos (e.g., dextrometorfano, codeína, caramifeno e carbetapentano); fármacos antipruríticos (e.g., metdilazina e trimeprazina); fármacos anticolinérgicos (e.g., escopolamina, atropina, homatropina, levodopa); fármacos anti-eméticos e anti-náuseas (e.g., ciclizina, meclizina, clorpromazina, buclizina); fármacos anoréxicos (e.g., benzfetamina, fentermina, clorfentermina, fenfluramina); fármacos estimulantes centrais (e.g., anfetaminas, metanfetamina,

dextroanfetamina e metilfenidato); fármacos anti-arrítmicos (e.g., propanolol, procainamida, disopiramida, quinidina, encainida); fármacos de bloqueadores β -adrenérgicos (e.g., metoprolol, acebutolol, betaxolol, labetalol e timolol); fármacos cardiotónicos (e.g., milrinona, amrinona e dobutamina); fármacos anti-hipertensivos (e.g., enalapril, clonidina, hidralazina, minoxidil, guanadrel, guanetidina); fármacos diuréticos (e.g., amilorida e hidroclorotiazida); fármacos vasodilatadores (e.g., diltiazem, amiodarona, isoxsuprina, nilidrina, tolazolina e verapamil); fármacos vasoconstritores (e.g., di-hidroergotamina, ergotamina e metilsergida); fármacos anti-úlceras (e.g., ranitidina e cimetidina); fármacos anestéticos (e.g., lidocaína, bupivacaína, cloroprocaína, dibucaína); fármacos antidepressivos (e.g., imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina); fármacos tranquilizantes e sedativos (e.g., clordiazepóxido, benacitizina, benzquinamida, flurazepam, hidroxizina, loxapina e promazina); fármacos anti-pscóticos (e.g., clorprotixeno, flufenazina, haloperidol, molindona, tioridazina e trifluoperazina); agentes antimicrobianos (fármacos antibacteriano, antifúngico, antiprotozoário e antivirais).

Classes de unidades terapêuticas úteis incluem adjuvantes. Os adjuvantes podem, por exemplo, ser selecionados a partir de conjugados de hemocianina de lapa, monofosforil lípido A, lipopéptido MALP-2 derivado de micoplasma, subunidade da toxina B da cólera, toxina termolábil de *Escherichia coli*, formas de epítipo de auxiliar T

universal do toxóide do tétano, interleuquina-12, oligodeoxinucleótidos CpG, brometo de dimetildioctadecilamónio, ciclodextrina, esqualeno, sais de alumínio, vesícula da membrana externa de meningococos (OMV), montanide ISA, TiterMax™ (disponível em Sigma, St. Louis MO), absorção de nitrocelulose, complexos de imuno-estimulação, tais como o adjuvante Quil A, Gerbu™ (Gerbu Biotechnik, Kirchwald, Alemanha), dipéptido de treonil muramil, timosina alfa, bupivacaína, GM-CSF, Adjuvante Incompleto de Freund, MTP-PE/MF59 (Ciba/ Geigy, Basel, Suíça), polifosfazeno, derivado da saponina da árvore soapbark, *Quillaja saponaria*, e a formulação de adjuvante Syntex (Biocine, Emeryville, CA), entre outros bem conhecidos dos especialistas na técnica.

Fármacos antimicrobianos que são preferidas para incorporação na present composição incluem, por exemplo, sais farmacêuticamente aceitáveis de fármacos de β -lactamo, fármacos de quinolona, ciprofloxacina, norfloxacina, tetraciclina, eritromicina, amicacina, triclosan, doxiciclina, capreomicina, clorexidina, clortetraciclina, oxitetraciclina, clindamicina, etambutol, hexamidina isotionato, metronidazole, pentamidina, gentamicina, canamicina, lineomicina, metaciclina, metenamina, minociclina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomicina, tobramicina, miconazole e amantadina.

Outras unidades de fármaco de utilização na prática da presente invenção incluem fármacos antineoplásicos (e.g., antiandrogénios (e.g., leuprolida ou flutamida),

agentes citocidas (e.g., adriamicina, doxorubicina, taxol, ciclofosfamida, busulfan, cisplatina, β -2-interferão) anti-estrogénios (e.g., tamoxifen), antimetabolitos (e.g., fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina). Estão também incluídos nesta classe agentes à base de radioisótopos para diagnóstico e terapia, e toxinas conjugadas, tais como ricina, geldanamicina, mitansina, CC-1065, C-1027, as duocarmicinas, caliqueamicina e suas estruturas e análogos relacionados, e as toxinas listadas na Tabela 2.

A unidade terapêutica também pode ser uma hormona (e.g., medroxiprogesterona, estradiol, leuprolida, megestrol, octreotida ou somatostatina); fármacos relaxantes musculares (e.g., cinamedrina, ciclobenzaprina, flavoxato, orfenadrina, papaverina, mebeverina, idaverina, ritodrina, difenoxilato, dantroleno e azumoleno); fármacos antispasmódicos; fármacos activos para o osso (e.g., compostos do fármaco difosfonato e fosfonoalquilfosfinato); fármacos de modulação endócrina (e.g., contraceptivos (e.g., etinodiol, etinil estradiol, noretindrona, mestranol, desogestrel, medroxiprogesterona), moduladores da diabetes (e.g., gliburido ou clorpropamida), anabólicos, tais como testolactona ou estanozolol, androgénios (e.g., metiltestosterona, testosterona ou fluoximesterona), antidiuréticos (e.g., desmopressina) e calcitoninas).

São também de utilização na presente invenção estrogénios (e.g., dietilstilbesterol), glucocorticóides (e.g., triamcinolona, betametasona, etc.) e progesteronas, tais como noretindrona, etinodiol, noretindrona, levonor-

gestrel; agentes da tiróide (e.g., liotironina ou levotiroxina) ou agentes anti tiróide (e.g., metimazole); fármacos anti-hiperprolactinémicos (e.g., cabergolina); supressores de hormona (e.g., danazol ou goserelina), oxitócicos (e.g., metilergonovina ou oxitocina) e prostaglandinas, tais como mioprostol, alprostadil ou dinoprostona, também podem ser empregues.

Outros grupos de modificação úteis incluem fármacos imunomoduladores (e.g., anti-histaminas, estabilizadores de mastócitos, tais como lodoxamida e/ou cromolina, esteróides (e.g., triamcinolona, beclometazona, cortisona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, beclometasona, ou clobetasol), antagonistas da histamina H2 (e.g., famotidina, cimetidina, ranitidina), imunossuppressores (e.g., azatioprina, ciclosporina), etc. grupos com actividade anti-inflamatória, tais como sulindac, etodolac, cetoprofeno e cetorolac, são também de utilidade. Outros fármacos de utilização em conjunção com a presente invenção serão óbvios para os especialistas na técnica.

Classes de unidades terapêuticas úteis incluem, por exemplo, fármacos anti-sentido e também DNA nu. Os fármacos anti-sentido podem ser seleccionados a partir de, por exemplo, Affinitak (ISIS, Carlsbad, CA) e Genasense™ (de Genta, Berkeley Heights, NJ). O DNA nu pode ser distribuído como um agente terapêutico para terapia génica por exemplo com o DNA que encodifica, por exemplo, para os factors VIII e IX para o tratamento de distúrbios de hemofilia.

F. Reparação de Açúcares Modificados

São aqui discutidos açúcares modificados úteis na formação de conjugados da invenção. A discussão foca-se na preparação de um açúcar modificado com um polímero solúvel em água para clareza de ilustração. Em particular, a discussão centra-se na preparação de açúcares modificados que incluem uma unidade de poli(etilenoglicol). Os especialistas entenderão que os métodos aqui apresentados são vastamente aplicáveis à preparação de açúcares modificados, por isso, a discussão não deve ser interpretada como limitante do âmbito da invenção.

Em geral, a unidade de açúcar e o grupo de modificação estão ligados juntamente através da utilização de grupos reactivos, que são tipicamente transformados pelo processo de ligação a um novo grupo funcional orgânico ou espécie não reactiva. O(s) grupo(s) funcionais reactivos do açúcar está localizado em qualquer posição na unidade de açúcar. Grupos reactivos e classes de reacções úteis na prática da presente invenção são geralmente aqueles que são bem conhecidos na técnica da química dos bioconjugados. Classes de reacções presentemente favorecidas disponíveis com unidades de açúcar reactivas são aquelas, que prosseguem em condições relativamente suaves. Estas incluem, mas não estão limitadas a substituições nucleofílicas (e.g., reacções de aminas e álcoois com haletos de acilo, ésteres activos), substituições electrofílicas (e.g., reacções de enamina) e adições a ligações múltiplas carbono-carbono e

carbono-heteroátomo (e.g., reacção de Michael, adição de Diels-Alder). Estas e outras reacções úteis são discutidas em, por exemplo, Smith e March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 5th Ed., John Wiley & Sons, New York, 2001; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; e Feeney *et al.*, PROTEINS MODIFICATION; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Grupos funcionais reactivos úteis pendentes de um núcleo ou grupo açúcar de modificação incluem, mas não estão limitados a:

- (a) grupos carboxilos e vários derivados destes incluindo, mas não limitados a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazole, haletos de ácido, acilimidazoles, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, alquilo, alqueno, alquinilo e ésteres aromáticos;
- (b) grupos hidroxilo, que podem ser convertidos em, e.g., ésteres, éteres, aldeídos, etc.
- (c) grupos haloalquilo, em que o haleto pode ser mais tarde deslocado com um grupo nucleofílico, tal como, por exemplo, uma amina, um anião carboxilato, anião tiol, carbanião, ou um ião alcóxido, resultando desse modo na ligação covalente de um novo grupo no grupo funcional do átomo de halogénio;
- (d) grupos dienofilo, que são capazes de parti-

cipar em reacções de Diels-Alder tais como, por exemplo, grupos maleimido;

(e) grupos aldeído ou cetona, de modo a que seja possível uma derivatização subsequente através da formação de derivados de carbonilo tais como, por exemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas ou oximas, ou através de cada mecanismo como adição de Grignard ou adição de alquil-lítio;

(f) grupos de haleto de sulfonilo subsequentes à reacção com aminas, por exemplo, para formar sulfonamidas;

(g) grupos tiol, que podem ser, por exemplo, convertidos em persulfuretos ou reagidos com haletos de alquilo e acilo;

(h) grupos amina ou sulfidrilo, que podem ser, por exemplo, acilados, alquilados ou oxidados;

(i) alquenos, que podem sofrer, por exemplo, cicloadições, acilação, Michael adição, etc; e

(j) epóxidos, que podem reagir com, por exemplo, compostos amina e hidroxilo.

Podem ser seleccionados grupos funcionais reactivos de modo a que não participem em, ou interfiram com, as reacções necessárias para montar o núcleo de açúcar reactivo ou grupo de modificação. Alternativamente, um grupo funcional reactivo pode ser protegido de participar na reacção pela presença de um grupo de protecção. Os especialistas na técnica sabem como proteger um grupo funcional particular de modo a que não interfira com um conjunto de condições de reacção seleccionadas. Para

exemplos de grupos de protecção úteis, ver, por exemplo, Greene *et al.*, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, New York, 1991.

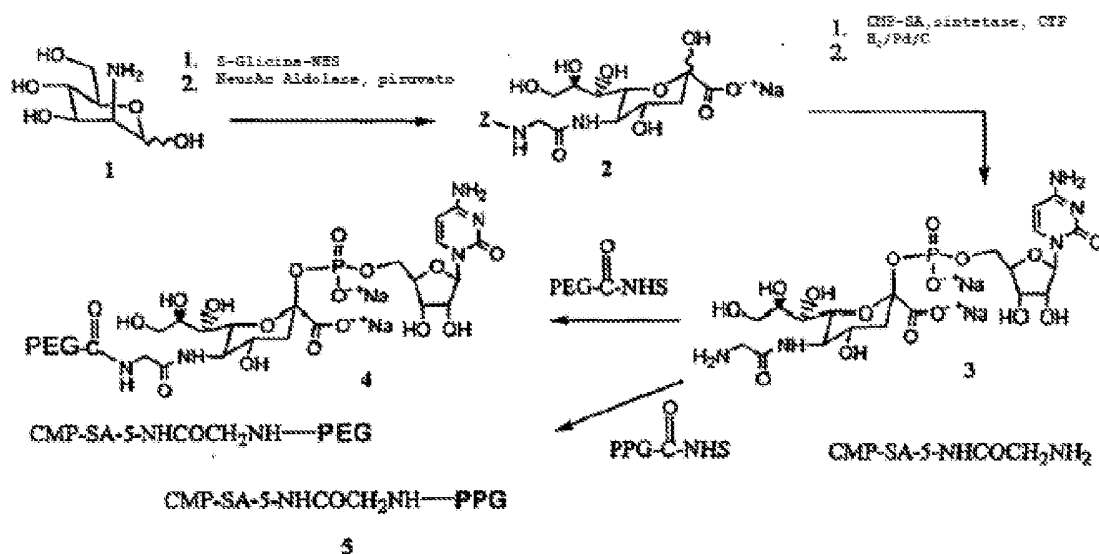
Na discussão que se segue, são apresentados vários exemplos específicos de açúcares modificados que são úteis na prática da presente invenção. Nas formas de realização exemplares, é utilizado um derivado de ácido siálico como o núcleo de açúcar ao qual o grupo de modificação está ligado. O foco da discussão de derivados de ácido siálico é apenas para clareza de ilustração e não deve ser encarada como limitando o âmbito da invenção. Os especialistas na técnica irão apreciar que uma variedade de outras unidades de açúcar podem ser activadas e derivadas de um modo análogo ao apresentado utilizando ácido siálico como um exemplo. Por exemplo, estão disponíveis vários métodos para modificar a galactose, glucose, N-acetilgalactosamina e fucose para referir alguns substratos de açúcar, que são rapidamente modificados através dos métodos reconhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Elhalabi *et al.*, *Curr. Med Chem.* 6: 93 (1999); e Schafer *et al.*, *J. Org. Chem.* 65: 24 (2000).

É também revelado um péptido que é modificado por um método da invenção, é um péptido que é produzido em células de mamíferos (e.g., células CHO) ou num animal transgénico e desse modo, contém cadeias de oligossacárido ligado em N- e/ou O-, que estão incompletamente sialiladas. As cadeias de oligossacáridos do glicopéptido que não tem um ácido siálico e que contém um resíduo de galactose

terminal pode ser PEGuilado, PPGuilado ou modificado de outra forma com um ácido siálico modificado.

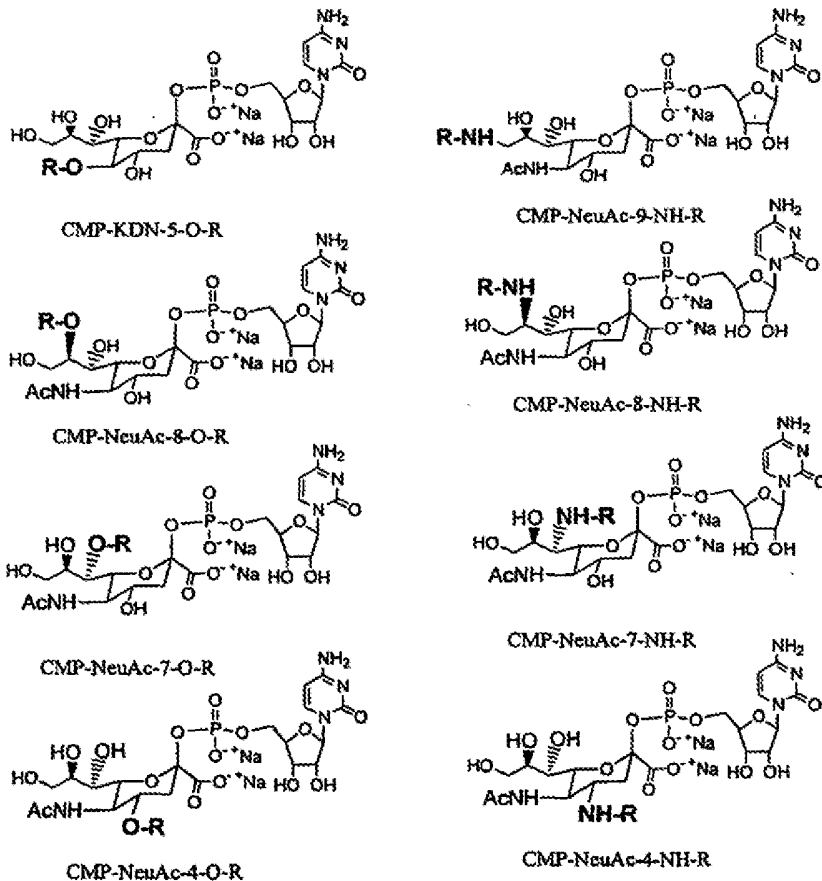
No esquema 4, o glicósido de manosamina **1**, é tratado com o éster activo de um derivado de aminoácido protegido (e.g., glicina), convertendo o resíduo amina de açúcar no aduto amida do aminoácido protegido correspondente. O aduto é tratado com uma aldolase para formar o ácido siálico **2**. O composto **2** é convertido no derivado de CMP correspondente através da acção de CMP-SA sintetase, seguido por hidrogenação catalítica do derivado de CMP para produzir o composto **3**. A amina introduzida através da formação do aduto da glicina é utilizada como um locus de ligação a PEG ou PPG reagindo o composto **3** com um derivado de PEG ou PPG activado (e.g., PEG-C(O)NHS, PPG-C(O)NHS), produzindo **4** ou **5**, respectivamente.

Esquema 4



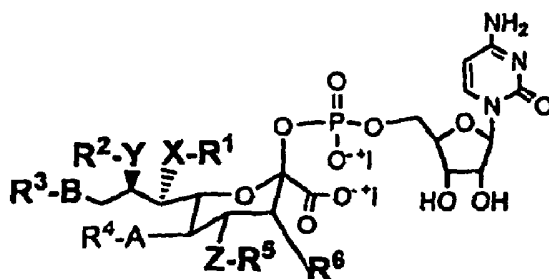
A Tabela 3 apresenta exemplos representativos de monofosfatos de açúcar que são derivados de uma unidade PEG ou PPG. Certos compostos da Tabela 3 são preparados pelo método do esquema 1. Outros derivados são preparados através de métodos reconhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Keppler *et al.*, *Glycobiology* 11: 11R (2001); e Charter *et al.*, *Glycobiology* 10: 1049 (2000)). Estão disponíveis comercialmente outros análogos de PEG e PPG reactivos para amina, ou podem ser preparados através de métodos prontamente acessíveis aos especialistas na técnica.

Tabela 3. Exemplos de monofosfatos de açúcar que são derivados com uma unidade PEG ou PPG



Os fosfatos de açúcar modificado de utilização na prática da presente invenção podem ser substituídos noutras posições assim como aqueles aqui apresentados acima. "i" pode ser Na ou outro sal e "i" pode ser utilizado indistintamente com Na. Substituições presentemente preferidas de ácido siálico são apresentados na fórmula 5.

Fórmula 5

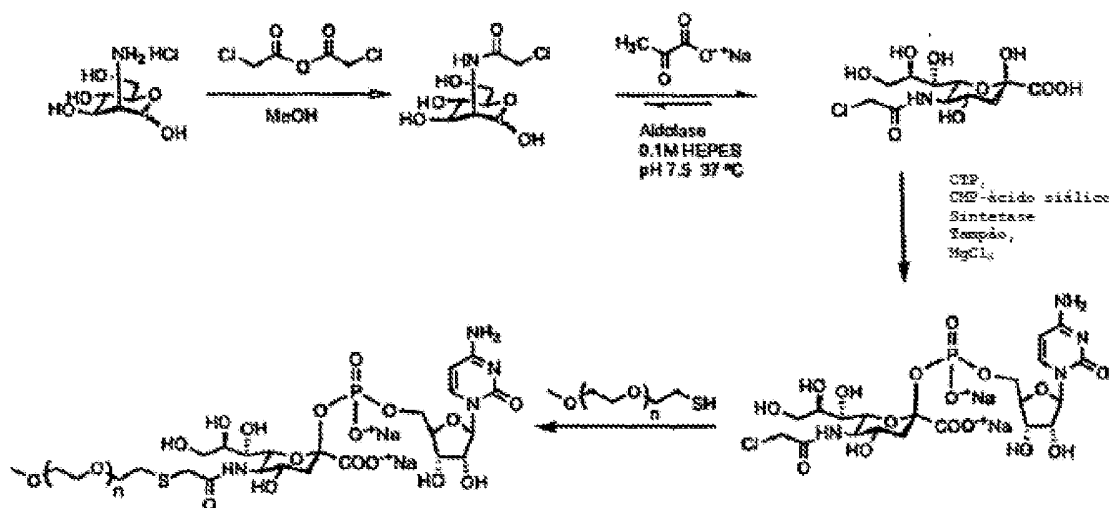


(I)

em que X é um grupo de ligação, que é preferencialmente seleccionado a partir de -O-, -N(H)-, -S, CH₂-, e N(R)₂, em que cada R é um membro seleccionado independentemente a partir de R¹-R⁵. "i" pode ser Na ou outro sal, e Na pode ser utilizado indistintamente com "i: Os símbolos Y, Z, A e B representam cada um deles, um grupo que é seleccionado a partir do grupo apresentado acima para a identidade de X. X, Y, Z, A e B são cada um seleccionado independentemente e, por isso, eles podem ser iguais ou diferentes. Os símbolos R¹, R², R³, R⁴ e R⁵ representam H, polímeros, um polímero solúvel em água, unidade terapêutica, biomolécula ou outra unidade. O símbolo R⁶ representa H, OH, ou um polímero. Alternativamente, esses símbolos representam um ligante que é ligado a um polímero, polímero solúvel em água, unidade terapêutica, biomolécula ou outra unidade.

É também revelada uma manosamina que é simultaneamente acilada e activada para uma substituição nucleofílica pela utilização de anidrido cloroacético, como apresentado no esquema 5. Em cada um dos esquemas apresentados nesta secção, i^+ ou Na^+ podem ser utilizados indistintamente, em que o sal pode ser sódio, ou pode ser qualquer outro sal adequado

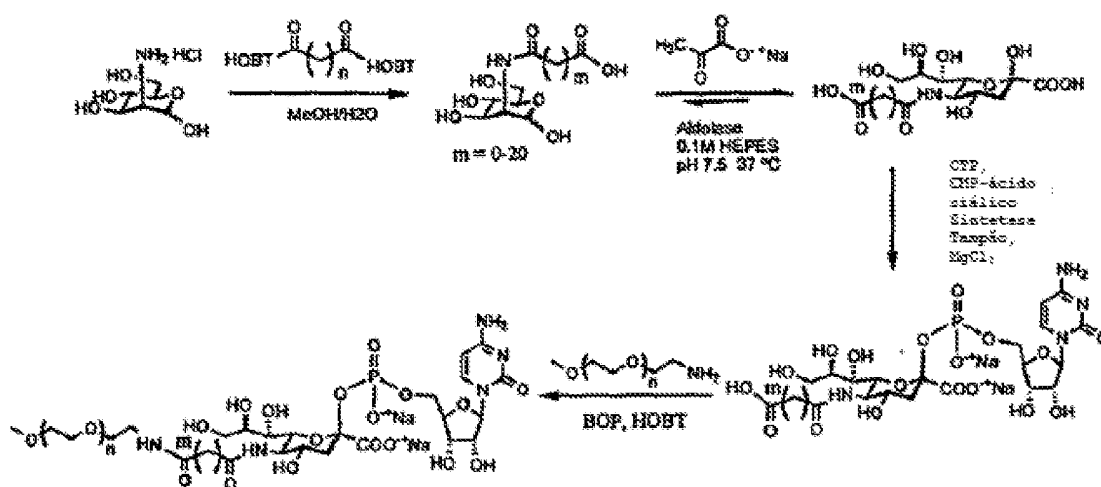
Esquema 5



O glicano derivado de cloro resultante é colocado em contacto com piruvato na presença de uma aldolase, formando um ácido siálico derivado de cloro. O açúcar do nucleótido correspondente é preparado colocando em contacto o derivado de ácido siálico com trifosfatos de um nucleótido apropriado e uma sintetase. O grupo cloro na unidade de ácido siálico é então deslocado com um derivado de PEG nucleofílico PEG, tal como tio-PEG.

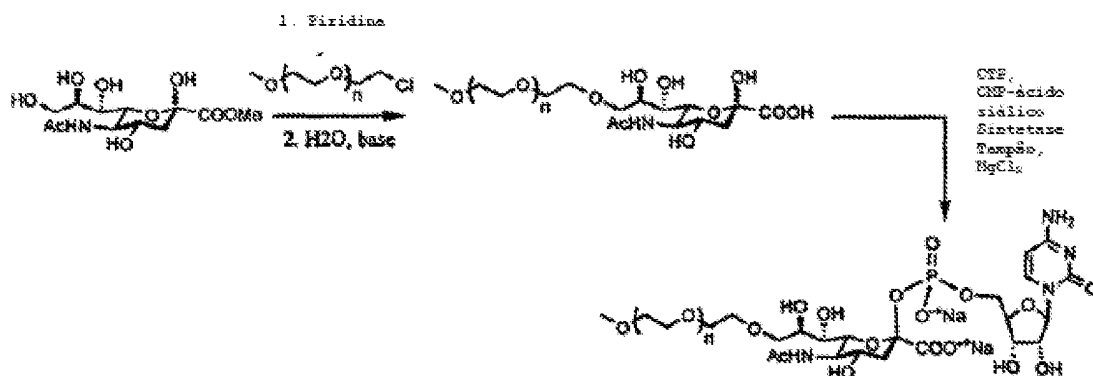
Numa outra forma de realização exemplar, como apresentado no esquema 6, uma manosamina é acilada com um bis-HOBT dicarboxilato, produzindo o ácido amido-alquil-carboxílico correspondente, que é subsequentemente convertido num derivado de ácido siálico. O derivado de ácido siálico é convertido num açúcar de nucleótido, e o ácido carboxílico é activado e reagido com um derivado de PEG nucleofílico, tal como amino-PEG.

Esquema 6



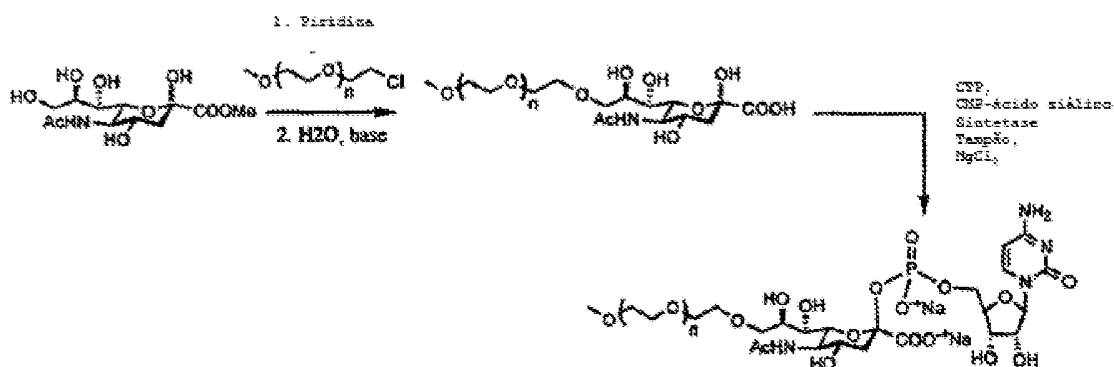
Noutra forma de realização exemplar, apresentada no esquema 7, o ácido neuramínico protegido em amina e carboxilo é activado convertendo o grupo hidroxilo primário no éster de p-toluenossulfonato correspondente, e o éster metílico é clivado. O ácido neuramínico activado é convertido no açúcar de nucleótido correspondente, e o grupo de activação é deslocado por uma espécie de PEG nucleofílica, tal como tio-PEG.

Esquema 7



Ainda noutra forma de realização exemplar, como apresentada no esquema 8, a unidade hidroxilo primária de um derivado de ácido neuramínico protegido em amina e carboxilo é alquilada utilizando um PEG electrofílico, tal como cloro-PEG. O éster metílico é subsequentemente clivado e o açúcar PEG é convertido num açúcar de nucleótido.

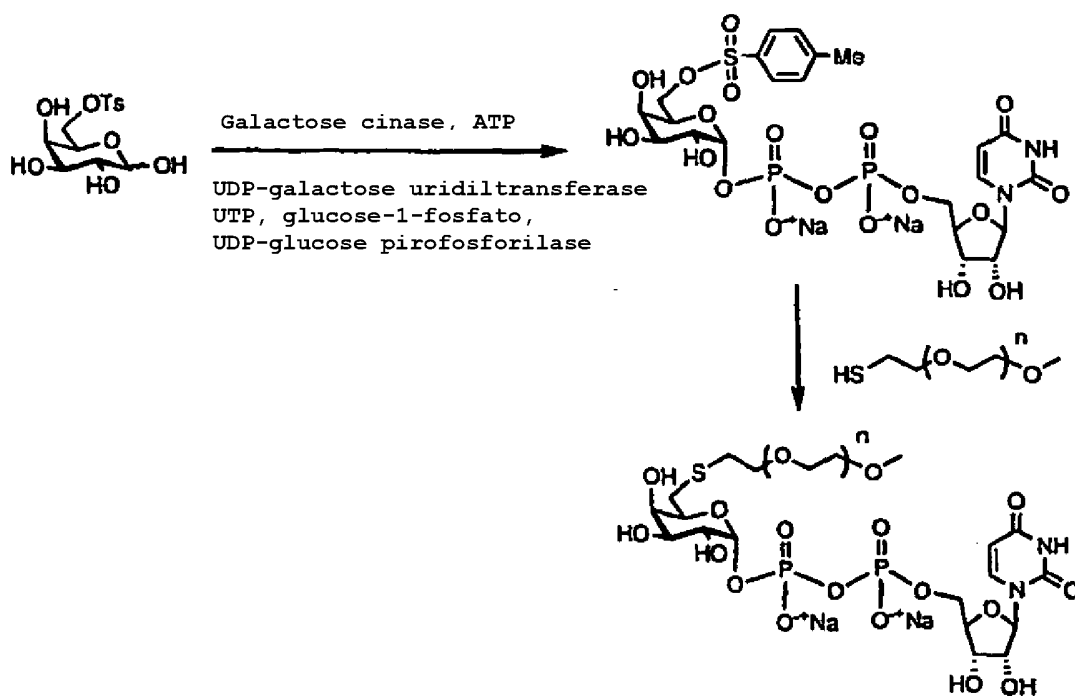
Esquema 8



Os glicanos diferentes de ácido siálico podem ser derivatizados com PEG utilizando os métodos aqui apresen-

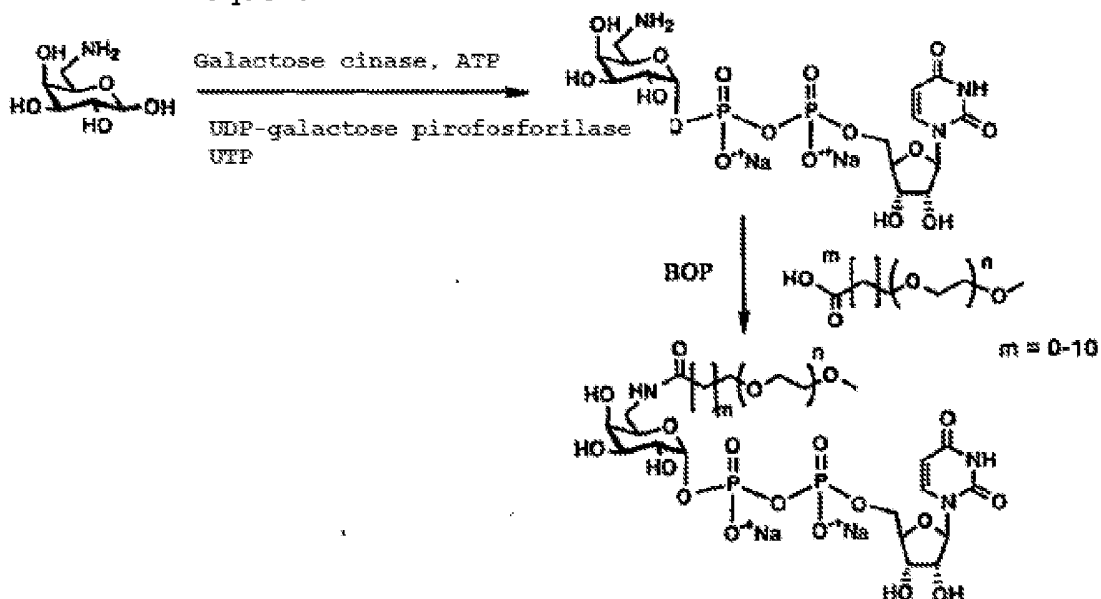
tados. Os glicanos derivatizados, estão eles próprios, também dentro do âmbito da invenção. Assim, o esquema 9 proporciona uma via sintética exemplar para um açúcar de nucleótido de galactose PEGuilado. O grupo hidroxilo primário da galactose é activado como o éster de toluenossulfonato correspondente, que é subsequentemente convertido num açúcar de nucleótido.

Esquema 9



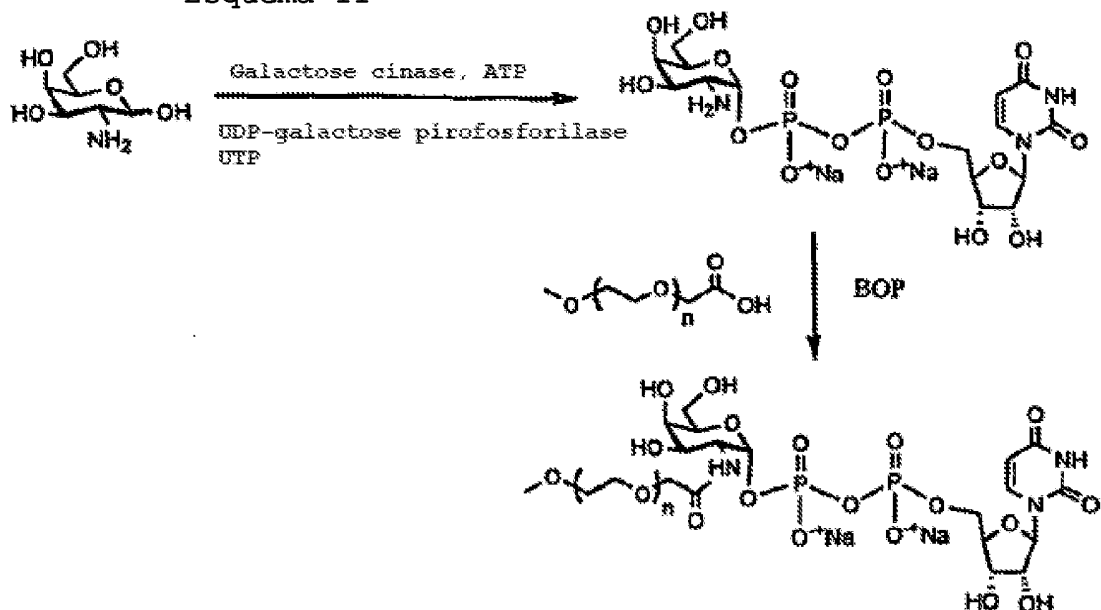
O esquema 10 apresenta uma via exemplar para preparar um derivado de galactose-PEG que se baseia numa unidade galactose-6-amina. Desse modo, a galactosamina é convertida num açúcar de nucleótido, e a unidade de amina da galactosamina é funcionalizada com um derivado de PEG activo.

Esquema 10



O esquema 11 proporciona outra via exemplar para derivados da galactose. O ponto de partida para o esquema 11 é a galactose-2-amina, que é convertida num açúcar de nucleótido. A unidade amina do açúcar nucleótido é o locus para ligar um derivado de PEG, tal como Metoxi-PEG (mPEG) ácido carboxílico.

Esquema 11



Unidades exemplares ligadas aos conjugados aqui revelados incluem, mas não estão limitados a, derivados de PEG (e.g., acil-PEG, acil-alquil-PEG, alquil-acil-PEG carbamoil-PEG, aril-PEG, alquil-PEG), derivados de PPG (e.g., acil-PPG, acil-alquil-PPG, alquil-acil-PPG carbamoil-PPG, aril-PPG), ácido poliaspártico, poliglutamato, polilisina, unidades terapêuticas, unidades de diagnóstico, manose-6-fosfato, heparina, heparano, SLex, manose, manose-6-fosfato, Sialil Lewis X, FGF, VEGF, proteínas (e.g., transferrina), condroitina, queratano, dermatano, dextrano, dextrano modificado, amilose, bisfosfato, poli-SA, ácido hialurônico, queritano, albumina, integrinas, oligossacáridos antenários, péptidos e semelhantes. Métodos de conjugação de vários grupos de modificação numa unidade de sacárido estão imediatamente acessíveis aos especialistas na técnica (POLI (ETILENOGLICOL CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., Plenum Pub. Corp., 1992; POLI (ETILENOGLICOL) CHEMISTRY AND BIOLOGICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., ACS Symposium Series No. 680, American Chemical Society, 1997; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; e Dunn et al., Eds. POLIMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

Purificação de açúcares, açúcares de nucleótido e derivados

Os açúcares de nucleótido e derivados produzidos através dos processos acima podem ser utilizados sem

purificação. Contudo, é normalmente preferido recuperar o produto. Podem ser utilizadas técnicas convencionais, bem conhecidas, para recuperar os sacáridos glicosilados, tais como cromatografia de camada fina ou grossa, cromatografia em coluna, cromatografia de permuta iónica, ou filtração em membrana. É preferida a utilização de filtração em membrana, mais preferencialmente utilizando uma membrana de osmose reversa, ou uma ou mais técnicas cromatográficas em coluna para a recuperação, como é aqui discutido adiante e é citado na literatura aqui referida. Por exemplo, a filtração em membrana em que as membranas possuem um limite de passagem de peso molecular de cerca de 3000 até cerca de 10 000 pode ser utilizada para remover proteínas para reagentes possuindo um peso molecular inferior a 10 000 Da. A filtração em membrana ou por osmose reversa pode ser então utilizada para remover sais e/ou purificar os sacáridos do produto (ver, e.g., WO 98/15581). As membranas de nanofiltro são uma classe de membranas de osmose reversa que deixam passar sais monovalentes mas retêm sais polivalentes e solutos sem carga superiores a cerca de 100 até cerca de 2 000 Daltons, dependendo da membrana utilizada. Assim, numa aplicação típica, os sacáridos preparados através dos métodos da presente invenção serão retidos na membrana e os sais contaminantes passarão através dela.

G. Grupos de Ligação Reticulada

A preparação do açúcar modificado para utilização nos métodos da presente invenção inclui a ligação de um

grupo de modificação a um resíduo de açúcar e forma um aduto estável, que é um substrato para uma glicosiltransferase. Assim, é frequentemente preferida a utilização de um agente de ligação reticulada para conjugar o grupo de modificação e o açúcar. Compostos bifuncionais exemplares que podem ser utilizados para ligar grupos de modificação a unidades de hidrato de carbono incluem, mas não estão limitados a, poli(etilenoglicóis) bifuncionais, poliamidas, poliéteres, poliésteres e semelhantes. Uma abordagem geral para ligar hidratos de carbono a outras moléculas é conhecida na literatura. Ver, por exemplo, Lee *et al.*, *Biochemistry* 28: 1856 (1989); Bhatia *et al.*, *Anal. Biochem.* 178: 408 (1989); Janda *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 8886 (1990) e Bednarski *et al.*, WO 92/18135. Na discussão que se segue, os grupos reactivos são tratados como benignos na unidade de açúcar da açúcar modificado nascente. O foco da discussão é para clarificar a ilustração. Os especialistas na técnica entenderão que a discussão é também relevante para os grupos reactivos no grupo de modificação.

Uma estratégia exemplar envolve a incorporação de um sulfidrilo protegido no açúcar utilizando o ligante de ligação reticulada heterobifuncional SPDP (n-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato e depois desprotegendo o sulfidrilo para a formação de uma ligação persulfureto com outro sulfidrilo no grupo de modificação.

Se o SPDP afecta prejudicialmente a capacidade do açúcar modificado para actuar como um substrato da glico-

siltransferase, uma das séries de outros ligantes de ligação reticulada tais como 2-iminotiolano ou N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA) é utilizado para formar uma ligação persulfureto. A 2-iminotiolano reage com aminas primárias, incorporando instantaneamente um sulfidrilo não protegido na molécula contendo amina. A SATA também reage com aminas primárias, mas incorpora um sulfidrilo protegido, que é mais tarde desacetilado utilizando hidroxilamina para produzir um sulfidrilo livre. Em cada caso, o sulfidrilo incorporado está livre para reagir com outros sulfidrilos ou sulfidrilo protegido, como SPDP, formando a ligação persulfureto necessária.

A estratégia acima-descrita é exemplar, e não limitante, de ligantes de utilização na invenção. Estão disponíveis outros ligantes de ligação reticulada que podem ser utilizados em diferentes estratégias para a ligação reticulada do grupo de modificação ao péptido. Por exemplo, TPCH(S-(2-tiopiridil)-L-cisteína hidrazida e TPMPH ((S-(2-tiopiridil)mercapto-propiono-hidrazida) reage com unidades de hidratos de carbono que foram previamente oxidados por tratamento de periodato suave, formando desse modo uma ligação de hidrazona entre a porção hidrazida do ligante de ligação reticulada e os aldeídos gerados do periodato. O TPCH e o TPMPH introduzem um grupo sulfidrilo protegido em 2-piridiltiona no açúcar, que pode ser desprotegido com DTT e depois subsequentemente utilizado para conjugação, tal como a formação de ligações persulfureto entre componentes.

Se a ligação persulfureto for considerada inadequada para produzir açúcares modificados estáveis, podem ser utilizados outros ligantes de ligação reticulada que incorporam ligações mais estáveis entre componentes. Os ligantes de ligação reticulada heterobifuncionais GMBS (N-gama-malimidobutiriloxi)succinimida) e SMCC (succinimidil 4-(N-maleimido-metil)ciclo-hexano) reagem com aminas primárias, introduzindo desse modo um grupo de maleimida no componente. O grupo maleimida pode reagir subsequentemente com sulfidrilos no outro componente, que pode ser introduzido através de ligantes de ligação reticulada previamente mencionados, formando desse modo uma ligação tioéter estável entre os componentes. Se o impedimento estérico entre componentes interfere com a actividade ou a capacidade do componente do açúcar modificado para actuar como um substrato de glicosiltransferase, os ligantes de ligação reticulada podem ser utilizadas que introduzem braços espaçadores longos entre os componentes e incluem derivados de alguns dos ligantes de ligação reticulada previamente mencionados (*i.e.*, SPDP). Assim, existe uma abundância de ligantes de ligação reticulada adequados, que são úteis; cada um dos quais é seleccionado dependendo dos efeitos que tem sobre o conjugado peptídico óptimo e a produção de açúcar modificado.

São utilizados vários reagentes para modificar os componentes do açúcar modificado com ligações reticuladas químicas intramoleculares (para revisões de reagentes de ligação reticulada e processos de ligação reticulada ver:

Wold, F., *Meth. Enzymol.* 25: 623-651, 1972; Weetall, H. H., e Cooney, D. A., In: ENZYMES AS DRUGS. (Holcenberg, e Roberts, eds.) pp. 395-442, Wiley, New York, 1981; Ji, T. H., *Meth. Enzymol.* 91: 580-609, 1983; Mattson et al., *Mol. Biol. Rep.* 17: 167-183, 1993, todas as quais são aqui incorporadas por referência). Os reagentes de ligação reticulada preferidos são derivados de vários reagentes de ligação reticulada de comprimento zero, homo-bifuncional, e hetero-bifuncional. Os reagentes de ligação reticulada de comprimento zero incluem a conjugação directa de dois grupos de química intrínseca sem introdução de material extrínseco. Os agentes que catalisam a formação de uma ligação persulfureto que pertence a esta categoria. Outro exemplo são reagentes que induzem a condensação de um carboxilo e um grupo amino primário para formar uma ligação amida, tal como carbodiimidas, etilcloroformato, reagente K de Woodward (2-etil-5-fenilisoxazólio-3'-sulfonato), e carbonildiimidazole. Adicionalmente a estes reagentes químicos, pode ser utilizada a enzima transglutaminase (glutamil-péptido γ -glutamiltransferase; EC 2.3.2.13) como reagente de ligação reticulada de comprimento zero. Esta enzima catalisa reacções de transferência de acilo nos grupos carboxamida dos resíduos glutaminilo ligados a proteína, normalmente, a um grupo amino primário, como substrato. Os reagentes homo- e hetero-bifuncionais preferidos contêm dois sítios idênticos ou dois sítios diferentes, respectivamente, que podem ser reactivos para grupos amino, sulfidrilos, guanidino, indole, ou grupos não específicos.

2. Sítios Específicos Preferidos em Reagentes de Ligação Reticulada

a. Grupos Amino reactivos

Numa forma de realização preferida, os sítios no agente de ligação reticulada são grupos amino reactivos. Exemplo úteis não limitantes de grupos amino reactivos incluem N-hidroxissuccinimida (NHS) ésteres, imidoésteres, isocianatos, acil-haletos, arilazidas, ésteres de p-nitro-fenilo, aldeídos, e cloretos de sulfonilo.

Os ésteres de NHS reagem de um modo preferido com os grupos amino primários (incluindo aromático) de um componente de açúcar modificado. Os grupos imidazole das histidinas são conhecidos por competirem com aminas primárias para a reacção, mas os produtos de reacção são instáveis e rapidamente hidrolisados. A reacção envolve o ataque nucleofílico de uma amina sobre o ácido carboxílico de um éster da NHS para formar uma amida, libertando a N-hidroxissuccinimida. Assim, a carga positiva do grupo amino original é perdida.

Os imidoésteres são os reagentes de acilação mais específicos para reacção com os grupos amina dos componentes do açúcar modificado. A um pH entre 7 e 10, os imidoésteres reagem apenas com aminas primárias. As aminas primárias atacam imidatos nucleofilicamente para produzir um intermediário que se degrada em amidina a pH elevado ou

num novo imidato a pH baixo. O novo imidato pode reagir com outra amina primária, ligando desse modo por ligação reticulada dois grupos amino, um caso de um imidato putativamente monofuncional reagindo bifuncionalmente. O produto principal da reacção com aminas primárias é uma amidina que é uma base mais forte do que a amina original. A carga positiva do grupo amino original é, por isso, retida.

Os isocianatos (e isotiocianatos) reagem com as aminas primárias do componentes do açúcar modificado para formar ligações estáveis. As suas reacções com grupos sulfidrilo, imidazole, e tirosilo originam produtos relativamente instáveis.

As acilazidas são também utilizadas como reagentes amino-específicos nos quais as aminas nucleofílicas do componente de afinidade atacam os grupos carboxilo acídicos em condições ligeiramente alcalinas, e.g. pH 8,5.

Os aril-haletos, tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno, reagem preferencialmente com os grupos amino e grupos fenólicos de tirosina dos componentes de açúcar modificado, mas também com grupos sulfidrilo e imidazole.

Os ésteres de p-nitrofenil de ácidos mono- e dicarboxílicos são também grupos amino-reactivos úteis. Embora a especificidade do reagente não seja muito elevada, os grupos α - e ε -amino parecem reagir mais rapidamente.

Os aldeídos, tais como o glutaraldeído, reagem com aminas primárias de açúcar modificado. Embora se formem bases de Schiff instáveis após reacção dos grupos amino com os aldeídos dos aldeídos, o glutaraldeído é capaz de modificar o açúcar modificado com agentes de ligação reticulada estáveis. A pH 6-8, o pH típico das condições de ligação reticulada, os polímeros cíclicos sofrem uma desidratação para formar polímeros aldeído α - β insaturados. As bases de Schiff, contudo, são estáveis, quando conjugadas com outra ligação dupla. A interacção ressonante de ambas as ligações duplas evita a hidrólise da ligação de Schiff. Para além disso, as aminas a concentrações locais elevadas podem atacar a ligação etilénica dupla para formar um produto de adição de Michael estável.

Os cloretos de sulfonilo aromáticos reagem com uma variedade de sítios dos componentes do açúcar modificado, mas a reacção com os grupos amino é a mais importante, resultando numa ligação sulfonamida estável.

b. Grupos Reactivos-Sulfidrilo

Noutra forma de realização preferida, os sítios são grupos reactivos-sulfidrilo. Exemplos úteis, não limitantes de grupos reactivos-sulfidrilo incluem maleimidas, haletos de alquilo, persulfuretos de piridilo, e tio-ftalimidas.

As maleimidas reagem preferencialmente com o

grupo sulfidrilo dos componentes do açúcar modificado para formar ligações tioéter estáveis. Eles também reagem a uma taxa muito mais lenta com grupos amino primários e os grupos imidazole das histidinas. Contudo, a pH 7 o grupo maleimida pode ser considerado um grupo específico para sulfidrilo, uma vez que a este pH, a taxa de reacção de tióis simples é 1000 vezes superior à da amina correspondente.

Os haletos de alquilo reagem com grupos sulfidrilo, sulfetos, imidazoles, e grupos amino. A pH neutro até ligeiramente alcalino, contudo, os haletos de alquilo reagem principalmente com grupos sulfidrilo para formar ligações tioéter estáveis. A pH mais elevado, a reacção com grupos amino é favorecida.

Os persulfuretos de piridilo reagem com sulfidrilos livres através da permuta de persulfureto para produzir persulfuretos mistos. Como resultado, os persulfuretos de piridilo são os grupos reactivos de sulfidrilo mais específicos.

As tioftalimidas reagem com grupos sulfidrilo livres para formar persulfuretos.

c. Resíduo Reactivo-Carboxilo

Noutra forma de realização, as carbodiimidas solúveis em água e solvente orgânico, são utilizadas como

reagentes reactivos para o carboxilo. Estes compostos reagem com grupos carboxilo livres que formam uma pseudoureia que pode ser depois acoplada a amins disponíveis produzindo uma ligação amida. Os processos para modificar um grupo carboxilo com carbodiimida são bem conhecidos na técnica (ver, Yamada et al., *Biochemistry* 20: 4836-4842, 1981).

3. Sítios Preferidos Não Específicos em Reagentes de Ligação Reticulada.

Adicionalmente à utilização de unidades reactivas específicas para um sítio, a presente invenção contempla a utilização de grupos reactivos não específicos para ligar o açúcar ao grupo de modificação.

Agentes de ligação reticulada exemplares não específicos incluem grupos fotoactiváveis, completamente inertes na escuridão, que são convertidos em espécies reactivas após absorção de um fotão de energia apropriada. Numa forma de realização preferida, os grupos fotoactiváveis são seleccionados a partir de precursores de nitrenos criados por aquecimento ou fotólise de azidas. Os nitrenos deficientes em electrões são extremamente reactivos e podem reagir com uma variedade de ligações químicas incluindo N-H, O-H, C-H, e C=C. Embora possam ser empregues três tipos de azidas (derivados de arilo, alquilo, e acilo), as arilazidas são presentemente preferidas. A reactividade das arilazidas após fotólise é melhor

com ligações N-H e O-H do que com C-H. Os arilnitrenos deficientes em electrões expandem rapidamente o seu anel para formar desidroazepinas, que tendem a reagir com nucleófilos, em vez de formar produtos de inserção C-H. A reactividade de arilazidas pode ser aumentada pela presença de substituintes que retiram electrões, tais como grupos nitro ou hidroxilo no anel. Esses substituintes empurram a absorção máxima de arilazidas para comprimentos de onda mais longos. As arilazidas não substituídas possuem um máximo de absorção no intervalo de 260-280 nm, enquanto o hidroxilo e as nitroarilazidas absorvem luz significativa para além de 305 nm. Por isso, o hidroxilo e nitroarilazidas são mais preferidos uma vez que eles permitem empregar condições de fotólise menos prejudiciais para o componente de afinidade do que as arilazidas não substituídas.

Noutra forma de realização preferida, os grupos fotoactiváveis são seleccionados a partir de arilazidas fluorinadas. Os produtos de fotólise de arilazidas fluorinadas são arilnitrenos, todos eles sofrem as reacções características deste grupo, incluindo inserção de ligação C-H, com elevada eficiência (Keana *et al.*, *J. Org. Chem.* 55: 3640-3647, 1990).

Noutra forma de realização, os grupos fotoactiváveis são seleccionados a partir de resíduos de benzofenona. Os reagentes de benzofenona produzem geralmente rendimentos de ligação reticulada mais elevados do que os reagentes arilazida.

Noutra forma de realização, os grupos fotoactiváveis são seleccionados a partir de compostos diazo, que formam um carbeno deficiente em electrões após fotólise. Estes carbenos sofrem uma variedade de reacções incluindo inserção em ligações C-H, adição a ligações duplas (incluindo sistemas aromáticos), atracção de hidrogénio e coordenação para centros nucleofílicos para produzir iões carbono.

Ainda noutra forma de realização, os grupos fotoactiváveis são seleccionados a partir de diazopiruvatos. Por exemplo, o éster de p-nitrofenilo de diazopiruvato de p-nitrofenilo reage com aminas alifáticas para produzir amidas de ácido diazopirúvico que sofrem fotólise ultravioleta para formar aldeídos. O componente de afinidade modificada para o diazopiruvato fotolizado irá reagir como agentes reticulados de formam formaldeído ou glutaraldeído.

4. Reagentes Homobifuncionais

a. Ligantes de ligação reticulada homobifuncionais reactivos com aminas primárias

A síntese, propriedades, e aplicações de agentes de ligação reticulada amino-activos estão comercialmente descritos na literatura (para revisões de processos de ligação reticulada e reagentes, ver acima). Estão disponí-

veis muitos reagentes (e.g., Pierce Chemical Company, Rockford, III.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.).

Exemplos preferidos, não limitantes de ésteres de NHS homobifuncionais incluem dissuccinimidilglutarato (DSG), dissuccinimidilsuberato (DSS), bis(sulfossuccinimidil)suberato (BS), dissuccinimidiltartarato (DST), dissulfossuccinimidiltartarato (sulfo-DST), bis-2-(succinimido-oxicarboniloxi)etil-sulfona (BSOCOES), bis-2-(sulfossuccinimidooxicarboniloxi) etil-sulfona (sulfo-BSOCOES), etilenoglicolbis-(succinimidil-succinato) (EGS), etilenoglicolbis-(sulfossuccinimidil-succinato) (sulfo-EGS), ditiobis-(succinimidilpropionato) (DSP), e ditiobis-(sulfossuccinimidilpropionato) (sulfo-DSP). Exemplos preferidos, não limitantes de imidoésteres homobifuncionais incluem dimetil malonimidato (DMM), dimetil succinimidato (DMSC), dimetil adipimidato (DMA), dimetil pimelimidato (DMP), dimetil suberimidato (DMS), dimetil-3,3'-oxidipropionimidato (DODP), dimetil-3,3'-(metilenodioxi)dipropionimidato (DMDP), dimetil-,3'-(dimetilenodioxi) dipropionimidato (DDDP), dimetil-3,3'-(tetrametilenedioxi)-dipropionimidato (DTDP), e dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP).

Exemplos preferidos, não limitantes de isotiocianatos homobifuncionais incluem: p-fenilenodi-isotiocianato (DITC), e ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfônico estilbeno (DIDS).

Exemplos preferidos, não limitantes de isocianatos homobifuncionais incluem xilenodiisocianato, tolueno-2,4-diisocianato, tolueno-2-isocianato-4-isotio-cianato, 3-metoxidifenilmetano-4,4'-diisocianato, 2,2'-dicarboxi-4,4'-azofenildiisocianato, e hexametenodi-isocianato.

Exemplos preferidos, não limitantes de aril-haletos homobifuncionais incluem 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno (DFDNB), e 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenil-sulfona.

Exemplos preferidos, não limitantes de reagentes de aldeído alifático homobifuncional incluem glicoxal, malondialdeído, e glutaraldeído.

Exemplos preferidos, não limitantes de reagentes de acilação homobifuncionais incluem ésteres de nitrofenilo de ácidos dicarboxílicos.

Exemplos preferidos, não limitantes de cloretos de sulfonilo aromáticos homobifuncionais incluem cloreto de fenol-2,4-dissulfonilo, e cloreto de α -naftol-2,4-dissulfonilo.

Exemplos preferidos, não limitantes de reagentes homobifuncionais amino-reativos adicionais incluem eritritolbis-carbonato que reage com aminas para produzir bis-carbamatos.

b. Ligantes de Ligação Reticulada Reactivos
Homobifuncionais com Grupos Sulfidrilo Livres

A síntese, propriedades, e aplicações desses reagentes são descritos na literatura (para revisões de processos de ligação reticulada e reagentes, ver acima). Muitos dos reagentes estão disponíveis comercialmente (e.g., Pierce Chemical Company, Rockford, III.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Exemplos preferidos, não limitantes de maleimidas homobifuncionais incluem bismaleimido-hexano (BMH), N,N'-(1,3-fenileno)bismaleimida, N,N'-(1,2-fenileno) bismaleimida, azofenildimaleimida, e bis(N-maleimidometil) éter.

Exemplos preferidos, não limitantes de persulfuretos de piridilo homobifuncionais incluem 1,4-di-3'-(2'-piridilditio)propionamidobutano (DPDPB).

Exemplos preferidos, não limitantes de haletos de alquilo homobifuncionais incluem 2,2'-dicarboxi-4,4'-diiodoacetamidoazobenzeno, ácido α,α' -diiodo-p-xilenossulfônico, ácido α,α' -dibromo-p-xilenossulfônico, N,N'-bis(b-bromoetil)benzilamina, N,N'-di(bromoacetil)feniltidrazina, e 1,2-di(bromoacetil)amino-3-fenilpropano.

c. Ligantes de Ligação Reticulada Fotoactiváveis Homobifuncionais

A síntese, propriedades, e aplicações desses reagentes são descritas na literatura (para revisões de processos e reagentes de ligação reticulada, ver acima). Alguns dos reagentes estão disponíveis comercialmente (e.g., Pierce Chemical Company, Rockford, III.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Exemplos preferidos, não limitantes de ligantes de ligação reticulada homobifuncionais fotoactiváveis incluem bis- β -(4-azidosalicilamido)etil-persulfureto (BASED), di-N-(2-nitro-4-azidofenil)-cistamina-S,S-dióxido (DNCO), e 4,4'-ditiobisfenilazida.

5. Reagentes HeteroBifuncionais

a. Reagentes Amino-Reactivos HeteroBifuncionais com uma Unidade de Persulfureto de Piridilo

A síntese, propriedades, e aplicações desses reagentes são descritas na literatura (para revisões de processos e reagentes de ligação reticulada, ver acima). Muitos dos reagentes estão disponíveis comercialmente (e.g., Pierce Chemical Company, Rockford, III.; Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Exemplos preferidos, não limitantes de reagentes hetero-bifuncionais com uma unidade persulfureto de piridilo e um éster de NHS amino-reactivo incluem N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succini-midil 6-3-(2-piridilditio)propionamido-hexanoato (LC-SPDP), sulfosuccinimidil 6-3-(2-piridilditio)propionamido-hexanoato (sulfo-LCSPDP), 4-succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (SMPT), e sulfossuccinimidil 6- α -metil- α -(2-piridilditio) toluamido-hexanoato (sulfo-LC-SMPT).

b. Reagentes Amino-Reactivos HeteroBifuncionais com uma Unidade Maleimida

A síntese, propriedades, e aplicações desses reagentes são descritas na literatura. Exemplos preferidos, não limitantes de reagentes hetero-bifuncionais com uma unidade de maleimida e um éster de NHS amino-reactivo incluem succinimidilmaleimidilacetato (AMAS), succinimidil 3-maleimidilpropionato (BMPS), éster de N- γ -maleimidobutiriloxissuccinimida (GMBS), éster de N- γ -maleimidobutiriloxisulfosuccinimida (sulfo-GMBS), succinimidil6-maleimidil-hexanoato (EMCS), succinimidil-3-maleimidilbenzoato (SMB), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-succinimida (MBS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissulfossuccinimida (sulfo-MBS), succinimidil 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), sulfo-succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), succinimidil 4-(p-maleimidofenil) butirato (SMPB), e sulfossuccinimidil 4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-SNTB).

c. Reagentes Amino-Reactivos HeteroBifuncionais
com uma Unidade de Haleto de Alquilo

A síntese, propriedades, e aplicações desses reagentes são descritas na literatura. Exemplos preferidos, não limitantes de reagentes hetero-bifuncionais com uma unidade de haleto de alquilo e um éster de NHS amino-reactivo incluem N-succinimidil-(4-iodoacetil)aminobenzoato (SIAB), sulfossuccinimidil-(4-iodoacetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), succinimidil-6-(iodoacetil)amino-hexanoato (SIAX), succinimidil-6-(6-((iodoacetil)-amino)hexanoil-amino)hexanoato (SIAXX), succinimidil-6-(((4-(iodoacetil)-amino)-metil)-ciclo-hexano-1-carbonil)amino-hexanoato (SIACX), e succinimidil-4((iodoacetil)-amino)metilciclo-hexano-1-carboxilato (SIAC).

Um exemplo preferido de um reagente hetero-bifuncional com um éster de NHS amino-reactivo e uma unidade de di-haleto de alquilo é N-hidroxisuccinimidil 2,3-dibromopropionato (SDBP). O SDBP introduz ligações reticuladas intramoleculares no componente de afinidade através da conjugação dos seus grupos amino. A reactividade da unidade de dibromopropionil em relação a grupos de amina primária é controlada pela temperatura de reacção (McKenzie *et al.*, *Protein Chem.* 7: 581-592 (1988)).

Exemplos preferidos, não limitantes de reagentes hetero-bifuncionais com uma unidade de haleto de alquilo e

uma unidade éster aminorreactivo de p-nitrofenilo incluem iodoacetato de p-nitrofenilo (NPIA).

São conhecidos dos especialistas na técnica outros agentes de ligação reticulada. Ver, por exemplo, Pomato *et al.*, Patente U.S. N°. 5 965 106. Está dentro das capacidades de um especialista na técnica escolher um agente de ligação reticulada apropriado para uma aplicação particular.

d. Grupos Ligantes Cliváveis

Ainda noutra forma de realização, o grupo ligante é proporcionado com um grupo que pode ser clivado para libertar o grupo de modificação do resíduo de açúcar. São conhecidos na técnica grupos cliváveis. Ver, por exemplo, Jung *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 761: 152-162 (1983); Joshi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 14518-14525 (1990); Zarling *et al.*, *J. Immunol.* 124: 913-920 (1980); Bouizar *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 155: 141-147 (1986); Park *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261: 205-210 (1986); Browning *et al.*, *J. Immunol.* 143: 1859-1867 (1989). Para além disso está disponível uma vasta gama de grupos de ligante clivável, bifuncional (tanto homo- como hetero-bifuncional) de fornecedores, tal como a Pierce.

Podem ser clivadas unidades cliváveis exemplares utilizando luz, calor ou reagentes tais como tióis, hidroxilamina, bases, periodato e semelhantes. Para além disso,

certos grupos preferidos são clivados *in vivo* em resposta a serem endocitados (e.g., cis-aconitilo; ver, Shen *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 1048 (1991)). Grupos cliváveis preferidos compreendem uma unidade clivável que é um membro seleccionado do grupo que consiste nos grupos persulfureto, éster, imida, carbonato, nitrobenzilo, fenacilo e benzoína.

e. Conjugação de Açúcares Modificados com Péptidos

Os açúcares modificados são conjugados com um péptido glicosilado ou não glicosilado utilizando uma enzima apropriada para mediar a conjugação. Preferencialmente, as concentrações do(s) açúcar(es) dador(es) modificado(s), enzima(s) e péptido(s) aceitador(es) são seleccionados de modo a que a glicosilação prossiga até o aceitador estar consumido. As considerações discutidas abaixo, embora apresentadas no contexto de uma sialiltransferase, são geralmente aplicáveis a outras reacções de glicosiltransferase.

São conhecidos vários métodos de utilização de glicosiltransferases para sintetizar estruturas de oligosacárido desejadas e são geralmente aplicáveis à presente invenção. São descritos métodos exemplares, por exemplo, em WO 96/32491, Ito *et al.*, *Pure Appl. Chem.* 65: 753 (1993), e Pat. U.S. N°s. 5 352 670, 5 374 541, e 5 545 553.

A presente invenção é praticada utilizando uma única glicosiltransferase para uma combinação de glicosiltransferases. Por exemplo, pode utilizar-se uma combinação de uma sialiltransferase e uma galactosil-transferase. Nessas formas de realização que utilizam mais do que uma enzima, as enzimas e substratos são preferencialmente combinados numa mistura de reacção inicial, ou as enzimas e os reagentes para uma segunda reacção enzimática são adicionados ao meio de reacção assim que a primeira reacção enzimática está completa ou quase completa. Realizando duas reacções enzimáticas em sequência num único tubo, os rendimentos globais são melhorados em relação aos processos nos quais é isolada apenas uma espécie de intermediário. Para além disso, a limpeza e remoção de solventes e produtos secundários extra é reduzida.

Numa forma de realização preferida, cada uma da primeira e da segunda enzima é uma glicosiltransferase. Noutra forma de realização preferida, uma enzima é uma endoglicosidase. Noutra forma de realização preferida, uma enzima é uma exoglicosidase. Numa forma de realização preferida adicional, são utilizadas mais do que duas enzimas para montar a glicoproteína modificada da invenção. As enzimas são utilizadas para alterar uma estrutura de sacárido no péptido em qualquer ponto, seja antes ou após a adição do açúcar modificado ao péptido.

Noutra forma de realização, pelo menos duas das enzimas são glicosiltransferases e o último açúcar adici-

onado à estrutura de sacárido do péptido é um açúcar não modificado. Contrariamente, o açúcar modificado é interno à estrutura de glicano e por isso não necessita de ser o último açúcar no glicano. Numa forma de realização exemplar, a galactosiltransferase pode catalisar a transferência do Gal-PEG da UDP-Gal-PEG para o glicano, seguido por incubação na presença de ST3Gal3 e CMP-SA, que serve para adicionar um ácido siálico de "protecção" não modificado ao glicano (Figura 23A).

Noutra forma de realização, pelo menos duas das enzimas utilizadas são glicosiltransferases, e pelo menos dois açúcares modificados são adicionados às estruturas de glicano no péptido. Deste modo, podem ser adicionados dois ou mais glicoconjugados a um ou mais glicanos num péptido. Este processo cria estruturas de glicano possuindo dois ou mais açúcares modificados funcionalmente diferentes. Numa forma de realização exemplar, a incubação do péptido com GnT-1, II e UDP-GlcNAc-PEG serve para adicionar uma molécula de GlcNAc-PEG ao glicano; a incubação com galactosiltransferase e UDP-Gal serve então para adicionar um resíduo de Gal a este; e, a incubação com ST3Gal3 e CMP-SA-Man-6-Fosfato serve para adicionar uma molécula de SA-manose-6-fosfato ao glicano. Esta série de reacções resulta numa cadeia de glicano possuindo as características funcionais de um glicano PEGuilado assim como actividade de direccionamento de manose-6-fosfato (Figura 23B).

Noutra forma de realização, pelo menos duas das

enzimas utilizadas na reacção são glicosiltransferases, e novamente, são adicionados açúcares modificados diferentes a glicanos ligados N e ligados em O no péptido. Esta forma de realização é útil quando se deseja adicionar dois açúcares modificados diferentes aos glicanos de um péptido, mas quando é importante separar espacialmente, um do outro, os açúcares modificados no péptido. Por exemplo, se os açúcares modificados compreende, moléculas volumosas, incluindo mas não limitadas a, PEG e outras moléculas, tais como uma molécula ligante, este método pode ser preferido. Os açúcares modificados podem ser adicionados simultaneamente às estruturas de glicano num péptido, ou podem ser adicionados sequencialmente. Numa forma de realização exemplar, a incubação com ST3Gal3 e CMP-SA-PEG serve para adicionar ácido siálico-PEG aos glicanos ligados em N, enquanto a incubação com ST3Gal1 e CMP-SA-bisFosfonato serve para adicionar ácido siálico-BisFosfonato aos glicanos ligados em O (Figura 23C).

Noutra forma de realização, o método utiliza uma ou mais exo- ou endoglicosidases. A glicosidase é tipicamente um mutante, que é modificado para formar ligações glicosilo em vez de as quebrar. O mutante de glicanase, por vezes denominado uma glicosintase, inclui tipicamente uma substituição de um resíduo de aminoácido para um sítio activo do resíduo de aminoácido ácido. Por exemplo, quando a endoglicanase é endo-H, os resíduos do sítio activo substituídos serão tipicamente Asp na posição 130, Glu na posição 132 ou uma combinação destes. Os aminoácidos

são geralmente substituídos por serina, alanina, asparagina, ou glutamina. As exoglicosidases, tais como a transialilidase, também são úteis.

A enzima mutante catalisa a reacção, normalmente através de um passo de síntese que é análogo à reacção reversa do passo de hidrólise da endoglicanase. Nestas formas de realização, a molécula dadora de glicosilo (e.g., uma estrutura se oligo- ou mono-sacárido desejada) contém um grupo de saída e a reacção prossegue com a adição da molécula dadora a um resíduo GlcNAc na proteína. Por exemplo, o grupo de saída pode ser um halogénio, tal como fluoreto. Noutras formas de realização, o grupo de saída é um Asn, ou uma unidade Asn-péptido. Ainda noutras formas de realização, o resíduo GlcNAc na molécula dadora de glicosilo é modificado. Por exemplo, o resíduo GlcNAc pode compreender uma unidade 1,2 oxazolina.

Numa forma de realização preferida, cada uma das enzimas utilizadas para produzir um conjugado da invenção está presente numa quantidade catalítica. A quantidade catalítica de uma enzima particular varia de acordo com a concentração do substrato dessa enzima, assim como as condições de reacção tais como temperatura, tempo e valor de pH. Os meios para determinar a quantidade catalítica para uma dada enzima em concentrações de substrato e condições de reacção pré-seleccionados são bem conhecidos dos especialistas na técnica.

A temperatura à qual um processo acima descrito é realizado pode variar desde pouco acima da congelação até à temperatura à qual a enzima mais sensível desnatura. Intervalos de temperatura preferidos são de cerca de 0 °C até cerca de 55 °C, e mais preferencialmente desde cerca de 20 °C até cerca de 37 °C. Noutra forma de realização exemplar, um ou mais componentes do presente método são realizados a uma temperatura elevada utilizando uma enzima termofílica.

A mistura de reacção é mantida durante um período de tempo suficiente para o aceitador ser glicosilado, formando desse modo o conjugado desejado. Alguns dos conjugados podem ser detectados frequentemente após algumas horas, com quantidades recuperáveis. A serem normalmente obtidos dentro de 24 horas ou menos. Os especialistas na técnica compreendem que a taxa de reacção está dependente de um número de factores variáveis (e.g., concentração enzimática, concentração do dador, concentração do aceitador, temperatura, volume do solvente), que são optimizados para sistema seleccionado.

A presente invenção também proporciona a produção à escala industrial de péptidos modificados. Como aqui utilizado, uma escala industrial produz geralmente pelo menos um grama de conjugado acabado, purificado.

Na discussão que se segue, a invenção é exemplificada pela conjugação de unidades de ácido siálico modificado com um péptido glicosilado. O ácido siálico modificado exemplar é marcado com PEG. O foco da discussão que se segue sobre a utilização de ácido siálico modificado com PEG e péptidos glicosilados destina-se a clarificar a ilustração e não pretende implicar que uma invenção está limitada à conjugação destes dois parceiros. Um especialista entende que a discussão é geralmente aplicável às adições de unidades de glicosilo modificado diferentes de ácido siálico. Para além disso, a discussão é igualmente aplicável à modificação de uma unidade glicosilo com agentes diferentes de PEG, incluindo outros polímeros solúveis em água, unidades terapêuticas, e biomoléculas.

Uma abordagem enzimática pode ser utilizada para a introdução selectiva de hidratos de carbono PEGuilados ou PPGuilados no péptido ou glicopéptido. O método utiliza açúcares modificados contendo PEG, PPG, ou um grupo funcional reactivo mascarado, e é combinado com a glicosiltransferase ou glicosintase apropriada. Seleccionando a glicosiltransferase que fará a ligação de hidrato de carbono desejado e utilizando o açúcar modificado como o substrato dador, o PEG ou PPG pode ser introduzido directamente na estrutura do péptido, nos resíduos de açúcar existentes de um glicopéptido ou nos resíduos de açúcar que foram adicionados a um péptido.

Um aceitador para a sialiltransferase está presente no péptido a ser modificado através dos métodos da presente invenção quer como uma que estrutura ocorre naturalmente ou como uma aí colocada de forma recombinante, enzimaticamente ou quimicamente. Aceitadores adequados, incluem, por exemplo, aceitadores galactosilo tais como Gal β 1, 4GlcNAc, Gal β 1,4GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, lacto-N-tetraose, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,3Ara, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,4Glc (lactose), e outros aceitadores conhecidos dos especialistas na técnica (Ver, e.g., Paulson et al., *J. Biol. Chem.* 253: 5617-5624 (1978)).

Numa forma de realização, um aceitador para a sialiltransferase está presente no péptido a ser modificado após a síntese do péptido *in vivo*. Esses péptidos podem ser sialilados utilizando os métodos reivindicados sem modificação anterior do padrão de glicosilação do péptido. Alternativamente, os métodos da invenção podem ser utilizados para sialilar um péptido que não inclui um aceitador adequado; um primeiro modifica o péptido de modo a incluir um aceitador através dos métodos conhecidos dos especialistas na técnica. Numa forma de realização exemplar, um é adicionado resíduo GalNAc pela acção de uma transferase GalNAc.

Numa forma de realização exemplar, o aceitador galactosil é montado ligando um resíduo de galactose a um aceitador apropriado ligado ao péptido, e.g., um GlcNAc. O

método inclui incubar o péptido a ser modificado com uma mistura de reacção que contém uma quantidade adequada de uma galactosiltransferase (e.g., gal β 1,3 ou gal β 1,4), e um dador de galactosilo adequado (e.g., UDP-galactose). A reacção é deixada prosseguir substancialmente até estar completa ou, alternativamente, a reacção é terminada quando é adicionada uma quantidade pré-seleccionada do resíduo de galactose. Outros métodos de montar um aceitador sacárido adequado serão óbvios para os especialistas na técnica.

Ainda noutra forma de realização, os oligossacáridos ligados ao péptido são primeiro "aparados", seja na totalidade ou em parte, para expor um aceitador para a sialiltransferase ou uma unidade à qual podem ser adicionados um ou mais resíduos apropriados para obter um aceitador adequado. As enzimas, tais como glicosiltransferases e endoglicosidases (Ver, por exemplo Patente U.S. Nº. 5 716 812) são úteis para as reacções de ligação e de aparamento. É aqui proporcionada noutro local uma discussão detalhada sobre "aparamento" e remodelação de glicanos ligados em N e ligados em O.

Na discussão que se segue, o método da invenção é exemplificado pela utilização de açúcares modificados possuindo um polímero solúvel em água ligado a estes. O foco da discussão é clarificar a ilustração. Os especialistas irão entender que a discussão é igualmente relevante

para as formas de realização nas quais o açúcar modificado contém uma unidade terapêutica, biomolécula ou semelhantes.

Uma forma de realização exemplar da invenção na qual um resíduo de hidrato de carbono "aparado" antes da adição do açúcar modificado é apresentado na Figura 14, que apresenta um esquema no qual a manose elevada é aparada de volta para a estrutura biantenária da primeira geração. Um açúcar modificado que contém um polímero solúvel em água é conjugado com um ou mais dos resíduos de açúcar expostos por "aparar de volta". Num exemplo, um polímero solúvel em água é adicionado através de uma unidade GlcNAc conjugada com o polímero solúvel em água. O GlcNAc modificado é ligado a um ou a ambos os resíduos de manose terminal da estrutura biantenária. Alternativamente, pode ser adicionado um GlcNAc não modificado a um ou a ambos os terminais da espécie ramificada.

Noutra forma de realização exemplar, um polímero solúvel em água é adicionado a um ou a ambos os resíduos de manose terminais da estrutura biantenária através de um açúcar modificado possuindo um resíduo de galactose, que é conjugado com um resíduo GlcNAc adicionado aos resíduos de manose terminal. Alternativamente, um Gal não modificado pode ser adicionado a um ou a ambos os resíduos GlcNAc terminal.

Ainda noutro exemplo, é adicionado um polímero

solúvel em água a um resíduo Gal utilizando um ácido siálico modificado.

Outro forma de realização exemplar é apresentada na Figura 15, que apresenta um esquema semelhante ao apresentado na Figura 14, no qual a estrutura de manose elevada é "aparada de volta" para a manose, a partir da qual a estrutura biantenária ramifica. Num exemplo, um polímero solúvel em água é adicionado através de um GlcNAc modificado com o polímero. Alternativamente, um GlcNAc não modificado é adicionado à manose, seguido por um Gal com um polímero solúvel em água ligado. Ainda noutra forma de realização, os resíduos GlcNAc e Gal não modificados são adicionados sequencialmente à manose, seguido por uma unidade de ácido siálico modificado com um polímero solúvel em água.

A Figura 16 apresenta uma outra forma de realização exemplar utilizando um esquema semelhante ao apresentado na Figura 14, no qual a manose elevada é "aparada de volta" ao GlcNAc ao qual a primeira manose é ligada. O GlcNAc é conjugado com um resíduo Gal contendo um polímero solúvel em água. Alternativamente, uma Gal não modificado é adicionado ao GlcNAc, seguido pela adição de um ácido siálico modificado com um açúcar solúvel em água. Ainda num outro exemplo, o terminal GlcNAc é conjugado com Gal e o GlcNAc é subsequentemente fucosilado com uma fucose modificada contendo um polímero solúvel em água.

A Figura 17 é um esquema semelhante ao apresentado na Figura 14, no qual a manose elevada é aparada de volta ao primeiro GlcNAc ligado ao Asn do péptido. Num exemplo, o GlcNAc do resíduo GlcNAc-(Fuc)_a é conjugado com um GlcNAc contendo um polímero solúvel em água. Noutro exemplo, o GlcNAc do resíduo GlcNAc-(Fuc)_a é modificado com Gal, que contém um polímero solúvel em água. Ainda numa outra forma de realização, o GlcNAc é modificado com Gal, seguido pela conjugação ao Gal de um ácido siálico modificado com um polímero solúvel em água.

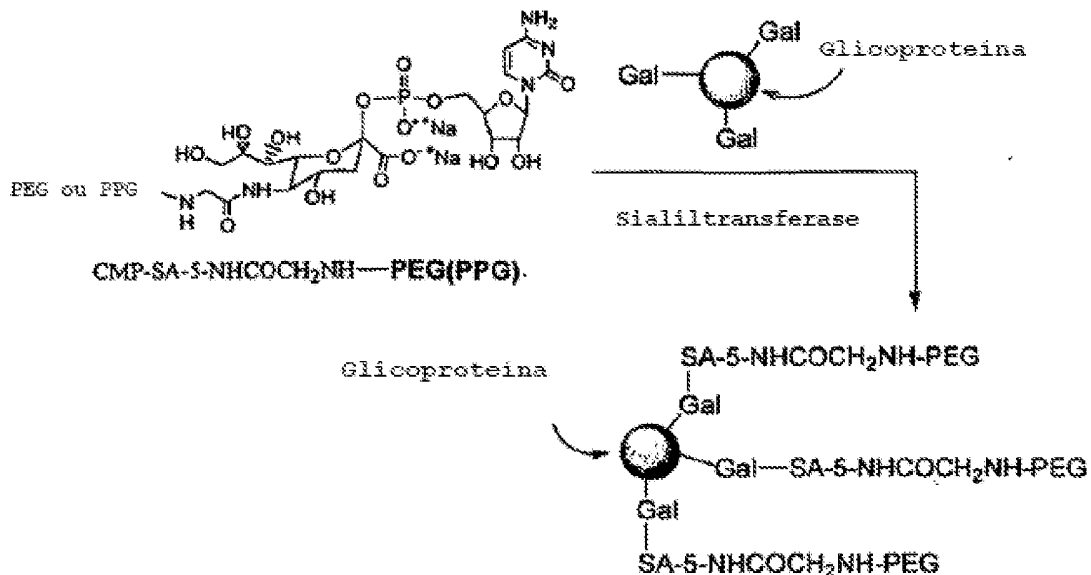
Outras formas de realização exemplares são apresentadas nas Figuras 18-22. Uma ilustração da sequência dos tipos de reacção com os quais a presente invenção pode ser praticada é proporcionada em cada uma das figuras acima mencionadas.

Os Exemplos apresentados acima proporcionam uma ilustração do poder dos métodos aqui apresentados. Utilizando os métodos da invenção, é possível "aparar de volta" e construir um resíduo de hidrato de carbono de substancialmente qualquer estrutura desejada. O açúcar modificado pode ser adicionado aos terminais da unidade de hidrato de carbono como apresentado acima, ou pode ser um intermediário entre o núcleo do péptido e o terminal do hidrato de carbono.

Numa forma de realização exemplar, um ácido

siálico existente é removido de um glicopéptido utilizando uma sialidase, desmascarando desse modo a totalidade ou quase todos os resíduos galactosil subjacentes. Alternativamente, um péptido ou glicopéptido é marcado com resíduos de galactose, ou um resíduo de oligossacárido que termina numa unidade de galactose. Após a exposição de ou adição dos resíduos de galactose, é utilizada uma sialiltransferase apropriada para adicionar um ácido siálico modificado. A abordagem está resumida no esquema 12.

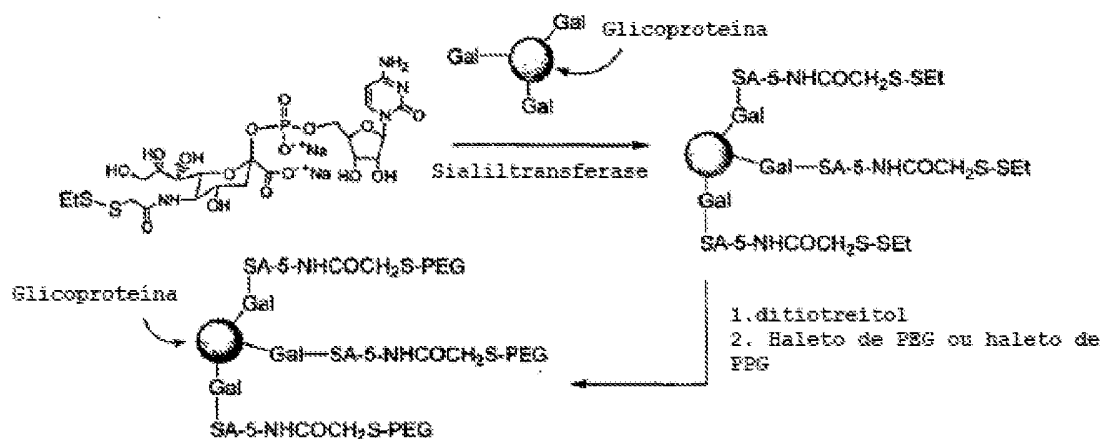
Esquema 12



Ainda noutra abordagem, resumida no esquema 13, uma funcionalidade reactiva mascarada está presente no ácido siálico. O grupo reactivo mascarado é preferencialmente não afectado pelas condições utilizadas para ligar o ácido siálico modificado ao péptido. Após a ligação

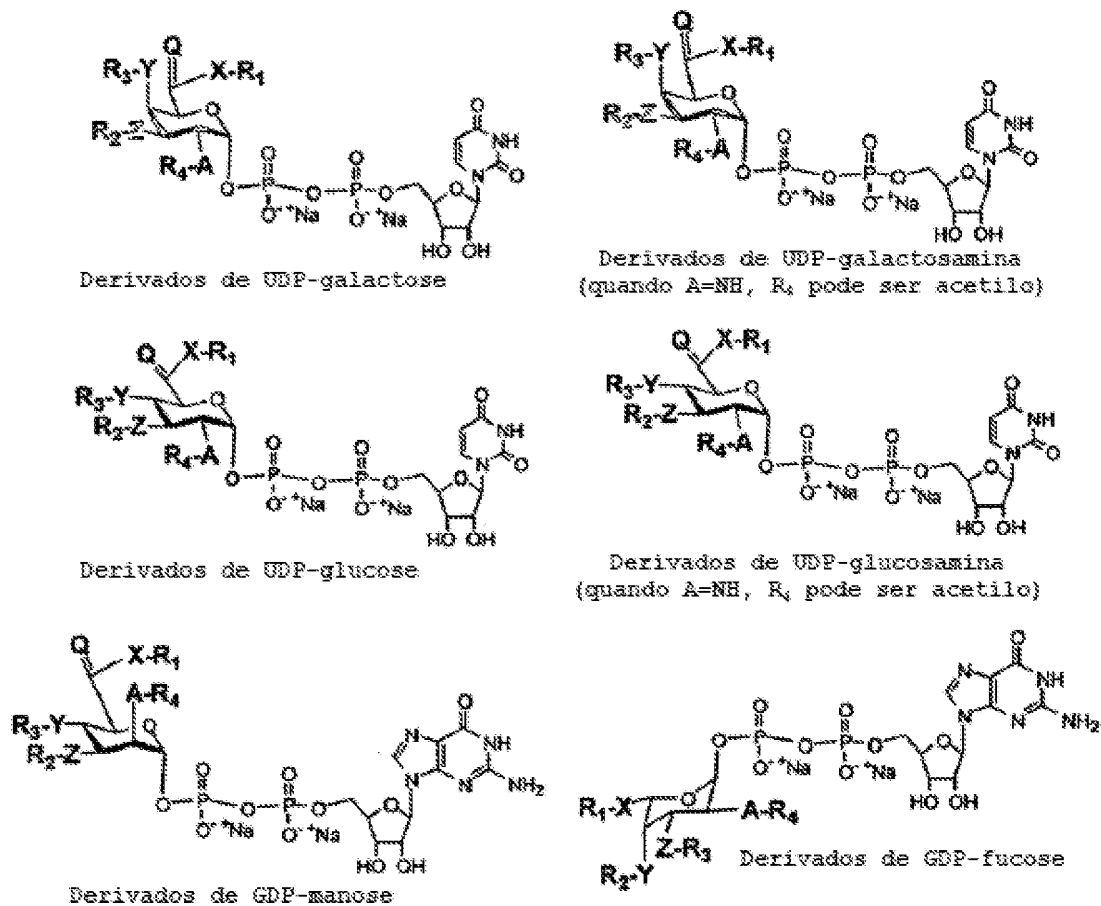
covalente do ácido siálico modificado ao péptido, a máscara é removida e o péptido é conjugado com um agente tal como PEG, PPG, uma unidade terapêutica, biomolécula ou outro agente. O agente é conjugado com o péptido de um modo específico pela sua reacção com o grupo reactivo não mascarado no resíduo de açúcar modificado.

Esquema 13



Pode ser utilizado qualquer açúcar modificado com a sua glicosiltransferase apropriada, dependendo dos açúcares terminais das cadeias laterais de oligossacárido do glicopéptido (Tabela 4). Como discutido acima, o açúcar terminal do glicopéptido necessário para introdução da estrutura PEGuilada ou PPGuilada pode ser introduzido naturalmente durante a expressão ou pode ser produzido após a expressão utilizando a(s) glicosidase(s), glicosiltransferase(s) ou mistura de glicosidase(s) e glicosiltransferase(s) apropriada(s).

Tabela 4. Açúcares modificados



X = O, NH, S, CH₂, N-(R₂₋₅)₂

Y = X; Z = X; A = X; B = X.

Q = H₂, O, S, NH, N-T.

R, R₁₋₄ = H, ligante-M, M.

M = Ligando de interesse

Ligando de interesse = 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, Manose-6-fosfato, heparina, heparano, Slex, Manose, FGF, VFGF, proteína, condroitina, queratano, dermatano, albumina, integrinas, péptidos, etc.

Numa outra forma de realização exemplar, a UDP-galactose-PEG é feita reagir com a β 1,4-galactosiltransferase do leite bovino, transferindo desse modo a galactose modificada para a estrutura de N-acetilglucosamina terminal apropriada. Os resíduos GlcNAc terminais no glicopéptido podem ser produzidos durante a expressão, como podem ocorrer

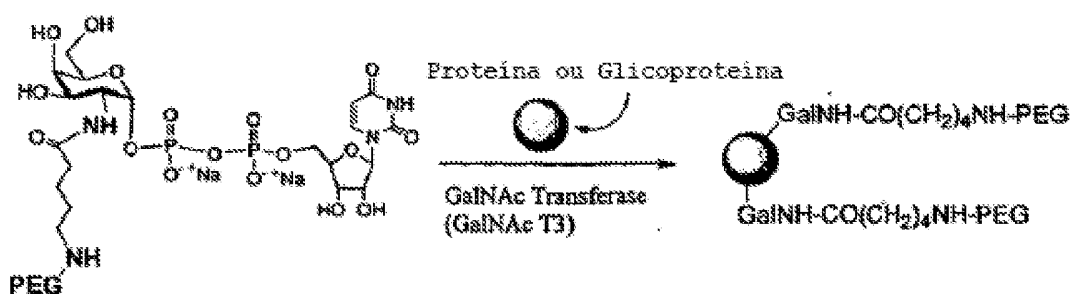
rer nos sistemas de expressão tais como mamíferos, insetos, plantas ou fungos, mas também podem ser produzidos através do tratamento do glicopéptido com uma sialidase e/ou glicosidase e/ou glicosiltransferase, conforme a necessidade.

Noutra forma de realização exemplar, uma GlcNAc transferase, tal como GnT-I-IV, é utilizada para transferir GlcNc PEGuilado para um resíduo de manose num glicopéptido. Ainda noutra forma de realização exemplar, as estruturas de glicano ligado a N- e/ou O- são removidas enzimaticamente a partir de um glicopéptido para expor um aminoácido ou um resíduo glicosilo terminal que é subsequentemente conjugado com o açúcar modificado. Por exemplo, é utilizada um endoglicanase para remover as estruturas ligadas a N de um glicopéptido para expor um GlcNAc terminal como um Asn ligado a GlcNAc no glicopéptido. UDP-Gal-PEG e a galactosiltransferase apropriada são utilizados para introduzir uma funcionalidade PEG- ou PPG-galactose no GlcNAc exposto.

Numa forma de realização alternativa, o açúcar modificado é adicionado directamente à estrutura peptídica utilizando uma glicosiltransferase conhecido por transferir resíduos de açúcar à estrutura peptídica. Esta forma de realização exemplar é apresentada no esquema 14. Glicosiltransferases exemplares úteis na prática da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, GalNAc transferases (GalNAc T1-14), GlcNAc transferases, fucosiltransferases, glucosiltransferases, xilosil-transferases, mano-

siltransferases e semelhantes. A utilização desta abordagem permite a adição directa de açúcares modificados aos péptidos que não possuem quaisquer hidratos de carbono ou, alternativamente, aos glicopéptidos existentes. Em ambos os casos, a adição do açúcar modificado ocorre em posições específicas na estrutura peptídica, como definido pela especificidade do substrato da glicosiltransferase e não de um modo aleatório, como ocorre durante a modificação de uma estrutura peptídica da proteína utilizando métodos químicos. Podem ser introduzidos vários agentes nas proteínas ou glicopéptidos que não têm a sequência peptídica do substrato da glicosiltransferase através da construção da sequência de aminoácidos apropriada na cadeia peptídica.

Esquema 14



Em cada uma das formas de realização exemplares apresentadas acima, podem ser utilizados um ou mais passos adicionais de química ou modificação enzimática após a conjugação do açúcar modificado ao péptido. Numa forma de realização exemplar, é utilizada uma enzima (e.g., fucosiltransferase) para anexar uma unidade glicosilo (e.g., fucose) no açúcar terminal modificado ligado ao péptido.

Noutro exemplo, é utilizada uma reacção enzimática para "proteger" sítios aos quais o açúcar modificado não conseguiu ser conjugado. Alternativamente, a química reacção é utilizada para alterar a estrutura do açúcar modificado conjugado. Por exemplo, o açúcar conjugado modificado é reagido com agentes que estabilizam ou desestabilizam a sua ligação com o péptido componente ao qual o açúcar modificado se liga. Noutro exemplo, a componente do açúcar modificado é desprotegida após a sua conjugação com o péptido. Um especialista entenderá que existe uma série de processos enzimáticos e químicos que são úteis nos métodos da invenção num estágio após o açúcar modificado ser conjugado com o péptido. A elaboração posterior do conjugado açúcar modificado-péptido está dentro do âmbito da invenção.

Direccionamento do Péptido com Manose-6-Fosfato

É também revelado o péptido que é derivado de pelo menos uma unidade manose-6-fosfato. A unidade manose-6-fosfato direcciona o péptido para um lisossoma de uma célula, e é útil, por exemplo, para direccionar proteínas terapêuticas a lisossomas para terapia das doenças de armazenamento lisossómico.

As doenças de armazenamento lisossómico são um grupo de mais do que 40 distúrbios que são o resultado de defeitos em genes que codificam enzimas que degradam produtos de desperdício de glicolípido ou polissacárido nos

lisossomas das células. Os produtos enzimáticos, e.g., açúcares e lípidos, são então reciclados em novos produtos. Cada um desses distúrbios resulta de uma característica hereditária autossómica ou ligada ao X recessiva que afecta os níveis de enzimas no lisossoma. Geralmente, não há actividade biológica ou funcional das enzimas afectadas nas células e tecidos de indivíduos afectados. A Tabela 5 proporciona uma lista de doenças de armazenamento representativas e o defeito enzimático associado às doenças. Nessas doenças, a deficiência na função enzimática cria uma deposição sistémica progressiva de lípido ou substrato de hidrato de carbono nos lisossomas nas células do corpo, eventualmente provocando perda da função do órgão e morte. A etiologia genética, manifestações clínicas, biologia molecular e a possibilidade das doenças de armazenamento lisossómico estão detalhados em Scriver *et al.*, eds., THE METABOLIC AND MOLECULAR BASIS OF INHERITED DISEASE, 7^{sup}.th Ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995).

Tabela 5. Doenças de armazenamento lisossómico e defeitos enzimáticos associados

Doença	Defeito Enzimático
Doença de Pompe	α -glucosidase ácida (maltase ácida)
MOPSI* (doença de Hurler)	α -L-iduronidase
MPSII (doença de Hunter)	sulfatase de iduronato
MPSIII (Sanfilippo)	heparano N-sulfatase
MPS IV (Morquio A)	galactose-6-sulfatase
MPS IV (Morquio B)	β -galactosidase ácida

(continuação)

Doença	Defeito Enzimático
MPS VII (doença de Sly)	β -glucoronidase
Doença de célula I	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferase
Doença de Schindler	α -N-acetilgalactosaminidase (α -galactosidase B)
Doença de Wolman	lipase ácida
Doença do armazenamento do éster do colesterol	lipase ácida
Doença de Farber	ceramidase ácida lisossomal
Doença de Niemann-Pick	Esfingomielinase ácida
Doença de Gaucher	glucocerebrosidase
Doença de Krabbe	galactosilceramidase
Doença de Fabry	α -galactosidase A
Gangliosidose GM1	β -galactosidase ácido
Galactosialidose	β -galactosidase e neuraminidase
Doença de Tay-Sach's	hexosaminidase A
Leucodistrofia magacariótica	arilsulfatase a
Doença de Sandhoff	hexosaminidase A e B
*MPS = mucopolissacaridose	

De Duve sugeriu primeiro que a substituição da enzima lisossômica em falta com enzima biologicamente activa exógena pode ser uma abordagem viável para tratamento de doenças de armazenamento lisossômico (De Duve, *Fed Proc.* 23: 1045 (1964). Desde essa altura, vários estudos suge-

riram que a terapia de substituição enzimática pode ser benéfica para tratar várias doenças de armazenamento lisossómico. O melhor sucesso foi apresentado com indivíduos com doença Gaucher tipo I, que tinham sido tratados com a enzima β -glucocerebrosidase), preparada a partir da placenta (Ceredase™) ou, mais recentemente, recombinantemente (Cerezyme™). Foi sugerido que a substituição da enzima também possa ser benéfica para o tratamento da doença de Fabry, assim como outras doenças de armazenamento lisossómico. Ver, por exemplo, Dawson *et al.*, *Ped Res.* 7(8): 684-690 (1973) (*in vitro*) e Mapes *et al.*, *Science* 169: 987 (1970) (*in vivo*). Os ensaios clínicos da terapia de substituição enzimática foi relatado para doentes de Fabry utilizando infusões de plasma normal (Mapes *et al.*, *Science* 169: 987-989 (1970)), α -galactosidase A purificada de placenta (Brady *et al.*, *N. Eng. J. Med* 279: 1163 (1973)); ou α -galactosidase A purificada do baço ou do plasma (Desnick *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci., USA* 76: 5326-5330 (1979)) e demonstraram que a eficiência da bioquímica de substituição directa da enzima para a doença de Fabry. Estes estudos indicam que o potencial para eliminar, ou reduzir significativamente, o armazenamento de glicolípido patológico através de substituição repetida de enzima. Por exemplo, um estudo (Desnick *et al.*, *supra*), a injeção intravenosa de enzima purificada resultou numa redução transiente nos níveis do plasma do substrato de lípido armazenado, a globotriasilceramida.

Consequentemente, existe uma necessidade na técnica para métodos para proporcionar quantidades suficientes de enzimas lisossômicas biologicamente activas, tais como α -galactosidase A humana, às células deficientes. Recentemente, as abordagens recombinantes tentaram abordar estas necessidades, ver, e.g., Pat. U.S. N°. 5 658 567; 5 580 757; Bishop *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci., USA.* 83: 4859-4863 (1986); Medin *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci., USA.* 93: 7917-7922 (1996); Novo, F. J., *Gene Therapy.* 4: 488-492 (1997); Ohshima *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci., USA.* 94: 2540-2544 (1997); e Sugimoto *et al.*, *Human Gene Therapy* 6: 905-915, (1995). Através do direccionamento de péptidos terapêuticos mediado pela manose-6-fosfato para lisossomas, a presente invenção proporciona composições e métodos para distribuir quantidades suficientes de péptidos lisossomais biologicamente activos para células deficientes.

Assim, é também revelado um péptido de acordo com a Tabela 7 que é derivado de manose-6-fosfato (Figura 24 e Figura 25). O péptido pode ser preparado de forma recombinante ou química. Para além disso, o péptido pode ser a sequência total, natural, ou pode ser modificado através de, por exemplo, truncagem, extensão, ou pode incluir substituições ou deleções. Proteínas exemplares que são remodeladas utilizando um método da presente invenção incluem glucocerebrosidase, β -glucosidase, α -galactosidase A, α -glucosidase ácida (maltase ácida). Péptidos modificados representativos que estão em utilização clínica

incluem, mas não estão limitados a, Ceredase™, Cerezyme™, e Fabryzym™. Um grupo glicosilo em péptidos modificados e clinicamente relevantes também podem ser alterados utilizando um método da invenção. A manose-6-fosfato é ligada ao péptido através de um grupo de ligação a glicosilo. Numa forma de realização exemplar, o grupo de ligação a glicosilo é derivado do ácido siálico. Grupos de ligação a glicosil derivados do ácido siálico exemplares são apresentados na Tabela 3, na qual uma ou mais das unidades "R" é manose-6-fosfato ou um grupo espaçador possuindo uma ou mais unidades de manose-6-fosfato ligadas a esta. A unidade de ácido siálico modificado é preferencialmente o resíduo terminal de um oligossacárido ligado à superfície do péptido (Figura 26).

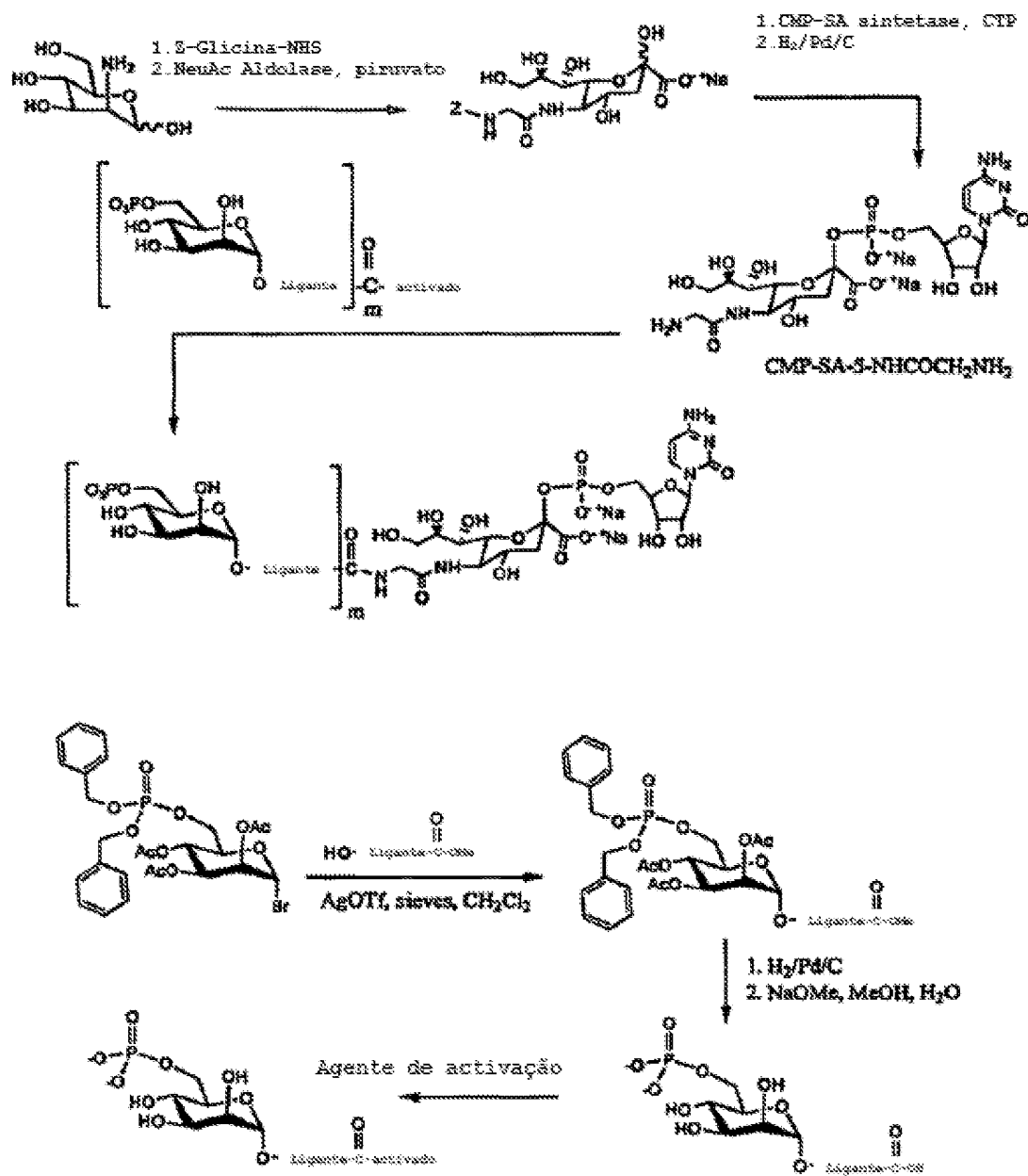
Adicionalmente à manose-6-fosfato, os péptidos da revelação podem ser ainda derivados de uma unidade tal como um polímero solúvel em água, uma unidade terapêutica, ou uma unidade de direcionamento adicional. Métodos para ligar estes e outros grupos também são aqui apresentados. É também revelado um grupo diferente de manose-6-fosfato que se liga ao péptido através de um derivado de ácido siálico derivado de acordo com a Tabela 3, em que uma ou mais das unidades "R" é um grupo diferente de manose-6-fosfato.

É também revelada a preparação de uma unidade de ácido siálico modificada com um braço ligante à base de glicina protegido com Cbz. O açúcar de nucleótido cor-

respondente é preparado e o grupo Cbz é removido através de hidrogenação catalítica. O açúcar do nucleótido resultante possui uma amina disponível, reactiva que é colocada em contacto com um derivado de manose-6-fosfato activada, proporcionando um açúcar de nucleótido derivado de manose-6-fosfato que é útil na prática de métodos da invenção.

Como apresentado no esquema abaixo (esquema 15), um derivado de manose-6-fosfato activado exemplar é formado através da conversão de fosfotriéster protegido com 2-bromo-benzilo no triflato correspondente, *in situ*, e reagindo o triflato com um ligante possuindo uma unidade contendo oxigénio reactivo, formando uma ligação éter entre o açúcar e o ligante. Os grupos de protecção benzilo são removidos por hidrogenação catalítica, e o éster metílico do ligante é hidrolisado, fornecendo o ácido carboxílico correspondente. O ácido carboxílico é activado por qualquer método conhecido na técnica. Um processo de activação exemplar baseia-se na conversão do ácido carboxílico no éster de N-hidroxissuccinimida.

Esquema 15



Está também revelado no esquema abaixo (Esquema 16), um ácido siálico N-acetilado que é convertido numa amina através da manipulação da unidade piruvilo. Assim, o hidroxilo primário é convertido num éster de sulfonato e reagido com azida de sódio. A azida é cataliticamente

reduzida à amina correspondente. O açúcar é subsequentemente convertido no seu análogo de nucleótido e acoplado, através do grupo amina, à manose-6-fosfato derivada do braço ligante preparada como discutido acima.

Péptidos úteis para tratar a doença de armazenamento lisossómico podem ser derivados com outras unidades de direccionamento incluindo, mas não limitados a, transferrina (para distribuir o péptido através da barreira hemato-encefálica, e aos endossomas), carnitina (para distribuir o péptido às células musculares), e fosfonatos, e.g., bisfosfonato (para direccionar o péptido para o osso e outros tecidos calcíferos). A unidade de direccionamento e o péptido terapêutico são conjugados através de qualquer método aqui discutido ou por outra forma conhecido na técnica.

Num exemplo referenciado, o agente de direccionamento e o péptido terapêutico são acoplados através de uma unidade ligante. Neste exemplo, pelo menos um dos péptidos terapêuticos ou o agente de direccionamento é acoplado à unidade ligante através de um grupo de ligação a glicosilo intacto de acordo com um método da invenção. Numa forma de realização, a unidade ligante inclui um poli(éter) tal como poli(etilenoglicol). Noutra forma de realização exemplar, a unidade ligante inclui pelo menos uma ligação que é degradada *in vivo*, libertando o péptido terapêutico do

agente de direccionamento, após a distribuição do conjugado ao tecido ou região do corpo constituídos alvo.

Ainda noutro exemplo referenciado, a distribuição *in vivo* da unidade terapêutica é alterada através da alteração de uma glicoforma na unidade terapêutica sem conjugar o péptido terapêutico a uma unidade de direccionamento. Por exemplo, o péptido terapêutico pode ser desviada da incorporação pelo sistema reticuloendotelial através da protecção de uma unidade de galactose terminal de um grupo glicosilo com ácido siálico (ou um seu derivado) (Figuras 24 e 27). A sialilação para cobrir o Gal terminal evita a incorporação do péptido por receptores de asialoglicoproteína hepática (ASGP), e pode prolongar a semi-vida do péptido em comparação com os péptidos que possuem apenas cadeias de glicano complexas, na ausência de sialilação.

II. Péptidos/Glicopéptidos da invenção

É também revelada uma composição compreendendo cópias múltiplas de um péptido único possuindo um núcleo elementar de trimanosilo como a estrutura primária de glicano ligado a esta. O péptido pode ser uma molécula terapêutica. A forma natural do péptido pode compreender glicanos complexos ligados a N ou podem ser um glicano de manose elevada. O péptido pode ser um péptido de mamífero, e é preferencialmente um péptido humano. O péptido pode ser

seleccionado a partir do grupo que consiste numa imunoglobulina, eritropoietina, péptido activador do tipo de tecido, e outros (Ver Figura 28).

Péptidos exemplares cujos glicanos podem ser remodelados utilizando os métodos da invenção são apresentados na Figura 28.

Tabela 6. Péptidos preferidos para remodelação de glicano

<u>Hormonas e Factores</u>	<u>Receptores e Receptores</u>
<u>de crescimento</u>	<u>Quiméricos</u>
G-CSF	CD4
GM-CSF	Receptor do Factor da Necrose Tumoral (TNF-R)
TPO	Fusão TNF-R:IgG Fc
EPO	Alpha-CD20
Variantes de EPO	PSGL-1
FSH	Complemento
HGH	GlyCAM ou a sua quimera
insulina	N-CAM ou a sua quimera
alfa-TNF	<u>Anticorpos Monoclonais</u> <u>(Imunoglobulinas)</u>
Leptina	MAB-anti-RSV
Gonadotropin coriónica humana	Receptor de MAB-anti-IL-2
<u>Enzimas e Inibidores</u>	MAB-anti-CEA
TPA	MAB-anti-glicoproteína IIb/IIIa

(continuação)

Variantes de TPA	MAB-anti-EGF
Uroquinase	MAB-anti-Her2
Factores VII, VIII, IX, X	MAB-CD20
DNase	MAB-alpha-CD3
Glucocerebrosidase	MAB-TNF α
Hirudina	MAB-CD4
α 1 antitripsina (inibidor α 1 da protease)	MAB-PSGL-1
Antitrombina III	Mab-anti proteína F do Vírus do Sincício Respiratório
α -glucosidase ácida (maltase ácida)	Anti-trombina-III
α galactosidase A	<u>Células</u>
α -L-iduronidase	Células de glóbulos vermelhos
Uroquinase	Células de glóbulos brancos
<u>Citoquinas e Citoquinas Quiméricas</u>	(e.g., células T, células B, células dendríticas, macrófagos, células NK, neutrófilos, monócitos e semelhantes)
Interleuquina-1 (IL-1), 1B, 2,3,4	Células estaminais
Interferão-alfa (IFN-alfa)	Outros
IFN-alfa-2b	Antigénio de superfície da Hepatite B (HbsAg)
IFN-beta	
IFN-gama	
IFN-omega	
Toxina da difteria -IL-2	

Tabela 7. Péptidos mais preferidos para remodelar glicano

Alfa-galactosidase A	Interleuquina-2 (IL-2)
Alpha-L-iduronidase	Factor VIII
Anti-trombina-III	hrDNase
Factor Estimulador da Colónia de Granulócitos (G-CSF)	Insulina
	Proteína de superfície da Hepatite B (HbsAg)
Interferão α	Hormona de Crescimento Humana (HGH)
Interferão β	Gonadotropina Coriónica Humana
Interferão omega	Uroquinase
Factor VII factor de coagulação	Fusão TNF receptor-IgG Fc (Enbrel™)
Factor IX factor de coagulação	MAB-Her-2 (Herceptin™)
Hormona de Estimulação do Folículo (FSH)	MAB-proteína F do Vírus do Sincício Respiratório (Synagis™)
Eritropoietina (EPO)	
Factor de estimulação de colónias de Granulócitos-macrófagos (GMCSF)	MAB-CD20 (Rituxan™)
	MAB-TNF α (Remicade™)
Interferão γ	MAB-Glicoproteína IIb/IIIa (Reopro™)
inibidor da protease $\alpha 1$ ($\alpha 1$ antitripsina)	
activador de plasminogénio tipo tecido (TPA)	
Glucocerebrosidase (Cerezyme™)	

É fornecida uma lista mais detalhada de péptidos úteis na invenção e a sua fonte, na Figura 28.

Outros péptidos exemplares que são modificados através dos métodos da invenção incluem membros da família de imunoglobulina (e.g., anticorpos, moléculas do MHC, receptores de células T, e semelhantes), receptores intercelulares (e.g., integrinas, receptores para hormonas ou factores de crescimento e semelhantes) lectinas, e citoquinas (e.g., interleuquinas). Exemplos adicionais incluem o activador do plasminogénio tipo tecido (TPA), renina, factores de coagulação, tais como o Factor VIII e o Factor IX, bombesina, trombina, factor de crescimento hematopoiético, factores de estimulação da colónia, anti-génios virais, péptidos de complemento, α 1-antitripsina, eritropoietina, P-selectina glicopéptido ligand-1 (PSGL-1), factor de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos, antitrombina III, interleuquinas, interferões, péptidos A e C, fibrinogénio, herceptin™, leptina, glicosidasas, entre muitos outros. Esta lista de péptidos é exemplar e não deve ser considerada como sendo exclusiva. Pelo contrário, como é óbvio a partir da revelação aqui fornecida, os métodos da invenção são aplicáveis a qualquer péptido no qual uma estrutura de glicano desejada pode ser modificada.

Os métodos da invenção são também úteis para modificar péptidos quiméricos, incluindo, mas não limitados a, péptidos quiméricos que incluem uma unidade derivada de uma imunoglobulina, tal como IgG.

Os péptidos modificados através dos métodos da invenção podem ser sintéticos ou péptidos de tipo selvagem ou podem ser péptidos mutados, produzidos através de métodos conhecidos na técnica, tais como mutagénesse dirigida a um sítio. A glicosilação de péptidos está tipicamente ligada a N ou ligada a O. Uma ligação a N exemplar é a ligação do açúcar modificado à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tripéptido asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido excepto prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática de uma unidade de hidrato de carbono à cadeia lateral da asparagina. Assim, a presença de qualquer uma destas sequências de tripéptido num péptido cria um sítio de glicosilação potencial. Como aqui descrito noutra local, a glicosilação ligada em O refere-se à ligação de um açúcar (e.g., N-acetilgalactosamina, galactose, manose, GlcNAc, glucose, fucose ou xilose) a uma cadeia lateral hidroxilo de um ácido hidroxiamino, preferencialmente serina ou treonina, embora também possa ser utilizada 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

São discutidas abaixo várias formas de realização exemplares da invenção. Embora várias destas formas de realização utilizem péptidos possuindo nomes que possuem marcas comerciais, e outros péptidos específicos como o péptido exemplar, estes exemplos não estão confinados a qualquer péptido específico. As seguintes formas de realização exemplares estão contempladas de modo a incluir

todos os equivalentes e variantes peptídicos de qualquer péptido. Essas variantes incluem, mas não estão limitadas a, adicionar e eliminar sítios de glicosilação ligada em N e ligada em O, e proteínas de fusão com sítios de glicosilação adicionados. Um especialista na técnica irá entender que as seguintes formas de realização e os métodos básicos aí revelados podem ser aplicados a muitos péptidos com igual sucesso.

Numa forma de realização exemplar, a presente invenção proporciona métodos para modificar um Factor de Estimulação de Colónia de Granulócitos (G-CSF). As Figuras 29A até 29G apresentam alguns exemplos sobre como isto será realizado utilizando a metodologia aqui revelada. Na Figura 29B, um péptido G-CSF que é expresso num sistema de células de mamífero é aparada de volta utilizando uma sialidase. Os resíduos assim expostos são modificados através da adição e uma unidade de ácido siálico-poli(etilenoglicol) (unidade PEG), utilizando um seu dador apropriado e ST3Gal1. A Figura 29C apresenta um esquema exemplar para modificar um péptido G-CSF que é expresso numa célula de insecto. O péptido é modificado adicionando uma unidade de galactose utilizando um seu dador apropriado e uma galactosil-transferase. Os resíduos de galactose são funcionalizados com PEG através de um derivado de ácido siálico-PEG, através da acção de ST3Gal1. Na Figura 29D, a G-CSF expressa em bactérias é colocada em contacto com uma dadora de N-acetilgalactosamina dadora e N-acetil-galactosamina transferase. O péptido é funcionalizado com PEG, utilizando

um dador de ácido siálico PEGuilado e uma sialiltransferase. Na Figura 29E, a G-CSF expressa em células de mamíferos é colocada em contacto com um dador de ácido siálico que é modificado com ácido levulínico, adicionando uma cetona reactiva ao dador de ácido siálico. Após adição a um resíduo glicosilo no glicano no péptido, a cetona é derivada com uma unidade tal como uma hidrazina- ou amina-PEG. Na Figura 29F, a G-CSF expressa em bactérias é remodelada colocando em contacto o péptido com uma enzima endo-GalNAc em condições em que funciona de um modo sintético, em vez de hidrolítico, adicionando desse modo uma molécula de PEG-Gal-GalNAc a partir de um seu derivado activado. A Figura 29G proporciona outra via para remodelar G-CSF expressa em bactérias. O polipéptido é derivado de um resíduo de N-acetilgalactosamina PEGuilada colocando em contacto o polipéptido com uma N-acetilgalactosamina transferase e um dador apropriado de N-acetilgalactosamina PEGuilada.

A. Criação ou eliminação de sítios de glicosilação ligados a N.

A presente invenção contempla a utilização de péptidos nos quais o sítio da(s) cadeia(s) de glicano no péptido tenha sido alterado a partir da do péptido nativo. Tipicamente, as cadeias de glicano ligado em N estão ligadas à estrutura primária do péptido nos resíduos de asparagina em que o resíduo de asparagina está numa sequência de aminoácidos que é reconhecida por uma glicosiltrans-

ferase ligada à membrana no retículo endoplásmico (ER). Tipicamente, o sítio de reconhecimento na estrutura primária do péptido é a sequência asparagina-X-serina/treonina em que X pode ser qualquer aminoácido excepto prolina e ácido aspártico. Embora este sítio de reconhecimento seja típico, uma invenção compreende ainda péptidos que possuem glicano ligado em cadeias N noutros sítios de reconhecimento em que as cadeias ligadas em N são adicionadas utilizando glicosiltransferases naturais ou recombinantes.

Uma vez que o sítio de reconhecimento para a glicosilação ligada em N de um péptido é desconhecidos, Está dentro da capacidade dos especialistas na técnica criar sequências de péptido mutado primárias em que o sítio de reconhecimento de glicosilação ligada a N nativa é removido, ou alternativamente ou adicionalmente, são criados um ou mais sítios de reconhecimento adicional. Mais simplesmente, pode ser removido um resíduo de asparagina da sequência primária do péptido removendo desse modo o sítio de sequência para um glicano, removendo assim um glicano do péptido maduro. Por exemplo, um sítio de reconhecimento nativo com a sequência de asparagina-serina-serina pode ser modificada geneticamente para possuir a sequência leucina-serina-serina, eliminando desse modo um sítio de glicosilação ligado a N nesta posição.

Além disso, pode ser removido um sítio de glicosilação ligada a N, através da alteração dos resíduos no sítio de reconhecimento de modo a que mesmo se o resíduo

de asparagina estiver presente, um ou mais dos resíduos de reconhecimento adicionais estão ausentes. Por exemplo, uma sequência nativa de asparagina-serina-serina pode ser mutada para asparagina-serina-lisina, eliminando desse modo um sítio de N-glicosilação nessa posição. No caso de sítios glicosilação ligados a N compreendendo resíduos diferentes dos sítios de reconhecimento típicos descritos acima, o especialistas na técnica podem determinar a sequência e os resíduos requeridos para o reconhecimento pela glicosiltransferase apropriada, e depois mutar pelo menos um resíduo de modo a que a glicosiltransferase apropriada já não reconheça esse sítio. Por outras palavras, Está bem dentro das capacidades do especialista manipular a sequência primária de um péptido, de modo a que os sítios de glicosilação sejam criados ou removidos, ou ambos, criando desse modo um péptido possuindo um padrão de glicosilação alterado. A invenção deve por isso não ser encarada de modo a estar limitada a qualquer sequência peptídica primária aqui fornecida como a única sequência para remodelar glicano, mas antes deve ser encarada de modo a incluir qualquer uma e todas as sequências de péptido adequadas para remodelar o glicano.

Para criar um péptido mutante, a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência primária do péptido é alterada de modo a que os codões nativos que codificam resíduos nativos de aminoácidos são mutados para criar um codão que codifica outro resíduo de aminoácido. São comuns na especialidade técnicas para alterar sequências de ácido

nucleico e são descritas por exemplo em qualquer manual de biologia molecular conhecido.

Adicionalmente, o ácido nucleico que codifica uma estrutura de péptido primária pode ser sintetizado *in vitro*, utilizando técnicas convencionais. Por exemplo, pode ser sintetizada uma molécula de ácido nucleico numa "máquina de genes" utilizando protocolos tais como o método da fosforamidite. Se for necessário DNA de cadeia dupla sintetizado quimicamente para uma aplicação tal como a síntese de um ácido nucleico ou um seu fragmento, então cada cadeia complementar é sintetizada separadamente. A produção de ácidos nucleicos curtos (60 a 80 pares de bases) é tecnicamente simples e pode ser realizada através da síntese das cadeias complementares e depois emparelhando-as. Para a produção de ácidos nucleicos mais longos (>300 pares de bases), podem ser necessárias estratégias especiais, porque a eficiência de acoplamento de cada ciclo durante a síntese química do DNA é raramente de 100%. Para superar este problema, os genes sintéticos (de cadeia dupla) são montados na forma modular desde fragmentos de cadeia simples que têm desde 20 até 100 nucleótidos de comprimento. Para revisões sobre síntese de polinucleótidos, ver, por exemplo, Glick e Pasternak (Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA, 1994, ASM Press), Itakura *et al.* (1984, *Annu. Rev. Biochem.* 53:323), e Climie *et al.* (1990, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:633).

Adicionalmente, alterações na sequência de ácido nucleico que codifica o péptido podem ser realizadas através de mutagénese dirigida para um sítio. Como será entendido, esta técnica emprega tipicamente um vector fágico que existe nas formas de cadeia simples e de cadeia dupla. Vectores típicos úteis na mutagénese dirigida para um sítio incluem vectores tais como o fago M13. Estes fagos estão prontamente disponíveis e a sua utilização é geralmente bem conhecida dos especialistas na técnica. São também empregues de rotina plasmídeos de cadeia dupla em mutagénese dirigida para um sítio que elimina o passo de transferir o ácido nucleico de interesse de um plasmídeo para um fago.

Em geral, a mutagénese dirigida para um sítio é realizada primeiro obtendo um vector de cadeia simples ou fundindo as duas cadeias de um vector de cadeia dupla que inclui dentro da sua sequência uma sequência de DNA que codifica o péptido desejado. Um iniciador oligonucleotídico que contém a sequência mutada desejada é preparado de um modo geral sinteticamente. Este iniciador é então emparelhado com o vector de cadeia simples, e sujeito a enzimas de polimerização de DNA, tais como o fragmento de Klenow da polimerase de *E. coli* I, de modo a completar a síntese da cadeia que contém a mutação. Assim, forma-se um heteroduplexo em que uma cadeia codifica a sequência não mutada original e a segunda cadeia contém a mutação desejada. Este vector de heteroduplexo é então utilizado para transformar ou transfectar células apropriadas, tais como células de *E.*

coli, e são seleccionados os clones que incluem os vectores recombinantes que contêm o arranjo da sequência mutada. Foi constituído um esquema de selecção genética por Kunkel *et al.* (1987, Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154:367-382) para enriquecimento em clones que incorporam o oligonucleótido mutagénico. Alternativamente, a utilização de PCR™ com enzimas termoestáveis disponíveis comercialmente, tais como Taq polimerase, pode ser utilizada para incorporar um iniciador de oligonucleótido mutagénico num fragmento de DNA amplificado que pode ser então clonado num vector de clonagem ou de expressão apropriado. Os processos de mutagénese mediados por PCR™ de Tomic *et al.* (1990, *Nucl. Acids Res.*, 12:1656) e Upender *et al.* (1995, *Biotechniques*, 18:29-31) proporcionam dois exemplos desses protocolos. Um PCR™ que emprega uma ligase termoestável adicionalmente a uma polimerase termoestável pode também ser utilizada para incorporar um oligonucleótido mutagénico fosforilado num fragmento de DNA amplificado DNA que pode ser então clonado num vector de clonagem ou de expressão apropriado. O processo de mutagénese descrito por Michael (1994, *Biotechniques* 16:410-412) proporciona um exemplo de um desses protocolos.

Nem todas as sequências de Asn-X-Ser/Thr são N-glicosiladas sugerindo que o contexto no qual o motivo é apresentado é importante. Noutra abordagem, as bibliotecas de péptidos mutantes que possuem novos sítios de consenso ligados a N são criados de modo a identificar novos sítios ligados a N que são glicosilados *in vivo* e são benéficos

para a actividade, estabilidade ou outras características do péptido.

Como apresentado anteriormente, a sequência de consenso para a adição de glicano ligado em cadeias N nas glicoproteínas é Asn-X-Ser/Thr em que X pode ser qualquer aminoácido. A sequência de nucleótidos que codifica o aminoácido a duas posições do sítio terminal carboxilo de Asn pode ser mutada para codificar um resíduo Ser e/ou Thr utilizando processos convencionais conhecidos dos especialistas na técnica. Como referido acima nem todos os sítios Asn-X-Ser/Thr são modificados pela adição de glicanos. Por isso, cada glicoproteína recombinante mutada pode ser expressa num fungo, leveduras ou sistema de expressão animal ou de mamífero e analisada para a adição de um glicano ligado na cadeia N. As técnicas para a caracterização de sítios de glicosilação são bem conhecidas dos especialistas na técnica. Para além disso, a função biológica da glicoproteína recombinante mutada pode ser determinada utilizando ensaios convencionais para a proteína particular a ser examinada. Assim, torna-se uma simples questão de manipular a sequência primária de um péptido e identificar novos sítios de glicosilação aí contidas, e determinar ainda o efeito do novo sítio na actividade biológica do péptido.

É também revelado que a sequência de nucleótidos que codifica o aminoácido a duas posições do lado terminal amino dos resíduos Ser/Thr pode ser mutada para codificar

um Asn utilizando processos convencionais conhecidos dos especialistas na técnica. Os processos para determinar se foi criado um novo sítio de glicosilação e o efeito deste sítio na actividade biológica do péptido são descritos acima.

B. Criação ou eliminação de sítios de glicosilação ligados em O.

A adição de um sítio de glicosilação ligado em O a um péptido é convenientemente realizada através da alteração da sequência de aminoácidos primária do péptido de modo a que contenha um ou mais sítios de glicosilação ligado em O adicionais, em comparação com o início da sequência de aminoácidos primária do péptido. A adição de um sítio de glicosilação ligado em O ao péptido também pode ser realizado através da incorporação de uma ou mais espécies de aminoácidos no péptido que compreende um grupo -OH, preferencialmente resíduos de serina ou treonina, na sequência do péptido, de modo a que o grupo OH esteja acessível e disponível para glicosilação ligada a O. Semelhante à discussão da alteração de sítios glicosilação ligados em N num péptido, a sequência primária de aminoácidos do péptido é preferencialmente alterada ao nível do nucleótido. Os nucleótidos específicos na sequência de DNA que codificam o péptido podem ser alterados de maneira a que um aminoácido desejado seja codificado pela sequência. A(s) mutação(ões) no DNA são preferencialmente realizadas utilizando métodos conhecidos na técnica, tais

como as técnicas do método de síntese de DNA da fosforamidite e mutagénese dirigida para um sítio descrita acima.

Alternativamente, a sequência de nucleótidos que codifica um sítio putativo para a adição do glicano ligado em O pode ser adicionada à molécula de DNA numa ou em várias cópias à extremidade 5' ou 3' da molécula. A sequência de DNA alterada é então expresso em cada um de um em fungos, leveduras, ou sistema de expressão animal ou de mamífero e analisado para a adição da sequência ao péptido e se esta sequência é ou não um sítio de glicosilação funcional ligado em O. Resumidamente, uma sequência aceitadora de péptido sintético é introduzida na extremidade 5' ou 3' da molécula de nucleótido. Em princípio, a adição deste tipo de sequência é menos disruptivo para a glicoproteína resultante quando expressa num sistema de expressão adequado. O DNA alterado é então expresso em células CHO ou outro sistema de expressão adequado e as proteínas expressas por este são examinadas para uma presença de um sítio de glicosilação ligada em O. Adicionalmente, a presença ou ausência das cadeias de glicano pode ser determinada.

Ainda noutra abordagem, sítios vantajosos para novos sítios ligados a O podem ser encontrados num péptido através da criação de bibliotecas do péptido que contém vários novos sítios ligados em O. Por exemplo, a sequência de aminoácidos de consenso para adição de N-acetilgalactosamina por uma N-acetilgalactosaminiltransferase

depende da transferase específica utilizada. A sequência de aminoácidos de um péptido pode ser rastreada para identificar grupos contíguos de aminoácidos que podem ser mutados para criar sítios potenciais para a adição de cadeias de glicano ligadas em O. Estas mutações podem ser criadas utilizando processos convencionais conhecidos dos especialistas na técnica como descrito anteriormente. De modo a determinar se qualquer sítio de glicosilação descoberto é actualmente glicosilado, cada péptido mutado recombinante é então expresso num sistema de expressão adequado e é subsequentemente analisado para a adição do sítio e/ou a presença de uma cadeia de glicano ligada em O.

C. Síntese química dos péptidos

Embora a estrutura primária de péptidos útil na invenção possa ser criada mais eficientemente num sistema de expressão à base de células, está dentro do âmbito da presente invenção que os péptidos possam ser criados sinteticamente. A síntese química de péptidos é bem conhecida na técnica e inclui, sem limitação, síntese passo-a-passo em fase sólida, e condensação de fragmentos seja em solução ou em fase sólida. Uma síntese clássica passo-a-passo em fase sólida envolve ligar covalentemente um aminoácido que corresponde ao aminoácido carboxilo terminal da cadeia de péptido desejada a um suporte sólido e estender a cadeia peptídica em direcção à extremidade amino através de acoplamento passo-a-passo dos derivados de aminoácido activados possuindo grupos carboxilo activados. Após

finalização da montagem da cadeia peptídica ligada a fase sólida totalmente protegida, a ligação covalente péptido-fase sólida é clivada através de química adequada e os grupos de protecção são removidos para produzir o péptido do produto. Ver, R. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis: The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963). Quanto mais longa for a cadeia peptídica, maior será o desafio para obter produtos de pureza elevada bem definidos. Devido à produção de misturas complexas, a abordagem da síntese passo-a-passo em fase sólida possui limitações de tamanho. Em geral, péptidos bem definidos de 100 resíduos ou mais de aminoácidos contíguos não são preparados de rotina através da síntese passo-a-passo fase sólida.

O método de condensação do segmento envolve a preparação de vários segmentos de péptido através do método passo-a-passo em fase sólida, seguido por clivagem da fase sólida e purificação desses segmentos de protecção máxima. Os segmentos protegidos são condensados um a um no primeiro segmento, que está ligado à fase sólida.

Os péptidos úteis na presente invenção podem ser sintetizados através da síntese exclusiva em fase sólida, métodos em fase sólida parcial, condensação de fragmentos ou síntese da solução clássica. Estes métodos de síntese são bem conhecidos dos especialistas na técnica (Ver, por exemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1963), Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis" (2^a

Edição), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer e Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3:3 (1986), Atherton *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press 1989), Fields e Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis", *Methods in Enzymology* Volume 289 (Academic Press 1997), e Lloyd-Williams *et al.*, *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Peptides* (CRC Press, Inc. 1997)). Variações nas estratégias de síntese química total, tal como "ligação química nativa" e "ligação do péptido expresso" são também convencionais (Ver, por exemplo, Dawson *et al.*, *Science* 266:776 (1994), Hackeng *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:7845 (1997), Dawson, *Methods Enzymol.* 287: 34 (1997), Muir *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:6705 (1998), e Severinov e Muir, *J. Biol. Chem.* 273:16205 (1998)). São também úteis os métodos de síntese do péptido em fase sólida desenvolvidos por Gryphon Sciences, South San Francisco, CA. ver, Patente U.S. N°s. 6 326 468, 6 217 873, 6 174 530, e 6 001 364, todos os quais são aqui incorporados na sua totalidade por referência.

D. Modificações Pós-tradução

Será entendido por uma especialista na técnica que os péptidos podem sofrer modificação pós-tradução para além da adição a estes de glicanos ligados em N e ou em O. Está contemplado que os péptidos que possuem modificações pós-tradução diferentes da glicosilação podem ser utilizados como os péptidos na invenção, desde que a actividade biológica ou função desejada do péptido seja mantida ou

melhorada. Essas modificações pós-tradução podem ser modificações naturais normalmente realizadas *in vivo*, ou modificações construídas do péptido realizadas *in vitro*. Modificações conhecidas contempladas incluem, mas não estão limitados a, acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma unidade hemo, ligação covalente de um nucleótido ou derivado de nucleótido, ligação covalente de um lípido ou derivado de lípido, ligação covalente de fosfotidilinositol, ligação cruzada, ciclização, formação da ligação persulfureto, desmetilação, formação de ligações reticuladas covalentes, formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, carboxilação gama, glicosilação, formação de âncora GPI, hidroxilação, iodinação, metilação, miristoilação, oxidação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, adição of aminoácidos mediada pelo RNA de transferência a péptidos tais como arginilação, e ubiquitinação. As enzimas que podem ser utilizadas para realizar muitas dessas modificações são bem conhecidas na técnica, e disponíveis comercialmente de empresas tais como Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) e Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), entre outros.

Essas modificações são bem conhecidas dos especialistas na técnica e foram descritas em maior detalhe na literatura científica. Várias modificações particularmente comuns, glicosilação, ligação lipídica, sulfatação, carboxilação gama de resíduos de ácido glutâmico, hidro-

xilação e ribosilação de ADP, por exemplo, são descritos em textos mais básicos, tais como *Peptides--Structure and Molecular Properties*, 2^a Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993). Muitas revisões detalhadas estão disponíveis neste tema, tal como por Wold, F., *Post-translational Covalent Modification of Peptides*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York 1-12 (1983); Seifter *et al.* (*Meth. Enzymol.* 182: 626-646 (1990)) e Rattan *et al.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62 (1992)).

As modificações covalentes de um péptido também podem ser introduzidas na molécula *in vitro* reagindo os resíduos de aminoácidos do péptido com um derivado do agente orgânico que é capaz de reagir com as cadeias laterais seleccionadas ou resíduos de aminoácidos terminais. Resíduos derivados mais comuns são os resíduos cisteinilo, histidilo, lisinilo, arginilo, tirosilo, glutaminilo, asparaginilo e amino terminal. A hidroxilação dos grupos prolina e lisina, fosforilação dos grupos hidroxilo dos resíduos serilo e treonilo, metilação dos grupos alfa-amino de lisina, histidina, e cadeias laterais da histidina, acetilação da amina N-terminal e amidação dos grupos carboxílicos C-terminais. Essas unidades derivadas podem melhorar a solubilidade, absorção, semi-vida biológica e semelhantes. As unidades também podem eliminar ou atenuar qualquer efeito lateral não desejável do péptido e semelhantes.

Adicionalmente, a derivatização com agentes

bifuncionais é útil para a ligação cruzada do péptido a matrizes de suporte insolúvel em água ou com outros veículos macromoleculares. Agentes de ligação reticulada normalmente utilizados incluem glutaraldeído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, imidoésteres homobifuncionais, 1,1-bis-(-diazoloacetil)-2-feniletano, e maleimidas bifuncionais. Agentes derivados tais como metil-3-[9p-azidofenil]ditio-propioimidato produzem intermediários fotoactiváveis que são capazes de formar ligações reticuladas na presença de luz. Alternativamente, matrizes reactivas insolúveis em água, tais como hidratos de carbono activados com brometo de cianogénio e os substratos reactivos descritos nas Pat. U.S. N°s. 3 969 287 e 3 691 016 podem ser empregues para imobilização do péptido.

E. Péptidos de fusão/péptidos

Péptidos úteis na presente invenção podem compreender péptidos de fusão. Os péptidos de fusão são particularmente vantajosos quando são desejadas características biológicas e/ou funcionais de dois péptidos para serem combinadas numa molécula péptido. Esses péptidos de fusão podem apresentar combinações da actividade biológica e função que não se encontram na natureza para criar moléculas novas e úteis de aplicações terapêuticas e industriais. Actividades biológicas de interesse incluem, mas não estão limitados a, actividade enzimática, actividade de receptor e/ou ligando, motivos imunogénicos, e domínios estruturais.

Esses péptidos de fusão são bem conhecidos na técnica, e os métodos de criação serão bem conhecidos dos técnicos na técnica. Por exemplo, foi preparado um péptido de fusão de α -interferão humano-albumina em que o péptido resultante possui os benefícios terapêuticos do α -interferão combinados com a longa vida em circulação da albumina, criando desse modo uma composição terapêutica que permite frequência de dosagem reduzida e efeitos colaterais potencialmente reduzidos, nos doentes. Ver, Albuferon™ de Human Genome Sciences, Inc. e Patente U.S. N°. 5 766 883. Outros péptidos de fusão incluem moléculas de anticorpo que são aqui descritas noutra local.

F. Criação de moléculas "biologicamente activas"
mais pequenas

Os péptidos utilizados na invenção podem ser variantes de péptidos nativos, em que um fragmento do péptido nativo é utilizado em vez do péptido nativo de comprimento total. Adicionalmente, estão contemplados pré-pró-, e pré-péptidos. Os péptidos variantes podem ser mais pequenos em tamanho do que o péptido nativo, e podem compreender um ou mais domínios de um péptido maior. A selecção de domínios de péptidos específicos pode ser vantajosa quando é desejada a actividade biológica de certos domínios no péptido, mas a actividade biológica de outros domínios no péptido não é desejada. São também incluídas truncagens do péptido e deleções internas que

podem aumentar o efeito terapêutico desejado do péptido. Qualquer uma dessas formas de um péptido está contemplada para ser útil na presente invenção desde que a actividade biológica desejada do péptido seja preservada.

Versões mais curtas de péptidos podem possuir vantagens únicas não encontradas no péptido nativo. No caso da albumina humana, verificou-se que uma forma truncada que compreende apenas 63% do péptido da albumina nativa é vantajosa como um expansor do volume do plasma. O péptido de albumina truncado é considerado como sendo melhor do que o péptido nativo para este objectivo terapêutico devido a uma dose de péptido individual de apenas metade até dois terços daquela da albumina do soro humano natural, ou albumina do soro humano recombinante é necessário para o efeito osmótico coloide equivalente. Ver Patente U.S. N°. 5 380 712, a totalidade da qual é aqui incorporada por referência.

Os péptidos mais pequenos "biologicamente activos" também demonstraram possuir actividade terapêutica aumentada em comparação com o péptido nativo. O potencial terapêutico de IL-2 é limitado por vários efeitos colaterais dominados pela síndrome de fuga vascular. Uma versão mais curta do péptido sintetizado quimicamente que consiste nos resíduos 1-30 correspondentes à hélice α inteira demonstrou dobrar apropriadamente e conter a actividade biológica de IL-2 natural sem os efeitos colaterais que a acompanham.

G. Criação de novos péptidos

O péptido da invenção pode ser derivado de uma sequência primária de um péptido nativo, ou pode ser construída utilizando qualquer um dos muitos meios conhecidos dos especialistas na técnica. Esses péptidos construídos podem ser concebidos e/ou seleccionados devido às propriedades aumentadas ou novas em comparação com o péptido nativo. Por exemplo, os péptidos podem ser construídos para possuírem taxas de reacção da enzima aumentadas, afinidade de ligação aumentada ou diminuída para um substrato ou ligando, afinidade de ligação aumentada ou diminuída para um receptor, especificidade alterada para um substrato, ligando, receptor ou outro parceiro de ligação, estabilidade aumentada ou diminuída *in vitro* e/ou *in vivo*, ou imunogenicidade aumentada ou diminuída num animal.

H. Mutações

1. Mutação da concepção racional

Os péptidos úteis nos métodos da invenção podem ser mutados para aumentar a actividade biológica ou função desejada, para diminuir uma propriedade indesejável do péptido, e/ou para adicionar novas actividades ou funções ao péptido. Pode ser utilizada "concepção de péptido racional" para criar esses péptidos alterados. Uma vez que

a sequência de aminoácidos e a estrutura do péptido são conhecidas e uma mutação desejada é planeada, as mutações podem ser realizadas mais convenientemente para o codão do ácido nucleico correspondente que codifica o resíduo de aminoácido que se deseja que seja mutado. Um especialista na técnica pode determinar facilmente como a sequência de ácido nucleico deve ser alterada com base no código genético universal, e o conhecimento das preferências de codões no sistema de expressão de escolha. A mutação num codão pode ser realizada para alterar o resíduo de aminoácido que irá ser polimerizado no péptido durante a tradução. Alternativamente, um codão pode ser mutado de modo a que o resíduo de aminoácido codificado correspondente seja o mesmo, mas a selecção do codão seja melhor adequada para o sistema de expressão de péptido desejado. Por exemplo, os resíduos cys podem ser substituídos por outros aminoácidos para remover persulfuretos de ligação do péptido maduro, os domínios catalíticos podem ser mutados para alterar a actividade biológica, e em geral, podem ser construídas isoformas do péptido. Essas mutações podem ser mutações pontuais, deleções, inserções e truncagens, entre outras.

As técnicas para mutar aminoácidos específicos num péptido são bem conhecidas na técnica. A técnica de mutagénesse dirigida para um sítio, discutido acima, está bem adequada para a mutação dirigida de codões. O método de mutagénesse mediada por oligonucleótido é também discutido em detalhe em Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, começando na página 15.51). Podem ser realizadas deleções, inserções e truncagens sistemáticas utilizando mutagénese de inserção de ligante, digestão com nuclease Bal31, e mutagénese de rastreio de ligante, entre outros métodos bem conhecidos na técnica (Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

A concepção de péptido racional foi utilizada com sucesso para aumentar a estabilidade das enzimas em relação à termoinactivação e oxidação. Por exemplo, a estabilidade de uma enzima foi melhorada pela remoção de resíduos de asparagina em α -amilase (Declerck *et al.*, 2000, *J. Mol. Biol.* 301:1041-1057), a introdução de elementos estruturais mais rígidos, tais como prolina em α -amilase (Igarashi *et al.*, 1999, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:1535-1540) e D-xilose isomerase (Zhu *et al.*, 1999, *Peptide Eng.* 12:635-638). Além disso, a introdução de contactos hidrofóbicos adicionais estabilizou a 3-isopropilmalato desidrogenase (Akanuma *et al.*, 1999, *Eur. J. Biochem.* 260:499-504) e a formato desidrogenase obtida a partir de *Pseudomonas* sp. (Rojkova *et al.*, 1999, *FEBS Lett.* 445:183-188). Os mecanismos por detrás do efeito estabilizador destas mutações é geralmente aplicável a muitos péptidos. Estas e mutações semelhantes estão contempladas como sendo úteis em relação aos péptidos remodelados nos métodos da presente invenção.

2. Técnicas de mutagénese Aleatória

Podem ser criados novos péptidos úteis nos métodos da invenção utilizando técnicas que introduzem mutações aleatórias na sequência codificante do ácido nucleico. O ácido nucleico é então expresso num sistema de digestão desejado, e o péptido resultante é avaliado em relação às propriedades de interesse. São bem conhecidas na especialidade técnicas para introduzir mutações aleatórias em sequências DNA, e incluem mutagénese por PCR, mutagénese por saturação, e abordagens com oligonucleótidos degenerados. Ver, Sambrook e Russell (2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) e Ausubel *et al.* (2002, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY).

Na mutagénese por PCR, a fidelidade reduzida da *Taq* polimerase é utilizada para introduzir mutações aleatórias num fragmento de DNA clonado (Leung *et al.*, 1989, *Technique* 1:11-15). Este é um método muito potente e relativamente rápido de introduzir mutações aleatórias numa sequência de DNA. A região de DNA a ser mutagenizada é amplificada utilizando a reacção em cadeia pela polimerase (PCR) em condições que reduzem a fidelidade da síntese de DNA pela polimerase de DNA *Taq*, *e.g.*, utilizando uma proporção alterada de dGTP/dATP e pela adição de Mn^{2+} à reacção de PCR. Os fragmentos de DNA amplificados misturados são inseridos em vectores de clonagem apropriados para proporcionar bibliotecas mutantes aleatórias.

A mutagénese de saturação permite a introdução rápida de um grande número de substituições de bases únicas nos fragmentos de DNA clonados (Mayers *et al.*, 1985, *Science* 229:242). Esta técnica inclui a criação de mutações, *e.g.*, através de tratamento químico ou irradiação de DNA de cadeia simples *in vitro*, e síntese de uma cadeia de DNA complementar. A frequência de mutação pode ser modulada através da modulação da gravidade do tratamento, e essencialmente podem ser obtidas todas as substituições de bases possíveis. Dado que este processo não envolve uma selecção genética para fragmentos mutantes, são obtidas tanto substituições neutras como aquelas que alteram a função. A distribuição de mutações pontuais não é enviesada em relação a elementos de sequência conservados.

Também pode ser criada uma biblioteca de homólogos de ácido nucleico a partir de um conjunto de sequências de oligonucleótidos degenerados. A síntese química de sequências de um oligonucleótido degenerado pode ser realizada num sintetizador de DNA automático, e os genes sintéticos podem ser então ligados num vector de expressão apropriado. A síntese de oligonucleótidos degenerados é conhecida na técnica (Ver por exemplo, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1981) *Recombinant DNA*, Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp. 273-289; Itakura *et al.* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acids*

Res. 11:477. Essas técnicas foram empregues na evolução dirigida de outros péptidos (Ver, por exemplo, Scott *et al.* (1990) *Science* 249:386-390; Roberts *et al.* (1992) *PNAS* 89:2429-2433; Devlin *et al.* (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla *et al.* (1990) *PNAS* 87: 6378-6382; assim como Pat. U.S. N°s. 5 223 409, 5 198 346, e 5 096 815).

a. Evolução dirigida

Péptidos úteis nos métodos da invenção também podem ser criados utilizando técnicas de "evolução dirigida". Em contraste como as técnicas de mutagénese dirigida para um sítio nas quais o conhecimento da estrutura do péptido é necessário, existem agora estratégias para criar bibliotecas de mutações das quais se podem obter péptidos com propriedades melhoradas sem o conhecimento das características estruturais do péptido. Estas estratégias são geralmente conhecidas como "evolução dirigida" e são diferentes de processos de mutagénese tradicionais na medida em que envolvem sujeitar a sequência de ácido nucleico que codifica o péptido de interesse a rondas de recursivas de mutação, rastreio e amplificação.

Em algumas técnicas de "evolução dirigida", a diversidade nos ácidos nucleicos obtida é criada através de métodos de mutação que criam aleatoriamente mutações pontuais na sequência de ácido nucleico. As técnicas de mutação pontual incluem, mas não estão limitados a, "error-prone PCR™" (Caldwell e Joyce, 1994; *PCR Methods Appl.* 2:

28-33; e Ke e Madison, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3371-3372), mutagénese dirigida a oligonucleótidos repetidos (Reidhaar-Olson et al., 1991, *Methods Enzymol.* 208:564-586), e qualquer um dos métodos acima mencionados de mutagénese aleatória.

Outro método de criar diversidade na qual a evolução dirigida pode actuar é a utilização de genes mutantes. O ácido nucleico de interesse é cultivado numa estirpe de célula mutante cujo genoma codifica tipicamente genes de reparação de DNA defeituoso (Patente U.S. Nº. 6 365 410; Selifonova et al., 2001, *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3645-3649; Long-McGie et al., 2000, *Biotech. Bioeng.* 68:121-125; ver, Genencor International Inc, Palo Alto CA).

Também pode ser alcançada a diversidade utilizando técnicas de evolução dirigida utilizando mutagénese de saturação juntamente com iniciadores degenerados (Gene Site Saturation Mutagenesis™, Diversa Corp., San Diego, CA). Neste tipo de mutagénese de saturação, são utilizados iniciadores degenerados para cobrir o comprimento da sequência de ácido nucleico a ser diversificada para iniciar a polimerase em reacções de PCR. Deste modo, cada codão de uma sequência codificante para um aminoácido pode ser mutada para codificar cada um dos restantes dezanove aminoácidos comuns. Esta técnica também pode ser utilizada para introduzir mutações, deleções e inserções em regiões específicas de uma sequência de ácido nucleico codificante

enquanto deixa o resto da molécula de ácido nucleico intocada. Processos para a técnica de saturação de genes são bem conhecidos na técnica, e podem ser encontrados na Patente U.S. Nº 6 171 820.

b. Baralhação de DNA

Péptidos novos úteis nos métodos da invenção também podem ser criados utilizando as técnicas de baralhar genes, baralhar motivos, baralhar exões, e/ou baralhar códões (colectivamente referidos como "Baralhação de DNA"). Técnicas de baralhação de DNA podem ser empregues para modular as actividades dos péptidos úteis na invenção e podem ser utilizados para criar péptidos possuindo actividade alterada. Ver, geralmente, Pat. U.S. Nºs. 5 605 793; 5 811 238; 5 830 721; 5 834 252; e 5 837 458, e Stemmer *et al.* (1994, *Nature* 370(6488):389-391); Crameri *et al.* (1998, *Nature* 391 (6664):288-291); Zhang *et al.* (1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(9):4504-4509); Stemmer *et al.* (1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (22):10747-10751), Patten *et al.* (1997, *Curr. Opinion Biotechnol.* 8:724-33); Harayama, (1998, *Trends Biotechnol.* 16 (2):76-82); Hansson, *et al.*, (1999, *J. Mol. Biol.* 287:265-76); e Lorenzo e Blasco (1998, *Biotechniques* 24(2):308-13) (cada uma destas patentes são aqui incorporadas por referência na sua totalidade).

A mistura de DNA envolve a montagem de dois ou mais segmentos de DNA por recombinação homóloga ou

específica para um sítio para criar variação na sequência do polinucleótido. A baralhação do DNA foi utilizado para criar novas variações de proteínas do vírus da imunodeficiência humana de tipo 1 (Pekrun *et al.*, 2002, *J. Virol.* 76(6):2924-35), hidrolases de triazina (Raillard *et al.* 2001, *Chem Biol* 8(9):891-898), proteínas do vírus da leucemia de murino (MLV) (Powell *et al.* 2000, *Nat Biotechnol* 18(12):1279-1282), e sintase de indoleglicerol fosfato (Merz *et al.* 2000, *Biochemistry* 39(5):880-889).

A técnica de baralhar DNA foi desenvolvida para criar diversidade biomolecular mimetizando recombinação natural permitindo recombinação homóloga de DNA *in vitro* (Stemmler, 1994, *Nature* 370: 389-391; e Stemmler, 1994, *PNAS* 91: 10747-10751). Geralmente, neste método, a população de genes relacionados é fragmentada e sujeita a ciclos recursivos de desnaturação, re-hibridação, seguido pela extensão das extremidades soltas 5' pela *Taq* polimerase. Com cada ciclo, o comprimento dos fragmentos aumenta, e a recombinação do DNA ocorre quando os fragmentos que têm origem nos diferentes genes hibridam um com outro. A fragmentação inicial do DNA é normalmente realizada por digestão com nuclease, tipicamente utilizando DNase (Ver referências de Stemmler, acima), mas também pode ser realizada por síntese por PCR interrompida (Patente U.S. Nº 5 965 408, aqui incorporado por referência na sua totalidade; ver, Diversa Corp., San Diego, CA). Os métodos de baralhação de DNA têm vantagens em relação aos métodos de mutação pontual aleatória na medida em que a

recombinação directa de mutações benéficas criadas por cada ronda de baralhação é alcançada e existe por isso uma auto-selecção para fenótipos de péptidos melhorados.

As técnicas de baralhação de DNA são bem conhecidas na técnica. Exposições detalhadas dessa tecnologia é encontrada em Stemmler, 1994, *Nature* 370: 389-391 e Stemmler, 1994, *PNAS* 91: 10747-10751. A técnica de baralhar DNA é também descrita nas Patentes U.S. 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, e 5 605 793 (todas elas são aqui incorporados por referência na sua totalidade).

A técnica também proporciona modificações mais recentes da técnica básica de baralhação de DNA. Num exemplo, baralhar exões, exões ou combinações de exões que codificam domínios específicos de péptidos são amplificados utilizando oligonucleótidos quiméricos. As moléculas amplificadas são então recombinadas por auto-iniciação da montagem da PCR (Kolkman e Stemmler, 2001, *Nat. Biotech.* 19:423-428). Noutro exemplo, utilizando a técnica de quimeragénese aleatória em construção de biblioteca com moldes transientes (RACHITT), os fragmentos de DNA parental de cadeia simples são emparelhados num molde de cadeia simples de comprimento total (Coco et al., 2001, *Nat. Biotechnol.* 19:354-359). Ainda noutro exemplo, o processo de extensão escalonada (StEP), é empregue termociclagem com ciclos de emparelhamento/extensão muito abreviados para interromper repetidamente a polimerização de DNA a partir

dos iniciadores flanqueadores (Zhao *et al.*, 1998, *Nat. Biotechnol.* 16: 258-261). Na técnica conhecida como CLERY, *in vitro* a baralhação da família é combinada com recombinação homóloga *in vivo* em leveduras (Abecassis *et al.*, 2000, *Nucleic Acids Res.* 28:E88;). Para maximizar a recombinação intergênica, o DNA de cadeia simples das cadeias complementares de cada um dos ácidos nucleicos são digeridos com DNase e emparelhados (Kikuchi *et al.*, 2000, *Gene* 243:133-137). As extremidades rombas de dois ácidos nucleicos truncados de comprimentos variáveis que estão ligados por uma sequência clivável são então ligadas para criar fusão de genes sem recombinação homóloga (Sieber *et al.*, 2001, *Nat Biotechnol.* 19:456-460; Lutz *et al.*, 2001, *Nucleic Acids Res.* 29:E16; Ostermeier *et al.*, 1999, *Nat. Biotechnol.* 17:1205-1209; Lutz e Benkovic, 2000, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:319-324). A recombinação entre ácidos nucleicos com pouca homologia de sequência em comum também foi aumentada utilizando marcação romba mediada por exonuclease de fragmentos de DNA e ligação dos fragmentos em conjunto para o recombinar (Patente U.S. Nº. 6 361 974, aqui incorporado por referência na sua totalidade). A invenção contempla a utilização de cada um e cada variação descrita acima como um meio de aumentar as propriedades biológicas de qualquer um dos péptidos e/ou enzimas úteis nos métodos da invenção.

Adicionalmente aos protocolos publicados detalhando a evolução dirigida e técnicas de baralhação de genes, estão agora disponíveis serviços comerciais que irão realizar a baralhação de genes e processos de selecção nos

péptidos de escolha. Maxygen (Redwood City, CA) oferece serviços comerciais para criar bibliotecas de DNA baralhado à pedido. Adicionalmente, esta companhia irá realizar processos de evolução dirigida sob encomenda incluindo a baralhação de genes e selecção numa família de péptido escolhida.

Optigenix, Inc. (Newark, DE) oferece o serviço relacionado de mistura de plasmídeo. A Optigenix utiliza famílias de genes para obter aí mutantes possuindo novas propriedades. O ácido nucleico de interesse é clonado num plasmídeo num sistema de expressão de *Aspergillus*. O DNA da família relacionada é então introduzido no sistema de expressão e ocorre no hospedeiro recombinação em regiões conservadas da família. Os DNA mutantes resultantes são então expressos e o péptido daí produzido é rastreado quanto à presença de propriedades desejadas e a ausência de propriedades indesejadas.

c. Processos de Rastreio

Após cada ronda recursiva de "evolução", os péptidos desejados expressos por genes mutados são rastreados para as características de interesse. Os genes "candidatos" são então amplificados e misturados para a próxima ronda de baralhação de DNA. O processo de rastreio utilizado é altamente dependente do péptido que está a ser "evoluído" e da característica de interesse. Características, tais como estabilidade do péptido, actividade biológica, antigenicidade, entre outros pode ser seleccionada

utilizando processos que são bem conhecidos na técnica. Ensaio individuais para a actividade biológica de péptidos úteis preferidos nos métodos da invenção são aqui descritos noutro local.

d. Combinações de técnicas

Será entendido pelo especialista que as técnicas de mutação acima e a selecção pode ser combinada uma com a outra e com processos adicionais para criar a melhor molécula de péptido útil possível nos métodos da invenção. Deste modo, a invenção não está limitada a qualquer método para a criação de péptidos, e deve ser encarada para compreender qualquer um e a totalidade das metodologias aqui descritas. Por exemplo, um processo para a introdução de mutações pontuais numa sequência de ácido nucleico pode ser realizado inicialmente, seguido por rondas recursivas de baralhação de DNA, selecção e amplificação. A introdução inicial de mutações pontuais pode ser utilizada para introduzir diversidade numa população de genes onde não existe, e a seguinte ronda de baralhação de DNA e o rastreio irá seleccionar e recombinar mutações pontuais vantajosas.

III. Glicosidases e Glicotransferases

A. Glicosidases

As glicosidases são glicosiltransferases que utilizam água como uma molécula aceitadora, e como tal, são

tipicamente enzimas de glicósido-hidrolíticos. As glicosidases podem ser utilizadas para a formação de ligações glicosídicas *in vitro* através do controlo da termodinâmica ou cinética da mistura de reacção. Mesmo com condições de reacção modificadas, contudo, as reacções de glicosidase podem ser difíceis de trabalhar, e as glicosidases tendem a produzir baixos rendimentos sintéticos como um resultado da reacção reversível de transglicosilase e a reacção hidrolítica competitiva.

Uma glicosidase pode funcionar através da retenção da estereoquímica na ligação a ser quebrada durante a hidrólise ou invertendo a estereoquímica na ligação a ser quebrada durante a hidrólise, classificando a glicosidase como uma glicosidase de "retenção" ou uma glicosidase de "inversão", respectivamente. As glicosidases de retenção possuem duas unidades de ácido carboxílico críticas presentes no sítio activo, com um carboxilato actuando como um catalisador ácido/base e o outro como um nucleófilo, enquanto as glicosidases de inversão, um ácido carboxílico funciona como um ácido e o outro funciona como uma base.

Métodos para determinar a actividade e especificidade de ligação de qualquer glicosidase são bem conhecidos na técnica, incluindo um protocolo de HPLC simplificado (Jacob e Scudder, 1994, *Methods in Enzymol.* 230: 280-300). Uma discussão geral de glicosidases e tratamento da glicosidase é encontrada em *Glicobiology, A Practical Approach*, (1993, Fukuda e Kobata eds., Oxford University Press Inc., New York). Glicosidases úteis na invenção

incluem, mas não estão limitados a, sialidase, galactosidase, endoglicanase, manosidase (*i.e.*, α e β , ManI, ManII e ManIII,) xilosidase, fucosidase, β -glucosidase de *Agrobacterium* sp., manosidase 2^a de *Celulomonas fimi*, glicosidase de *Humicola insolens*, glicosidase de *Sulfolobus solfataricus* e glicosidase de *Bacillus licheniformis*.

A escolha de fucosidases para utilização na invenção depende da ligação da fucose a outras moléculas. As especificidades de muitas α -fucosidases úteis nos métodos da invenção são bem conhecidos dos especialistas na técnica, e muitas variedades de fucosidase estão também comercialmente disponíveis (Glyko, Novato, CA; PROzyme, San Leandro, CA; Calbiochem- Novabiochem Corp., San Diego, CA; entre outros). As α -fucosidases de interesse incluem, mas não estão limitados a, α -fucosidases de *Turbo cornutus*, *Charonia lampas*, *Bacillus fulminans*, *Aspergillus niger*, *Clostridium perfringens*, Rim de bovino (Glyko), fígado de galinha (Tyagarajan *et al.*, 1996, *Glycobiology* 6:83-93) e α -fucosidase II de *Xanthomonas manihotis* (Glyko, PROzyme). A fucosidase de fígado de galinha é particularmente útil para remover a fucose do núcleo de glicanos ligados em N.

B. Glicosiltransferases

As flicossiltransferases catalisam a adição de açúcares activados (NDP dador-açúcares), num modo passo-a-passo, a uma proteína, glicopéptido, lípido ou glicolípido ou à extremidade de não redução de um oligossacárido em crescimento. Os glicopéptidos ligados em N são sintetizados

através de uma transferase e um oligossacárido dador ligado ao lípido Dol-PP-NAG₂Glc₃Man₉, numa transferência em bloco seguida pelo aparar do núcleo. Neste caso, a natureza do sacárido "núcleo" é algo diferente de ligações subsequentes. Um número muito grande de glicosil-transferases são conhecidos na técnica.

A glicosiltransferase a ser utilizada na presente invenção pode ser qualquer uma desde que possa utilizar o açúcar modificado como o açúcar dador. Exemplos dessas enzimas incluem as glicosiltransferases da via Leloir, tal como galactosiltransferase, N-acetilglucosaminil-transferase, N-acetilgalactosaminiltransferase, fucosil-transferase, sialiltransferase, manosiltransferase, xilosiltransferase, glucurononiltransferase e semelhantes.

Para a síntese de sacárido enzimática que envolve reacções de glicosiltransferase, podem ser clonadas glicosiltransferases, ou isoladas a partir de qualquer fonte. São conhecidas muitas glicosiltransferases clonadas, assim como as suas sequências de polinucleótidos. Ver, e.g., Taniguchi *et al.*, 2002, Handbook of glycosiltransferases and related genes, Springer, Tóquio.

As sequências de aminoácidos de glicosiltransferase e sequências de nucleótidos que codificam glicosiltransferases das quais as sequências de aminoácido podem ser deduzidas são também encontradas em várias bases de dados disponíveis ao público, incluindo GenBank, Swiss-Prot, EMBL, e outras.

Glicosiltransferases que podem ser empregues nos métodos da invenção incluem, mas não estão limitados a, galactosiltransferases, fucosiltransferases, glucosil-transferases, N-acetilgalactosaminiltransferases, N-acetil-glucosaminiltransferases, glucuroniltransferases, sialiltransferases, manosiltransferases, transferases de ácido glucurónico, transferases de ácido galacturónico, e oligossacariltransferases. Glicosiltransferases adequadas incluem as obtidas a partir de eucariotas, assim como a partir de procariotas.

O DNA que codifica as glicosiltransferases pode ser obtido através de síntese química, por rastreio de transcritos reversos de mRNA a partir de células apropriadas ou culturas de linhas celulares, por rastreio de bibliotecas genómicas a partir de células apropriadas, ou por combinações desses processos. O rastreio de mRNA ou DNA genómico pode ser realizado utilizando sondas de oligonucleótidos criados a partir da sequência de ácido nucleico das glicosiltransferases. As sondas podem ser marcadas com um marcador detectável, tal como, mas não limitados a, um grupo fluorescente, um átomo radioactivo ou um grupo quimioluminescente de acordo com processos conhecidos e utilizados em ensaios de hibridação convencional. Em alternativa, podem ser obtidas sequências de ácido nucleico de glicosiltransferases através da utilização do processo da reacção em cadeia pela polimerase (PCR), com os iniciadores de oligonucleótido da PCR a serem

produzidos a partir da sequência de ácido nucleico das glicosiltransferases. Ver, Pat. U.S. Nº. 4 683 195 atribuída a Mullis *et al.* e Pat. U.S. Nº. 4 683 202 atribuída a Mullis.

Uma enzima das glicosiltransferases pode ser sintetizada numa célula hospedeira transformada com um vector que contém DNA que codifica a enzima glicosiltransferase. Um vector é uma construção de DNA replicável. São utilizados vectores para amplificar o DNA que codifica a enzima glicosiltransferase e/ou para expressar o DNA que codifica as enzimas glicosil-transferases. Um vector de expressão é uma construção de DNA replicável, na qual uma sequência de DNA que codifica as enzimas glicosiltransferases está ligada operacionalmente a sequências de controlo adequadas capazes de realizar a expressão das enzimas glicosiltransferases num vector adequado. A necessidade para que essas sequências de controlo variem dependem do hospedeiro seleccionado e do método de transformação escolhido. Geralmente, as sequências de controlo incluem um promotor de transcrição, uma sequência de operador óptima para controlar a transcrição, uma sequência que codifica sítios de ligação ao ribossoma de mRNA adequados, e sequências que controlam a terminação da transcrição e tradução. Os vectores de amplificação não necessitam de domínios de controlo de expressão. Tudo o que é necessário é a capacidade para se replicar num hospedeiro, normalmente conferido por uma origem de replicação, e um gene de selecção para facilitar o reconhecimento dos transformantes.

1. Fucosiltransferases

Em algumas formas de realização, a glicosiltransferase utilizada no método da invenção é uma fucosiltransferase. As fucosiltransferases são conhecidas dos especialistas na técnica. Fucosiltransferases exemplares incluem enzimas, que transferem L-fucose da GDP-fucose para uma posição hidroxilo de um açúcar aceitador. As fucosiltransferases que transferem dos açúcares de não nucleótido para um aceitador são também possíveis de utilizar na presente invenção.

Em algumas formas de realização, o açúcar aceitador é, por exemplo, o GlcNAc num grupo $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3,4)\text{GlcNAc}\beta$ - num oligossacárido glicósido. As fucosiltransferases adequadas para esta reacção incluem a $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3,4)\text{GlcNAc}\beta1-\alpha(1\rightarrow3,4)$ fucosiltransferase (FTIII E.C. No. 2.4.1.65), que foi primeiro caracterizada no leite humano (Ver, Palcic, et al., *Carbon Hydrate Res.* 190: 1-11 (1989); Prieels, et al., *J. Biol. Chem.* 256: 10456-10463 (1981); e Nunez, et al., *Can. J. Chem.* 59: 2086-2095 (1981)) e as $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta-\alpha$ fucosiltransferases (FTIV, FTV, FTVI) que são encontradas no soro humano. FTVII (E.C. No. 2.4.1.65), uma sialil- $\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta((1\rightarrow3)\text{GlcNAc}\beta$ fucosiltransferase, foi também caracterizada. Uma forma recombinante da $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3,4)\text{GlcNAc}\beta-\alpha(1\rightarrow3,4)$ fucosiltransferase foi também caracterizada (Ver, Dumas, et al., *Bioorg. Med. Letters* 1: 425-428 (1991) e Kukowska-Latallo, et al., *Genes and Development* 4: 1288-1303 (1990)). Outras fucosil-

transferases exemplificativas incluem, por exemplo, α 1,2 fucosiltransferase (E.C. No. 2.4.1.69). A fucosilação enzimática pode ser realizada através dos métodos descritos em Mollicone, et al., *Eur. J. Biochem.* 191: 169-176 (1990) ou Patente U.S. Nº. 5 374 655.

2. Galactosiltransferases

Em outro grupo de formas de realização, q glicosiltransferase é uma galactosiltransferase. As galactosiltransferases exemplificativas incluem α (1,3) galactosiltransferases (E.C. No. 2.4.1.151, ver, e.g., Dabkowski et al., *Transplant Proc.* 25: 2921 (1993) e Yamamoto et al. *Nature* 345: 229-233 (1990), bovino (GenBank j04989, Joziassse et al., *J. Biol. Chem.* 264: 14290-14297 (1989)), murino (GenBank m26925; Larsen et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 86: 8227-8231 (1989)), porcina (GenBank L36152; Strahan et al., *Immunogenetics* 41: 101-105 (1995)). Outra α 1,3 galactosiltransferase adequada é a que está envolvida na síntese do antigénio B do grupo de sangue (EC 2.4.1.37, Yamamoto et al., *J. Biol. Chem.* 265: 1146-1151 (1990) (humano)).

São também adequadas para a utilização nos métodos da invenção β (1,4) galactosiltransferases, que incluem, por exemplo, EC 2.4.1.90 (LacNAc sintetase) e EC 2.4.1.22 (lactose sintetase) (bovino (D'Agostaro et al., *Eur. J. Biochem.* 183: 211-217 (1989)), humano (Masri et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 657-663 (1988)), murino (Nakazawa et al., *J. Biochem.* 104: 165-168 (1988)), assim

como E.C. 2.4.1.38 e a ceramidagalactosiltransferase (EC 2.4.1.45, Stahl *et al.*, *J. Neurosci. Res.* 38: 234-242 (1994)). Outras galactosiltransferases adequadas incluem, por exemplo, α 1,2 galactosiltransferases (de *e.g.*, *Schizosaccharomyces pombe*, Chapell *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 5: 519-528 (1994)). Para outras galactosiltransferases adequadas, ver Taniguchi *et al.* (2002, *Handbook of Glicosiltransferases and Related Genes*, Springer, Tóquio), Guo *et al.* (2001, *Glycobiology*, 11(10):813-820), e Breton *et al.* (1998, *J Biochem.* 123:1000-1009).

A produção de proteínas tal como a enzima GalNAc TI-XIV de genes clonados por engenharia genética é bem conhecida. Ver, *e.g.*, Pat. U.S. N°. 4 761 371. Um método envolve a colecção de amostras suficientes, depois a sequência de aminoácidos da enzima é determinada por sequenciação N-terminal. Esta informação é depois utilizada para isolar um clone de cDNA que codifica uma transferase de comprimento total (ligada a membrana) que após expressão na linha de células de insecto Sf9 resultou na síntese de uma enzima activa completa. A especificidade do aceitador da enzima é depois determinada utilizando uma análise semiquantitativa dos aminoácidos que circundam os sítios de glicosilação conhecidos em 16 diferentes proteínas, seguido por estudos de glicosilação de péptidos sintéticos *in vitro*. Este trabalho demonstrou que certos resíduos de aminoácidos estão sobre-representados em segmentos de péptidos glicosilados e que os resíduos em posições específicas que circundam os resíduos de serina e treonina

glicosilados podem ter uma influência mais marcada na eficiência do aceitador do que outras unidades de aminoácidos.

3. Sialiltransferases

As sialiltransferases são outro tipo de glicosiltransferases que são úteis nas células recombinantes e misturas de reacção da invenção. Os exemplos de sialiltransferases que são adequadas para utilização na presente invenção incluem ST3Gal III (e.g., uma ST3Gal III de rato ou humana), ST3Gal IV, ST3Gal I, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II, e ST6GalNAc III (a nomenclatura de sialiltransferase aqui utilizada é a descrita em Tsuji *et al.*, *Glycobiology* 6: v-xiv (1996)). Uma $\alpha(2,3)$ sialiltransferase exemplificativa referida como $\alpha(2,3)$ sialiltransferase (EC 2.4.99.6) transfere ácido siálico para a Gal terminal não redutora de um dissacárido Gal β 1-3Glc ou glicósido. Ver, Van den Eijnden *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256: 3159 (1981), Weinstein *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 13845 (1982) e Wen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 21011 (1992). Outra $\alpha 2,3$ -sialiltransferase (EC 2.4.99.4) exemplificativa transfere ácido siálico para a Gal terminal não redutora de dissacárido ou glicósido. Ver, Rearick *et al.*, *J. Biol. Chem.* 254: 4444 (1979) e Gillespie *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 21004 (1992). Outras enzimas exemplificativas incluem Gal- β -1,4-GlcNAc α -2,6 sialiltransferase (Ver, Kurosawa *et al.* *Eur. J. Biochem.* 219: 375-381 (1994)).

Preferencialmente, para a glicosilação de hidratos de carbono de glicopéptidos, a sialiltransferase será capaz de transferir ácido siálico para a sequência Gal β 1,4GlcNAc-, Gal β 1,3GlcNAc-, ou Gal β 1,3GalNAc-, as penúltimas sequências mais comuns subjacentes ao ácido siálico terminal numa estrutura totalmente sialilada de hidrato de carbono (Ver, Tabela 8). As α 2,8-sialiltransferases capazes de transferir o ácido siálico para α 2,3 Gal β 1,4GlcNAc são também úteis nos métodos da invenção.

Tabela 8. Sialiltransferases que utilizam a sequência Gal β 1,4GlcNAc como um substrato aceitador

Sialiltransferase	Fonte	Sequência(s) formada	Ref.
ST6Gal I	Mamífero	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	Mamífero	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	Mamífero	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST6Gal III	Mamífero	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	
ST6Gal II	<i>Photobacterium</i>	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitides</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	3

1) Goochee et al., *Bio/Technology* 9: 1347-1355 (1991)

2) Yamamoto et al., *J. Biochem.* 120: 104-110 (1996)

3) Gilbert et al., *J. Biol. Chem.* 271: 28271-28276 (1996)

Um exemplo de uma sialiltransferase que é útil nos métodos reivindicados é ST3Gal III, que é também referido como $\alpha(2,3)$ sialiltransferase (EC 2.4.99.6). esta enzima catalisa a transferência de ácido siálico para o Gal de um Gal β 1,3GlcNAc ou Gal β 1,4GlcNAc glicósido (Ver, e.g., Wen et al., *J. Biol. Chem.* 267: 21011 (1992); Van den Eijnden et al., *J. Biol. Chem.* 256: 3159 (1991)) e é responsável para a sialilação de oligossacáridos ligados a asparagina em glicopéptidos. O ácido siálico é ligado a uma Gal com a formação de uma ligação α entre os dois sacáridos. A ligação (junção) entre os sacáridos está entre a posição 2 de NeuAc e a posição 3 de Gal. Esta enzima particular pode ser isolada a partir de fígado de rato (Weinstein et al., *J. Biol. Chem.* 257: 13845 (1982)); a cDNA humana (Sasaki et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 22782-22787; Kitagawa & Paulson (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 1394-1401) e são conhecidas sequências de DNA genómico (Kitagawa et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 931-938), facilitando a produção desta enzima por expressão recombinante. Numa forma de realização preferida, os métodos de sialilação reivindicados utilizam uma ST3Gal III de rato.

Um exemplo de uma sialiltransferase que é útil nos métodos reivindicados é CST-I de *Campilobacter* (Ver, por exemplo, Pat. U.S. N°. 6 503 744, 6 096 529, e 6 210 933 e WO99/49051, e publicado no Pedido de Pat. U.S. 2002/2 042 369). Esta enzima catalisa a transferência de ácido siálico para a Gal de um Gal β 1,4Glc ou Gal β 1,3GalNAc.

Outras sialiltransferases exemplares de utilização na presente invenção incluem as isoladas de *Campilobacter jejuni*, incluindo a $\alpha(2,3)$ sialiltransferase. Ver, e.g., WO99/49051.

Outras sialiltransferases, incluindo as listadas na Tabela 8, são também úteis num processo em grande escala económico e eficiente para a sialilação de glicopéptidos comercialmente importantes. Como um simples teste para encontrar a utilidade destas outras enzimas, várias quantidades de cada enzima (1-100 mU/mg proteína) são feitas reagir com asialo- $\alpha 1$ AGP (a 1-10 mg/mL) para comparar a capacidade da sialiltransferase de interesse para sialilar glicopéptidos relacionados com cada sialiltransferase bovina ST6Gal I, ST3Gal III ou ambas. Alternativamente, outros glicopéptidos ou glicopéptidos, ou oligossacáridos ligados em N, libertados enzimaticamente da estrutura peptídica, podem ser utilizados em vez de asialo- $\alpha 1$ AGP para esta avaliação. As sialiltransferases com a capacidade de sialilar oligossacáridos ligados em N dos glicopéptidos mais eficientemente do que ST6Gal I são úteis na prática de processos em larga escala para a sialilação de péptido (como ilustrado para ST3Gal III nesta revelação).

4. Outras glicosiltransferases

Um especialista na técnica compreenderá que outras glicosiltransferases podem ser substituídas em ciclos de transferase semelhantes como foi descrito em

detalhe para a sialiltransferase. Em particular, a glicosiltransferase pode também ser, por exemplo, glicosiltransferases, e.g., Alg8 (Stagljov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5977 (1994)) ou Alg5 (Heesen et al., *Eur. J. Biochem.* 224: 71 (1994)).

As N-acetilgalactosaminiltransferases são também de utilização na prática da presente invenção. As N-acetilgalactosaminiltransferases adequadas incluem, mas não estão limitados a, $\alpha(1,3)$ N-acetilgalactosaminiltransferase, $\beta(1,4)$ N-acetilgalactosaminiltransferases (Nagata et al., *J. Biol. Chem.* 267: 12082-12089 (1992) e Smith et al., *J. Biol. Chem.* 269: 15162 (1994)) e a N-acetilgalactosaminiltransferase de péptido (Homa et al., *J. Biol. Chem.* 268: 12609 (1993)). As N-acetilglucosaminiltransferases adequadas incluem GnT-I (2.4.1.101, Hull et al., *BBRC* 176: 608 (1991)), GnT-II, GnT-III (Ihara et al., *J. Biochem.* 113: 692 (1993)), GnT-IV, GnT-V (Shoreibah et al., *J. Biol. Chem.* 268: 15381 (1993)) e GnT-VI, N-acetilglucosaminiltransferase ligadas a O (Bierhuizen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9326 (1992)), N-acetilglucosamina-1-fosfato transferase (Rajput et al., *Biochem J.* 285: 985 (1992)), e hialuronano sintase.

As manosiltransferases são de utilização para transferir unidades de manose modificadas. As manosiltransferases adequadas incluem $\alpha(1,2)$ manosiltransferase, $\alpha(1,3)$ manosiltransferase, $\alpha(1,6)$ manosiltransferase, $\beta(1,4)$ manosiltransferase, Dol-P-Man sintase, Och1, e Pmt1 (Ver, Kornfeld et al., *Annu. Rev. Biochem.* 54: 631-664 (1985)).

As xilosiltransferases são também úteis na presente invenção. Ver, por exemplo, Rodgers, *et al.*, *Biochem. J.*, 288:817-822 (1992); e Elbain, *et al.*, Patente U.S. N° 6 168 937.

Outros ciclos de glicosiltransferase adequados são descritos em Ichikawa *et al.*, *JACS* 114: 9283 (1992), Wong *et al.*, *J. Org. Chem.* 57: 4343 (1992), e Ichikawa *et al.* em CARBOHYDRATES AND CARBOHYDRATE POLYMERS. Yaltami, ed. (ATL Press, 1993).

As glicosiltransferases de procariotas são também úteis na prática da invenção. Estas glicosiltransferases incluem enzimas envolvidas na síntese de lipo-oligosacáridos (LOS), que são produzidos por muitas bactérias gram negativas. Os LOS possuem tipicamente sequências terminais de glicano que mimam os glicoconjugados encontrados à superfície das células epiteliais humanas ou nas secreções do hospedeiro (Preston *et al.*, *Critical Revisions in Microbiology* 23(3): 139-180 (1996)). Estas enzimas incluem, mas não estão limitados a, proteínas dos operões *rfa* de espécies tal como *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, que incluem uma β 1,6 galactosiltransferase e a β 1,3 galactosiltransferase (Ver, e.g., Acesso EMBL N°s M80599 e M86935 (*E. coli*); Acesso EMBL N° S56361 (*S. typhimurium*)), uma glucosiltransferase (Acesso Swiss-Prot N° P25740 (*E. coli*), uma β 1,2-glucosiltransferase (*rfaJ*) (Acesso Swiss-Prot N° P27129 (*E. coli*) e Acesso Swiss-Prot N° P19817 (*S.*

typhimurium)), e uma β 1,2-N-acetilglucosaminiltransferase (*rfaK*) (Acesso EMBL N° U00039 (*E. coli*)). Outras glicosiltransferases para as quais as sequências de aminoácidos são conhecidas incluem as que são codificadas por operões tal como *rfaB*, que foram caracterizadas em organismos tais como *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium leprosum*, e o operão *rhl* de *Pseudomonas aeruginosa*.

São também adequadas para utilização na presente invenção glicosiltransferases que estão envolvidas na produção de estruturas contendo lacto-N-neotetraose, D-galactosil- β -1,4-N-acetil-D-glucosaminil- β -1,3-D-galactosil- β -1,4-D-glucose, e a sequência de trissacárido do grupo de sangue P^k, D-galactosil- α -1,4-D-galactosil- β -1,4-D-glucose, que foram identificados nos LOS dos patogénicos da mucosa *Neisseria gonorrhoeae* e *N. meningitidis* (Scholten et al., *J. Med. Microbiol.* 41: 236-243 (1994)). Os genes de *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* que codificam as glicosiltransferases envolvidas na biossíntese destas estruturas foram identificados nos imunotipos de *N. meningitidis* L3 e L1 (Jennings et al., *Mol. Microbiol.* 18: 729-740 (1995)) e mutante F62 de *N. gonorrhoeae* (Gotshlich, *J. Exp. Med.* 180: 2181-2190 (1994)). Em *N. meningitidis*, um locus que consiste em três genes, *IgtA*, *IgtB* e *Ig E*, codifica a enzima glicosiltransferase necessária para a adição dos últimos três açúcares na cadeia de lacto-N-neotetraose (Wakarchuk et al., *J. Biol. Chem.* 271: 19166-73 (1996)). Recentemente a actividade enzimática do produto dos genes

IgtB e *IgtA* foi demonstrada, proporcionando a primeira evidência directa para a função proposta para a glicosiltransferase (Wakarchuk et al., *J. Biol. Chem.* 271 (45): 28271-276 (1996)). Em *N. gonorrhoeae*, existem dois genes adicionais, *IgtD* que adiciona β -D-GalNAc à posição 3 da galactose terminal da estrutura Da lacto-N-neotetraose e *IgtC* que adiciona um α -D-Gal terminal ao elemento lactose de um LOS truncado, criando deste modo a estrutura do antígeno do grupo de sangue P^k (Gotshlich (1994), *supra.*). Em *N. meningitidis*, um imunotipo separado L1 também expressa o antígeno do grupo de sangue P^k e foi mostrado que era portador de um gene *IgtC* (Jennings et al., (1995), *supra.*). As glicosiltransferases de *Neisseria* e genes associados estão também descritos em USPN 5 545 553 (Gotschlich). Os genes para α 1,2-fucosiltransferase e α 1,3-fucosiltransferase de *Helicobacter pylori* foi também caracterizada (Martin et al., *J. Biol. Chem.* 272: 21349-21356 (1997)). Também de utilização na presente invenção são as glicosiltransferases de *Campilobacter jejuni* (Ver, Taniguchi et al., 2002, Handbook of glicosiltransferases and related genes, Springer, Tóquio).

B. Sulfotransferases

A invenção também proporciona métodos para a produção de péptidos que incluem moléculas sulfatadas, incluindo, por exemplo polissacáridos sulfatados tais como heparina, sulfato de heparano, carragenano, e compostos relacionados. As sulfotransferases adequadas incluem, por

exemplo, condroitin-6-sulphotransferase (cDNA de galinha descrita por Fukuta *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 18575-18580 (1995); GenBank Accession No. D49915), glicosaminoglicano N-acetilglucosamina N-desacetilase/N-sulfotransferase 1 (Dixon *et al.*, *Genomics* 26: 239-241 (1995); UL18918), e glicosaminoglicano N-acetilglucosamina N-desacetilase/N-sulphotransferase 2 (cDNA de murino descrita em Orellana *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 2270-2276 (1994) e Eriksson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 10438-10443 (1994); cDNA humano descrito no Acesso GenBank N° U2304).

C. Glicosiltransferases Ligadas a Células

Noutra forma de realização, as enzimas utilizadas no método da invenção são glicosiltransferases ligadas a células. Embora sejam conhecidas muitas glicosiltransferases solúveis (Ver, por exemplo, Pat. U.S. N°. 5 032 519), as glicosiltransferases estão geralmente na forma ligada à membrana quando associada com células. Muitas das enzimas ligadas a membrana estudadas deste modo são, de longe, consideradas como sendo proteínas intrínsecas; ou seja, estas não são libertadas das membranas por sonicação e requerem detergentes para solubilização. As glicosiltransferases de superfície foram identificadas nas superfícies de células de vertebrados e invertebrados, e foi também reconhecido que estas transferases de superfície mantêm actividade catalítica sob condições fisiológicas. Contudo, a função mais reconhecida das glicosiltransferases da superfície celular é a do reconhecimento intercelular

(Roth, 1990, Molecular Approaches to Supracellular Phenomena,).

Os métodos foram desenvolvidos para alterar as glicosiltransferases expressas pelas células. Por exemplo, Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8227-8231 (1989), reportaram uma abordagem genética para isolar sequências de cDNA clonadas que determinam a expressão das estruturas do oligossacárido à superfície celular e suas glicosiltransferases conhecidas. Uma biblioteca de cDNA foi produzida a partir de mRNA isolado a partir de uma linha de células de murino conhecida por expressar UDP-galactose: β -D-galactosil-1,4-N-acetil-D-glucosaminida α -1,3-galactosiltransferase foi transfectada em células COS-1. As células transfectadas foram depois cultivadas e ensaiadas quanto a actividade de α 1-3 galactosiltransferase.

Francisco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2713-2717 (1992), revela um método de ancoragem de β -lactamase à superfície externa de *Escherichia coli*. Uma fusão tripartida que consiste em (i) uma sequência sinal de uma proteína da membrana externa, (ii) uma secção que atravessa a membrana de uma proteína da membrana externa, e (iii) uma sequência completa de β -lactamase madura é produzida resultando numa molécula de β -lactamase activa ligada à superfície. Contudo, o método de Francisco é limitado apenas a sistemas de células procariotas e as reconhecidas pelos autores, requerem a completa fusão tripartida para um funcionamento adequado.

D. Enzimas de Fusão

Em outras formas de realização exemplares, os métodos da invenção utilizam péptidos de fusão que têm mais de uma actividade enzimática que é envolvido na síntese de um glicoconjugado peptídico desejado. Os péptidos de fusão podem ser compostos por, por exemplo, um domínio cataliticamente activo de uma glicosiltransferase que é ligado a um domínio cataliticamente activo de uma enzima acessória. O domínio catalítico da enzima acessória pode, por exemplo, catalisar um passo na formação de um açúcar de nucleótido que é um dador para a glicosiltransferase, ou catalisar uma reacção envolvida num ciclo de glicosiltransferase. Por exemplo, um polinucleótido que codifica uma glicosiltransferase pode ser ligado, em fase, a um polinucleótido que codifica uma enzima envolvida na síntese de açúcar de nucleótido. O péptido de fusão resultante pode depois catalisar não apenas a síntese do açúcar de nucleótido, mas também a transferência da unidade de açúcar para a molécula aceitadora. O péptido de fusão pode ser duas ou mais enzimas de ciclo ligadas numa sequência de nucleótidos com expressão. Em outras formas de realização o péptido de fusão inclui os domínios cataliticamente activos de duas ou mais glicosiltransferases. Ver, por exemplo, Patente U.S. N°. 5 641 668. Os glicopéptidos modificados da presente invenção podem ser prontamente concebidos e preparados utilizando vários péptidos de fusão adequados (Ver, por exemplo, Pedido de

Patente PCT PCT/CA98/01180, que foi publicado como WO 99/31224 em 24 de Junho de 1999.)

E. Enzimas Imobilizadas

Adicionalmente a enzimas ligadas a célula, a presente invenção também proporciona a utilização de enzimas que são imobilizadas num suporte sólido e/ou solúvel. Numa forma de realização exemplar, é proporcionada uma glicosiltransferase que é conjugada com um PEG via um ligante glicosilo intacto de acordo com os métodos da invenção. O conjugado PEG-ligante-enzima é opcionalmente ligado a um suporte sólido. A utilização de enzimas em suporte sólido nos métodos da invenção simplifica o processamento da mistura de reacção e purificação do produto de reacção, e também permite a fácil recuperação da enzima. O conjugado de glicosiltransferase é utilizado nos métodos da invenção. Outras combinações de enzimas e suportes serão óbvias para os especialistas na técnica.

F. Mutagénesse de Glicosiltransferases

As novas formas das glicosiltransferases, sialiltransferases, sulfotransferases, e quaisquer outras enzimas utilizadas no método da invenção podem ser criadas utilizando qualquer dos métodos descritos previamente, assim como outros bem conhecidos dos da técnica. De particular interesse, são transferases com especificidade do aceitador e/ou especificidade do dador alterada. Também

de interesse são enzimas com elevadas taxas de conversão e elevada estabilidade entre outros.

As técnicas de concepção racional da mutagênese podem ser utilizadas quando a sequência do péptido é conhecida. Uma vez que as sequências assim como muitas das estruturas terciárias das transferases e glicosidases utilizadas na invenção são conhecidas, estas enzimas são ideais para a concepção racional de mutantes. Por exemplo, o sítio catalítico da enzima pode ser mutado para alterar a especificidade do dador e/ou aceitador da enzima.

Os extensos dados de estrutura terciária nas glicosiltransferases e glicosidase hidrolases também tornam esta enzima ideal para mutações envolvendo trocas de domínios. As glicosiltransferases e glicosidase hidrolases são enzimas modulares (Ver, Bourne e Henrissat, 2001, *Current Opinion in Structural Biology* 11:593-600). As glicosiltransferases são divididas em duas famílias com base na sua estrutura: GT-A e GT-B. as glicosiltransferases da família GT-A compreendem dois domínios dissemelhantes, um envolvido na ligação ao nucleótido e o outro no aceitador da ligação. Deste modo, pôde-se convenientemente fundir a sequência de DNA que codifica para o domínio de um gene em fase com um domínio de um segundo gene para criar um novo gene que codifica uma proteína com um novo aceitador/dador de especificidade. Estas trocas de domínios podem adicionalmente incluir os módulos de hidrato de carbono e outros domínios acessórios.

As técnicas de mutação aleatória e/ou de evolução dirigida, como descrito acima, podem também ser utilizadas para produzir novas formas de glicosiltransferases e glicosidases utilizadas na invenção.

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

A. Células para a produção de glicopéptidos

A acção das glicosiltransferases é a chave para a glicosilação de péptidos, deste modo, a diferença na expressão de um conjunto de glicosiltransferases em qualquer tipo de célula determinado afecta o padrão de glicosilação de qualquer péptido determinado produzido nessa célula. Para uma revisão da glicosilação de péptidos dependente da célula hospedeira, ver Kabata e Takasaki, "Structure and Biosynthesis of Cell Surface Carbohydrates," em Cell Surface Carbohydrates and Cell Development, 1991, pp. 1-24, Eds. Minoru Fukuda, CRC Press, Boca Raton, FL.

De acordo com a presente revelação, o tipo de célula em que o péptido é produzido é relevante apenas no que respeita ao grau de remodelação necessário para produzir um péptido possuindo a glicosilação desejada. Por exemplo, o número e sequência das reacções de digestão enzimática e o número e sequência das reacções enzimáticas de síntese que são necessárias para produzir *in vitro* um péptido possuindo a glicosilação desejada irá variar

dependendo da estrutura do glicano no péptido produzido por um tipo particular de célula. Embora a invenção não deva ser, de algum modo entendida como limitante para a produção de péptidos a partir de qualquer um particular tipo de célula incluindo qualquer tipo de célula aqui revelado, é agora apresentada uma discussão de vários sistemas de células que estabelece o poder da presente invenção e a sua independência do tipo de célula em que os péptidos são produzidos.

Em geral, e para expressar um péptido de um ácido nucleico que o codifica, o ácido nucleico deve ser incorporado numa cassette de expressão, compreendendo um elemento promotor, um elemento terminador, e a sequência codificante do péptido ligada operacionalmente entre os dois. A cassette de expressão é depois ligada operacionalmente num vector. Para este fim, podem ser empregues adaptadores ou ligantes para ligar os fragmentos de nucleótidos ou podem ser envolvidas outras manipulações para proporcionar sítios de restrição convenientes, remoção de nucleótidos supérfluos, remoção de sítios de restrição, ou semelhantes. Para este propósito, podem ser envolvidos a mutagénese *in vitro*, reparação de iniciadores, restrição, emparelhamento, ressubstituições, e.g., transições e transversões. Um vector vai-vem possui os elementos genéticos necessários para a replicação numa célula. Alguns vectores podem ser replicados apenas em procariotas, ou podem ser replicados em ambos, procariotas e eucariotas. Este vector de expressão plasmídico será mantido em um ou

mais sistemas de replicação, preferencialmente dois sistemas de replicação, que permitem a manutenção estável numa célula hospedeira de levedura para propósitos de expressão, e num hospedeiro procariota para propósitos de clonagem. Muitos vectores com diversas características estão agora disponíveis comercialmente. Os vectores são normalmente plasmídeos ou fagos, mas podem também ser cosmídeos ou mini-cromossomas. Convenientemente, muitos vectores comercialmente disponíveis terão o promotor e terminador da cassette de expressão já presentes, e um sítio multi-ligante em que a sequência codificante para o péptido de interesse pode ser inserida. O vector vai-vem contendo a cassette de expressão é depois transformado em *E. coli* onde é replicado durante a divisão da célula para produzir uma preparação de vector que é suficiente para transformar as células hospedeiras do sistema de expressão seleccionado. A metodologia acima é bem conhecida dos da técnica, e os protocolos para a realizar podem ser encontrados em Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque).

O vector, uma vez purificado a partir das células em que é amplificado, é depois transformado nas células do sistema de expressão. O protocolo para a transformação dependeu do tipo de células e da natureza do vector. Os transformantes são cultivados num meio nutriente apropriado, e, quando apropriado, mantido sob pressão selectiva para assegurar a retenção de DNA endógeno. Quando a expressão é indutível, pode ser permitido o crescimento às

leveduras hospedeiras para produzir uma elevada densidade de células, e depois a expressão é induzida. O péptido secretado, heterólogo maduro pode ser recolhido através de qualquer meio convencional, e purificada por cromatografia, electroforese, diamentese, extracção solvente-solvente, e semelhantes.

As técnicas de clonagem molecular são bem conhecidas na técnica. Além disso, as técnicas para os procedimentos da clonagem molecular podem ser encontradas em Sambrook *et al.* (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Glover *et al.*, (1985, *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I e II); Gait *et al.*, (1985, *Oligonucleotide Synthesis*); Hames e Higgins (1985, *Nucleic Acid Hybridization*); Hames e Higgins (1984, *Transcription and Translation*); Freshney *et al.*, (1986, *Animal Cell Culture*); Perbal, (1986, *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press); Perbal, (1984, *A Practical Guide To Molecular Cloning*); Ausubel *et al.* (2002, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.).

B. Fungos e leveduras

Os péptidos produzidos em leveduras são glicosilados e as estruturas de glicano nela presentes são primariamente estruturas com manose elevada. No caso dos N-glicanos, as estruturas de glicano produzidas em leveduras podem conter nove ou mais resíduos de manose que podem ou

não conter açúcares adicionais a elas adicionadas. Um exemplo do tipo de glicano em péptidos produzidos por células de leveduras é apresentado na Figura 4, lado esquerdo. Independentemente do número de resíduos de manose e do tipo e complexidade dos açúcares adicionados a estes, os N-glicanos como componentes de péptidos produzidos em células de leveduras compreendem uma estrutura nuclear de trimanosilo como apresentado na Figura 4. Quando a estrutura de glicano num péptido produzido por uma célula de levedura é uma estrutura com manose elevada, é uma matéria simples para o técnico normal remover *in vitro*, utilizando enzimas manosidase disponíveis, todos os resíduos de manose da molécula excepto para os que compreendem o núcleo de trimanosilo do glicano, produzindo deste modo um péptido possuindo uma estrutura nuclear elementar de trimanosilo ligados a esta. Agora, utilizando as técnicas disponíveis na técnica e detendo a presente revelação, é uma matéria simples para adicionar enzimaticamente, *in vitro*, unidades de açúcar adicionais para a estrutura nuclear elementar de trimanosilo para produzir um péptido possuindo uma estrutura de glicano desejada ligados a este. De um modo semelhante, quando o péptido produzido pelas células de levedura compreende uma estrutura com manose elevada adicionalmente a outros açúcares complexos ligados a este, é uma matéria simples remover enzimaticamente por clivagem todos os açúcares adicionais, incluindo resíduos de manose extra, para chegar à estrutura nuclear de trimanosilo elementar. Uma vez produzida a estrutura nuclear elementar de trimanosilo, a

produção de um péptido possuindo a glicosilação desejada é possível seguindo as directivas aqui proporcionadas.

Por "levedura" entendem-se leveduras ascosporógenas (*Endomycetales*), leveduras basidiosporógenas, e leveduras pertencentes aos *Fungi Imperfecti* (*Blastomycetes*). As leveduras ascosporógenas são divididas em duas famílias, *Spermophthoraceae* e *Saccharomycetaceae*. A última está compreendida em quatro subfamílias, *Schizosaccharomycoideae* (e.g., género *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae*, e *Saccharomycoideae* (e.g., géneros *Pichia*, *Kluyveromyces*, e *Saccharomyces*). As leveduras basidiosporógenas incluem os géneros *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium*, e *Filobasidiella*. As leveduras pertencentes aos *Fungi Imperfecti* são divididas em duas famílias, *Sporobolomycetaceae* (e.g., géneros *Sporobolomyces*, *Bullera*) e *Cryptococcaceae* (e.g., género *Candida*). De particular interesse para a presente invenção são as espécies dos géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Kluyveromyces*, especialmente *K. lactis* e *K. drosophilum*, *Candida*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, e *Chrysosporium*. Uma vez que a classificação das leveduras pode alterar-se no futuro, para os propósitos desta invenção, as leveduras devem ser definidas como descrito em Skinner et al., eds. 1980) *Biology and Activities of Yeasts* (*Soc. App. Bacteriol. Symp. Série No. 9*).

Adicionalmente ao exposto, os técnicos normais da técnica estão presumivelmente familiarizados com a biologia

de leveduras e a manipulação genética de leveduras. Ver, por exemplo, Bacila *et al.*, eds. (1978, *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Academic Press, Nova Iorque); e Rose e Harrison. (1987, *As leveduras* (2^a ed.) Academic Press, Londres). Os métodos de introdução de DNA exógeno nas leveduras hospedeiras são bem conhecidos na técnica. Existe uma vasta variedade de métodos para a transformação de leveduras. A transformação de esferoplastos é ensinada por Hinnen *et al* (1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1919-1933); Beggs, (1978, *Nature* 275(5676):104-109); e Stinchcomb *et al.*, (Publicação EPO No. 45 573; aqui incorporada por referência), Electroporação é ensinada por Becker e Gaurante, (1991, *Methods Enzymol.* 194:182-187), o acetate de lítio é ensinado por Gietz *et al.* (2002, *Methods Enzymol.* 350:87-96) e Mount *et al.* (1996, *Methods Mol Biol.* 53:139-145). Para uma revisão de sistemas de transformação de leveduras não *Saccharomyces*, ver Wang *et al.* (*Crit Rev Biotechnol.* 2001; 21(3):177-218). Para os procedimentos gerais de engenharia genética de leveduras, ver Barr *et al.*, (1989, *Yeast genetic engineering*, Butterworths, Boston).

Adicionalmente às leveduras e células de fungos do tipo selvagem, existem também estirpes de leveduras e fungos que foram mutados e/ou seleccionados para melhorar o nível de expressão dos genes exógenos, e a pureza, o processamento pós-tradução do péptido resultante, e a recuperação e pureza do péptido maduro. A expressão de um péptido exógeno pode também ser dirigida para a via de

secreção da célula, como ilustrado pela expressão de insulina (Ver (Kjeldsen, 2000, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:277-286, e referências aí citadas). Em geral, para fazer com que o péptido exógeno seja secretado pelas células de levedura, os sinais de secreção derivados de genes de leveduras podem ser utilizadas, tal como os dos genes da toxina assassina (Stark e Boyd, 1986, *EMBO J.* 5:1995-2002) ou da ferormona alfa (Kurjan e Herskowitz, 1982, *Cell* 30:933; Brake *et al.*, 1988, *Yeast* 4:S436).

No que respeita a fungos filamentosos em geral, os métodos para manipulação genética podem ser encontrados em Kinghorn e Turner (1992, *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*, Blackie Academic and Professional, Nova Iorque). Um guia dos vectores apropriados pode ser encontrado em Martinelli e Kinghorn (1994, *Aspergillus : 50 years*, Elsevier, Amsterdam).

1. *Saccharomyces*

Em *Saccharomyces*, os vectores de leveduras adequados para a utilização da produção de um péptido incluem YRp7 (Struhl *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1035-1039, 1978), YEpl3 (Broach *et al.*, *Gene* 8: 121-133, 1979), vectores POT (Kawasaki *et al.*, Pat. U.S. N°. 4 931 373, que é aqui incorporada por referência), pJDB249 e pJDB219 (Beggs, *Nature* 275:104-108, 1978) e seus derivados. Os promotores preferidos para utilização em leveduras incluem promotores para a expressão de genes

glicolíticos de leveduras (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 255: 12073-12080, 1980; Alber e Kawasaki, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 419-434, 1982; Kawasaki, Pat. U.S. N°. 4 599 311) ou genes da desidrogenase alcoólica (Young *et al.*, na *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemistry*, Hollaender *et al.*, (eds.), p. 355, Plenum, Nova Iorque, 1982; Ammerer, *Meth. Enzymol.* 101: 192-201, 1983), e o promotor ADH2-4c (Russell *et al.*, *Nature* 304: 652-654, 1983; Irani e Kilgore, pedido de patente U.S. Ser. No. 07/784,653, CA 1,304,020 e EP 284 044, que são aqui incorporada por referência). As unidades de expressão podem também incluir um terminador de transcrição. Um terminador de transcrição preferido é o terminator TPI1 (Alber e Kawasaki, *ibid.*).

Exemplos destes vectores vai-vem leveduras-bactérias incluem Yep24 (Botstein *et al.* (1979) *Gene* 8:17-24; pC1 (Brake *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4642-4646), e Yrp17 (Stnichomb *et al.* (1982) *J. Mol. Biol.* 158: 157). Adicionalmente, um vector de expressão plasmídico pode ser um plasmídeo de número de cópias elevado ou baixo, variando o número de cópias geralmente desde cerca de 1 a cerca de 200. No caso de vectores de leveduras de número de cópias elevado, será geralmente pelo menos 10, preferencialmente pelo menos 20, e não excede normalmente cerca de 150 cópias do vector num único hospedeiro. Dependendo do péptido heterólogo seleccionado, um vector de número de cópias elevado ou baixo pode ser desejável, dependendo do efeito do vector e do péptido

recombinante no hospedeiro. Ver, por exemplo, Brake *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4642-4646. As construções de DNA da presente invenção podem também ser integradas no genoma das leveduras através de um vector de integração. Exemplos destes vectores são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Botstein *et al.* (1979) *Gene* 8:17-24.

A selecção de leveduras adequadas e outros microrganismos hospedeiros para a prática da presente invenção está na especialidade da técnica. De particular interesse são as espécies de *Saccharomyces S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, e *S. oviformis*. Quando se seleccionam célula hospedeiras de leveduras para expressão de um péptido desejado, as células hospedeiras adequadas podem incluir as que mostram ter, *inter alia*, boa capacidade de secreção, baixa actividade proteolítica, e vigor global. As leveduras e outros microrganismos estão geralmente disponíveis de uma variedade de fontes, incluindo as leveduras do Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, Universidade da Califórnia, Berkeley, Calif.; e da American Type Culture Collecção, Manassas VA. Para uma revisão, ver Strathern *et al.*, eds. (1981, *The Molecular Biology of the yeasts Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Os métodos de introdução de DNA exógeno nas leveduras hospedeiras são bem conhecidos na técnica.

2. *Pichia*

A utilização de *Pichia metanolica* como célula hospedeira para a produção de péptidos recombinantes é revelada nos Pedidos PCT WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536, e WO 98/02565. As moléculas de DNA para utilização na transformação de *P. metanolica* são normalmente preparadas como plasmídeos de cadeia dupla, circulares, que são preferencialmente linearizadas antes da transformação. Para produção de péptidos em *P. metanolica*, é preferido que o promotor e terminador no plasmídeo seja o do gene de *P. metanolica*, tal como um gene de utilização de álcool de *P. metanolica* (AUG1 ou AUG2). Outros promotores úteis incluem os genes da sintase de di-hidroxiacetona (DHAS), formato desidrogenase (FMD), e catalase (CAT), assim como os revelados na Patente U.S. N°. 5 252 726. Para facilitar a integração do DNA no cromossoma do hospedeiro, é preferido ter o segmento de expressão completo do plasmídeo flanqueado em ambas as extremidades pelas sequências de DNA do hospedeiro. Um marcador seleccionável preferido para utilização em *Pichia metanolica* é um gene ADE2 de *P. metanolica*, que codifica fosforibosil-5-aminoimidazolecarboxilase (AIRC; EC 4.1.1.21), que permite que as células hospedeiras ade2to cresçam na ausência de adenina. Para processos industriais, de larga escala em que é desejável minimizar a utilização de metanol, são preferidas as células hospedeiras em que ambos os genes utilizadores de metanol (AUG1 e AUG2) são removidos. Para a produção de péptidos secretados, são preferidas as células

hospedeiras deficientes em genes de protease vacuolar (PEP4 e PRB1). A electroporação é utilizada para facilitar a introdução de um plasmídeo contendo DNA que codifica um péptido de interesse em células de *P. metanolica*. É preferido transformar células de *P. metanolica* pela electroporação utilizando um campo eléctrico pulsado, em decaimento exponencial, possuindo uma intensidade de campo desde 2,5 a 4,5 kV/cm, preferencialmente cerca de 3,75 kV/cm, e um constante de tempo (t) desde 1 a 40 milisegundos, mais preferencialmente cerca de 20 milisegundos. Para uma revisão da utilização de *Pichia pastoris* para produção de larga-escala de fragmentos de anticorpo, ver Fischer et al., (1999, *Biotechnol Appl Biochem.* 30 (Pt 2):117-120).

3. *Aspergillus*

Os métodos para expressar péptidos em *Aspergillus* spp. são bem conhecidos na técnica, incluindo mas não limitados aos descritos em Carrez et al., 1990, *Gene* 94:147-154; Contreras, 1991, *Bio/Technology* 9:378-381; Yelton et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474; Tilburn et al., 1983, *Gene* 26:205-221; Kelly and. Hynes, 1985, *EMBO J.* 4: 475-479; Ballance et al., 1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 112:284-289; Buxton et al., 1985, *Gene* 37:207-214, e Pat. U.S. N°. 4 935 349, aqui incorporada por referência na sua totalidade. Exemplos de promotores úteis em *Aspergillus* são encontrados na Patente U.S. N°. 5 252 726. As estirpes de *Aspergillus* úteis para expressão do péptido são encontradas na Patente U.S. N°.

4 935 349. A produção comercial de péptidos exógenos está disponível de Novoenzymes para *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*.

4. *Trichoderma*

Trichoderma tem certas vantagens sobre outras espécies de células hospedeiras recombinantes para expressão dos péptidos desejados. Este organismo é fácil de cultivar em grandes quantidades e tem a capacidade de glicosilar e eficientemente secretar elevados rendimentos de péptidos recombinantes de mamífero no meio, tornando o isolamento do péptido relativamente fácil. Adicionalmente, o padrão de glicosilação em péptidos expressos é mais semelhante ao dos péptidos humanos do que aos péptidos expressos em muitos outros sistemas. Contudo, existem ainda diferenças nas estruturas de glicano em péptidos expressos a partir destas células. Por exemplo, os resíduos terminais de ácido siálico são importantes para a função terapêutica de um péptido num sistema de mamífero, uma vez que a presença destas unidades no final da estrutura de glicano impede a eliminação do péptido da corrente sanguínea de mamífero. Crê-se que o mecanismo para lá do aumento de semi-vida biológica de moléculas sialiladas reside no seu reconhecimento diminuído através de lectinas (Drickamer, 1988, *J. Biol. Chem.* 263:9557-9560). Contudo, em geral as células de fungos não adicionaram resíduos terminais de ácido siálico a glicanos em péptidos, e os péptidos sintetizados em células de fungos são por isso assiálicas.

De acordo com a presente invenção, esta deficiência pode ser remediada utilizando os métodos *in vitro* de remodelação glicano da invenção descritos em detalhe noutra secção.

As espécies de *Trichoderma* úteis como hospedeiras para a produção de péptidos a ser remodelados incluem *T. reesei*, tal como QM6a, ALKO2442 ou CBS383.78 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, PO Box 273, 3740 AG Baarn, Holanda, ou, ATCC13631 (American Type Culture Collection, Manassas VA, 10852, USA, tipo); *T. viride* (tal como CBS189.79 (det. W. Gams); *T. longibrachiatum*, tal como CBS816.68 (tipo); *T. pseudokoningii* (tal como MUCL19358; Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain); *T. saturnisporum* CBS330.70 (tipo); *T. harzianum* CBS316.31 (det. W. Gams); *T. virgatum* (*T. pseudokoningii*) ATCC24961. Mais preferencialmente, o hospedeiro é *T. reesei* e mais preferencialmente, são as estirpes de *T. reesei* QM9414 (ATCC 26921), RUT-C-30 (ATCC 56765), e mutantes altamente produtivos tal como VTT-D-79125, que é derivado do QM9414 (Nevalainen, Technical Research Centre of Finland Publications 26, (1985), Espoo, Finlândia).

A transformação de *Trichoderma* com DNA é efectuada utilizando qualquer técnica conhecida na técnica, incluindo a ensinada na Patente Europeia No. EP0244234, Harkki (1989, *Bio/Technology* 7:596-601) e Uusitalo (1991, *J. Biotech.* 17:35-50). A cultura de *Trichoderma* é apoiada pela prévia extensa experiência em técnicas de fermentação de escala industrial; por exemplo, ver Finkelstein, 1992,

Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Products, Butterworth-Heinemann, publicado por, Stoneham, Mass.

5. *Kluyveromyces*

As leveduras pertencentes ao género *Kluyveromyces* foram utilizadas como organismos hospedeiros para a produção de péptidos recombinantes. Os péptidos produzidos por este género de leveduras são, em particular, quimosina (Patente Europeia 96 430), taumatina (Patente Europeia 96 910), albumina, interleuquina-1 β , TPA, TIMP (Patente Europeia 361 991) e derivados de albumina possuindo uma função terapêutica (Patente Europeia 413 622). As espécies particulares de interesse no género *Kluyveromyces* incluem *K. lactis*.

Os métodos de expressão de péptidos recombinantes em *Kluyvermyces* spp. são bem conhecidos na técnica. Os vectores para a expressão e secreção de péptidos recombinantes humanos em *Kluyvermyces* são conhecidos na técnica (Yeh, *J. Cell. Biochem. Supl.* 14C:68, Abst. H402; Fleer, 1990, *Yeast* 6 (Número especial):S449) assim como os procedimentos para a transformação e expressão de péptidos recombinantes (Ito *et al.*, 1983, *J. Bacteriol.* 153:163-168; van den Berg, 1990, *Bio/Technology* 8: 135-139; Patente U.S. N°. 5 633 146, WO8304050A1, EP0096910, EP0241435, EP0301670, EP0361991, todos estes são aqui incorporados por referência na sua totalidade). Para uma revisão da manipu-

lação genética do plasmídeos de DNA linear de *Kluyveromyces lactis* por direccionamento de genes e plasmídeos vai-vem, ver Schaffrath et al. (1999, *FEMS Microbiol Lett.* 178(2): 201-210).

6. *Chrysoporium*

O género fúngico *Chrysoporium* foi recentemente utilizado para expressão de péptidos recombinantes estranhos. Uma descrição dos procedimentos através dos quais um especialista na técnica pode utilizar *Chrysoporium* pode ser utilizada para expressar péptidos estranhos é encontrada em WO 00/20555 (aqui incorporada por referência na sua totalidade). As espécies particularmente adequadas para o sistema de expressão incluem, mas não estão limitados a, *C. botryoides*, *C. carmichaelii*, *C. crassitunicatum*, *C. europae*, *C. evolceannui*, *F. fastidium*, *C. filiforme*, *C. gorgiae*, *C. globiferum*, *C. globiferum* var. *articulatum*, *C. globiferum* var. *niveum*, *C. hirundo*, *C. hispanicum*, *C. holmii*, *C. indicum*, *C. inops*, *C. keratinophilum*, *C. kreiselii*, *C. kuzurovianum*, *C. lignorum*, *C. lobatum*, *C. lucknowense*, *C. lucknowense* Garg 27K, *C. medium*, *C. medium* var. *spissescens*, *C. mephiticum*, *C. merdarium*, *C. merdarium* var. *roseum*, *C. minor*, *C. pannicola*, *C. parvum*, *C. parvum* var. *crescens*, *C. pilosum*, *C. peodomerderium*, *C. pyriformis*, *C. queenslandicum*, *C. sigleri*, *C. sulfureum*, *C. synchronum*, *C. tropicum*, *C. undulatum*, *C. vallenarense*, *C. vespertilium*, e *C. zonatum*.

7. Outros

Os métodos para transformar *Schwanniomyces* são revelados na Patente Europeia 394 538. Os métodos para transformar *Acremonium chrysogenum* são revelados pela Pat. U.S. N°. 5 162 228. Os métodos para transformar *Neurospora* são revelados pela Pat. U.S. N°. 4 486 533. É também conhecido um sistema de expressão especificamente para *Schizosaccharomyces pombe* (Patente Europeia 385 391). Os métodos gerais para expressar péptidos em leveduras de fissão, a *Schizosaccharomyces pombe* pode ser encontrada em Giga-Hama e Kumagai (1997, Foreign gene expression in fission yeasts: *Schizosaccharomyces pombe*, Springer, Berlin).

C. Sistemas de mamíferos

Como discutido acima, as células de mamíferos produzem tipicamente uma mistura heterogênea de estruturas N-glicano que varia com respeito ao número e arranjo de açúcares adicionais ligados ao núcleo de trimanosilo. Tipicamente, as células de mamíferos produzem péptidos possuindo uma estrutura de glicano complexo, tal como a apresentada na Figura 3, lado direito. Utilizando os métodos da presente invenção, um péptido produzido numa célula de mamífero podem ser remodelados *in vitro* para produzir um péptido possuindo a glicosilação desejada por, primeiro, identificar a estrutura primária de glicano e depois determinar que açúcares devem ser removidos de modo

a remodelar a estrutura de glicano. Como aqui discutido, os açúcares a ser removidos determinam que enzimas de clivagem serão utilizadas e deste modo, os passos precisos do processo de remodelação variarão dependendo da estrutura primária de glicano utilizada como o substrato inicial. Um esquema de amostras para remodelar a estrutura de glicano normalmente produzida em células de mamíferos é apresentado na Figura 2. A via biossintética do N-glicano em células de mamíferos foi bem caracterizada (revista em Moremen, 1994, *Glycobiology* 4:113-125). Muitas das enzimas necessárias para a síntese de glicano foram identificadas, e as linhas de célula mutantes deficientes nesta via enzimática foram isolados incluindo as linhas de células de ovário de hamster Chinês (CHO) Lec23 (deficiente em alfa-glucosidase I) e Lec18 (nova GlcNAc-TVIII). O padrão de glicosilação dos péptidos produzidos por estas células mutante é alterado relativamente às células CHO normais. Como aqui discutido, os defeitos de glicosilação nestas células mutantes e outras podem ser exploradas com os propósitos de produção de um péptido que não possui uma estrutura de glicano complexo. Por exemplo, os péptidos produzidos por células Lec23 não têm resíduos de ácido siálico, e deste modo requerem menos manipulação enzimática de modo a reduzir a estrutura de glicano a um núcleo elementar de trimanosilo ou a Man3GlcNAc4. Deste modo, os péptidos produzidos nestas células podem servir como substratos preferidos para remodelação de glicano. Um técnico normal da técnica pode isolar ou identificar outras linhas de células deficientes em glicosilação com base em métodos

conhecidos, por exemplo o método descrito em Stanley *et al.*, 1990, *Somatic Cell Mol. Genet.*, 16: 211-223. A utilização de linhas de células deficientes em glicosilação, as identificadas e as ainda não identificadas, está incluída na invenção com o propósito de produzir substratos péptidos preferidos para os processos de remodelação aqui descrito.

Os vectores de expressão úteis para expressão de péptidos exógenos em células de mamíferos são numerosos, e são bem conhecidos dos da técnica. Muitos vectores de expressão de mamífero são agora comercialmente disponíveis de companhias, incluindo Novagen, Inc (Madison, WI), Gene Therapy Sistemas (San Diego, CA), Promega (Madison, WI), ClonTech Inc. (Palo Alto, CA), e Stratagene (La Jolla, CA), entre outros.

Existem várias linhas de células de mamífero que são particularmente adeptas da expressão de péptidos exógenos. Tipicamente as linhas de células de mamífero têm origem em células de tumor extraídas de mamíferos que ficaram imortalizadas, ou seja, podem replicar em cultura essencialmente indefinidamente. Estas linhas de células incluem, mas não estão limitados a, CHO (Ovário de hamster Chinês, e.g. CHO-K1; ATCC No. CCL 61) e suas variantes, NSO (mieloma de murganho), BNK, BHK 570 (ATCC No. CRL 10314), BHK (ATCC No. CRL 1632), Per.C6™ (células humanas imortalizadas, Crucell N.V., Leiden, Holanda), COS- 1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC No. CRL 1651), HEK 293, células

L de murganho, linhas de células T linfóides, células BW5147 e MDCK (rim canino de Madin-Darby), HeLa (humano), A549 (carcinoma do pulmão humano), 293 (ATCC No. CRL 1573; Graham *et al.*, 1977, *Gen. Virol.* 36:59-72), BGMK (rim de Buffalo Green Monkey), Hep-2 (carcinoma da laringe epidermóide humana), LLC-MK2 (African Green Monkey Kidney), McCoy, NCI-H292 (tubo de carcinoma pulmonar mucoepidermóide humano), RD (rabdomiossarcoma), Vero (rim de African Green Monkey), HEL (pulmão embrionário humano), Lung-Chang Fetal Humano, MRC5 (pulmão embrionário humano), MRHF (prepúcio humano), e WI-38 (pulmão embrionário humano). Em alguns casos, as células em que o péptido terapêutico é expresso podem ser células derivadas do doente a ser tratado, ou estes podem ser derivados de outro mamífero relacionado ou ou não relacionado. Por exemplo, as células de fibroblasto podem ser isoladas a partir do tecido de pele de mamífero, e cultivadas e transformadas *in vitro*. Esta tecnologia está comercialmente disponível de Transkaryotic Therapies, Inc. (Cambridge, MA). Quase todas as linhas de células presentemente utilizadas são disponíveis na American Type Culture Collecção (ATCC, Manassas, VA) e BioWhittaker (Walkersville, Mariland).

As células de mamíferos podem ser transformadas com DNA utilizando qualquer uma de várias técnicas que são bem conhecidas dos da especialidade. Estas técnicas incluem, mas não estão limitados a, transformação por fosfato de cálcio (Chen e Okayama, 1988; Graham e van der Eb, 1973; Corsaro e Pearson, 1981, *Somatic Cell Genetics*

7:603), Diethylaminoethyl (DEAE)-dextran transfection (Fujita et al., 1986; Lopata et al., 1984; Selden et al., 1986), electroporação (Neumann et al., 1982,; Potter, 1988,; Potter et al., 1984,; Wong e Neuman, 1982), transfecção com reagente de lípido catiónico (Elroy-Stein e Moss, 1990; Feigner et al., 1987; Rose et al., 1991; Whitt et al., 1990; Hawley-Nelson et al., 1993, *Focus* 15:73; Ciccarone et al., 1993, *Focus* 15:80), retroviral (Cepko et al., 1984; Miller e Baltimore, 1986; Pear et al., 1993; Austin e Cepko, 1990; Bodine et al., 1991; Fekete e Cepko, 1993; Lemischka et al., 1986; Turner et al., 1990; Williams et al., 1984; Miller e Rosman, 1989, *BioTechniques* 7:980-90; Wang e Finer, 1996, *Nature Med.* 2:714-6), polibreno (Chaney et al., 1986; Kawai e Nishizawa, 1984), microinjecção (Capecchi, 1980), e fusão de protoplasto (Rassoulzadegan et al., 1982; Sandri-Goldin et al., 1981; Schaffer, 1980), entre outros. Em geral, ver Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque) e Ausubel et al. (2002, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque) para técnicas de transformação.

Recentemente, o sistema de baculovírus, popular para a transformação de células de insecto, foi adaptado para a transformação estável de células de mamíferos (Ver, para revisão, Koat e Condeelis, 2002, *Trends Biotechnol.* 20:173-180, e referências aí citadas). A produção de péptidos recombinantes em células de mamíferos em cultura é revelada, por exemplo, na Pat. U.S. N°s. 4 713 339,

4 784 950; 4 579 821; e 4 656 134. Várias companhias oferecem os serviços de transformação e cultura das células de mamíferos, incluindo Cell Trends, Inc. (Middletown, MD). As técnicas para cultivar células de mamíferos são bem conhecidas na técnica, e ainda encontradas em Hauser *et al.* (1997, Mammalian Cell Biotechnology, Walter de Gruyter, Inc., Hawthorne, NY), e Sambrook *et al.* (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor e referências aí citadas.

D. Insectos

Células de insecto e em particular, células de insecto em cultura, expressam péptidos possuindo estruturas de glicano ligadas a N que são raramente sialiladas e compreendem normalmente resíduos de manose que podem ou não ter resíduos adicionais de fucose ligados a esta. Os exemplos dos tipos de estruturas de glicano presentes nos péptidos produzidos em células de insecto em cultura são apresentados na Figura 6, e seus glicanos de manose. Nesta situação, podem existir ou não um núcleo de fucose presente, que se presente, podem estar ligado ao glicano através de várias ligações diferentes.

A expressão mediada por baculovírus em células de insecto tornou-se particularmente bem estabelecida para a produção de péptidos recombinantes (Altmann *et al.*, 1999, *Glycoconjugate J.* 16:109-123). No que respeita à dobragem do péptido e processamento pós-tradução, as células de

insecto estão apenas em segundo com as linhas de células de mamífero. Contudo, como notado acima, a N- glicosilação de péptidos em células de insecto difere em muitos aspectos da N-glicosilação em células de mamíferos particularmente nas células de insecto que frequentemente produzem estruturas truncadas de glicano compreendendo oligossacáridos contendo apenas três ou por vezes apenas dois manose resíduos. Estas estruturas podem ser adicionalmente substituídas com resíduos de fucose.

De acordo com a presente invenção, um péptido produzido numa célula de insecto pode ser remodelado *in vitro* para produzir um péptido com glicosilação desejada por primeiro remover opcionalmente quaisquer resíduos de fucose substituídos utilizando uma enzima fucosidase apropriada. Em casos em que o péptido compreende uma estrutura nuclear elementar de trimanosilo após a remoção de resíduos de fucose, depois tudo isso é necessária a adição *in vitro* dos açúcares apropriados à estrutura nuclear de trimanosilo para produzir um péptido possuindo glicosilação desejada. Em casos em que o péptido pode conter apenas dois resíduos de manose na estrutura de glicano após remoção de quaisquer resíduos de fucose, um terceiro resíduo de manose pode ser adicionado utilizando uma enzima manosiltransferase e uma molécula dadora adequada tal como GDP-manose, e depois os resíduos apropriados são adicionados para produzir um péptido possuindo a glicosilação desejada. Opcionalmente, os glicanos mono-antena podem também ser produzidos a partir destas espécies.

O protocolos para a utilização de baculovírus para transformar células de insecto são bem conhecidos dos da técnica. Foram publicados vários livros que proporcionam os procedimentos para a utilização do sistema de baculovírus para expressar péptidos em células de insecto. Estes livros incluem, mas não estão limitados a, Richardson (Baculovirus Expression Protocols, 1998, Methods in Molecular Biology, Vol 39, Humana Pr), O'Reilly et al. (1994, Baculovirus Expression Vectors : A Laboratory Manual, Oxford Univ Press), e King e Possee (1992, The Baculovirus Expression System : A Laboratory Guide, Chapman & Hall). Adicionalmente, existem também publicações tal como Lucklow (1993, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:564-572) e Miller (1993, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:97-101).

Muitas patentes tiveram também a preocupação relacionada com os sistemas para expressão baculoviral de proteínas estranhas. Estas patentes incluem, mas não estão limitadas a, Patente U.S. N°. 6 210 966 (Meio de cultura para células de insecto sem glutamina e contendo sal de amónio), Patente U.S. N°. 6 090 584 (Utilização de BVACs (Cromossomas Artificiais de Baculovírus) para produzir péptidos recombinantes), Patente U.S. N°. 5 871 986 (Utilização de um baculovírus para expressar um ácido nucleico recombinante numa célula de mamífero), Patente U.S. N°. 5 759 809 (Métodos de expressão de péptidos em células de insecto e métodos de matar os insectos), Patente U.S. N°. 5 753 220 (Baculovírus deficiente para o gene de

protease de cisteína, processo para a sua produção, e processo para a produção económica de péptido utilizando o mesmo), Patente U.S. N°. 5 750 383 (Sistema de clonagem por baculovírus), Patente U.S. N°. 5 731 182 (DNA de vírus de não mamífero para expressar um ácido nucleico recombinante numa célula de mamífero), Patente U.S. N°. 5 728 580 (Métodos e meios de cultura para induzir a suspensão de células únicas em linhas de células de insectos), Patente U.S. N°. 5 583 023 (Baculovírus modificado, seu processo de preparação e sua aplicação como um vector de expressão de gene), Patente U.S. N°. 5 571 709 (Baculovírus modificado e vectores de expressão de baculovírus), Patente U.S. N°. 5 521 299 (Oligonucleótidos para a detecção de infecção por baculovírus), Patente U.S. N°. 5 516 657 (Vectores de baculovírus para a expressão de péptidos de secreção e ligados a membrana), Patente U.S. N°. 5 475 090 (Gene que codifica um péptido que melhora a infecção por vírus de insectos hospedeiros), Patente U.S. N°. 5 472 858 (Produção de péptidos recombinantes em larvas de insecto), Patente U.S. N°. 5 348 886 (Método de produção de vírus eucariota recombinante em bactérias), Patente U.S. N°. 5 322 774 (Sequência líder procariota em sistema de expressão recombinante em baculovírus), Patente U.S. N°. 5 278 050 (Método para melhorar a eficiência de processamento e secreção de genes recombinantes em sistemas de insectos), Patente U.S. N°. 5 244 805 (Vectores de expressão de baculovírus), Patente U.S. N°. 5 229 293 (Baculovírus recombinante), Patente U.S. N°. 5 194 376 (Sistema de expressão de baculovírus capaz de produção de péptidos

recombinantes em níveis elevados), Patente U.S. N°. 5 179 007 (Método e vector para a purificação de péptidos recombinantes), Patente U.S. N°. 5 169 784 (Vector de expressão de baculovírus com promotor duplo), Patente U.S. N°. 5 162 222 (Utilização de promotores precoces de baculovírus para a expressão de ácidos nucleicos recombinantes em células de insecto estavelmente transformadas ou baculovírus recombinantes), Patente U.S. N°. 5 155 037 (Sequências sinal de insecto úteis para melhorar a eficiência do processamento e secreção de ácidos nucleicos recombinantes em sistemas de insecto), Patente U.S. N°. 5 147 788 (Vectores de baculovírus e métodos de utilização), Patente U.S. N°. 5 110 729 (Método de produção de péptidos utilizando vectores de baculovírus em células em cultura), Patente U.S. N°. 5 077 214 (Utilização de promotores precoces de baculovírus para expressão de genes recombinantes em células de insecto estavelmente transformadas), Patente U.S. N°. 5 023 328 (Sequência sinal AKH de lepidópteros), e Patentes U.S. Nos. 4 879 236 e 4 745 051 (Método para produzir um vector de expressão recombinante de baculovírus). Todas as patentes acima mencionadas são incorporadas na sua totalidade por referência.

As linhas de células de insectos de várias diferentes origens de espécies são presentemente utilizadas para a expressão de péptidos, e estas linhas são bem conhecidas dos da técnica. As linhas de células de insectos de interesse incluem, mas não estão limitados a, células de insectos diptópteros e lepidópteros em geral, Sf9 e suas

variantes (lagarta do outono *Spodoptera frugiperda*), *Estigmene acrea*, *Trichoplusia ni*, *Bombyx mori*, *Malacosoma disstri*. As linhas de drosófila Kc1 e SL2 entre outras, e de mosquito.

E. Plantas

As células de plantas enquanto produtoras de péptidos apresentam um conjunto diferente de preocupações. Embora os glicanos ligados a N produzidos em plantas compreendam uma estrutura nuclear de trimanosilo, esta esqueleto pentassacárido pode compreender vários diferentes açúcares adicionais como apresentado na Figura 5. Por exemplo, numa circunstância, a estrutura nuclear de trimanosilo é substituída por um resíduo de xilose ligado em $\beta 1,2$ e um resíduo de fucose ligado em $\alpha 1,3$. Adicionalmente, as células de plantas podem também produzir uma estrutura Man5GlcNAc2. Os péptidos produzidos em células de plantas são frequentemente altamente antigénicos em resultado da presença do núcleo $\alpha 1,3$ de fucose e xilose na estrutura do glicano, e são rapidamente eliminados da corrente sanguínea quando introduzidas num mamífero devido à ausência de resíduos terminais de ácido siálico. Por isso, a menos que estes péptidos sejam remodelados utilizando os métodos aqui proporcionados, estes são geralmente considerados como sendo inadequados como agentes terapêuticos em mamíferos. Embora se tenha verificado que alguns anticorpos monoclonais expressos em células de plantas eram não imunogénicos no murganho, é provável que

as cadeias de glicano não sejam imunogénicas porque estas ficaram mergulhadas na região Fc nestes anticorpos (Chargelegue *et al.*, 2000, *Transgenic Res.* 9(3):187-194).

Seguindo as directivas aqui proporcionadas, é agora possível produzir um péptido produzido numa célula vegetal em que um número aumentado das estruturas de glicano nela presentes compreende uma estrutura nuclear de trimanosilo elementar, ou uma estrutura Man3GlcNAc4. Isto é realizado por remoção por clivagem de quaisquer açúcares adicionais *in vitro* utilizando uma combinação de glicosidases apropriada, incluindo fucosidases, até chegar à estrutura nuclear elementar de trimanosilo ou à estrutura Man3GlcNAc4. Estas reacções de clivagem devem também incluir a remoção de quaisquer resíduos de fucose ou xilose das estruturas de modo a diminuir a antigenicidade do péptido final quando introduzidas num mamífero. As células de plantas que possuem mutações que inibem a adição de resíduos de fucose e xilose à estrutura nuclear de trimanosilo são conhecidas na técnica (von Schaewen *et al.*, 1993, *Plant Physiology* 102:1109-1118). A utilização destas células para produzir péptidos possuindo glicanos com ausência de fucose e xilose está contemplada na invenção. Após a produção do núcleo elementar de trimanosilo ou da estrutura Man3GlcNAc4, os açúcares adicionais podem depois ser adicionados a estas para chegar a um péptido possuindo a glicosilação desejada e que é por isso adequado para utilização terapêutica num mamífero.

As plantas transgênicas são consideradas por muitos como sendo o sistema de expressão de eleição para péptidos farmacêuticos. Potencialmente, as plantas podem proporcionar uma fonte económica de péptidos recombinantes. Foi estimado que os custos de produção dos péptidos recombinantes em plantas podem ser entre 10 a 50 vezes inferior à produção do mesmo péptido em *E. coli*. Embora existam ligeiras diferenças na utilização de codões em plantas em comparação com os animais, estes podem ser compensados pelo ajuste das sequências de DNA recombinante (Ver, Kusnadi *et al.*, 1997, *Biotechnol. Bioeng.* 56:473-484; Khoudi *et al.*, 1999, *Biotechnol. Bioeng.* 135-143; Hood *et al.*, 1999, *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:127-147). Adicionalmente, a síntese, secreção e modificação pós-tradução do péptido são muito semelhantes em plantas e animais, com apenas diferenças menores na glicosilação em plantas (Ver, Fischer *et al.*, 2000, *J. Biol. Regul. Homest. Agents* 14: 83-92). Deste modo, os produtos de plantas transgênicas são também provavelmente menos contaminados com patogénicos animais, toxinas microbianas e sequências oncogénicas.

A expressão de péptidos recombinantes em células de plantas é bem conhecida na técnica. Adicionalmente às plantas transgênicas, os péptidos podem também ser produzidos em culturas de células vegetais transgênicas (Lee *et al.*, 1997, *Mol. Cell.* 7:783-787), e plantas não transgênicas inoculadas com vírus recombinante de plantas. Foram publicados vários livros que descrevem protocolos para a transformação genética de células de plantas:

Potrykus (1995, Gene transfer to plants, Springer, Nova Iorque), Nickoloff (1995, Plant cell electroporation and electrofusion protocols, Humana Press, Totowa, Nova Iorque) e Draper (1988, Plant genetic transformation, Oxford Press, Boston).

São presentemente utilizados vários métodos para transformar de forma estável células de plantas com material genético recombinante. Estes métodos incluem, mas não estão limitados a, transformação de *Agrobacterium* (Bechtold e Pelletier, 1998; Escudero e Hohn, 1997; Hansen e Chilton, 1999; Touraev et al., 1997), biolística (microprojecteis) (Finer et al., 1999; Hansen e Chilton, 1999; Shilito, 1999), electroporação de protoplastos (Fromm et al., 1985, Ou-Lee et al., 1986; Rhodes et al., 1988; Saunders et al., 1989; Trick et al., 1997), tratamento com polietilenoglicol (Shilito, 1999; Trick et al., 1997), em microinjecção de plantas (Leduc et al., 1996; Zhou et al., 1983), embebição de sementes (Trick et al., 1997), feixe laser (1996), e limalhas de carbeto de sílicio (Thompson et al., 1995; Pedido de Patente U.S. No. 20020100077, aqui incorporada por referência na sua totalidade).

Muitos géneros de plantas são condescendentes com a transformação e expressão de péptidos exógenos. As plantas de particular interesse para expressarem os péptidos a ser utilizados no método de remodelação da invenção incluem, mas não estão limitados a, *Arabidopsis thaliana*, colza (*Brassica* spp.; Ruiz e Blumwald, 2002,

Planta 214:965-969)), soja (*Glicina max*), girassol (*Helianthus unnuus*), óleo de palma (*Elaeis guineeis*), amendoim (amendoim, *Arachis hypogaea*; Deng et al., 2001, *Cell. Res.* 11:156-160), côco (*Cocus nucifera*), rícino (*Ricinus communis*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), mostarda (*Brassica* spp. e *Sinapis alba*), coentros, (*Coriandrum sativum*), abóbora (*Cucurbita maxima*; Spencer e Snow, 2001, *Heredity* 86(Pt 6):694-702), linhaça/linho (*Linum usitatissimum*; Lamblin et al., 2001, *Physiol Plant* 112: 223-232), castanha do Brazil (*Bertholletia excelsa*), jojoba (*Simmondsia chinensis*), milho (*Zea mays*; Hood et al., 1999, *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:127-147; Hood et al., 1997, *Mol. Breed.* 3:291-306; Petolino et al., 2000, *Transgenic Research* 9: 1-9), alfalfa (Khouidi et al., 1999, *Biotechnol. Bioeng.* 64:135-143), tabaco (*Nicotiana tabacum*; Wright et al., *Transgenic Res.* 10:177-181; Frigerio et al., 2000, *Plant Physiol.* 123:1483-1493; Cramer et al., 1996, *Ann. New York Acad. Sci.* 792:62-8-71; Cabanes-Macheteau et al., 1999, *Glycobiology* 9:365-372; Ruggiero et al., 2000, *FEBS Lett.* 469:132-136), canola (Bai et al., 2001, *Biotechnol. Prog.* 17:168-174; Zhang et al., 2000, *J. Anim. Sci.* 78:2868-2878)), batata (Tacket et al., 1998, *J. Infect. Dis.* 182:302-305; Richter et al., 2000, *Nat. Biotechnol.* 18:1167-1171; Chong et al., 2000, *Transgenic Res.* 9:71-78), alfalfa (Wigdorovitz et al., 1999, *Virology* 255:347-353), Ervilha (*Pisum sativum*; Perrin et al., 2000, *Mol. Breed.* 6:345-352), arroz (*Oryza sativa*; Stoger et al., 2000, *Plant Mol. Biol.* 42:583-590), algodão (*Gossypium hirsutum*; Korniyev et al., 2001, *Physiol Plant* 113:323-

331), cevada (*Hordeum vulgare*; Petersen et al., 2002, *Plant Mol Biol* 49: 45-58); trigo (*Triticum* spp.; Pellegrineschi et al., 2002, *Genome* 45:421-430) e feijão (*Vicia* spp.; Saalbach et al., 1994, *Mol Gen Genet* 242:226-236).

Se a expressão do ácido nucleico recombinante é desejada numa planta inteira em vez de em células em cultura, as células de plantas são primeiro transformadas com DNA que codifica o péptido, e depois a planta é regenerada. Isto envolve procedimentos de cultura de tecidos que são tipicamente otimizados para cada espécie de planta. Os protocolos para regenerar plantas são já bem conhecidos na técnica para muitas espécies. Para além disso, os protocolos para outras espécies podem ser desenvolvidos por um especialista na técnica utilizando experimentação de rotina. Estão disponíveis vários manuais de laboratório que descrevem os procedimentos para a reprodução de plantas, incluindo mas não limitados a, Smith (2000, *Plant tissue culture : techniques and experiments*, Academic Press, San Diego), Bhojwani e Razdan (1996, *Plant tissue culture : theory and practice*, Elsevier Science Pub., Amsterdam), Islam (1996, *Plant tissue culture*, Oxford & IBH Pub. Co., Nova Deli, Índia), Dodds and. Roberts (1995, *Experiments in plant tissue culture*, Nova Iorque : Cambridge University Press, Cambridge Inglaterra), Bhojwani (*Plant tissue culture : applications and limitations*, Elsevier, Amsterdam, 1990), Trigiano e Gray (2000, *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*, . CRC Press, Boca Raton, Fla), e Lindsey (1991, *Plant tissue*

culture manual : fundamentals and applications, Kluwer Academic, Boston).

Embora a purificação de péptido recombinantes a partir de plantas possa ser potencialmente dispendiosa, foram desenvolvidos vários sistemas para minimizar estes custos. Um método dirige o péptido sintetizado para o endosperma da semente de onde pode ser facilmente extraído (Wright *et al.*, 2001, *Transgenic Res.* 10:177-181, Guda *et al.*, 2000, *Vegetal Cell Res.* 19:257-262; e Patente U.S. N°. 5 767 379, que é aqui incorporada por referência na sua totalidade). Uma abordagem alternativa é a co-extracção do péptido recombinante com produtos convencionais de plantas tal como amido, meal ou óleo. Em óleo de semente de colza, um péptido de fusão de oleosina-hurudin quando expresso na planta, liga-se ao corpo oleoso da semente, e pode ser extraído a partir da semente da planta em simultâneo com o óleo (Parmenter, 1995, *Plant Mol. Biol.* 29:1167-1180; Patentes U.S. Nos. 5 650 554, 5 792 922, 5 948 682 e 6 288 304, e pedido US 2002/0037303, sendo todos aqui incorporados na sua totalidade por referência). Numa variação desta abordagem, a oleosina é fundida com um péptido possuindo afinidade para o péptido exógeno co-expresso de interesse (Patente U.S. No. 5 856 452, aqui incorporada por referência na sua totalidade).

A expressão dos péptidos recombinantes em plastídeos de plantas, tal como o cloroplasto, produz péptidos que não possuem estruturas de glicano ligados a

estes, semelhante à situação nos procariotas. Contudo, o rendimento destes péptidos é largamente superior quando expresso em nestes organelos de célula vegetal, e deste modo este tipo de sistema de expressão pode ter vantagens sobre outros sistemas. Para uma revisão geral da tecnologia de expressão de péptidos exógenos em plastídeos de plantas superiores, ver Hager e Beck (2000, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:302-310, e referências aí citadas). A expressão em plastídeos foi particularmente bem sucedida em tabaco (Ver, por exemplo, Staub *et al.*, 2000, *Nat. Biotechnol.* 18:333-338).

F. Animais transgénicos

A introdução de um DNA recombinante no ovo fertilizado de um animal (e.g., um mamífero) pode ser realizado utilizando qualquer das várias técnicas convencionais em tecnologias de animais transgénicos. Ver, e.g., Hogan *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986; e Pat. U.S. N°. 5 811 634, que é aqui incorporada por referência na sua totalidade. Mais normalmente, o DNA recombinante é introduzido no embrião através de microinjecção pró-nuclear (Gordon *et al.*, 1980, *PNAS* 77:7380-7384; Gordon e Ruddle, 1981, *Science* 214:1244-1246; Brinster *et al.*, 1981, *Cell* 27:223-231; Costantini e Lacy, 1981, *Nature* 294: 92-94). A microinjecção possui a vantagem de ser aplicável a uma vasta variedade de espécies. A embriões de pré-implantação podem também ser

transformados com retrovírus (Jaenisch e Mintz, 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:1250-1254; Jaenisch *et al.*, 1976, *Hamatol Bluttransfus.* 19:341-356; Stuhlmann *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:7151-7155). A transformação mediada por retrovírus tem a vantagem de adicionar cópias simples do ácido nucleico recombinante à célula, mas produz um elevado grau de mosaicismo. Mais recentemente, técnicas mediadas por células estaminais embrionárias - foram utilizadas (Gossler *et al.*, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:9065-9069), para transferir segmentos inteiros de cromossoma (Lavitrano *et al.*, 1989, *célula* 57:717-723), e transfecção de gâmetas em conjunção com fertilização *in vitro* (Lavitrano *et al.*, 1989, *Cell* 57:717-723) têm também sido utilizados. Vários livros de procedimentos de laboratório foram publicados revelando estas técnicas: Cid-Arregui e García-Carrancá (1998, *Microinjection and Transgenesis : Strategies and Protocols*, Springer, Berlin), Clarke (2002, *Transgenesis techniques : Principles and protocols*, Humana Press, Totowa, NJ), e Pinkert (1994, *Transgenic Animal Technology : A Laboratory Handbook*, Academic Press, San Diego).

Uma vez introduzido o DNA recombinante no ovo, o ovo é incubado durante um curto período de tempo e é depois transferido para um animal pseudográvido da mesma espécie de que o ovo foi obtido (Hogan *et al.*, *supra*). No caso dos mamíferos, são injectados tipicamente 125 ovos por experiência, aproximadamente dois terços dos quais sobreviverão ao procedimento. Vinte ovos viáveis são

transferidos para um mamífero pseudográvido, quatro a dez dos quais se desenvolverão em prole viva. Tipicamente, 10-30% da prole (no caso dos murganhos) contém o DNA recombinante.

Embora um animal inteiro pode ser utilizado como um sistema de expressão para os péptidos da invenção, numa forma de realização preferida, o péptido exógeno acumula-se em produtos do animal, a partir do qual pode ser recolhido sem prejuízo do animal. Em formas de realização preferidas, o péptido exógeno acumula no leite, ovos, cabelo, sangue, e urina.

Se o péptido recombinante é para ser acumulado no leite do animal, os mamíferos adequados são os ruminantes, ungulados, mamíferos domesticados, e animais leiteiros. Os animais particularmente preferidos são cabras, ovelhas, camelos, vacas, porcos, cavalos, gado, e lamas. Os métodos para produzir vacas transgênicas que acumulam um péptido recombinante no seu leite são bem conhecidos: ver, Newton (1999, *J. Immunol. Methods* 231:159-167), Ebert et al. (1991, *Biotechnology* 9: 835-838), e Patente U.S. Nos. 6 210 736, 5 849 992, 5 843 705, 5 827 690, 6 222 094, todas aqui incorporadas por referência na sua totalidade. A produção de mamíferos transgênicos que produzem um péptido recombinante desejado está comercialmente disponível em GTC Biotherapeutics, Framingham, MA.

Se o péptido recombinante é para ser acumulado em ovos, as aves adequadas incluem, mas não estão limitadas a, galinhas, gansos, e perus. Outros animais de interesse incluem, mas não estão limitados a, outras espécies de aves, peixes, répteis e anfíbios. A introdução de DNA recombinante numa galinha por transformação retroviral é bem conhecida na técnica: Thoraval *et al.* (1995, *Transgenic Research* 4:369-376), Bosselman *et al.*, (1989, *Science* 243: 533-535), Petropoulos *et al.* (1992, *J. Virol.* 66: 3391-3397), Patente U.S. N°. 5 162 215, aqui incorporada por referência na sua totalidade. Foi também conseguida a transformação bem sucedida de galinhas com DNA recombinante em que o DNA é introduzido nas células blastodérmicas e as células blastodérmicas assim transfectadas são introduzidas no embrião: Brazolot *et al.* (1991, *Mol. Reprod. Dev.* 30: 304-312), Fraser, *et al.* (1993, *Int. J. Dev. Biol.* 37: 381-385), e Petitte *et al.* (1990, *Development* 108: 185-189). A tecnologia de elevado processamento foi desenvolvida para avaliar se uma galinha transgénica expressa o péptido desejado (Harvey *et al.*, 2002, *Poult. Sci.* 81:202-212, Patente U.S. N°. 6 423 488, aqui incorporada por referência na sua totalidade). Utilizando transformação retroviral de galinhas com um DNA recombinante, foi acumulada beta-lactamase exógena na clara do ovo de galinha (Harvey *et al.*, 2002, *Nat. Biotechnol.* 20(4):396-399). A produção de galinhas que produzem péptidos exógenos no ovo está comercialmente disponível em AviGenics, Inc., Athens GA.

G. Bacteria

Os péptidos recombinantemente expressos produzidos em bactérias não são geralmente glicosilados. Contudo, sistemas bacterianos capazes de glicosilação de péptidos estão a tornar-se evidentes e por isso é provável que os péptidos recombinantes glicosilados possam ser produzidos em bactérias no futuro.

São conhecidos na técnica numerosos sistemas de expressão bacterianos. As espécies bacterianas preferidas incluem, mas não estão limitadas a, *E.coli*. e espécies de *Bacillus*. A expressão dos péptidos recombinantes em *E. coli* é bem conhecida na técnica. Os protocolos para os sistemas de expressão com base em *E. coli* são encontrados em Pedido U.S. No. 20020064835, Patentes U.S. Nos. 6 245 539, 5 606 031, 5 420 027, 5 151 511, e RE33 653, entre outros. Os métodos para transformar bactérias incluem, mas não estão limitados a; cloreto de cálcio (Cohen et al., 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:2110-2114; Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166:557-580; Mandel e Higa, 1970, *J. Mol. Biol.* 53:159-162) e electroporação (Shigekawa e Dower, 1988, *Biotechniques* 6:742-751), e os descritos em Sambrook et al., 2001 (*supra*). Para uma revisão dos protocolos laboratoriais na transformação microbiana e sistemas de expressão, ver Saunders e Saunders (1987, *Microbial Genetics Applied to Biotechnology: Principles and techniques of Gene Transfer and Manipulation*, Croom Helm, London), Pühler (1993, *Genetic Engineering of Micro-*

organisms, Weinheim, Nova Iorque), Lee *et al.*, (1999, Metabolic Engineering, Marcel Dekker, Nova Iorque), Adolph (1996, Microbial Genome Methods, CRC Press, Boca Raton), e Birren e Lai (1996, Nonmammalian Genomic Anamentesis: A Practical Guide, Academic Press, San Diego),

Para uma revisão geral na literatura para a expressão de péptidos em *E. coli* ver Balbas (2001, *Mol. Biotechnol.* 19: 251-267). Várias companhias oferecem agora estirpes bacterianas seleccionadas para a expressão de péptidos de mamífero, tais como as estirpes Rosetta™ de *E. coli* (Novagen, inc., Madison, WI; com expressão melhorada de codões eucariotas não normalmente utilizados em células bacterianas, e formação melhorada da ligação persulfureto).

H. Engenharia celular

Deve ser óbvio a partir da presente revelação que quanto mais uniforme for o material de partida produzido pela célula, mais eficiente será a produção *in vitro* de grandes quantidades de péptidos possuindo a glicosilação desejada. Deste modo, a engenharia genética das células hospedeiras para produzir péptidos uniformemente glicosilados como material de partida para as reacções enzimáticas *in vitro* aqui reveladas, proporciona uma vantagem significativa sobre a utilização de um péptido material de partida possuindo um conjunto heterogéneo de estruturas de glicano ligados a este. Um péptido material de partida preferido para a utilização na presente invenção

é um péptido possuindo primariamente moléculas de glicano que consistem unicamente de uma estrutura nuclear de trimanosilo elementar. Outro material de partida preferido é Man3GlcNAc4. Após o processo de remodelação, os péptidos preferidos darão origem à maior quantidade de péptidos possuindo a glicosilação desejada, e melhoram deste modo a eficácia clínica. Contudo, outros glicanos materiais de partida são também adequados para utilização nos métodos aqui descritos, em que por exemplo, os glicanos de manose elevada podem ser facilmente reduzidos, *in vitro*, para as estruturas elementares do núcleo de trimanosilo utilizando uma série de manosidases. Como aqui descrito noutra secção, outros glicanos materiais de partida podem também ser utilizados, desde que seja possível clivar todas as unidades de açúcar extras de modo a que a estrutura nuclear elementar de trimanosilo ou Man3GlcNAc4 seja produzida. Deste modo, o propósito de utilização de células geneticamente modificadas para a produção do péptidos da presente invenção é produzir péptidos possuindo tão uniforme quanto possível a estrutura de glicano ligada a estes, em que a estrutura de glicano pode ser remodelada *in vitro* para produzir um péptido possuindo a glicosilação desejada. Isto resultará numa dramática redução nos custos de produção destes péptidos. Uma vez que os glicopéptidos produzidos utilizando esta metodologia terão predominantemente a mesma estrutura de glicano ligado em N, o protocolo de modificação pós-produção pode ser convencionalizado e optimizado para produzir uma maior consistência de lote para lote do produto final. Como um resultado, os

produtos finais de cadeia completa podem ser menos heterogéneos do que os presentemente disponíveis. Os produtos terão uma semi-vida biológica e bioactividade melhoradas em comparação com os produtos da técnica anterior. Alternativamente, se desejado, a invenção pode ser utilizada para introduzir heterogeneidade limitada e específica, *e.g.*, seleccionando condições de reacção que resultam na adição diferencial de unidades de açúcar.

Preferencialmente, embora não como um requisito rígido, a célula geneticamente modificada é uma que produz péptidos possuindo estruturas de glicano que compreendem primariamente uma estrutura nuclear elementar de trimanosilo ou Man3GlcNAc4. Num mínimo, a proporção destas estruturas preferidas produzidas pela célula geneticamente modificada devem ser suficientes para produzir um péptido possuindo glicosilação desejada após o protocolo de remodelação.

Em geral, qualquer tipo de célula eucariota pode ser modificada para se tornar uma célula hospedeira da presente invenção. Primeiro, o padrão de glicosilação dos glicopéptidos endógenos e recombinantes produzidos pelo organismo é determinado de modo a identificar adições/deleções adequadas de actividades enzimáticas que resultam na produção de glicopéptidos com núcleo elementar de trimanosilo ou glicopéptidos Man3GlcNAc4. Isto implica tipicamente a deleção de actividades que utilizam os trimanosilglicopéptidos como substratos para uma reacção de

glicosiltransferase e inserem actividades enzimáticas que degradam glicanos mais complexos ligados a N para produzir cadeias mais curtas. Adicionalmente, as células geneticamente modificadas podem produzir glicanos com manose elevada, que podem ser clivadas por manosidase para produzir as estruturas de glicano desejadas iniciais. A manosidase pode ser activa *in vivo* na célula (*i.e.*, a célula pode ser modificada geneticamente para os produzir), ou estes podem ser utilizados em reacções pós-produção *in vitro*.

As técnicas para modificar geneticamente células hospedeiras para alterar o perfil de glicosilação dos péptidos expressos são bem conhecidos. Ver, *e.g.*, Altmann *et al.* (1999, *Glycoconjugate J.* 16: 109-123), Ailor *et al.* (2000, *Glycobiology* 10(8): 837-847), Jarvis *et al.*, (*In vitro* Conference, March, 1999, resumo), Hollister e Jarvis, (2001, *Glycobiology* 11(1): 1-9), e Palacpac *et al.*, (1999, *PNAS USA* 96: 4697), Jarvis *et al.*, (1998. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:528-533), Gemgross (Publicação de Patente U.S. N° 20020137134), todos revelando técnicas para "mamiferizar" sistemas de expressão de células de insecto ou vegetais por transfecção de células de insecto ou plantas com genes de glicosiltransferase.

Existem também técnicas para alterar geneticamente o perfil de glicosilação de péptidos expressos em *E. coli*. A *E. coli* foi manipulada com várias glicosiltransferases da bactéria *Neisseria meningitidis* e *Azorhizobium* para produzir oligossacáridos *in vivo* (Bettler *et al.*,

1999, *Glycoconj. J.* 16:205-212). A *E. coli* que foi geneticamente modificada para sobre-expressar o gene IgtA da β 1,3 N acetilglucosaminiltransferase de *Neisseria meningitidis* glicosila eficientemente lactoses exógenas (Priem *et al.*, 2002, *Glycobiology* 12:235-240).

As células de fungos foram também geneticamente modificadas para produzir glicosiltransferases exógenas (Yoshida *et al.*, 1999, *Glycobiology*, 9(1):53-58; Kalsner *et al.*, 1995, *Glycoconj. J.* 12:360-370; Schwientek e Ernst, 1994, *Gene* 145 (2):299-303; Chiba *et al.*, 1995, *Biochem J.* 308:405-409).

Deste modo, num aspecto, a presente invenção proporciona uma célula que glicosila uma população de glicopéptidos de modo que a proporção de glicopéptidos produzidos possui deste modo um núcleo elementar de trimanosilo ou uma estrutura Man3GlcNAc4. Preferencialmente, a célula produz um péptido possuindo uma estrutura de glicano compreendendo unicamente um núcleo elementar de trimanosilo. Num mínimo, a proporção de péptidos possuindo um núcleo elementar de trimanosilo ou uma estrutura Man3GlcNAc4 é suficiente para produzir péptidos possuindo a glicosilação desejada após os processos de remodelação. A célula incorporou uma ou mais unidades de expressão de ácido nucleico heterólogo, cada uma podendo compreender uma ou mais sequências de ácido nucleico que codifica um ou mais péptidos de interesse. A forma natural do glicopéptido de interesse pode compreender um ou mais glicanos complexos

ligados a N ou pode simplesmente ser um glicano com manose elevada.

A célula pode ser qualquer tipo de célula e é preferencialmente uma célula eucariota. A célula pode ser uma célula de mamífero tal como humano, murganho, rato, coelho, hamster ou outros tipos de células de mamífero. Quando a célula é uma célula de mamífero, a célula de mamífero pode ser derivada de ou contida num mamífero transgénico não humano em que a célula no mamífero codifica o glicopéptido desejado e uma variedade de enzimas de glicosilação e glicosidases conforme necessário para a produção de moléculas de glicopéptido desejadas. Adicionalmente, a célula pode ser uma célula fúngica, preferencialmente, uma célula de levedura, ou a célula pode ser de um insecto ou uma célula de planta. De um modo semelhante, quando a célula é uma célula de planta, a célula vegetal pode ser derivada de ou contida numa planta transgénica, em que a planta codifica o glicopéptido desejado e uma variedade de enzimas de glicosilação e glicosidases conforme são necessárias para a produção de moléculas do glicopéptido desejado.

Em algumas formas de realização a célula hospedeira pode ser uma célula eucariota que expressa uma ou mais enzimas glicosiltransferases heterólogas e/ou uma ou mais enzimas glicosidase heterólogas, em que a expressão de um glicopéptido recombinante na célula hospedeira resulta na produção de um glicopéptido recombinante possuindo um

núcleo elementar de trimanosilo como a estrutura primária de glicano ligados a esta.

Em algumas formas de realização a enzima glicosiltransferase heteróloga útil na célula pode ser seleccionada a partir de um grupo que consiste em qualquer enzima glicosiltransferase conhecida incluída, por exemplo, na lista de Glicosyltransferase Families disponível em Taniguchi *et al.* (2002, Handbook of Glicosyltransferases and Related Genes, Springer, Nova Iorque).

Em outras formas de realização, a enzima glicosilase heteróloga pode ser seleccionada a partir de um grupo que consiste em manosidase 1, manosidase 2, manosidase 3, e outras manosidases, incluindo, mas não limitados a, manosidases microbianas. É aqui proporcionada revelação adicional respeitante a enzimas úteis na presente invenção.

Ainda em outras formas de realização, a célula hospedeira pode ser uma célula eucariota em que uma ou mais enzimas glicosiltransferase endógenas e/ou uma ou mais enzimas glicosidase endógenas foram inactivadas de modo a que a expressão de um glicopéptido recombinante na célula hospedeira resulta na produção de um glicopéptido recombinante possuindo um núcleo elementar de trimanosilo como a estrutura primária de glicano ligados a esta.

Em formas de realização adicionais, a célula

hospedeira pode expressar enzimas glicosiltransferase heterológicas e/ou enzimas glicosidase enquanto ao mesmo tempo, uma ou mais enzimas glicosiltransferase endógenas e/ou enzimas glicosidase são inactivadas. As enzimas glicosiltransferase e/ou enzimas glicosidase endógenas podem ser inactivadas utilizando qualquer técnica conhecida dos especialistas na técnica incluindo, mas não limitados a, técnicas antisentido e técnicas envolvendo a inserção de ácidos nucleicos no genoma da célula hospedeira. Em algumas formas de realização, as enzimas endógenas podem ser seleccionadas a partir de um grupo que consiste em GnT-I, uma selecção de manosidases, xilosiltransferase, núcleo $\alpha 1,3$ fucosiltransferase, serina/treonina O-manosiltransferases, e semelhantes.

Alternativamente pode ser explorado um sistema de expressão que naturalmente glicosila péptidos de modo a que os glicanos ligados a N sejam predominantemente o núcleo do tipo trimanosilo, ou do tipo Man3GlcNAc4. Um exemplo de um tipo de célula que produz o núcleo de trimanosilo são as células Sf9. Outros destes sistemas de expressão podem ser identificados por análise de glicopéptidos que são naturalmente ou recombinantemente expressos em células e seleccionando os que exibem as características de glicosilação desejada. A invenção deve ser entendida como incluindo qualquer e todas estas células para a produção de péptidos da presente invenção.

V. Purificação de péptidos remodelados com glicano e/ou glicoconjugados

Se a glicoproteína modificada é produzida intracelularmente ou secretada, como um primeiro passo, o sedimento particulado, células hospedeiras, fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração; opcionalmente, a proteína pode ser concentrada com um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, seguido por separação da variante de péptido de outras impurezas através de um ou mais passos seleccionados a partir de cromatografia de imunoafinidade, fraccionamento por coluna de troca iónica (e.g., em dietilaminoetilo (DEAE) ou matrizes contendo grupos carboximetilo ou sulfopropilo), cromatografia em Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, lentillectina-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Ether Toyopearl, Butil Toyopearl, Fenil Toyopearl, ou proteína A Sepharose, cromatografia SDS-PAGE, cromatografia em sílica, cromatofocagem, HPLC de fase reversa (RP-HPLC), filtração em gel utilizando, e.g., peneira molecular Sephadex ou cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia em colunas que ligam selectivamente o péptido, e precipitação com etanol, pH ou sulfato de amónio, filtração por membrana e várias técnicas.

Os péptidos modificados produzidos em cultura são normalmente isolados por extracção inicial a partir das células, enzimas, etc., seguido por um ou mais passos de

concentração, precipitação com sal, cromatografia aquosa de troca iónica, ou exclusão por tamanho. Adicionalmente, a glicoproteína modificada pode ser purificada por cromatografia por afinidade. Depois, pode ser empregue HPLC nos passos finais de purificação.

Um inibidor de protease, *e.g.*, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) pode ser incluído em qualquer dos passos anteriores para inibir a proteólise e os antibióticos podem ser incluídos para evitar o crescimento de contaminantes adventícios.

Noutra forma de realização, os sobrenadantes dos sistemas que produzem o péptido modificado da invenção são primeiro concentrados utilizando um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon após o passo de concentração, o concentrado pode ser aplicado a matrizes de purificação adequadas. Por exemplo, uma matriz de afinidade adequada pode compreender um ligando para o péptido, uma lectina ou molécula de anticorpo ligados a um suporte adequado. Alternativamente, pode ser empregue uma resina de troca aniónica, por exemplo, uma matriz ou substrato possuindo grupos DEAE pendentes. As matrizes adequadas incluem acrilamida, agarose, dextrano, celulose, ou outros tipos normalmente empregues em purificação de proteínas. Alternativamente, pode ser empregue um passo de troca catiónica. Os trocadores catiónicos adequados incluem várias matrizes insolúveis compreendendo grupos sulfo-

propilo ou carboximetilo. Os grupos sulfopropilo são particularmente preferidos.

Então, um ou mais passos de RP-HPLC empregando meios de RP-HPLC hidrofóbicos, e.g., sílica gel possuindo pendentes metilo ou outros grupos alifáticos, podem ser empregues para depois purificar uma composição de variante de péptido. Alguns ou todos os passos anteriores de purificação, em várias combinações, podem também ser empregues para proporcionar uma glicoproteína homogénea modificada.

O péptido modificado da invenção resultante de uma fermentação em larga escala pode ser purificado por métodos análogos aos revelados por Urdal *et al.*, *J. Chromatog.* 296: 171 (1984). Esta referência descreve dois passos sequenciais de RP-HPLC para a purificação de IL-2 humano recombinante numa coluna de HPLC preparativa. Alternativamente, as técnicas tal como a cromatografia de afinidade podem ser utilizadas para purificar a glicoproteína modificada.

VI. Péptidos preferidos e Ácidos Nucleicos Que Codificam Péptidos Preferidos

A presente invenção inclui ácidos nucleicos isolados que codificam vários péptidos e proteínas, e moléculas semelhantes ou fragmentos destes. A invenção não deve ser entendida como sendo limitada de qualquer forma unicamente para a utilização destes péptidos nos métodos da

invenção, mas deve, em vez disso, ser entendida como incluindo em qualquer e todos os péptidos presentemente disponíveis ou que se tornarem disponíveis para os da art. Adicionalmente, a invenção não deve ser entendida como incluindo apenas uma particular sequência de ácido nucleico ou de aminoácidos para os péptidos aqui listados, mas deve, em vez disso, ser entendida como incluindo qualquer e todas as variantes, homólogos, mutantes, etc. de cada um dos péptidos. Deve ser notado que quando um péptido particular é identificado como possuindo uma mutação ou outra alteração na sequência para esse péptido, a numeração dos aminoácidos que identificam a alteração ou mutação é estabelecida de modo que o primeiro aminoácido na sequência peptídica madura é o aminoácido nº 1, a menos que especificado o contrário.

Os péptidos preferidos incluem, mas não estão limitados a factor de estimulação de colónias de granulócitos humanos (G-CSF), interferão alfa humano (IFN-alfa), interferão beta humano (IFN-beta), Factor VII humano (Factor VII), Factor IX humano (Factor IX), hormona estimuladora do folículo humano (FSH), eritropoietina humana (EPO), factor estimulador de colónias de granulócitos/macrófagos humano (GM-CSF), interferão gama humano (IFN-gama), inibidor de alfa-1-protease humano (também conhecido como alfa-1-antitripsina ou inibidor de alfa-1-tripsina; A-1-PI), glucocerebrosidase, activador do tipo de tecido humano (TPA), interleuquina-2 humana (IL-2), Factor VIII humano (Factor VIII), um receptor de factor de

necrose de tumor de 75 kDa em fusão com uma porção Fc de imunoglobulina IgG humana, comercialmente conhecido como ENBREL™ ou ETANERCEPT™ (TNFR quimérico), uroquinase humana (uroquinase), um fragmento Fab do anticorpo monoclonal quimérico humano/murganho que se liga especificamente à glicoproteína IIb/IIIa e o receptor de vitronectina alfa v beta3, conhecido comercialmente como REOPRO™ ou ABCEXIMAB (anti-glicoproteína IIb/IIIa quimérica), um anticorpo monoclonal quimérico murganho/humano que se liga especificamente a HER2 humano, conhecido comercialmente como HERCEPTIN™ (anti-HER2quimérico), um anticorpo quimérico humano/murganho que se liga especificamente ao sítio antigénico A ou a proteína F do vírus sincicial respiratório comercialmente conhecido como SYNAGIS™ ou PALIVIZUMAB (anti-RSV quimérico), um anticorpo monoclonal quimérico humano/murganho que se liga especificamente a CD20 em células B humanas, conhecido comercialmente como RITUXAN™ ou RITUXAMAB (anti-CD20quimérico), DNase humana recombinante (DNase), um anticorpo monoclonal quimérico humano/murganho que se liga especificamente ao factor de necrose de tumor humano, conhecido comercialmente como REMICADE™ ou INFLIXIMAB (anti-TNF quimérico), insulina humana, o antigénio de superfície de um vírus da hepatite B (subtipo adw; HBsAg), e hormona do crescimento humano (HGH), alpha-galactosidase A (Fabryzyme™), α -Iduronidase (Aldurazyme™), antitrombina (antitrombina III, AT-III), gonadotropina coriónica humana (hCG), interferão omega, e semelhantes.

O ácido nucleico isolado da invenção deve ser entendido como incluindo uma sequência de RNA ou de DNA que codifica qualquer dos péptidos da invenção identificados acima, e quaisquer formas modificadas destes, incluindo modificações químicas do DNA ou RNA que tornam a sequência de nucleótidos mais estável quando está sem células ou quando está associado com uma célula. Como um exemplo não limitante, os oligonucleótidos que contêm pelo menos uma modificação fosforotioato são conhecidos por conferir com o oligonucleótido resistência melhorada a nucleases. Os exemplos específicos de oligonucleótidos modificados incluem os que contêm fosforotioato, fosfotriéster, metilfosfonato, ligações interaçúcar de cadeia curta de alquilo ou cicloalquilo, ou ligações interaçúcar de cadeia curta heteroatómicas ou heterocíclicas ("esqueleto"). Adicionalmente, podem também ser utilizados os oligonucleótidos possuindo estruturas de esqueleto morfolino (Patente U.S. Nº: 5 034 506) ou estruturas de esqueleto de poliamida (Nielsen *et al.*, 1991, *Science* 254: 1497).

As modificações químicas dos nucleótidos podem também ser utilizadas para melhorar a eficiência com que uma sequência de nucleótidos é adquirida por uma célula ou a eficiência com que é expressa numa célula. Qualquer e todas as combinações de modificações das sequências de nucleótidos estão contempladas na presente invenção.

A presente invenção não deve ser entendida como sendo limitante unicamente para as sequências nucleicas e

de aminoácidos aqui reveladas. Como descrito aqui em maior detalhe, uma vez detendo a presente invenção, é rapidamente óbvio para um especialista na técnica, que outros ácidos nucleicos que codificam os péptidos da presente invenção podem ser obtidos pelos procedimentos aqui descritos que se seguem (e.g., mutagénese dirigida ao sítio, mutações de deslocação de grelha, e semelhantes), e procedimentos que são bem conhecidas na técnica.

São também incluídos ácidos nucleicos isolados que codificam fragmentos de péptidos, em que os fragmentos de péptido retêm a desejada actividade biológica do péptido. Adicionalmente, embora os ácidos nucleicos exemplificativos que codificam péptidos preferidos são aqui revelados em relação às SEQ ID NOS específicas, a invenção não deve ser entendida como sendo limitante para qualquer ácido nucleico específico aqui revelado. Em vez disso, a invenção deve ser entendida como incluindo qualquer e todas as moléculas de ácido nucleico possuindo uma percentagem de identidade suficiente com as sequências aqui reveladas de modo a que estes ácidos nucleicos também codificam um péptido possuindo a desejada actividade biológica aqui revelada. São também contemplados ácidos nucleicos isolados que são mais curtos do que o comprimento total dos ácidos nucleicos, em que a actividade biológica do péptido por eles codificada é retida. Os métodos para determinar a percentagem de identidade entre um ácido nucleico e outro são aqui revelados como ensaios para a determinação da actividade biológica de qualquer péptido específico preferido.

Também como aqui revelado, quaisquer outros procedimentos podem ser utilizados para a produção de formas derivadas, mutantes, ou variantes dos péptidos da presente invenção utilizando metodologia do DNA recombinante bem conhecido na técnica tal como, por exemplo, a descrita em Sambrook *et al.* (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) e Ausubel *et al.* (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green & Wiley, New York). Os procedimentos para a introdução das alterações de aminoácidos num péptido ou polipéptido por alteração da sequência de DNA que codifica o péptido são bem conhecidos na técnica e são também descritos em Sambrook *et al.* (1989, *supra*); Ausubel *et al.* (1997, *supra*).

Também é aqui revelado um ácido nucleico que codifica um G-CSF, IFN-alfa, IFN-beta, Factor VII, Factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN-gama, A-1-PI, glucocerebrosidase, TPA, IL-2, Factor VIII, TNFR quimérico, uroquinase, anti-glicoproteína IIb/IIIa quimérico, anti-HER2 quimérico, anti-RSV quimérico, anti-CD20 quimérico, DNase, anti-TNF quimérico, insulina humana, HBsAg, e HGH, em que um ácido nucleico que codifica um péptido marcado é covalentemente ligado a este. Ou seja, a invenção inclui um ácido nucleico quimérico em que a sequência do ácido nucleico que codifica um péptido marcado é ligada covalentemente ao ácido nucleico que codifica um péptido da presente invenção. Estes péptidos marcados são bem conhecidos na técnica e

incluem, por exemplo, proteína verde fluorescente (GFP), myc, myc-cinase do piruvato (myc-PK), His6, proteína de ligação a maltose (MBP), polipéptido marcado com uma hemaglutinina do vírus influenza, um polipéptido marcado flag (FLAG), e um polipéptido marcado de glutathione-S-transferase (GST). Contudo, a invenção não deve ser de alguma forma entendida como limitada aos ácidos nucleicos que codificam os péptidos marcados listados acima. Em vez disso, qualquer sequência de ácido nucleico que codifica um péptido que podem funcionar de uma forma substancialmente semelhante a estes péptidos marcados devem ser entendidos como incluídos na presente invenção.

O ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico que codifica um péptido marcado pode ser utilizado para localizar um péptido da presente invenção numa célula, um tecido, e/ou um organismo completo (e.g., um embrião de mamífero), detectar um péptido da presente invenção secretado a partir de uma célula, e para estudar o papel do péptido numa célula. Ainda, a adição de um péptido com marca facilita o isolamento e a purificação do péptido "marcado" de modo que os péptidos da invenção podem ser produzidos e purificados rapidamente.

A invenção inclui os seguintes péptidos isolados preferidos: G-CSF, IFN-alfa, IFN-beta, Factor VIII, Factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN-gama, A-1-PI, glucocerebrosidase, TPA, IL-2, Factor VIII, TNFR quimérica, uroquinase, anti-glicoproteína IIb/IIIa quimérica, anti-HER2 quimérica,

anti-RSV quimérica, anti-CD20 quimérica, DNase, anti-TNF quimérica, insulina humana, HBsAg, HGH, alfa-galactosidase A, α -Iduronidase, anti-trombina III, hCG, e interferão ômega, e semelhantes.

A presente invenção deve também ser considerada como incluindo "derivados," "mutantes", e "variantes" dos péptidos da invenção (ou do DNA que codifica o mesmo), derivados, mutantes, e variantes que são péptidos que estão alterados em um ou mais aminoácidos (ou, quando se refere a sequência de nucleótidos que codifica o mesmo, estão alterados em um ou mais pares de bases) de modo que o péptido resultante (ou DNA) não é idêntico às sequências aqui recitadas, mas tem a mesma propriedade biológica dos péptidos aqui revelados, em que o péptido possui propriedades biológicas/bioquímicas de G-CSF, IFN-alfa, IFN-beta, Factor VII, Factor IX, FSH, EPO, GM-CSF, IFN-gama, A-1-PI, glucocerebrosidase, TPA, IL-2, Factor VIII, TNFR quimérico, uroquinase, anti-glicoproteína IIb/IIIa quimérica, anti-HER2 quimérica, anti-RSV quimérica, anti-CD20 quimérica; DNase, anti-TNF quimérica, insulina humana, HBsAg, e HGH.

São ainda incluídos fragmentos de péptidos que retêm a desejada actividade biológica do péptido independente do comprimento do péptido. Está no âmbito de especialidade do técnico o isolamento de formas mais pequenas do que o comprimento total de qualquer dos péptidos úteis na invenção, e determinar, utilizando os

ensaios aqui proporcionados, que fragmentos isolados retêm uma actividade biológica desejada e são por isso péptidos úteis na invenção.

Uma propriedade biológica de uma proteína da presente invenção deve ser entendida como incluindo, mas não deve ser limitada por incluir a capacidade do péptido funcionar no ensaio biológico e ambientes aqui descritos, tal como redução de inflamação, estimulação de uma resposta imunitária, coagulação sanguínea, aumento da produção hematopoiética, inibição de protease, modulação do sistema imunitário, ligação a antigénio, crescimento, alívio do tratamento de uma doença, clivagem de DNA, e semelhantes.

A. G-CSF

A presente invenção inclui um método para a modificação da estrutura de glicano no G-CSF. O G-CSF é bem conhecido na técnica como uma citocina produzida por células T activada, macrófagos, células endoteliais, e fibroblastos estromáticos. O G-CSF actua primariamente na medula óssea para aumentar a produção de leucócitos inflamatórios, e funciona ainda como uma hormona endócrina para iniciar o reabastecimento de neutrófilos consumidos durante funções inflamatórias. O G-CSF também possui aplicações clínicas na substituição de medula óssea a seguir a quimioterapia.

Um péptido G-CSF remodelado pode ser administrado

a um doente seleccionado a partir do grupo que consiste de um doente com cancro não mielóide que recebe quimioterapia mielossupressora, um doente possuindo Leucemia Mielóide Aguda (AML) que recebe quimioterapia de indução ou de consolidação, um cancro não mielóide doente que recebe um transplante de medula óssea, um doente que sofre recolha de células progenitoras do sangue periférico, um doente possuindo neutropenia crónica grave, e um doente possuindo neutropenia persistente e também possuindo infecção avançada de HIV. Preferencialmente, o doente é um doente humano.

Enquanto G-CSF foi apresentado como sendo um composto importante e útil para aplicações terapêuticas em mamíferos, especialmente humanos, os presentes métodos para a produção de G-CSF a partir de células recombinantes resulta num produto possuindo uma vida biológica relativamente curta, um padrão de glicosilação impreciso que pode potencialmente levar a imunogenicidade, perda de função, e uma necessidade crescente para doses maiores e mais frequentes de modo a conseguir o mesmo efeito, e semelhantes.

O G-CSF foi isolado e clonado, as suas sequências de ácido nucleico e de aminoácidos são apresentadas como SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2, respectivamente (Figura 58A e 58B, respectivamente). A presente invenção inclui um método para modificar G-CSF, particularmente porque se refere à capacidade de G-CSF funcionar como uma molécula biológica

potente e funcional. O técnico especialista, quando equipado com a presente revelação e os seus ensinamentos, compreenderá rapidamente que a presente invenção proporciona composições e métodos para a modificação de G-CSF.

A presente invenção inclui ainda variantes de G-CSF, como bem conhecido na técnica. Como um exemplo, mas de nenhuma forma limitante da presente invenção, é descrita uma variante G-CSF foi descrita na Patente U.S. Nº. 6 166 183, em que a G-CSF compreendendo o complemento natural de resíduos de lisina e ainda ligado a uma ou duas moléculas de polietilenoglicol. Adicionalmente, as Patentes U.S. Nos. 6 004 548, 5 580 755, 5 582 823, e 5 676 941 descrevem uma variante G-CSF em que um ou mais dos resíduos de cisteína na posição 17, 36, 42, 64, e 74 são substituídos por alanina ou alternativamente serina. A Patente U.S. Nº. 5 416 195 descreve uma molécula G-CSF em que a cisteína na posição 17, o ácido aspártico na posição 27, e as serinas nas posições 65 e 66 são substituídos por serina, serina, prolina, e prolina, respectivamente. Outras variantes são bem conhecidas na técnica, e são descritas em, por exemplo, Patente U.S. Nº. 5 399 345.

A expressão e actividade de uma molécula de G-CSF modificado da presente invenção podem ser ensaiadas utilizando métodos bem conhecidos na técnica, e como descrito em, por exemplo, Patente U.S. Nº. 4 810 643. Como um exemplo, a actividade pode ser medida utilizando ensaios

de incorporação de timidina marcada radioativamente. Resumidamente, medula óssea humana de dadores saudáveis é sujeita a uma separação por densidade com Ficoll-Hypaque (1,077 g/mL, Pharmacia, Piscataway, NJ) e as células de baixa densidade são ressuspensas em meio Iscove (GIBCO, La Jolla, CA) contendo 10% de soro fetal de bovino, glutamina e antibióticos. Cerca de 2×10^4 células de medula óssea humana são incubadas com o meio de controlo ou com o G-CSF ou a presente invenção em placas de fundo plano de 96 poços a cerca de 37 °C em 5% de CO₂ em ar durante cerca de 2 dias. As culturas são depois pulsadas durante cerca de 4 horas com 0,5 µCi/poço de ³H-timidina (New England Nuclear, Boston, Mass.) e a incorporação é medida como descrito em, por exemplo, Ventua, et al. (1983, *Blood* 61:781). Um aumento na incorporação de ³H-timidina nas células da medula óssea humana em comparação com as células da medula óssea tratada com um composto de controlo é uma indicação de um composto G-CSF activo e viável.

VII. Composições Farmacêuticas

Noutro aspecto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica. A composição farmacêutica inclui um diluente farmacêuticamente aceitável e um conjugado covalente entre um polímero que não ocorre naturalmente, solúvel em água, unidade terapêutica ou biomolécula e um péptido glicosilado ou não glicosilado. O polímero, unidade terapêutica ou biomolécula é conjugado com o péptido através de um grupo de ligação a glicosilo intacto

interposto entre e covalentemente ligado ao péptido e ao polímero, unidade terapêutica ou biomolécula.

As composições farmacêuticas da invenção são adequadas para utilização numa variedade de sistemas de distribuição de fármaco. As formulações adequadas para utilização na presente invenção são encontradas em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17^a ed. (1985). Para uma breve revisão de métodos para distribuição de fármacos, ver, Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990).

As composições farmacêuticas podem ser formuladas para qualquer maneira apropriada de administração, incluindo por exemplo, administração tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraniana, intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular. Para administração parentérica, tal como injeção subcutânea, o veículo compreende preferencialmente água, solução fisiológica salina, álcool, uma gordura, uma cera ou um tampão. Para administração oral, qualquer dos veículos acima ou um veículo sólido, tal como manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glucose, sacarose, e carbonato de magnésio, podem ser empregues. Podem também ser empregues microesferas biodegradáveis (e.g., poliglicolato de polilactato) como veículos para as composições farmacêuticas desta invenção. As microesferas biodegradáveis adequadas são reveladas, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 4 897 268 e 5 075 109.

Normalmente, as composições farmacêuticas são administradas parentericamente, e.g., intravenosamente. Deste modo, a invenção proporciona composições para administração parentérica que compreende o composto dissolvido ou suspenso num veículo aceitável, preferencialmente um veículo aquoso, e.g., água, água tamponada, solução fisiológica salina, PBS e semelhantes. As composições podem conter substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis como necessário para aproximar de condições fisiológicas, tal como agentes de ajuste de pH e tamponação, agentes de ajuste de tonicidade, agentes de humedecimento, detergentes e semelhantes.

Estas composições podem ser esterilizadas por técnicas convencionais de esterilização, ou podem ser esterilizadas por filtração. As soluções aquosas resultantes podem ser empacotadas para utilização como tal, ou liofilizadas, sendo a preparação liofilizada combinada com um veículo aquoso estéril antes da administração. O pH das preparações estará tipicamente entre 3 e 11, mais preferencialmente de 5 a 9 e mais preferencialmente de 7 e 8.

Em algumas formas de realização os péptidos da invenção podem ser incorporados em lipossomas formados a partir de lípidos formadores de vesículas convencionais. A variedade de métodos que estão disponíveis para a preparação de lipossomas, como descrito no, e.g., Szoka *et al.*, *Arm. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467 (1980), Pat. U.S.

Nºs. 4 235 871, 4 501 728 e 4 837 028. O direccionamento de lipossomas utilizando uma variedade de agentes de direccionamento (e.g., os sialilgalactósidos da invenção) é bem conhecido na técnica (Ver, e.g., Patente U.S. Nos. 4 957 773 e 4 603 044).

Podem ser utilizados os métodos convencionais para acoplar os agentes de direccionamento para os lipossomas. Estes métodos envolvem geralmente a incorporação em lipossomas de componentes lipídicos, tal como fosfatidiletanolamina, que podem ser activados para ligação dos agentes de direccionamento, ou compostos lipofílicos derivados, tal como os péptidos derivados de lípidos da invenção.

Os mecanismos de direccionamento requerem geralmente que os agentes de direccionamento estejam posicionados à superfície do lipossoma de uma maneira tal que as unidades alvo estejam disponíveis para interacção com o alvo, por exemplo, um receptor da superfície celular. Os hidratos de carbono da invenção podem ser ligados a uma molécula lipídica antes do lipossoma ser formado utilizando métodos conhecidos dos especialistas na técnica (e.g., alquilação ou acilação de um grupo hidroxilo presente no hidrato de carbono com um haleto de alquilo de cadeia longa ou com um ácido gordo, respectivamente). Alternativamente, o lipossoma pode ser modelado de modo a que uma porção conectora é primeiro incorporada na membrana na altura da formação da membrana. A porção conectora deve ter uma porção lipofílica, que é firmemente embebida e ancorada na

membrana. Deve também ter uma porção reactiva, que é quimicamente disponível à superfície aquosa do lipossoma. A porção reactiva é seleccionada de modo a que seja quimicamente adequada para formar uma ligação química estável com o agente de direccionamento ou hidrato de carbono, que é adicionado depois. Em alguns casos, é possível ligar o agente alvo à molécula conectora directamente, mas na maioria dos casos, é mais adequada a utilização de uma terceira molécula para actuar como uma ponte química, ligando deste modo a molécula conectora que está na membrana com o agente alvo ou hidrato de carbono que é prolongado, tridimensionalmente, para fora da superfície da vesícula. Os intervalos de dosagem para a administração dos péptidos da invenção são os suficientemente grandes para produzir o efeito desejado de modo a que a resposta imunitária apresente algum grau de supressão. A dosagem não deve ser tão grande que cause efeitos adversos. Geralmente, a dosagem variará com a idade, estado, sexo e extensão da doença no animal e pode ser determinada por um especialista na técnica. A dosagem pode ser ajustada pelo médico individual no evento de quaisquer contra-indicações.

Os métodos farmacêuticos adicionais podem ser empregues para controlar a duração da acção. As preparações de libertação controlada podem ser conseguidas pela utilização de polímeros para conjugar, complexar ou adsorver o péptido. A distribuição controlada pode ser testada através da selecção apropriada de macromoléculas (por exemplo, poliésteres, poliaminocarboximetilcelulose, e sulfato de

protamina) e a concentração de macromoléculas assim como os métodos de incorporação de modo a controlar a libertação. Outro possível método para controlar a duração da acção pelas preparações de libertação controlada é incorporar o péptido em partículas de um material polimérico tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeis, poli(ácido láctico) ou copolímeros de etilenovinilacetato.

De modo a proteger os péptidos da ligação com proteínas do plasma, é preferido que os péptidos sejam aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente, ou em sistemas de distribuição de fármaco coloidais, por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas, e nanocápsulas ou em macroemulsões. Estes ensinamentos são revelados em Remington's Pharmaceutical Sciences (16^a Ed., A. Oslo, ed., Mack, Easton, Pa., 1980).

Os péptidos da invenção são bastante adequados para utilização em sistemas de distribuição de fármaco direccionáveis tais como polímeros sintéticos ou naturais na forma de complexos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, ou esferas, e sistemas com base em lípido incluindo emulsões óleo em água, micelas, micelas misturadas, lipossomas, e eritrócitos re-selados. Estes sistemas são colectivamente conhecidos como sistemas de distribuição

de fármaco coloidais. Tipicamente, estas partículas coloidais contendo os péptidos dispersos são cerca de 50 nm-2 μ m de diâmetro. A dimensão das partículas coloidais permite-lhes que sejam administrados intravenosamente tal como por injeção, ou como um aerossol. Os materiais utilizados na preparação de sistemas coloidais são tipicamente esterilizáveis através de esterilização por filtração, não tóxicos, e biodegradáveis, por exemplo albumina, etilcelulose, caseína, gelatina, lecitina, fosfolípidos, e óleo de soja. Os sistemas poliméricos coloidais são preparados por um processo semelhante ao da coacervação da microencapsulação.

São também revelados péptidos que são componentes de um lipossoma, utilizado como um sistema de distribuição direccionado. Quando os fosfolípidos são suavemente dispersos em meios aquosos, estes aumentam de volume, hidratam, e formam espontaneamente vesículas de bicamadas concêntricas multilamelares com camadas de meio aquoso que separaram a bicamada de lípido. Estes sistemas são normalmente referidos como lipossomas multilamelares ou vesículas multilamelares (MLVs) e possuem diâmetros que variam desde cerca de 100 nm a cerca de 4 μ m. Quando os MLVs são sujeitos a sonicação, são formadas pequenas vesículas unilamelares (SUVs) com diâmetros no intervalo desde cerca de 20 a cerca de 50 nm, que contêm uma solução aquosa no núcleo do SUV.

Exemplos de lípidos úteis na produção de

lipossomas incluem compostos de fosfatidilo, tais como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, e fosfatidiletanolamina. Particularmente úteis são diacilfosfatidilgliceróis, em que a unidade lipídica contém de 14-18 átomos de carbono, particularmente de 16-18 átomos de carbono, e é saturada. Os fosfolípidos ilustrativos incluem fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, e diesteairoilfosfatidilcolina do ovo.

Na preparação de lipossomas contendo os péptidos da invenção, variáveis tais como a eficiência da encapsulação do péptido, labilidade do péptido, homogeneidade e dimensão da população resultante de lipossomas, proporção péptido-para lípido, instabilidade da permeabilidade da preparação, e a aceitabilidade farmacêutica da formulação deve ser considerada. Szoka, et al, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 9: 467 (1980); Deamer, et al., in *LIPOSOMES*, Marcel Dekker, New York, 1983, 27: Hope, et al., *Chem. Phys. Lipids*, 40: 89 (1986)).

O sistema de distribuição direccionado contendo os péptidos da invenção pode ser administrado numa variedade de maneiras a um hospedeiro, particularmente a hospedeiro mamífero, tal como intravenosamente, intramuscularmente, subcutaneamente, intraperitonelamente, intravascularmente, topicamente, intracavitariamente, transdermicamente, intranasalmente, e por inalação. A concentração de péptidos variará de acordo com a aplicação particular, a natureza da doença, a frequência da administração, ou

semelhantes. O sistema de distribuição direccionado de péptido encapsulado pode ser proporcionado numa formulação compreendendo outros compostos conforme apropriado e um meio aquoso fisiologicamente aceitável, por exemplo, solução fisiológica salina, solução fisiológica salina tamponada com fosfato, ou semelhantes.

Os compostos preparados através dos métodos da invenção podem também encontrar utilização como reagentes de diagnóstico. Por exemplo, os compostos marcados podem ser utilizados para localizar áreas de inflamação ou metástases de tumor num doente com suspeita de possuir uma inflamação. Para esta utilização, os compostos podem ser marcados com ^{125}I , ^{14}C , ou trítio.

EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

A invenção é agora descrita com referência aos Exemplos seguintes. Estes Exemplos são proporcionados com o propósito de apenas ilustração e a invenção não deve ser, de todo, considerada como estando limitada a estes Exemplos, mas deve ser entendida como incluindo quaisquer e todas as variações que se tornam evidente como um resultado dos ensinamentos aqui proporcionados.

Os materiais e métodos utilizados nas experiências apresentadas neste Exemplo são agora descritos.

A. Procedimentos Gerais

1. Preparação de CMP-SA-PEG

Este exemplo apresenta a preparação de CMP-SA-PEG.

Preparação de 2-(benziloxicarboxamido)-glicilamido-2-desoxi-D-manopirranose. O éster de N-benziloxicarbonil-glicil-N-hidroxissuccinimida (3,125 g, 10,2 mmol) foi adicionada a uma solução contendo D-manosamina-HCl (2 g, 9,3 mmol) e trietilamina (1,42 mL, 10,2 mmol) dissolvida em MeOH (10 mL) e H₂O (6 mL). A reacção foi agitada à temperatura ambiente durante 16 horas e concentrada utilizando rotoevaporação. Cromatografia (sílica, 10% MeOH/CH₂Cl₂) produziu 1,71 g (50% rendimento) de produto como um sólido branco: R_f= 0,62 (sílica; CHCl₃:MeOH:H₂O, 6/4/1); ¹H RMN (CD₃OD, 500 MHz) δ 3,24-3,27 (m, 2H), 3,44 (t, 1H), 3,55 (t, 1H), 3,63-3,66 (m, 1H), 3,76-3,90 (m, 6H), 3,91 (s, 2H), 4,0 (dd, 2 H), 4,28 (d, 1H, J = 4,4), 4,41 (d, 1H, J = 3,2), 5,03 (s, 1H), 5,10 (m, 3H), 7,29-7,38 (m, 10H).

Preparação de 5-(N-benziloxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato. 2-(N-Benziloxicarboxamido) glicilamida-2-desoxi-D-manopirranose (1,59 g, 4,3 mmol) foi dissolvido numa solução de 0,1 M HEPES (12 mL, pH 7,5) e piruvato de sódio (4,73 g, 43 mmol). A aldolase de ácido neuramínico (540 U de enzima em 45 mL de uma solução tamponada com fosfato a 10 mM

contendo 0,1 M de NaCl a pH 6,9) e a mistura de reacção foi aquecida a 37 °C durante 24 hr. A mistura de reacção foi depois centrifugada e o sobrenadante foi sujeito a cromatografia (sílica C18, gradiente de H₂O (100%) a 30% MeOH/água). As fracções apropriadas foram misturadas, concentradas e o resíduo sujeito a cromatografia (sílica, gradiente de 10% MeOH/CH₂Cl₂ a CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 6/4/1). As fracções apropriadas foram recolhidas, concentradas e o resíduo ressuspendido em água. Após liofilização, o produto (1,67 g, 87% de rendimento) foi obtido como um sólido branco: R_f= 0,26 (sílica, CHCl₃/MeOH/H₂O 6/4/1); ¹H RMN (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, 5R).

Preparação de 5-glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranossuronato. Foi dissolvido 5-(N-benziloxicarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranossuronato (1,66 g, 3,6 mmol) em 20 mL de 50% de água/metanol. O frasco foi repetidamente evacuado e colocado sob árgon e depois foi adicionado 10% de Pd/C (0,225 g). Após sujeição a vácuo repetida, foi depois adicionado hidrogénio (cerca de 1 atm) ao frasco e a mistura de reacção foi agitada durante 18 hr. A mistura de reacção foi filtrada através de celite, concentrada por evaporação rotatória e liofilizada para produzir 1,24 g (100% de rendimento) de produto como um sólido branco: R_f= 0,25 (sílica, IPA/H₂O/NH₄OH 7/2/1); ¹H RMN (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).

Preparação de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-fluorenilmetoxycarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Uma solução contendo 5-glicilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato (0,55 g, 1,70 mmol) dissolvido em 20 mL de H₂O foi adicionada a uma solução de Tris (1,38 g, 11,4 mmol), 1 M de MgCl₂ (1,1 mL) e BSA (55 mg). O pH da solução foi ajustado a 8,8 com 1M de NaOH (2 mL) e foi adicionada CTP-2Na⁺ (2,23 g, 4,2 mmol). O pH da mistura de reacção foi controlado com um controlador de pH que distribui 1 M de NaOH conforme necessário para manter o pH 8,8. A proteína de fusão (sialiltransferase/sintetase de CMP-ácido neurâmico) foi adicionada à solução e a mistura de reacção foi agitada à temperatura ambiente. Após 2 dias, uma quantidade adicional de proteína de fusão foi adicionada e a reacção agitada por mais 40 horas. A mistura de reacção foi precipitada em EtOH e o precipitado foi lavado 5 vezes com EtOH frio para produzir 2,3 gramas de um sólido branco. Cerca de 1,0 g do produto bruto foi dissolvido em 1,4 dioxano (4 mL), H₂O (4 mL) e NaHCO₃ saturado (3 mL) e uma solução de FMOC-Cl (308 mg, 1,2 mmol) dissolvido em 2 mL de dioxano foi adicionada gota a gota. Após agitação durante 16 hr à temperatura ambiente, a mistura de reacção foi concentrada para cerca de 6 mL por evaporação rotatória e purificada utilizando cromatografia (sílica C18, gradiente de 100% de H₂O a 30% de MeOH/H₂O). As fracções apropriadas

foram combinadas e concentradas. O resíduo foi dissolvido em água e liofilizado para produzir 253 mg de um sólido branco: Rf= 0,50 (sílica, IPA/H₂O/NH₄OH 7/2/1); ¹H RMN (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, obscured by solvent peak), 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 (q, J = 7, 3H). MS (ES); calc. para C₃₅H₄₂N₅O₁₈P ([M-H]⁻), 851,7; encontrado 850,0.

Preparação de citidina-5'-monofosforil-(5-glicil-amido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato). Foi adicionado diisopropilamina (83 μL, 0,587 μmol) a uma solução de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-fluorenilmetoxycarboxamido)glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato] (100 mg, 0,117 mmol) dissolvido em água (3 mL) e metanol (1 mL). A mistura de reacção foi agitada 16 hr à temperatura ambiente e o metanol da reacção removido da mistura de reacção por evaporação rotatória. A mistura bruta de reacção foi filtrada através de uma coluna de sílica gel C18 utilizando água e o efluente foi recolhido e liofilizado para produzir (87 mg, 100%) de produto como um sólido branco: Rf= 0,21 (sílica, IPA/H₂O/NH₄OH 7/2/1); ¹H RMN (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.

Preparação de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-metoxi-polioxietileno-(1 kDa)-3-oxipropionamido)-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranossuronato]. Foi adicionado hexafluorofosfato de benziltriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfônio (BOP, 21 mg, 48 μmol) a uma solução de ácido metoxipolioxietileno - (1 kDa de peso molecular médio)-3-oxipropiónico (48 mg, 48 μmol) dissolvido em DMF anidro (700 μL) e trietilamina (13 μL, 95 μmol). Após 30 min, foi adicionada uma solução contendo citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranossuronato) (30 mg, 48 μmol), água (400 μL) e trietilamina (13 μL, 95 μmol). Esta solução foi agitada 20 min à temperatura ambiente e depois sujeita a cromatografia (sílica C18, gradiente de metanol/água). As fracções apropriadas foram recolhidas, concentradas, o resíduo dissolvido em água e liofilizado para produzir 40 mg (50% de rendimento) de um sólido branco: $R_f=0,36$ (sílica, IPA/H₂O/NH₄OH 7/2/1); ¹H RMN (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, obscurecido pelo pico 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.

Preparação de citidina-5'-monofosforil-[5-(N-metoxi-polioxietileno-(10 kDa)-oxicarboxamido)-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosurionato]. Foram adicionados citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosurionato) (2,5 mg, 4 μ mol) e água (180 μ L) a uma solução de éster de (Metoxipolioxietileno-(10 kDa, peso molecular médio)-oxicarbonil-(N-oxibenzotriazole) (40 mg, 4 μ mol) em DMF anidro (800 μ L) contendo trietilamina (1,1 μ L, 8 μ mol) e a mistura de reacção agitada durante 1 hr à temperatura ambiente. A mistura de reacção foi depois diluída com água (8 mL) e foi purificada por cromatografia de fase reversa (sílica C18, gradiente de metanol/água). As fracções apropriadas foram combinadas, concentradas, o resíduo dissolvido em água e liofilizado produzindo 20 mg (46% de rendimento) de produto como um sólido branco: $R_f = 0,35$ (sílica, IPA/H₂O/NH₄OH 7/2/1); ¹H RMN (D₂O, 500 MHz) δ 1,66 (td, 1H), 2,50 (dd, 1H); 2,64 (t, 3H) 3,55-3,7 (m, obscurecido pelo pico 3,71), 3,71 (s, 488H), 3,72-4,0 (m, obscurecido pelo pico 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.

2. Preparação de CMP-SA-PEG II

Este exemplo apresenta o procedimento geral para produzir CMP-SA-PEG, e procedimentos específicos para produzir CMP-SA-PEG (1 kDa) e CMP-SA-PEG (20 kDa).

Procedimentos gerais da Preparação de Citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranossuronato). Foi dissolvido citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranossuronato (870 mg, 1,02 mmol) em 25 mL de água e foram adicionados 5,5 mL de 40% pt de solução de dimetilamina em H₂O. A reacção foi agitada durante 1 hr e o excesso de dimetilamina foi depois removido por evaporação rotatória. A solução aquosa foi filtrada através de uma coluna de sílica gel C-18 e a coluna foi lavada com água. Os eluentes foram combinados e liofilizados para produzir 638 mg (93%) de um sólido branco. R_f= 0,10 (sílica, IPA/H₂O/NH₄CH; 7/2/1). ¹H RMN (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, 1 H), 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. for C₂₁H₃₂N₅O₁₁P ([M-H]⁻), 629,47; encontrado 627,9.

Procedimentos gerais para Preparar CMP-SA-PEG utilizando mPEG-(p-nitrofenol)carbonato. Foi dissolvido citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato) (175 mg, 0,259 mMol) numa mistura de água, pH 8,5, e DMF ou THF (numa proporção de 1:2). O carbonato de mPEG-nitrofenol (2 a 20 kDa de mPEG) (0,519 mMole) foi adicionado em várias porções ao longo de 8 hr à temperatura ambiente e a mistura de reacção foi agitada à temperatura ambiente durante 3 dias. Quando completa, foram adicionados água (40 mL) e 1,5 mL de NH_4OH (29% de solução aquosa). A mistura de reacção amarela foi agitada por mais 2 hr e depois concentrada por evaporação rotatória. A mistura de reacção foi depois diluída com água (pH 8,5) para cerca de um volume de 500 mL e foi purificada por cromatografia de fase reversa (Biotage 40M, coluna de sílica C18) com um gradiente de metanol/água. As fracções apropriadas foram combinadas e concentradas para produzir os produtos como sólidos brancos. Rf (sílica; 1-propanol/água/29% NH_4OH ; 7/2/1); (PEG 2 kDa) = 0,31; (PEG 5 kDa) = 0,33; (PEG 10 kDa) = 0,36; (PEG 20 kDa) = 0,38 (TLC sílica, IPA/ H_2O / NH_4OH 7/2/1); MS (MALDI), observado [M-CMP+Na]; (2 kDa) = 2460; (5 kDa) = 5250; (10 kDa) = 10700; (20 kDa) = 22500.

Preparação de Citidina-5'-monofosforil-[5-(N-fluorenilmetoxycarboxamido)-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato]. Foram misturados piruvato de sódio (2,4 g, 218 mmol), tampão HEPES (0,25 M, pH 7,34) e 1,0 g (22 mmol) de Fmoc-glicilinosamida num

frasco de polycarbonato de 150 mL. Uma solução de aldolase de ácido neuramínico (19 mL, ~600 U) foi depois adicionada e a mistura de reacção foi incubada a 30 °C num agitador orbital. Após 23 horas, a cromatografia em camada fina (TLC) indicou que ocorreu aproximadamente 75% de conversão em produto. O CTP (1,72 g, 33 mmol) e 0,1 M de MnCl_2 (6 mL) foram depois adicionados à mistura de reacção. O pH foi ajustado a 7,5 com 1 M de NaOH (5,5 mL) e foi adicionada uma solução contendo sintetase de CMP-ácido neuramínico (*Neisseria*) (25 mL, 386 U). A reacção ficou completa após 24 hrs e a mistura de reacção foi sujeita a cromatografia (C-18 sílica, gradiente de H_2O (100%) a 10% $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$). As fracções apropriadas foram re combinadas, concentradas e liofilizadas para produzir um sólido branco, R_f (IPA/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$, 7/2/1) = 0,52, ^1H RMN (D_2O 500 MHz) δ 1,64 (dt, 1H, $J = 12,0, 6,0$), 2,50 (dd, 1H, $J = 13,2,4,9$), 3,38 (d, $J = 9,67, 1\text{H}$), 3,60 (dd, $J=11,65, 6,64, 1\text{H}$), 3,79 (d, $J=4,11,1\text{H}$), 3,87 (dd, $J= 12,24, 1,0, 1\text{H}$), 3,97 (m, 2H), 4,07 (td, $J = 10,75, 4,84, 1\text{H}$), 4,17 (dd, $J = 10,68, 1,0, 1\text{H}$), 4,25 (s, 2H), 4,32 (t, $J =4,4, 1\text{H}$), 4,37 (t, $J=5,8 1\text{H}$), 4,6-4,7 (m, obscurecido pelo pico do solvente), 5,95 (d, $J = 4, 1\text{H}$), 6,03 (d, $J = 7,4, 1\text{H}$), 7,43-7,53 (m, 3H), 7,74 (m, 2H), 7,94 (q, $J = 7,3\text{H}$) MS (ES); calc. para $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_{18}\text{P}$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$), 850,7; encontrado 850,8.

Preparação de Citidina-5'-monofosforil-[5-(N-metoxipolioxietileno-(1 kDa)-3-oxipropionamido)-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulo-piranossuronato]. O éster metoxipolioxietileno-(1 kDa de peso molecular

médio)-3-oxipropionato-N-succinimidilo (52 mg, 52 μ mol) dissolvido em DMF anidro (450 μ L) e trietilamina (33 μ L, 238 μ mol). Citidina-5'-monofosforil-(5-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulo-piranossuronato) (30 mg, 48 μ mol) foi adicionada como um sólido. Foi adicionada água, pH 8 (330 μ L) e após 30 min, foram adicionados uns adicionais 28 mg de PEG NHS-ativado. Após mais 5 min adicionais, a mistura de reacção foi sujeita a cromatografia (C-18 sílica, gradiente de metanol/água), e as fracções apropriadas foram concentradas para produzir 32 mg (40% rendimento) de um sólido branco, R_f = 0,31 (sílica, IPA/H₂O/NH₄OH 7/2/1); 1RMN (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, obscurecido pelo pico 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, 1 H), 6,13 (d, J = 7,56, 1H), 7,98 (d, J=7,54, 1H). MS (MALDI), observado [(M-CMP)-H]; 1506,4, 1550,4, 1594,5, 1638,5, 1682,4, 1726,4, 1770,3, 1814,4, 1858,2.

Preparação de Citidina-5'-monofosforil-{5-[N-(2,6-dimetoxipolioxietileno-(20 kDa)-3-oxipropionamidil-lisilamido]-glicilamido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranossuronato}. O éster 2,6-Di-[metoxipolioxietileno-(20 kDa de peso molecular médio)-3-oxipropionami-

dil]-lisilamido-N-succinimidilo (367 mg, 9 μ mol) foi dissolvido em THF anidro (7 mL) e trietilamina (5 μ L, 36 μ mol). Foi dissolvido Citidina-5'-monofosforil-(5-glicil-amido-3,5-didesoxi- β -D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranossonato) (30 mg, 48 μ mol) em 1,0 mL de água, e adicionada à mistura de reacção. A reacção foi agitada durante 4 horas à temperatura ambiente e foi depois sujeita a cromatografia (HPLC, Waters Xterra RP8, gradiente de água/ NH_4OH , 100% a 20% de metanol/água/ NH_4OH a 1 mL/min) para produzir um sólido branco com um R_t = 22,8 min. MS (MALDI), observado [(M-CMP)-H]; 43 027,01 (40 000 - 45 500).

3. Preparação de UDP-Gal-PEG.

Este exemplo apresenta o procedimento geral para produzir UDP-Gal-PEG.

Foi adicionado 348 mg de éster de metoxipolióxi-etilenopropionato e N-hidroxissuccinimida (nnPEG-SPA, PM 1 000) em THF (0,5 mL) a uma solução de 25 mg de galactosamina-1-fosfato em 1 mL de água, seguido pela adição de 67 μ L de trietilamina. A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 17 hr. A concentração a pressões reduzidas proporcionou uma mistura bruta de reacção que foi purificada por cromatografia (C-18 sílica, utilizando um gradiente descontínuo de 10%, 20%, 30%, 40% de MeOH aquoso) para produzir 90 mg (74%) de produto, depois as fracções apropriadas foram combinadas e concen-

tradas até à secura. Rf= 0,5 (sílica, Propanol/H₂O/NH₄OH 30/20/2); MS(MALDI), observado 1356, 1400, 1444, 1488, 1532, 1576, 1620.

[α -1-(Uridino-5'-difosforil)]-2-desoxi-2-(metoxipolioxietilenopropionoilamido-1 kDa)- α -D-galactosamina. O 2-desoxi-2-(metoxipolioxietilenopropionoilamido - 1 kDa)- α -1-monofosfato-D-galactosamina (58 mg) foi dissolvido em 6 mL de DMF e 1,2 mL de piridina. UMP-morfolidato (60 mg) foi depois adicionado e a mistura resultante foi agitada a 70 °C durante 48 hr. Após concentração, o resíduo foi sujeito a cromatografia (C18-sílica, utilizando um gradiente descontínuo de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% , 80% de MeOH) para produzir 50 mg de produto após concentração das fracções apropriadas. Rf= 0,54 (sílica, propanol/H₂O/NH₄OH 30/20/2). MS(MALDI); Observado 1485, 1529, 1618, 1706.

[α -1-(Uridino-5'-difosforil)]-6-desoxi-6-(metoxipolioxietileno-amino-2 kDa)- α -D-galactose. [α -1-(Uridino-5'-difosforil)]-6-carboxaldeído- α -D-galactose (10 mg) foi dissolvido em 2 mL de 25 mM de tampão de fosfato de sódio (pH 6,0) e tratado com metoxipolietilenoglicolamina (PM 2 000, 70 mg) e depois 25 μ L de solução 1 M de NaBH₃CN a 0 °C. A mistura resultante foi congelada a -20 °C durante três dias. A mistura de reacção foi sujeita a cromatografia (HPLC, água Xterra P8) utilizando 0,015 M de NH₄OH como fase móvel A e MeOH como fase móvel B como eluente à velocidade de 1,0 mL/min. O produto foi recolhido, e

concentrado para produzir um sólido; $R_t = 9,4$ minutos. $R_f = 0,27$ (sílica, EtOH/H₂O 7/3).

[α -1-(Uridino-5'-difosforil)]-6-amino-6-desoxi- α -D-galactose. Foi adicionado acetato de amônio 15 mg a uma solução de [α -1-(Uridino-5'-difosforil)]-6-carboxaldeído- α -D-galactopiranosídeo (10 mg) em tampão de fosfato de sódio (pH 6,0). A solução de (25 μ L) 1M de NaBH₃CN foi depois adicionada e a mistura foi agitada durante 24 hr. A solução foi concentrada e o resíduo foi sujeito a cromatografia (sephadex G10) para produzir 10 mg de um sólido branco, $R_f = 0,62$ (sílica, EtOH/0,1 M NH₄Ac).

[α -1-(Uridino-5'-difosforil)]-6-desoxi-6-(metoxipolioxietilenopropionoilamido, -2 kDa)- α -D-galactopiranosídeo. [α -1-(Uridino-5'-difosforil)]-6-amino-6-desoxi- α -D-galactopiranosídeo (5 mg) foi dissolvido em 1 mL de H₂O. Depois foi adicionado éster de metoxipolietilenoglicol-propionoil-NHS (PM ~2 000, 66 mg), seguido por 4,6 μ L de trietilamina. A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante a noite, e depois purificada em HPLC (sílica C-8) para produzir o produto, $R_t = 9,0$ min.

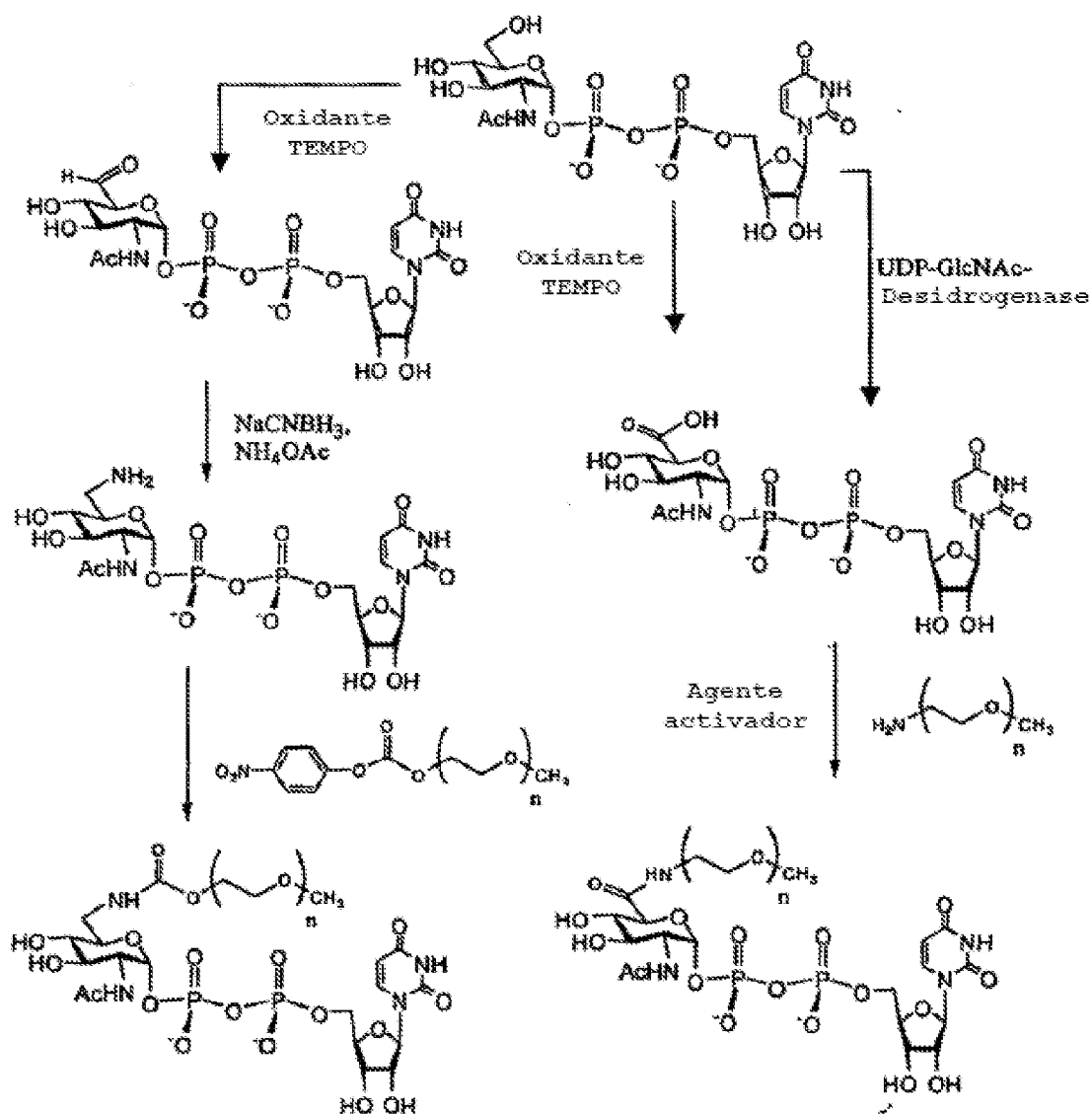
[α -1-(Uridino-5'-difosforil)]-6-desoxi-6-(metoxipolioxietilenocarboxamido, -2 kDa)- α -D-galactopiranosídeo. [α -1-(Uridino-5'-difosforil)]-6-amino-6-desoxi- α -D-galactopiranosídeo (10 mg) foi misturado com metoxipolietilenoglicolcarboxi-HOBT (PM 2000, 67 mg) em 1 mL de H₂O, seguido

pela adição de cloridrato de EDC(1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida 6,4 mg e 4,6 µL de trietilamina. A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente 24 hr. A mistura foi sujeita a cromatografia (sílica C-8) para produzir o produto.

4. Preparação of UDP-GlcNAc-PEG

Este exemplo apresenta o procedimento geral para produzir UDP-GlcNAc-PEG. No lado esquerdo do esquema 17, o açúcar difosfo-nucleótido amino protegido é oxidado para formar um aldeído na posição 6 do açúcar. O aldeído é convertido na correspondente amina primária por formação e redução da base de Schiff. O aducto resultante é colocado em contacto com o carbonato de p-nitrofenol de m-PEG, que reage com a amina, ligando o m-PEG ao núcleo sacárido via uma ligação amida. No lado direito do esquema 17 no cimo, o açúcar difosfonucleótido amino protegido é tratado com um oxidante químico para formar um grupo carboxilo no carbono 6 do núcleo de açúcar. O grupo carboxilo é activado e feito reagir com a m-PEG amina, ligação do m-PEG ao núcleo sacárido via uma ligação amida. No lado direito do esquema 17 em baixo, as reacções são substancialmente semelhantes às do topo direito, com a excepção de que o açúcar nucleótido de partida é colocado em contacto com uma enzima oxidante, tal como uma desidrogenase, em vez de um oxidante químico.

Esquema 17

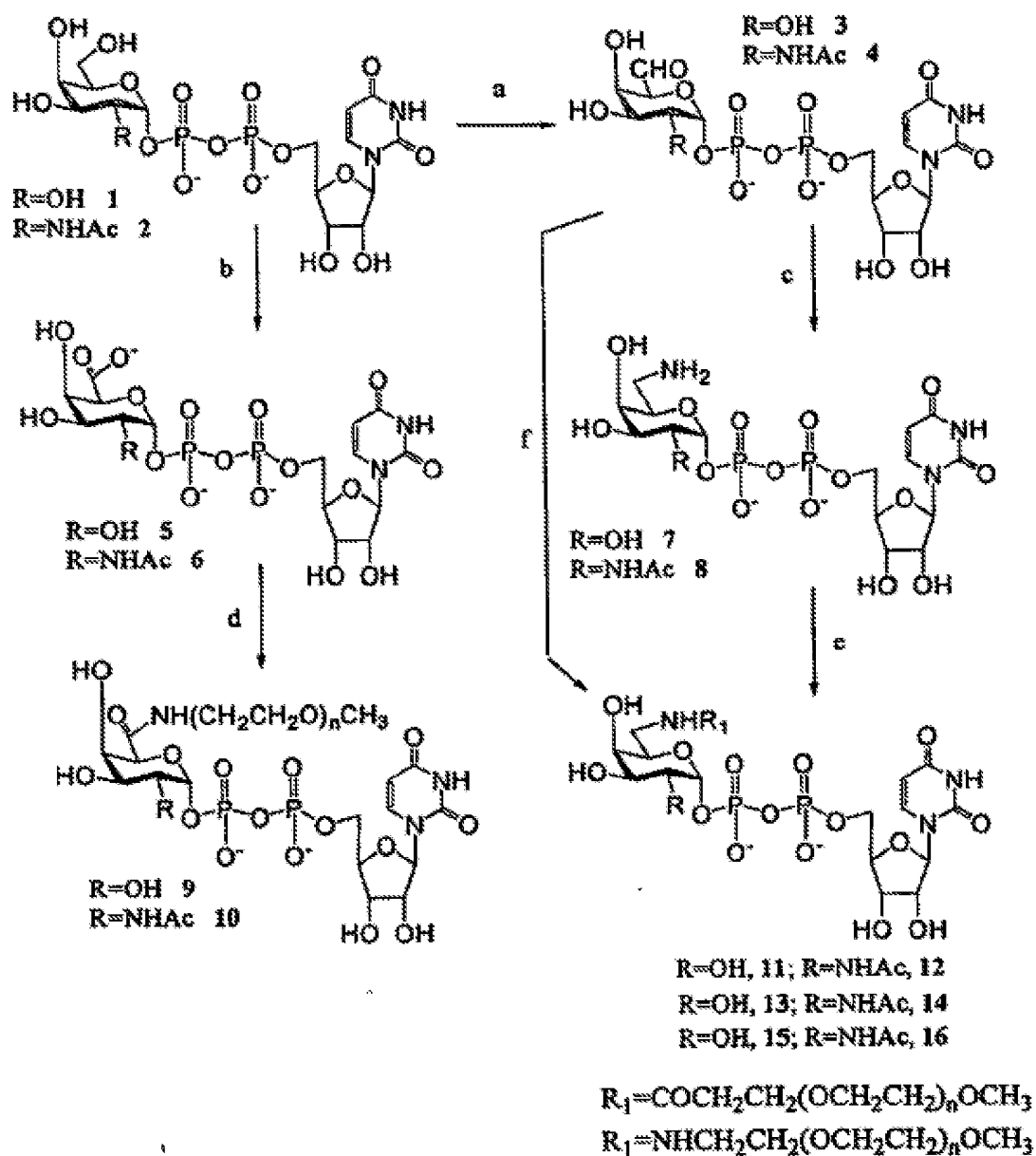


5. Preparação de UDP-GalNAc-PEG

Este exemplo (esquema 18) apresenta o procedimento geral para a produção de UDP-GalNAc-PEG. A reacção apresentada acima originatetem origem com um açúcar difosfo-nucleótido, em que R é um hidroxilo 1 ou uma amina

protegida **2**. Num passo a, o açúcar inicial é tratado com uma mistura de uma oxidase e uma catalase, convertendo a posição 6 do açúcar numa unidade aldeído (**3 e 4**). No passo c, o aldeído é convertido no correspondente amina (**7 e 8**) pela formação e redução de uma base de Schiff. No passo e, a amina é opcionalmente tratada com um derivado activado m-PEG, acilando deste modo a amina para produzir a correspondente amida m-PEG (**11 e 13**). Alternativamente, no passo f, a amina é colocada em contacto com uma espécie m-PEG activada, tal como um éster de m-PEG activo, formando deste modo a correspondente amida m-PEG (**12 e 14**). No passo b, o material de partida é também tratada com uma catalase e oxidase, oxidando completamente a unidade hidroximetilo, formando um grupo carboxilo na posição 6. No passo d, a unidade carboxilo é activada e subsequentemente convertida num aducto m-PEG (**9 e 10**) por reacção com uma m-PEG amina intermediária. Isto é apresentado no esquema 18.

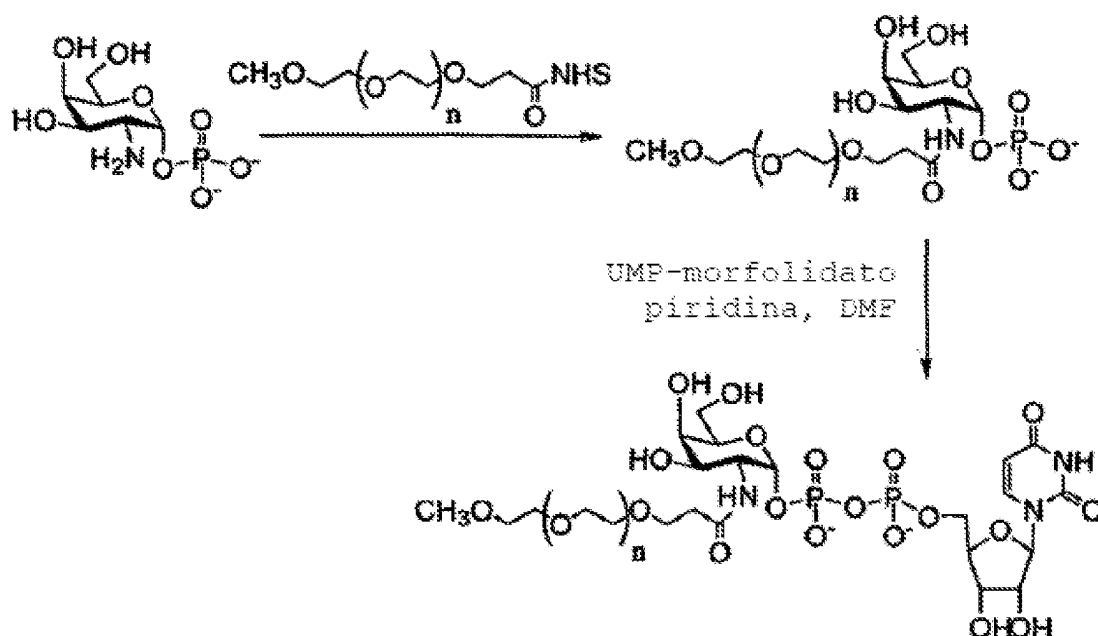
Esquema 18



a e b): Galactase oxidase e catalase em 25 mM de tampão fosfato de sódio (pH 6,0); c): NH_4Ac , $NaBH_3CN$ em 25 mM de tampão fosfato de sódio (pH 6,0); d) $CH_3(OCH_2CH_2)_nNH_2$, EDC, H_2O ; e) $CH_3(OCH_2CH_2)_nNH_2$, $NaBH_3CN$, H_2O para 15 e 16; f) $CH_3O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2CONHS$, H_2O , Et_3N

O fosfato de amino-açúcar é colocado em contacto com um éster activo de m-PEG N-hidroxissuccinimida, formando deste modo o correspondente açúcar-PEG-amida. A amida é colocada em contacto com UMP-morfolidato para formar o correspondente açúcar difosfo-nucleótido activo.

Esquema 19



6. Síntese de CMP-SA-Levulinato

Este exemplo apresenta o procedimento para a síntese de CMP-SA-levulinato.

Preparação de 2-levulinamido-2-desoxi-D-manopiranosose. Foi adicionado isobutilcloroformato (100 µL, 0,77 mmol) gota a gota a uma solução de ácido levulínico (86 µL,

0,84 mmol), THF anidro (3 mL) e trietilamina (127 μ L, 0,91 mmol). Esta solução foi agitada durante 3 horas à temperatura ambiente e foi depois adicionada gota a gota a uma solução contendo cloridrato de D-manosamina (151 mg, 0,7 mmol), trietilamina (127 μ L, 0,91 mmol), THF (2 mL) e água (2 mL). A mistura de reacção foi agitada 15 horas e depois concentrada até à secura por evaporação rotatória. Foi utilizada cromatografia (sílica, gradiente por passo 5-15% MeOH/CH₂Cl₂) para isolar o produto produzindo 0,156 g (73% rendimento) de um sólido branco: R_f = 0,41 (sílica, CHCl₃/MeOH/água 6/4/1); ¹H RMN (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, 1 H), 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.

Preparação de 5-levulinamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosuronato. Foi adicionado piruvato de sódio (0,616 g, 5,6 mmol) e aldolase do ácido N-acetilneuramínico (50 U) a uma solução de 2-levulinado-2-desoxi-D-manopiranosose (0,156 g, 0,56 mmol) em 0,1 M de HEPES (pH 7,5). A mistura de reacção foi aquecida a 37 °C durante 20 horas e após congelação. A mistura de reacção foi depois filtrada através de sílica C18, congelada e liofilizada. O sólido bruto foi purificado utilizando

cromatografia (sílica, utilizando primeiro 10-40% de MeOH/CH₂Cl₂ e depois CH₂Cl₂/Me-OH/H₂O 6/4/0,5). As fracções apropriadas foram combinadas e concentradas produzindo 45 mg (80% de rendimento) de um sólido branco: R_f= 0,15 (sílica, CHCl₃/MeOH/água 6/4/1); ¹H RMN (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 (app q, J = 6,6, 2H), 2,86-2,95 (m, 2H), 3,15-3,18 (m, 1H), 3,28-3,61 (complexo, 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 (complexo, 2H), 4,04 (td, J = 11,18,4,67, 1H). MS (ES); calculada para C₁₄H₂₃NO₁₀, 365,33; encontrado ([M-1]⁻), 363,97.

Preparação de citidina-5'-monofosforil-(5-levulinamido-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranos-suronato). Foi dissolvido 5-levulinamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranos-suronato (50 mg, 137 μmol) em 2 mL de 100 mM de tampão HEPES pH 7,5 e foi adicionado 1 M de MnCl₂ (300 μL, 300 μmol). Foi dissolvido CTP-2Na⁺ (79 mg, 1,5 μmol) em 5 mL de tampão HEPES e foi adicionado ao açúcar. A enzima de fusão sialiltransferase/sintetase de CMP-ácido neuramínico (11 U) foi adicionada e a mistura de reacção agitada à temperatura ambiente durante 45 horas. A mistura de reacção foi filtrada através de um filtro de 10 000 PMCO e o filtrado, que continha o produto da reacção, foi utilizado directamente sem purificação posterior: R_f= 0,35 (sílica, IPA/água/NH₄OH 7/2/1).

B. Glicoconjugação e GlicoPEGuilação de péptidosG-CSF28. GlicoPEGuilação de G-CSF produzido em célulasCHO

Preparação de Factor de Estimulação de colónias de Granulócitos Asialo (G-CSF). O G-CSF produzido nas células CHO é dissolvido a 2,5 mg/mL em 50 mM de Tris 50 mM Tris-HCl a pH 7,4, 0,15 M NaCl, 5 mM de CaCl_2 e concentradas para 500 μL num filtro de centrifugação Centricon Plus 20. A solução é incubada com 300 mU/mL de Neuraminidase II (*Vibrio cholerae*) durante 16 horas a 32 °C. Para monitorizar a reacção, uma pequena fracção da reacção é diluída com o tampão apropriado e é realizado um gel IEF. A mistura de reacção é depois adicionada ao conjugado ácido N-(p-aminofenil)oxâmico-agarose pré-lavado (800 μL /mL de volume de reacção) e as esferas lavadas suavemente rodadas durante 24 horas a 4 °C. A mistura é centrifugada a 10 000 rpm e o sobrenadante foi recolhido. As esferas são lavadas 3 vezes com tampão Tris-EDTA, uma vez com 0,4 mL de tampão Tris-EDTA e uma vez com 0,2 mL do tampão Tris-EDTA e todos os sobrenadantes são misturados. O sobrenadante é dialisado a 4 °C contra 50 mM de Tris-HCl a pH 7,4, 1 M de NaCl, 0,05% de NaN_3 e depois duas vezes mais contra 50 mM de Tris HCl pH 7,4, 1M de NaCl, 0,05% de NaN_3 . A solução dialisada é depois concentrada utilizando um filtro de centrífuga Centricon Plus 20 e armazenada a 20 °C. As condições para o gel IEF foram aplicadas de acordo com os procedimentos e reagentes fornecidos pela Invitrogen. As amostras de G-CSF

nativo e PEGuilado são dialisadas contra água e analisadas por MALDI-TOF MS.

Preparação de G-CSF-(alfa2,3)-Sialil-PEG. O G-CSF dessialilado foi dissolvido a 2,5 mg/mL em 50 mM de Tris-HCl, 0,15 M de NaCl, 0,05% de NaN₃, pH 7,2. A solução é incubada com 1 mM de CMP-ácido siálico-PEG e 0,1 U/mL de ST3Gal1 a 32 °C durante 2 dias. Para monitorizar a incorporação de ácido siálico-PEG, uma pequena fracção da reacção tinha adicionado o ligando CMPSA-PEG-fluorescente; a marcação incorporada no péptido é separada da marcação livre por filtração em gel numa coluna analítica Toso Haas G3000SW utilizando tampão PBS (pH 7,1). A incorporação de marcação fluorescente no péptido é quantificada utilizando um detector de fluorescência em linha. Após 2 dias, a mistura de reacção é purificada utilizando uma coluna preparativa Toso Haas G3000SW utilizando tampão PBS (pH 7,1) e são recolhidas fracções com base na absorção de UV. O produto da reacção é analisado utilizando análise SDS-PAGE e IEF de acordo com os procedimentos e reagentes fornecidos por Invitrogen. As amostras de G-CSF nativo e PEGuilado são dialisadas contra água e analisadas por MALDI-TOF MS.

Preparação de G-CSF-(alfa2,8)-Sialil-PEG. O G-CSF produzido em células CHO, que contém um alfa2,3-sialilado glicano ligado em O, é dissolvido a 2,5 mg/mL em 50 mM de Tris-HCl, 0,15 M de NaCl, 0,05% de NaN₃, pH 7,2. A solução é incubada com 1 mM de CMP-ácido siálico-PEG e 0,1 U/mL de

CST-II a 32 °C durante 2 dias. Para monitorizar a incorporação de ácido siálico-PEG, uma pequena fracção da reacção tem adicionado o ligando CMP-SA-PEG-fluorescente; a marcação incorporada no péptido é separada da marcação livre por filtração em gel numa coluna analítica Toso Haas G3000SW utilizando tampão PBS (pH 7,1). A incorporação de marcação fluorescente no péptido é quantificada utilizando um detector de fluorescência em linha. Após 2 dias, a mistura de reacção é purificada utilizando uma coluna preparativa Toso Haas G3000SW utilizando tampão PBS (pH 7,1) e as fracções recolhidas com base na absorção de UV. O produto da reacção é analisado utilizando análise SDS-PAGE e IEF de acordo com os procedimentos e reagentes fornecidos por Invitrogen. As amostras de G-CSF nativo e PEGuilado são dialisadas contra água e analisadas por MALDI-TOF MS.

Preparação de G-CSF-(alfa2,6)-Sialil-PEG. G-CSF, contendo apenas GalNac ligado a O, é dissolvido a 2,5 mg/mL em 50 mM de Tris-HCl, 0,15 M de NaCl, 0,05% de NaN₃, pH 7,2. A solução é incubada com 1 mM de CMP-ácido siálico-PEG e 0,1 U/mL de ST6GalNAcI ou II a 32 °C durante 2 dias. Para monitorizar a incorporação de ácido siálico-PEG, uma pequena fracção da reacção tem adicionado o ligando CMP-SA-PEG-fluorescente; a marcação incorporada no péptido é separada da marcação livre por filtração em gel numa coluna analítica Toso Haas G3000SW utilizando tampão PBS (pH 7,1). A incorporação da marcação fluorescente no péptido é quantificada utilizando um detector de fluorescência em linha. Após 2 dias, a mistura de reacção é purificada

utilizando uma coluna preparativa Toso Haas G3000SW utilizando tampão PBS (pH 7,1) e as fracções recolhidas com base na absorção UV. O produto da reacção é analisado utilizando análise SDS-PAGE e IEF de acordo com os procedimentos e reagentes fornecidos por Invitrogen. As amostras de G-CSF nativo e PEGuilado são dialisadas contra água e analisadas por MALDI-TOF MS.

A G-CSF produzida em células CHO foi tratada com sialidase de *Arthrobacter* e foi então purificados por exclusão de tamanho em Superdex75 e foi tratada com ST3Gal1 ou ST3 Gal2 e depois com CMP-SA-PEG de 20 Kda. A molécula resultante foi purificada por troca iónica e filtração em gel e análise por SDS PAGE demonstrou que a PEGuilação foi completa. Isto é a primeira demonstração de glicoPEGuilação de um glicano ligado em O.

As revelações de cada uma e de todas as patentes, pedidos de patente, e publicações aqui citados são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

Embora esta invenção tenha sido revelada com referência a formas de realização específicas, é óbvio que outras formas de realização e variações desta invenção podem ser concebidos por outros especialistas na técnica sem se afastar do verdadeiro espírito e âmbito da invenção. Pretende-se que as reivindicações em anexo sejam interpretadas de modo a incluir todas as formas de realização e variações equivalentes.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Neose Technologies, Inc.

DeFrees, Shawn

Zopf, David

Bayer, Robert

Hakes, David

Chen, Xi

Bowe, Caryne

<120> MÉTODOS DE GLICOPEGUILAÇÃO E PROTEÍNAS/PÉPTIDOS PRODUZIDOS
ATRAVÉS DOS MÉTODOS

<130> 040853-01-5051WO

<150> US 60/328,523

<151> 2001-10-10

<150> US 60/334,233

<151> 2001-11-28

<150> US 60/334,301

<151> 2001-11-28

<150> US 60/344,692

<151> 2001-10-19

<150> US 60/387,292

<151> 2002-06-07

<150> US 60/391,777

<151> 2002-06-25

<150> US 60/396,594.

<151> 2002-07-17

<150> US 60/404,249

<151> 2002-08-16

<150> US 60/407,527

<151> 2002-08-28

<150> PCT/US02/32263

<151> 2002-10-09

<150> US 10/360,779

<151> 2003-02-19

<150> US 10/360,770

<151> 2003-01-06

<150> US 10/287,994

<151> 2002-11-05

<160> 75

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 525

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

acccccctgg gccctgccag ctccctgcc cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa
60

gtgaggaaga tccagggcga tggcgagcg ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag
120

ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc
180

ctgagcagct gccccagcca ggcctgcag ctggcaggct gcttgagcca actccatagc
240

ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt
300

cccaccttgg acacactgca gctggacgtc gccgactttg ccaccaccat ctggcagcag
360

atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg cagcccaccc aggggtgcat gccggccttc
420

gcctctgctt tccagcgccg ggcaggaggg gtcttggttg cctcccatct gcagagcttc
480

ctggaggtgt cgtaccgctg tctacgccac cttgcccagc cctga
525

<210> 2

<211> 174

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

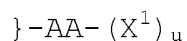
Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
1      5      10      15
Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
20      25      30
Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
35      40      45
Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
50      55      60
Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
65      70      75      80
Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
85      90      95
Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
100     105     110
Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
115     120     125
Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
130     135     140
Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe
145     150     155     160
Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165     170

```

Lisboa, 2 de Dezembro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Método *in vitro* isento de células de remodelação de um péptido G-CSF compreendendo poli(etileno)glicol (PEG), possuindo o referido péptido a fórmula:



em que AA é um resíduo terminal ou interno de aminoácido do referido péptido;

X¹ é um resíduo de monossacarilo ligado covalentemente ao referido AA; e

u é um inteiro seleccionado a partir de 0 e 1;

compreendendo o referido método colocar em contacto o referido péptido com pelo menos uma glicosiltransferase e pelo menos um dador de glicosilo compreendendo poli(etileno)glicol, possuindo um peso molecular de 20 kDa ligado covalentemente a este sob condições adequadas para transferir o referido pelo menos um dador de glicosilo ao referido péptido.

2. Método da reivindicação 1, em que AA é um aminoácido contendo um grupo hidroxilo livre.

3. Método da reivindicação 1 ou 2, em que AA é um aminoácido seleccionado a partir de serina, treonina e hidroxilprolina.

4. Método de qualquer das reivindicações 1 a 3, em que AA é um resíduo de treonina correspondente a Thr 133 da G-CSF.

5. Método de qualquer das reivindicações 1 a 4, em que o dador glicosilo é o ácido siálico-poli(etileno)glicol.

6. Método de qualquer das reivindicações 1 a 5, em que o resíduo monossacarilo é GalNAc.

7. Método de qualquer das reivindicações 1 a 6, em que u é 1.

8. Método de qualquer das reivindicações 1 a 7, em que o péptido G-CSF é obtido por expressão em *E. coli*.

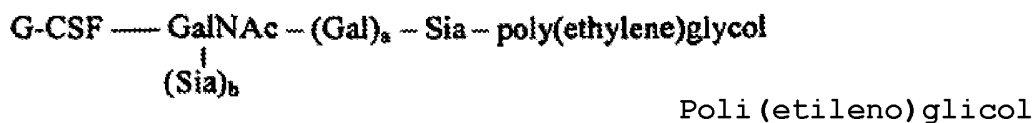
9. Utilização de CMP-ácido siálico-poli(etileno)glicol para formar um conjugado covalente entre um péptido G-CSF e poli(etileno)glicol possuindo um peso molecular de 20 kDa.

10. Conjugado covalente entre um péptido G-CSF e poli(etileno)glicol possuindo um peso molecular de 20 kDa via um grupo de ligação a glicosilo compreendendo GalNAc e

ácido siálico, em que o conjugado possui a estrutura G-CSF - GalNAc

- ácido siálico - poli(etileno)glicol, o péptido G-CSF é obtido por expressão em *E. coli*, e o grupo de ligação a glicosilo é ligado ao péptido G-CSF num resíduo de treonina correspondente a Thr 133 da G-CSF.

11. Conjugado covalente entre a péptido G-CSF e poli(etileno)glicol possuindo um peso molecular de 20 kDa via um grupo de ligação a glicosilo compreendendo GalNAc e ácido siálico, em que o conjugado possui a estrutura



a e b são seleccionados independentemente de 0 ou 1, o péptido G-CSF é obtido por expressão in células CHO, e o grupo de ligação a glicosilo é ligado ao péptido G-CSF num resíduo de treonina correspondente à treonina 133 da G-CSF.

12. Composição farmacêutica compreendendo um diluente farmacêuticamente aceitável e um conjugado covalente de acordo com a reivindicação 10 ou 11.

13. Conjugado covalente da reivindicação 10 ou 11 ou a composição farmacêutica da reivindicação 12 para utilização no tratamento de um doente humano que sofre de cancro não mielóide e que recebe quimioterapia mielo-supressoras, ou possuindo leucemia mielóide aguda e que

recebem quimioterapia de indução ou consolidação, ou que sofrem de um cancro não mielóide e que recebem um transplante de medula óssea, ou que se sujeitam a colheita de células progenitoras do sangue periférico, ou que possuem neutropenia crónica grave ou que possuem neutropenia persistente e também que possuem uma infecção avançada com HIV.

Lisboa, 2 de Dezembro de 2011

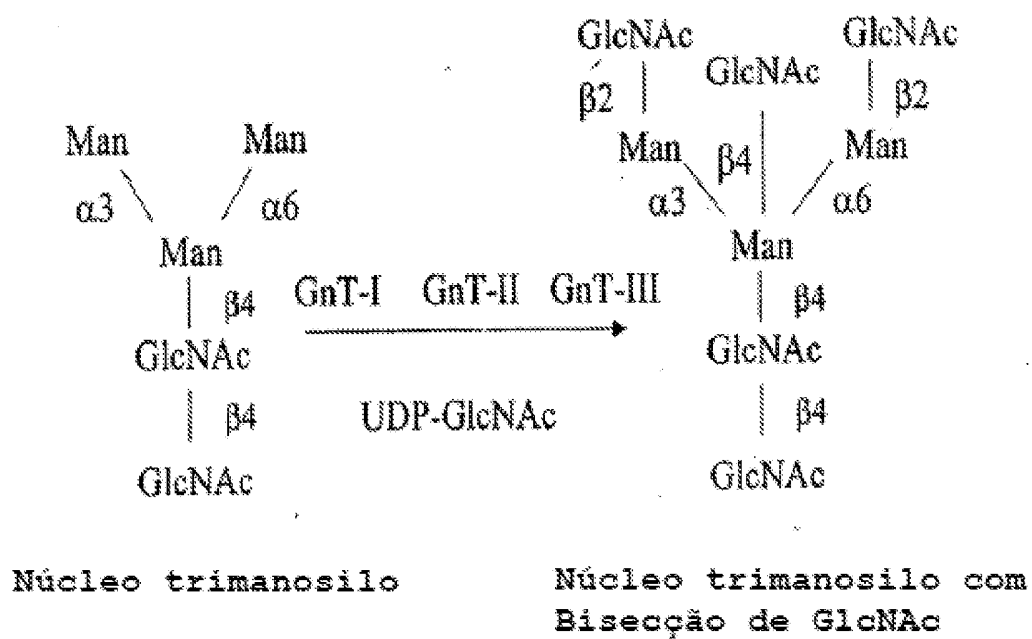
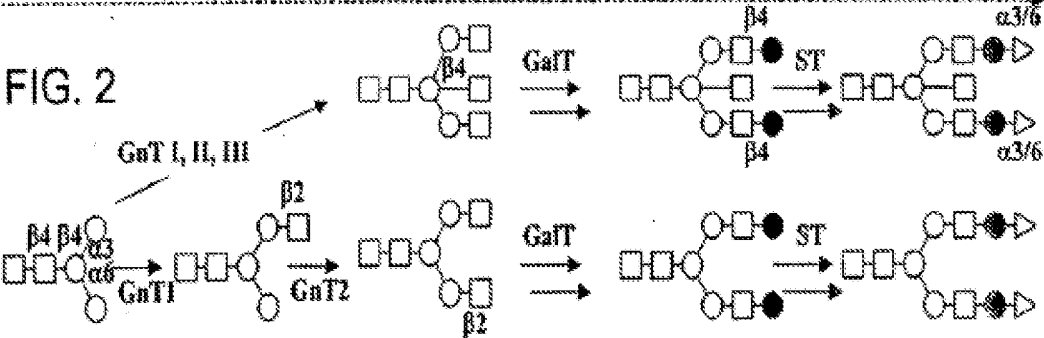
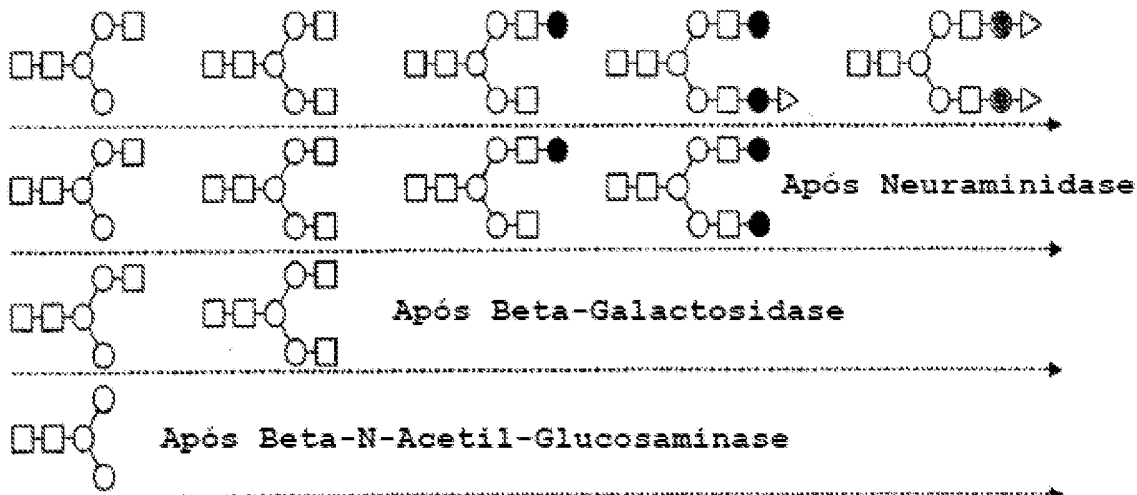


FIG. 1



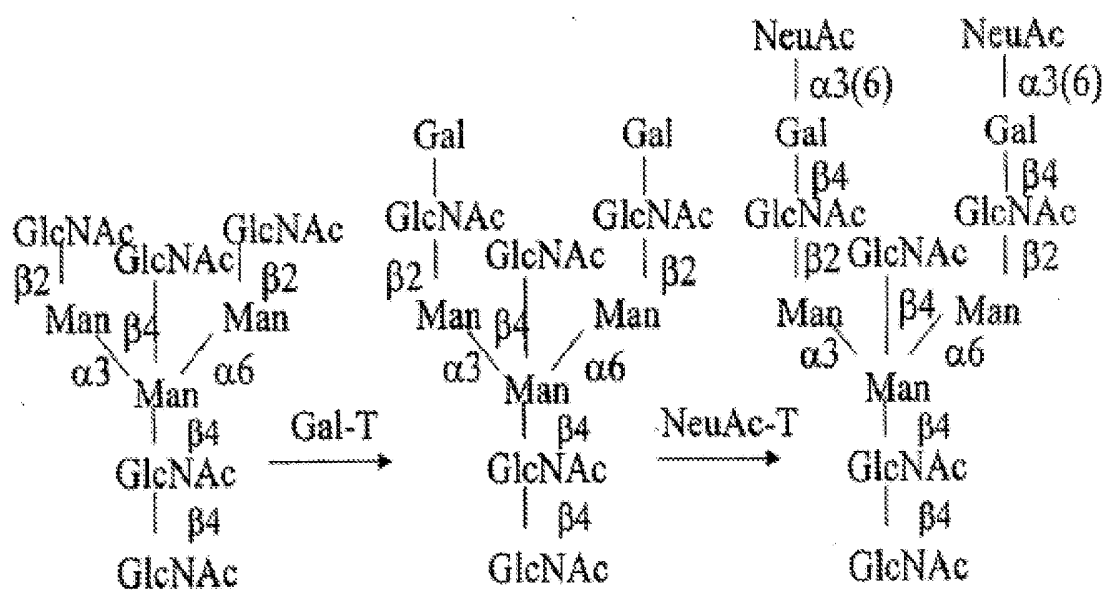


FIG. 3

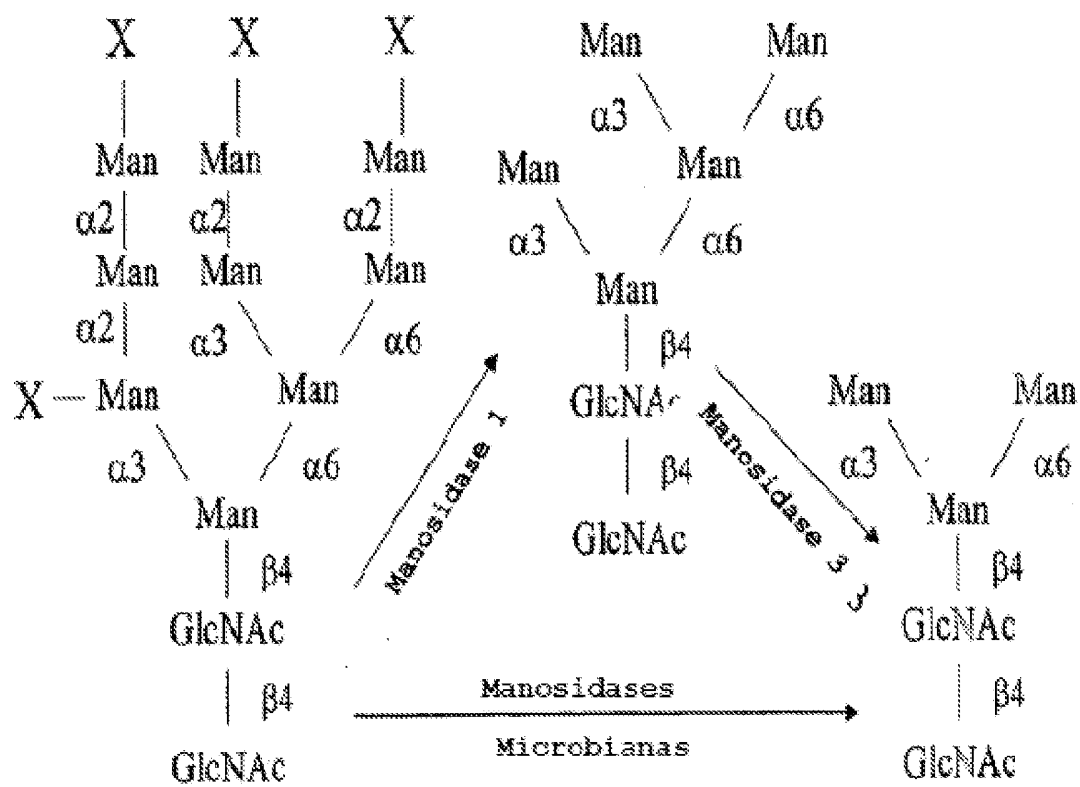


FIG. 4

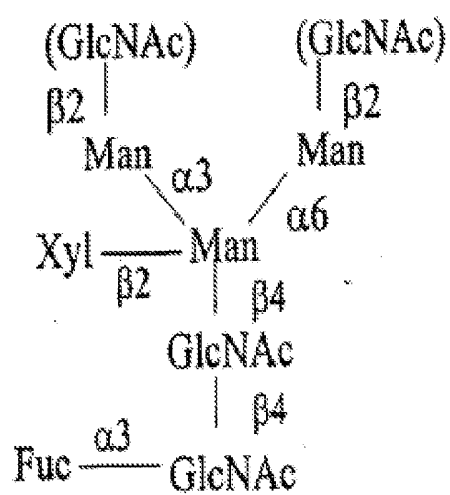


FIG. 5

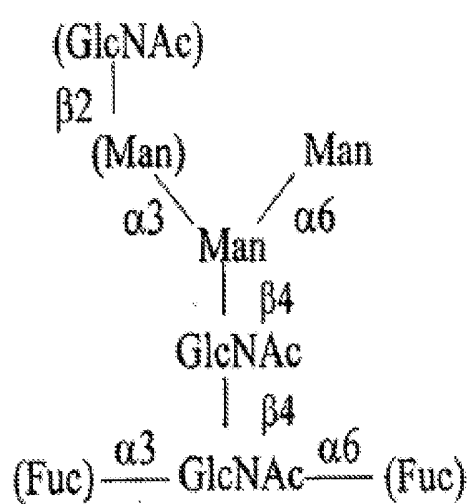
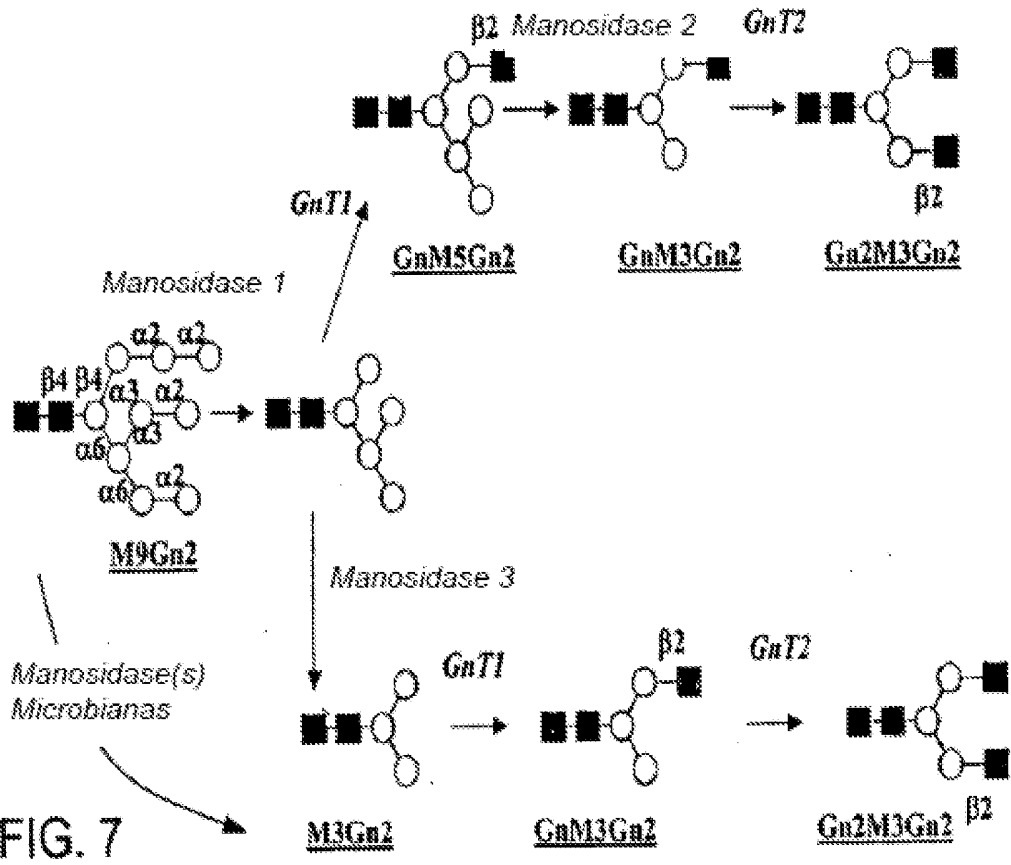


FIG. 6



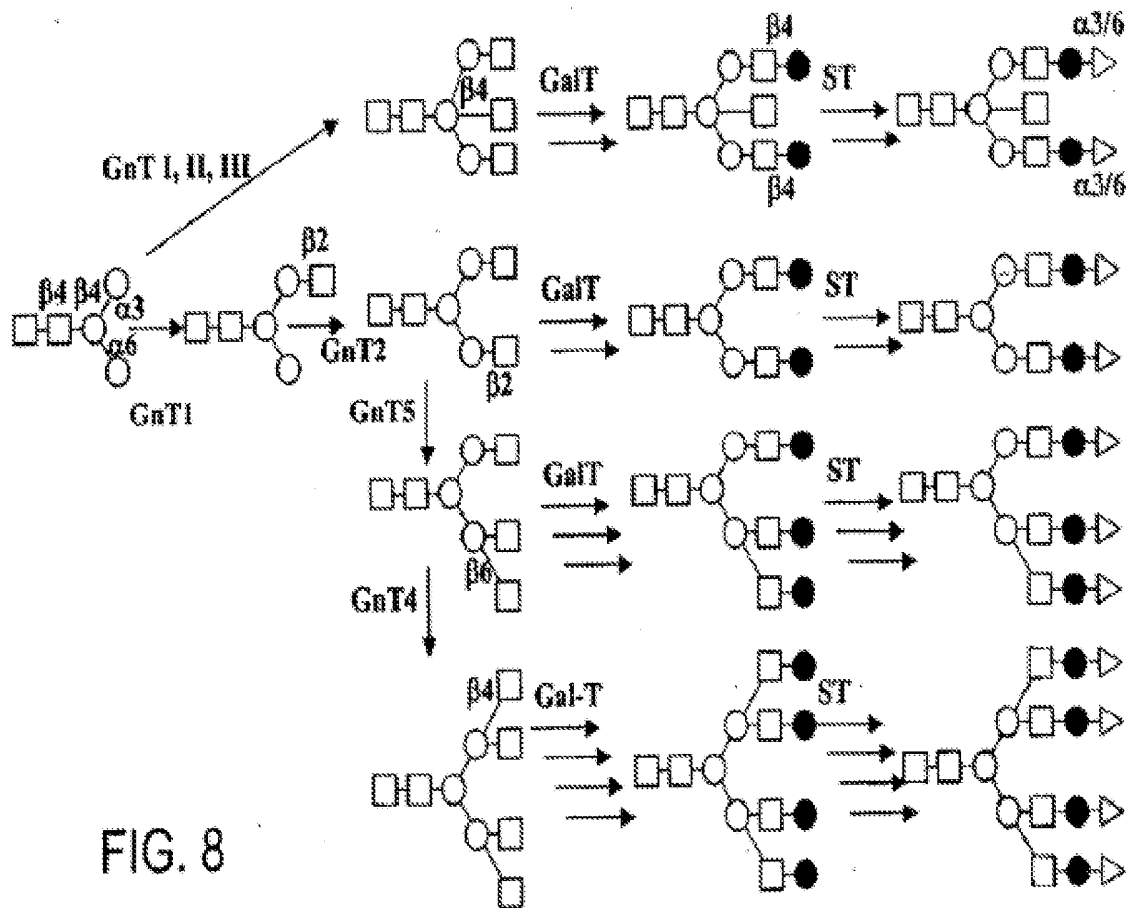


FIG. 8

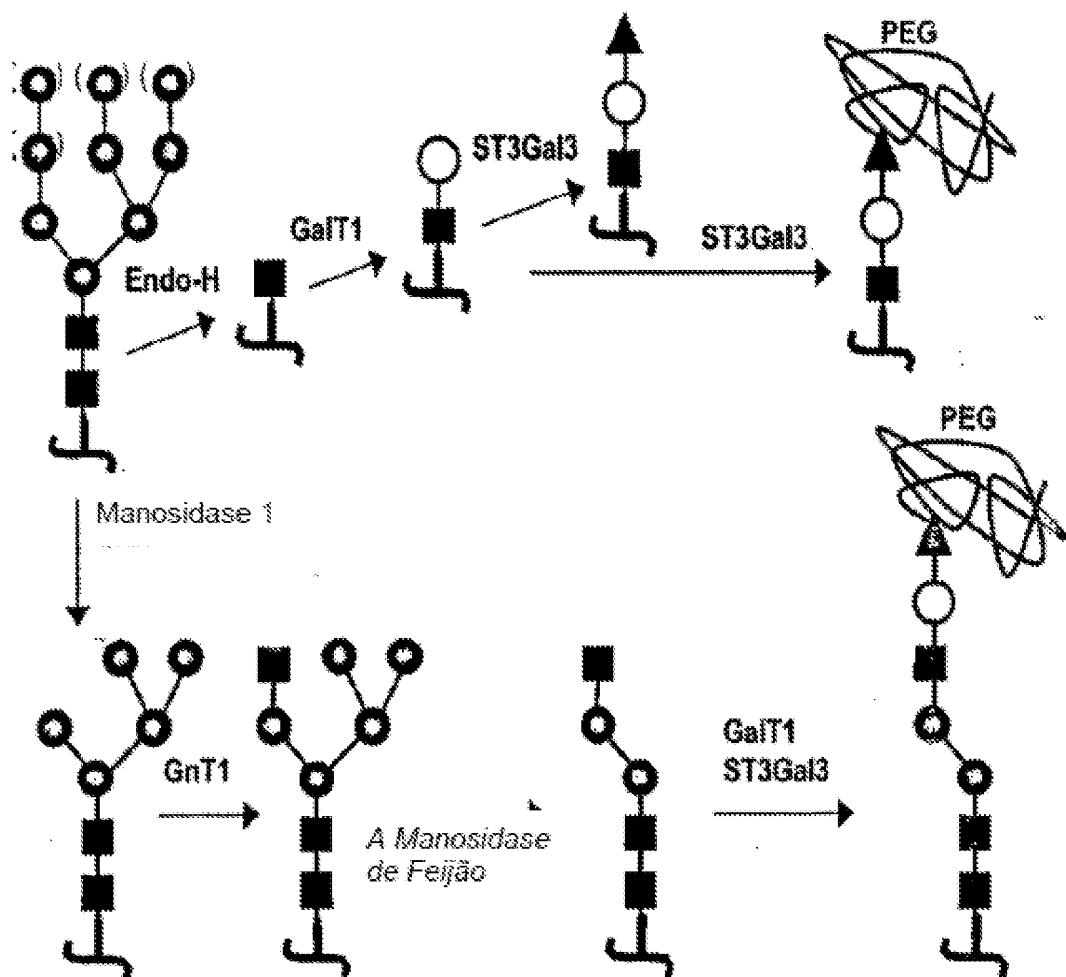
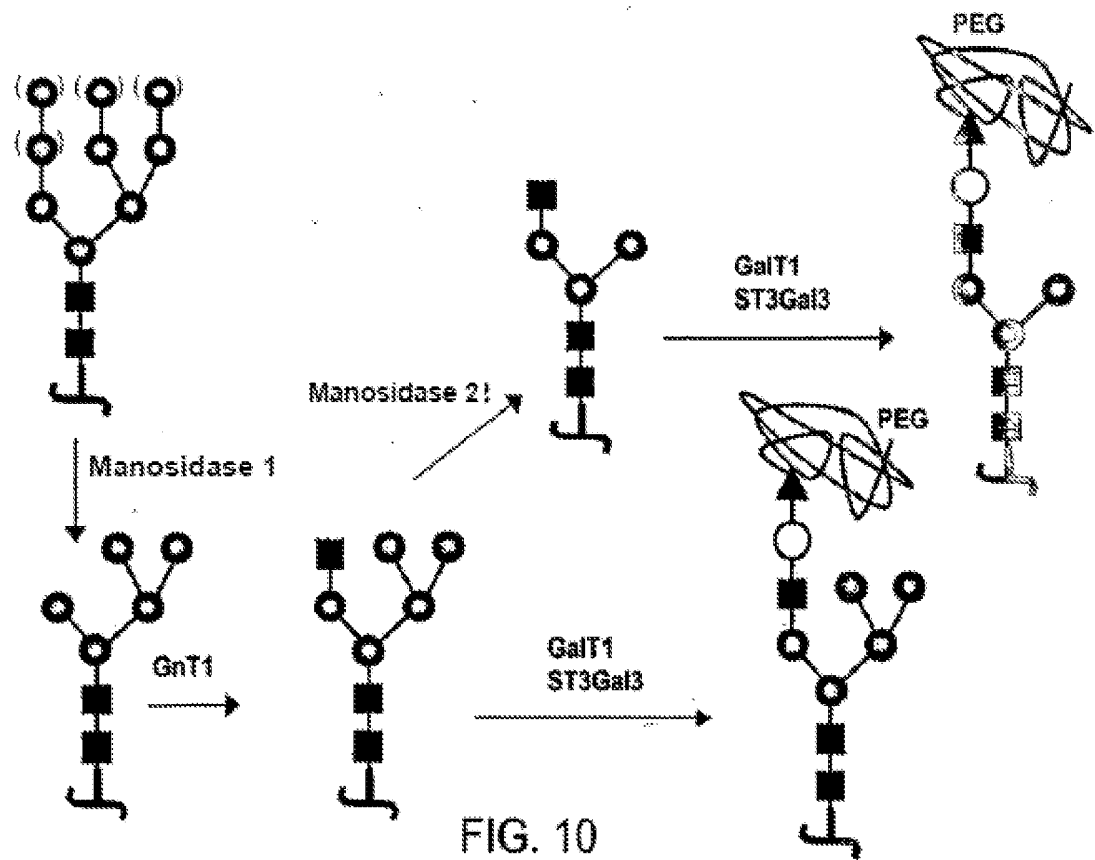
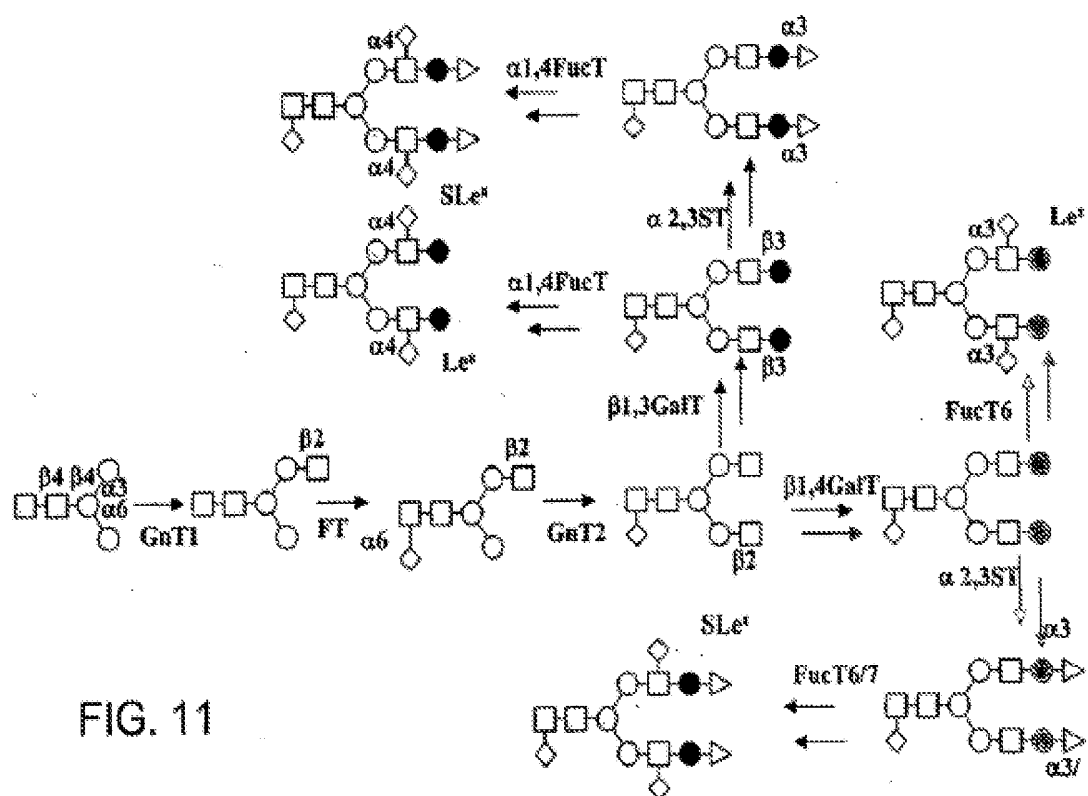
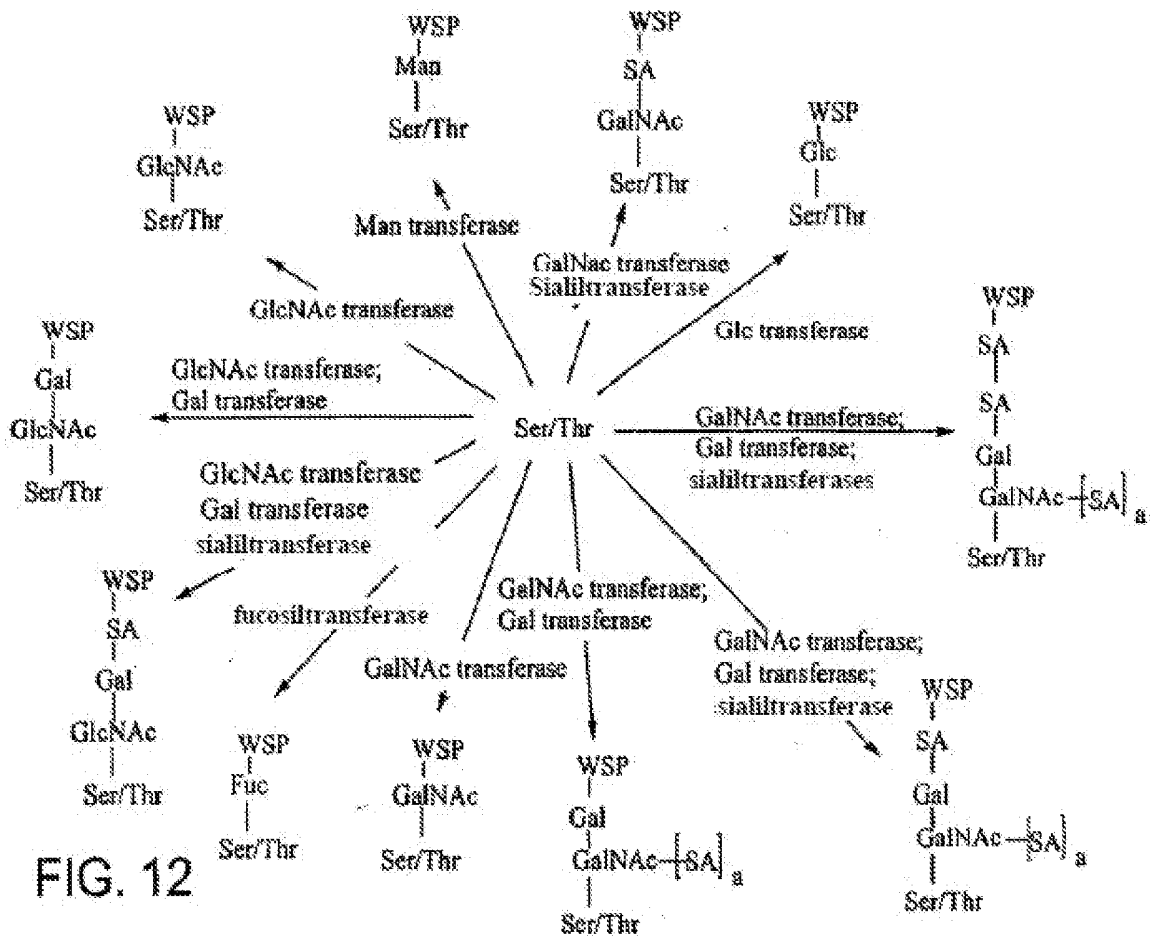


FIG. 9







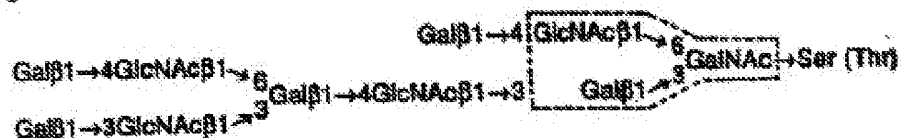
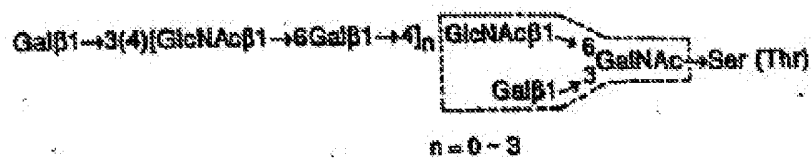
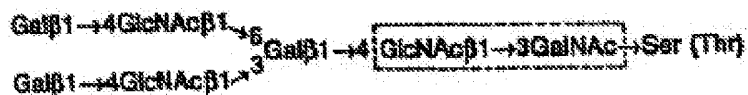
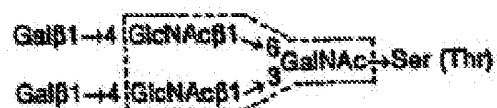
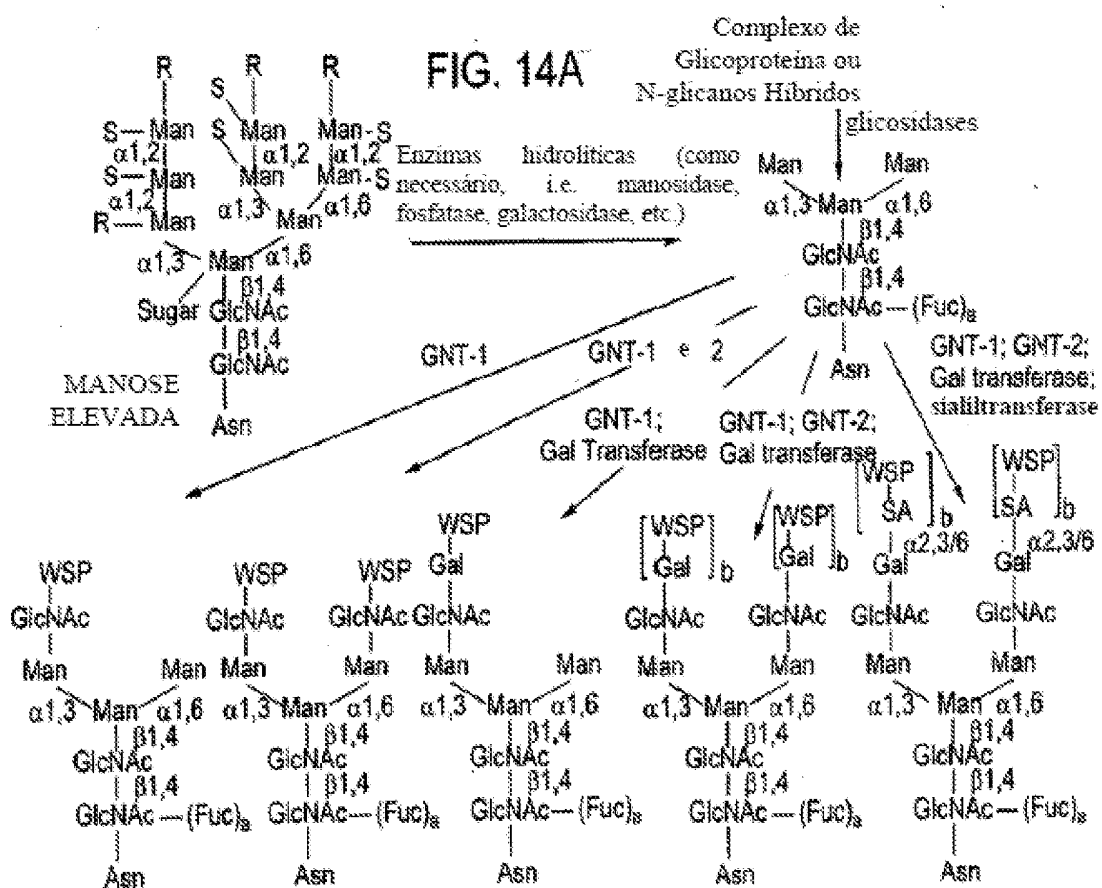
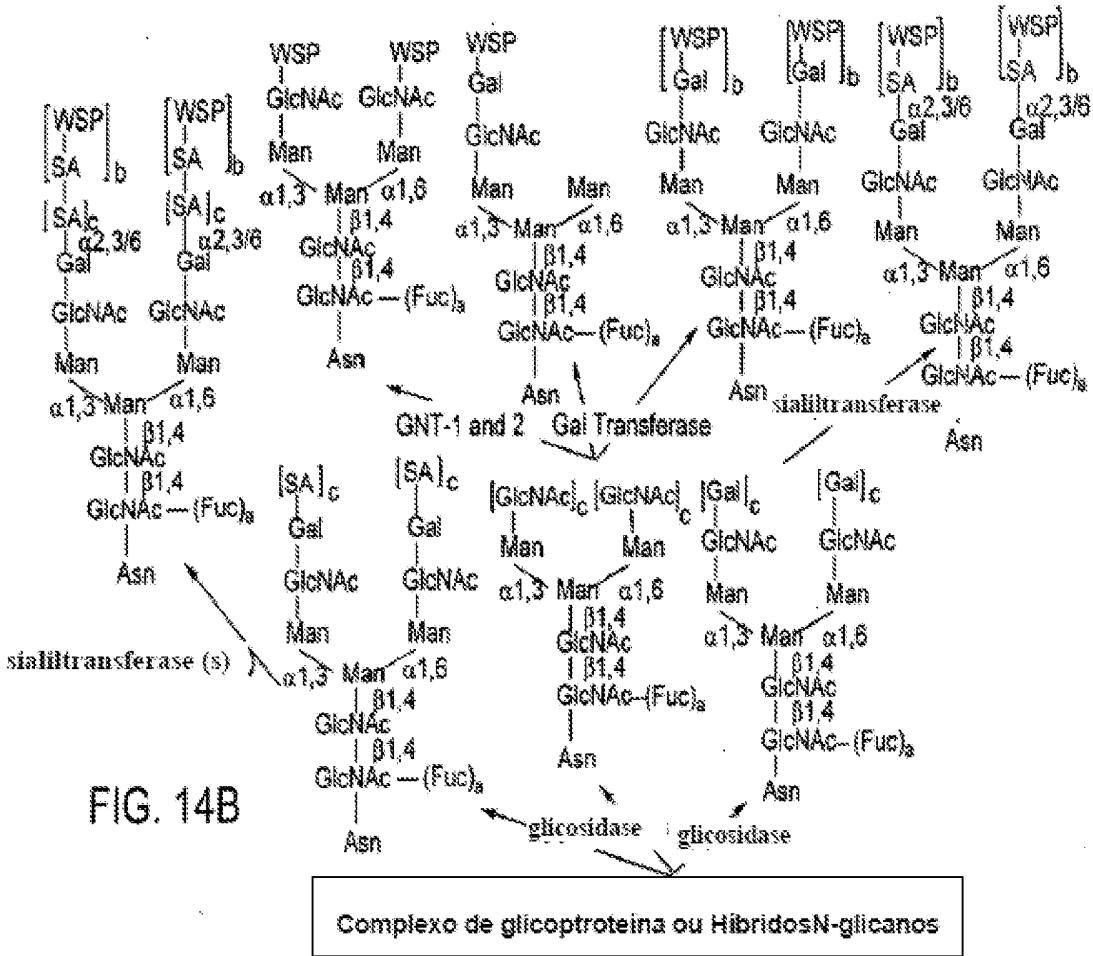
Núcleo 1*Núcleo 2**Núcleo 3**Núcleo 4*

FIG. 13

FIG. 14A





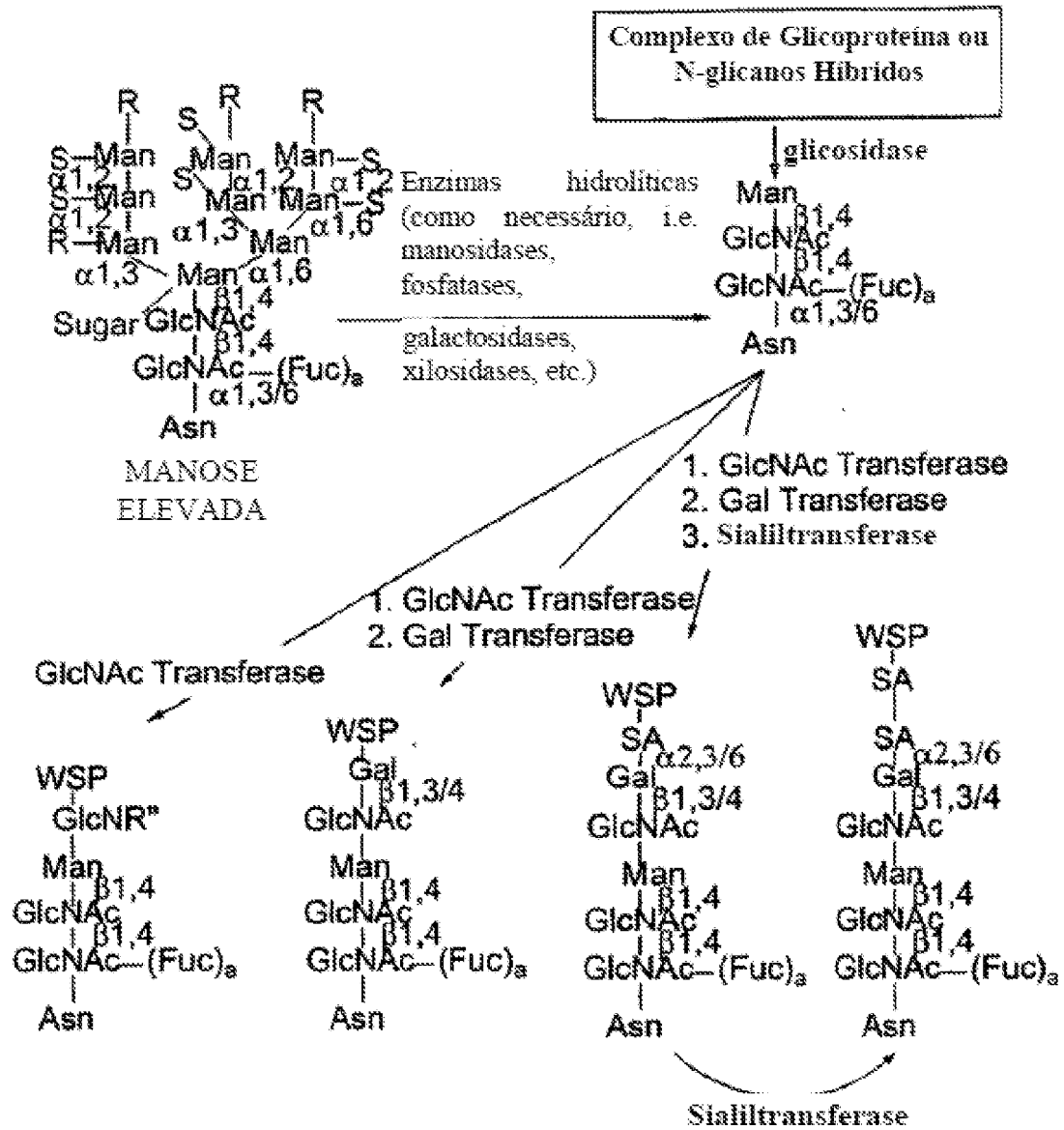


FIG. 15

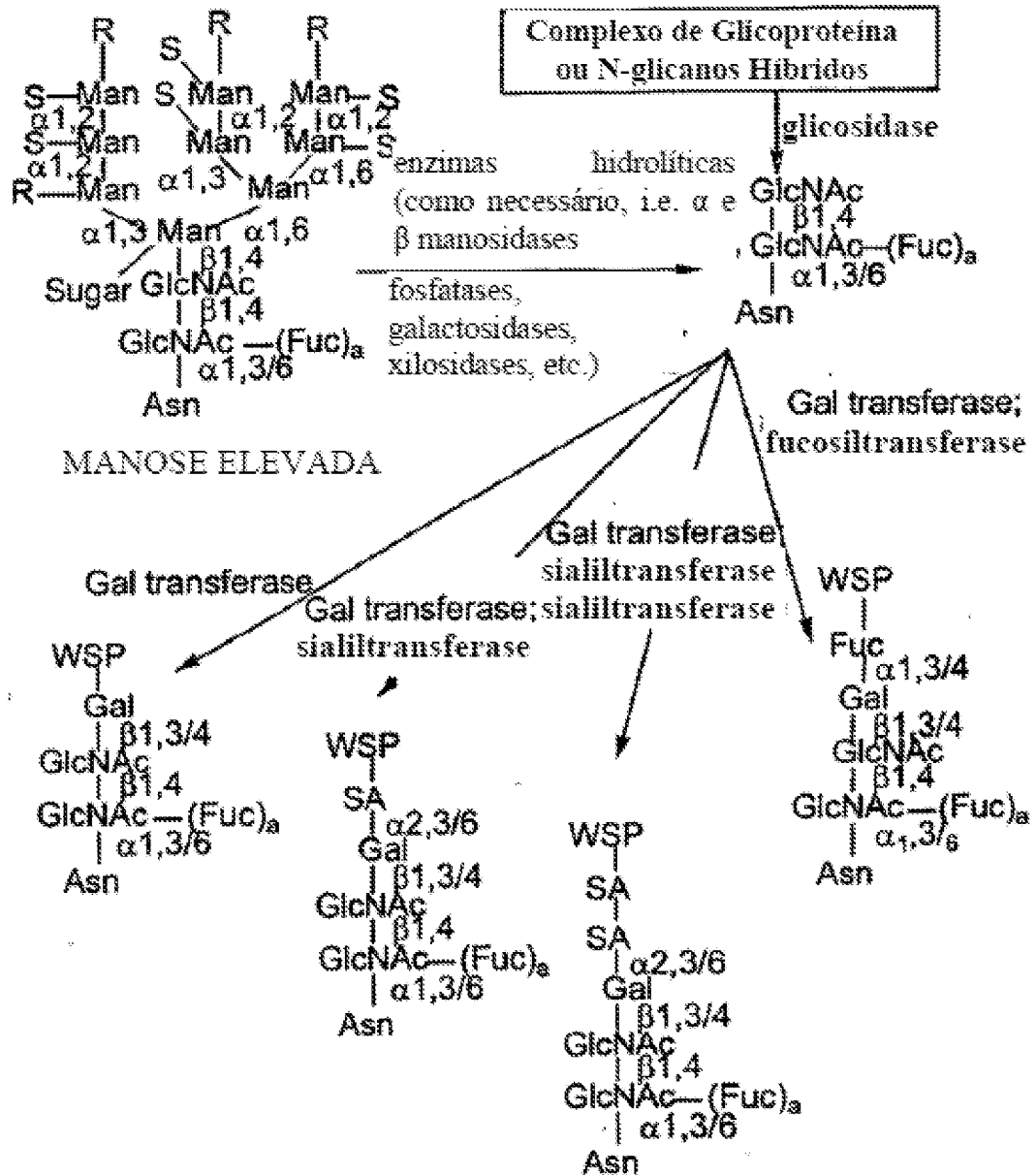


FIG. 16

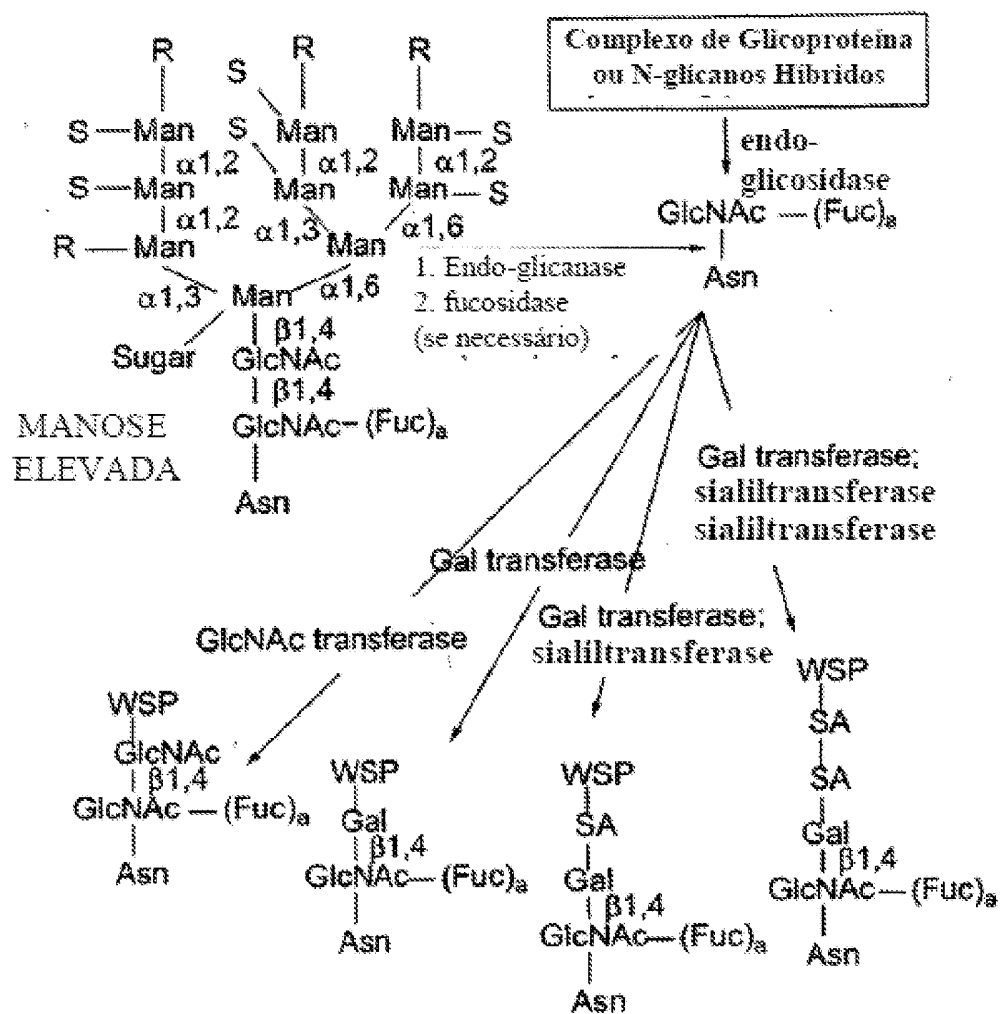
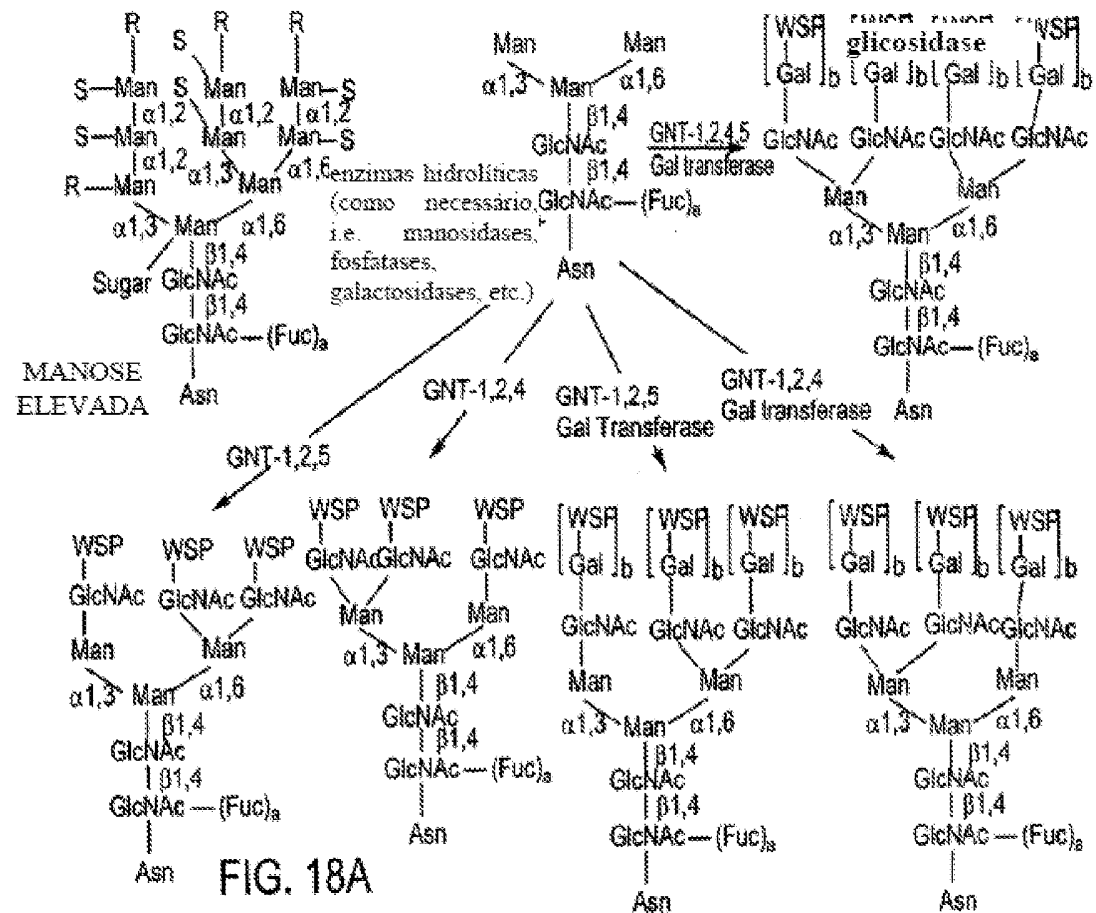
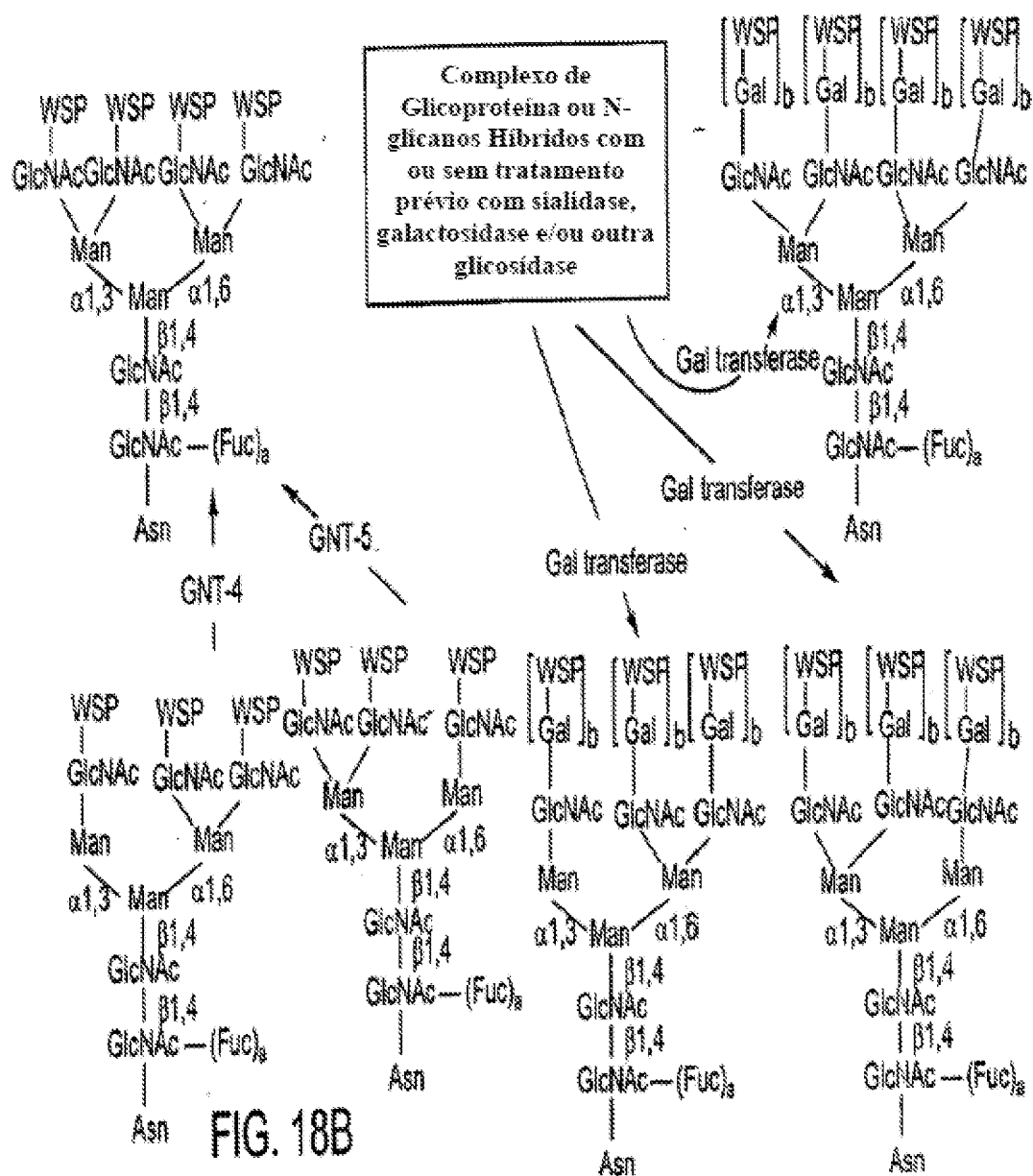
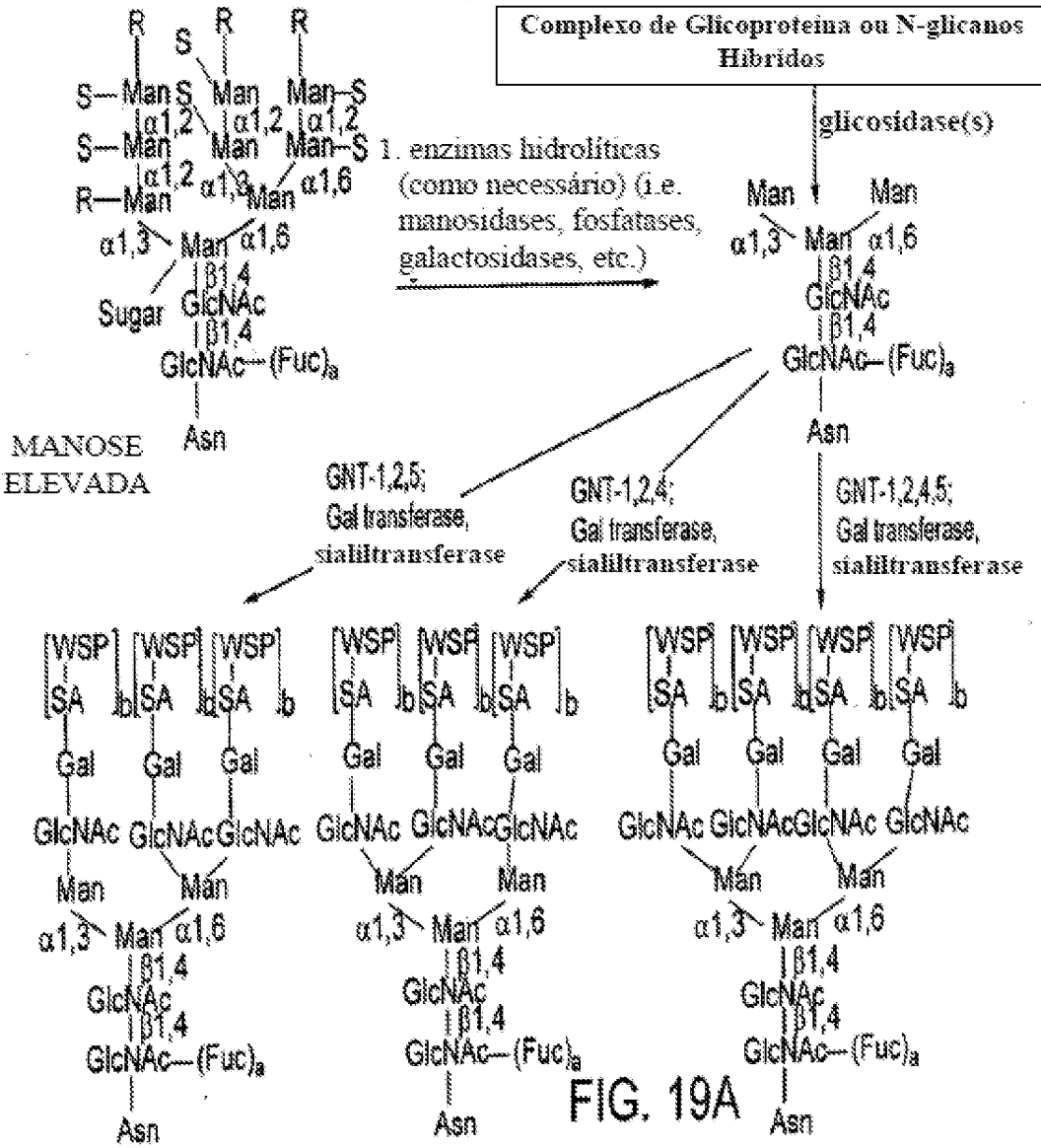
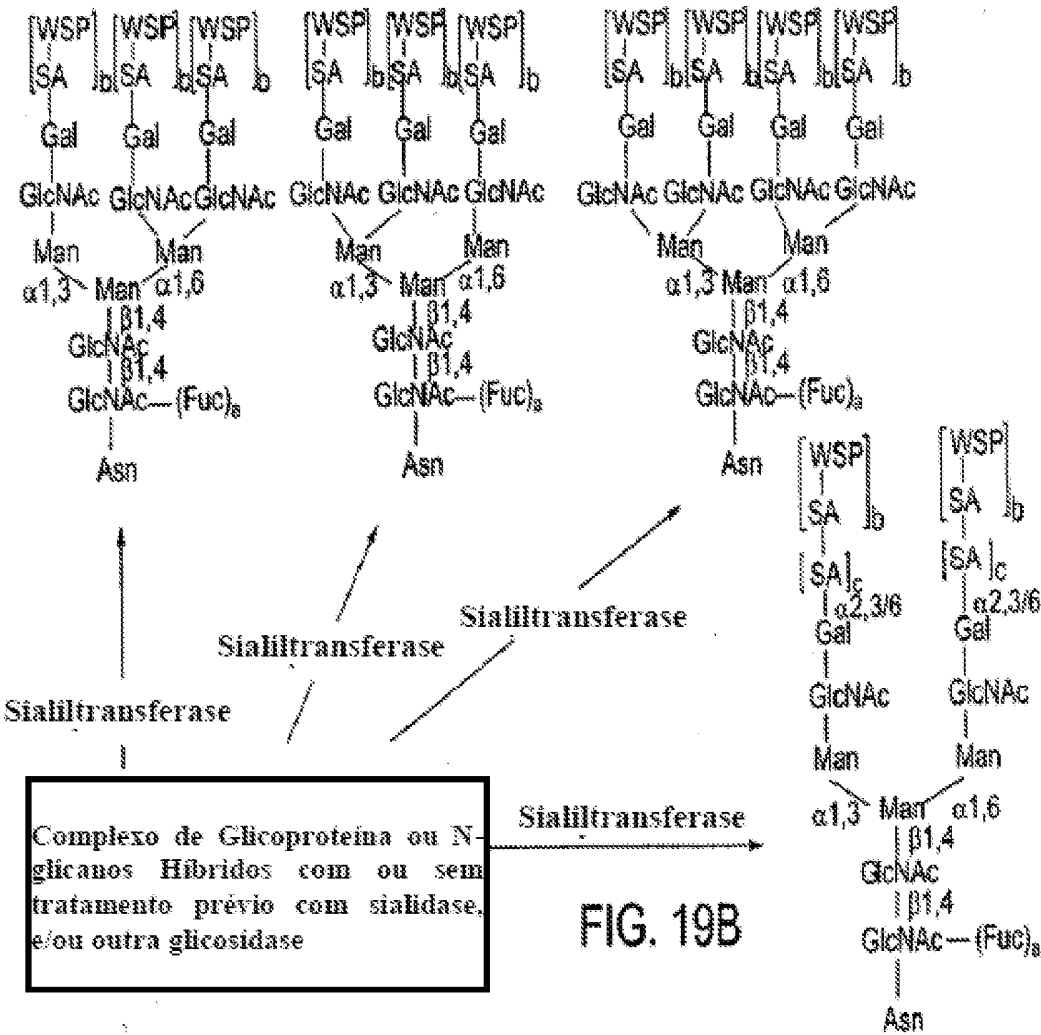


FIG. 17









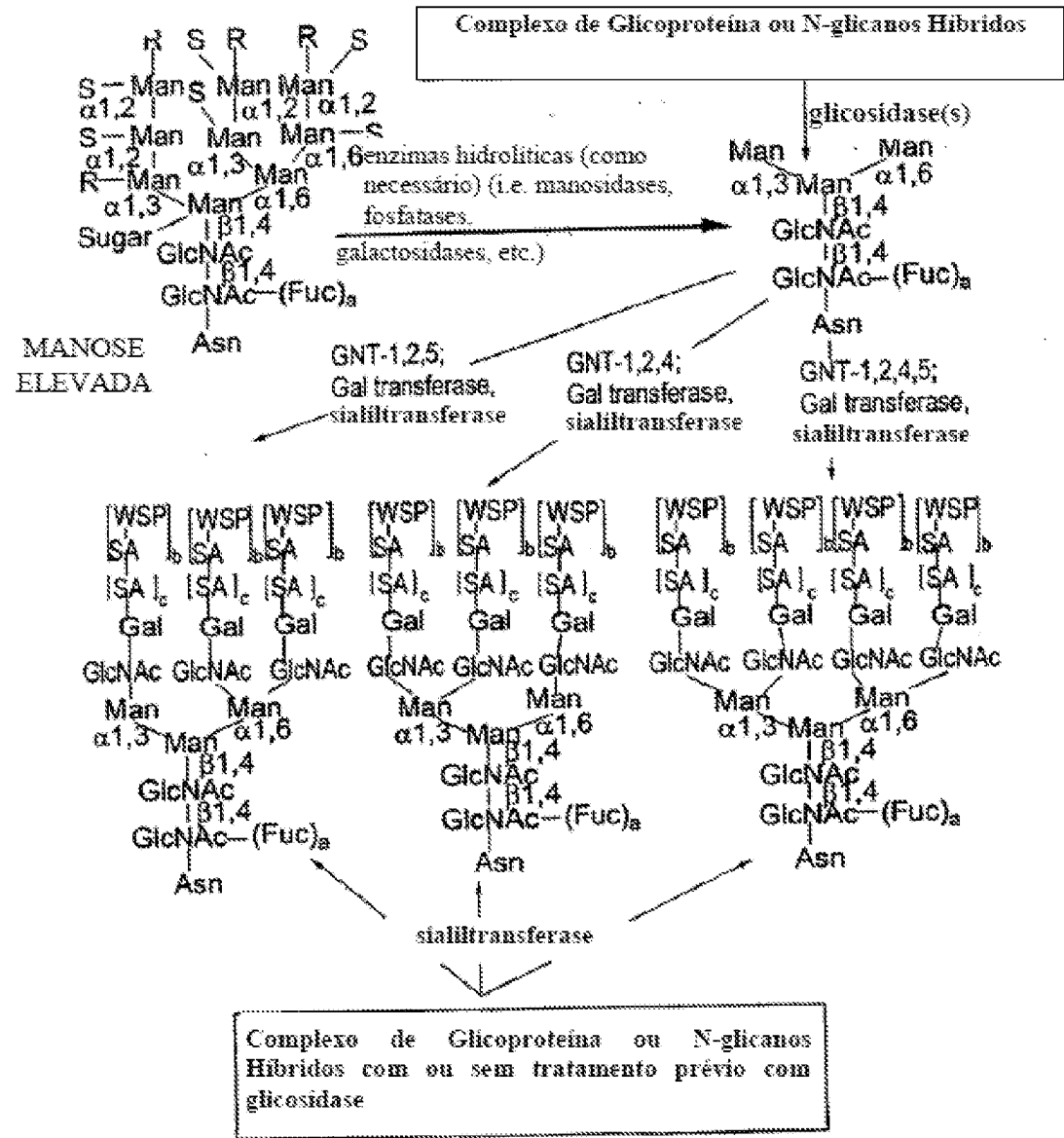
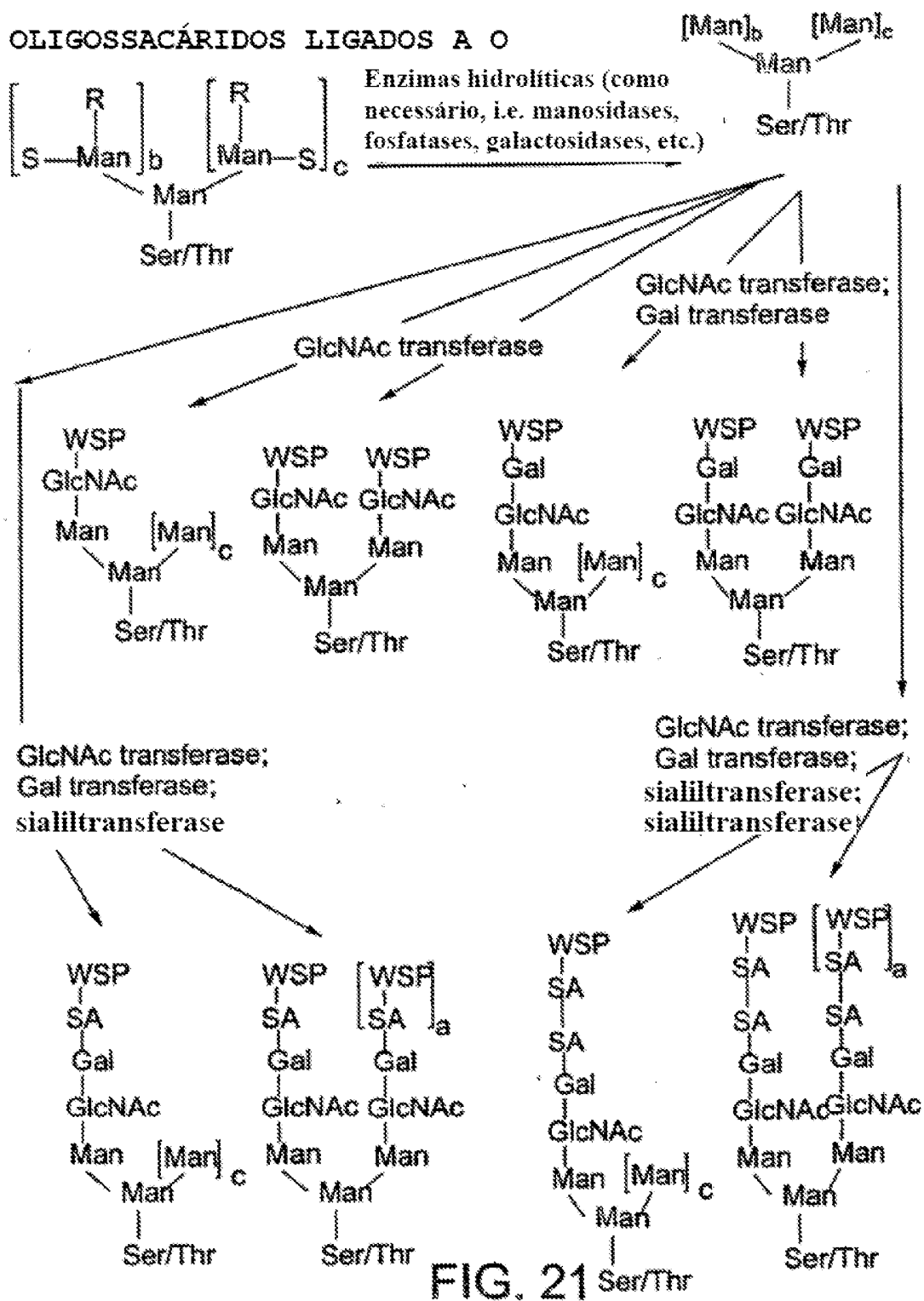
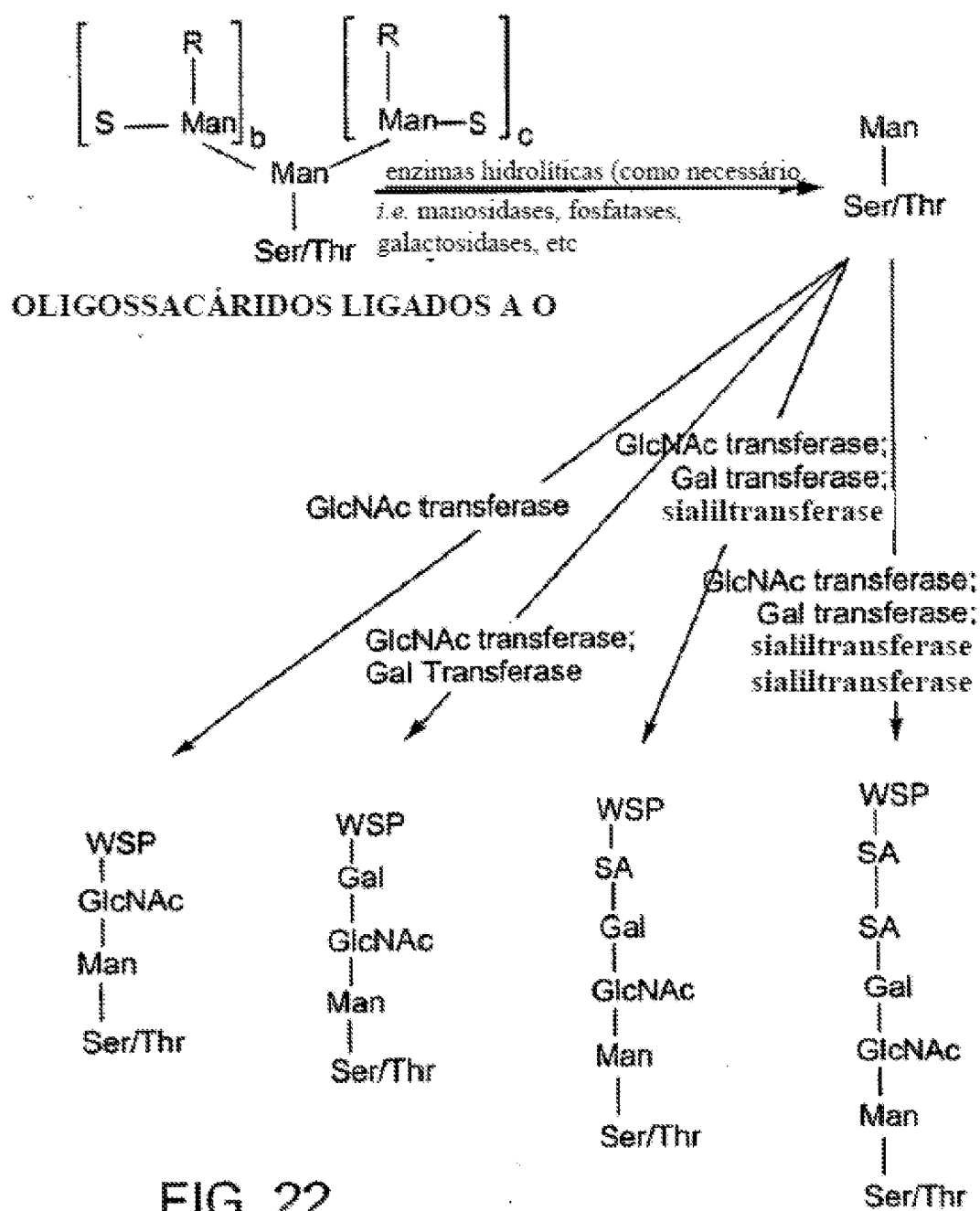


FIG. 20

OLIGOSSACÁRIDOS LIGADOS A O





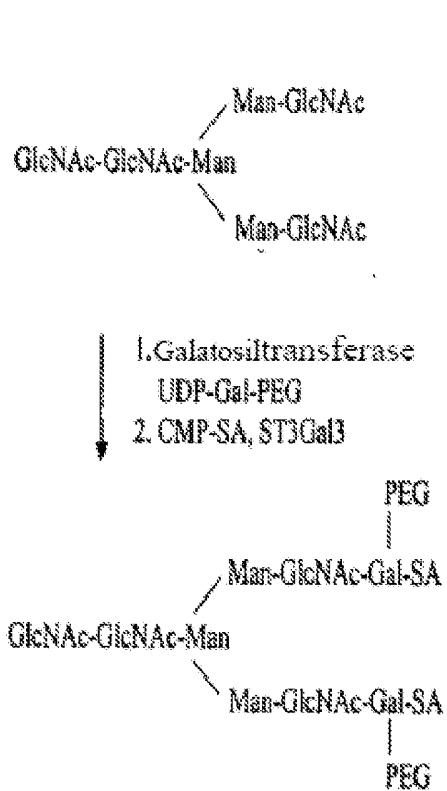


FIG. 23A

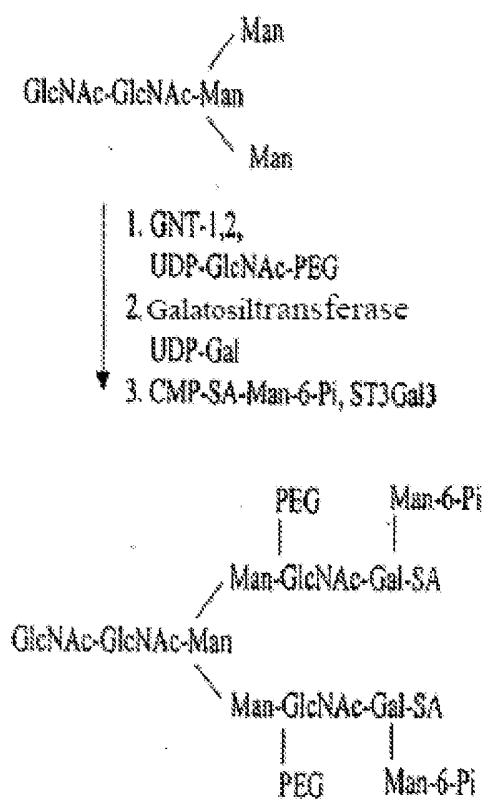


FIG. 23B

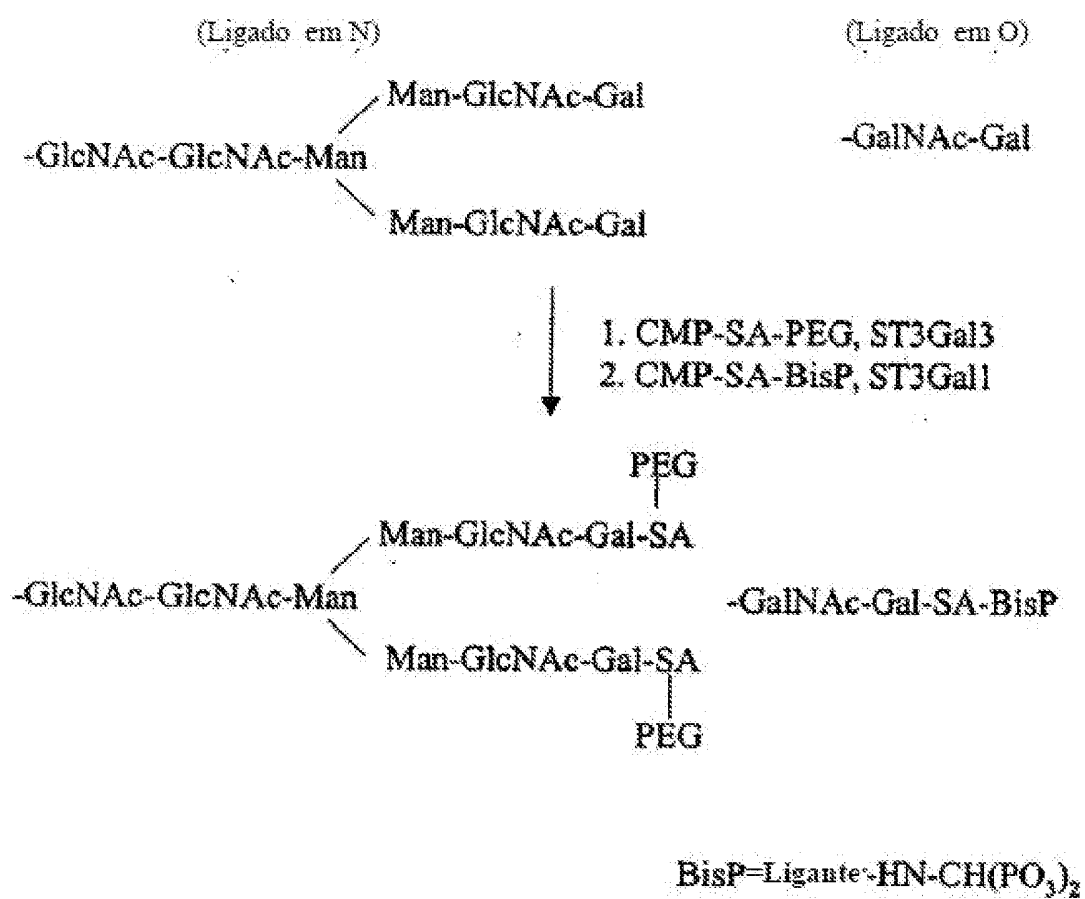


FIG. 23C

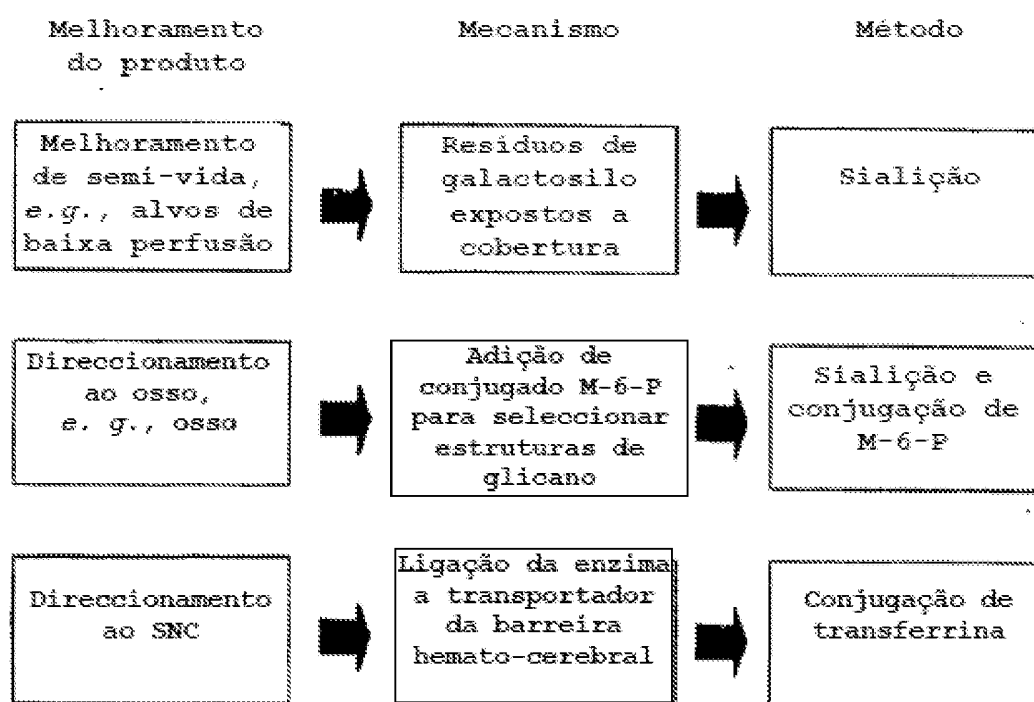


FIG. 24

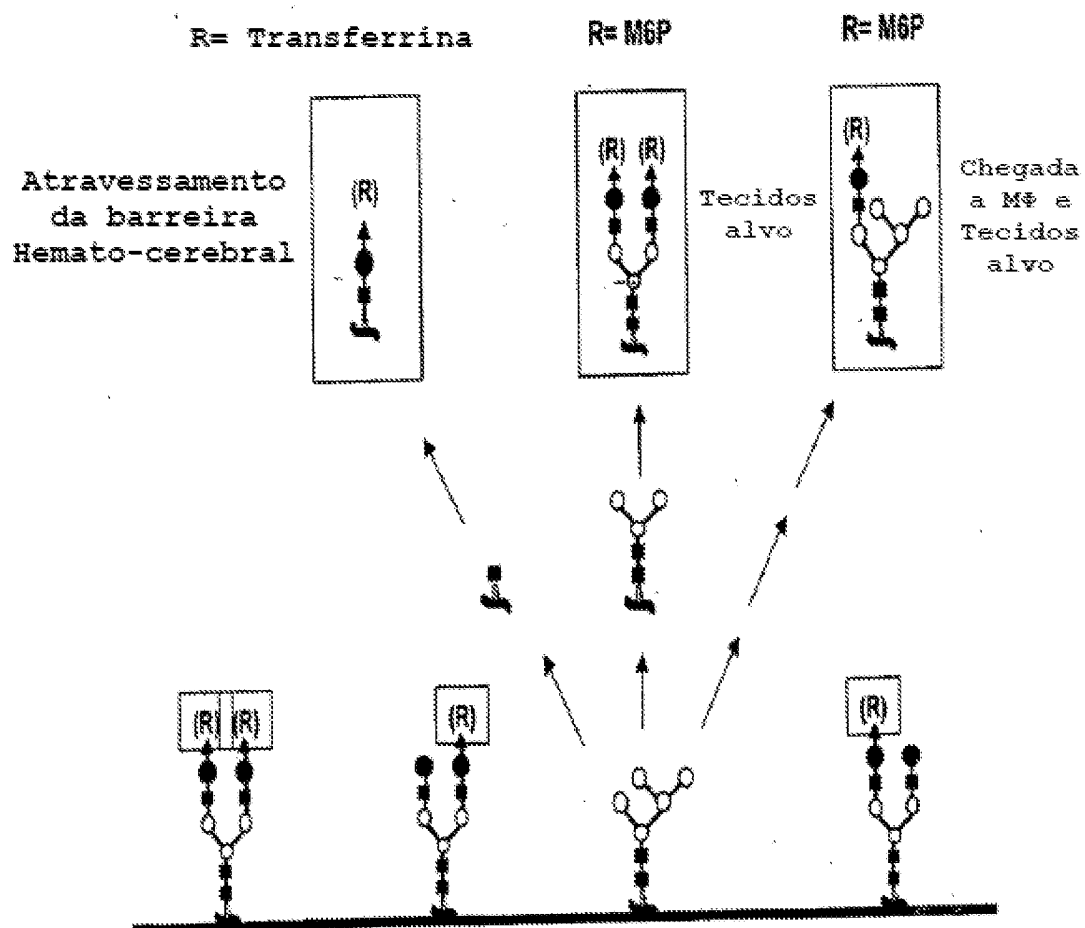


FIG. 25

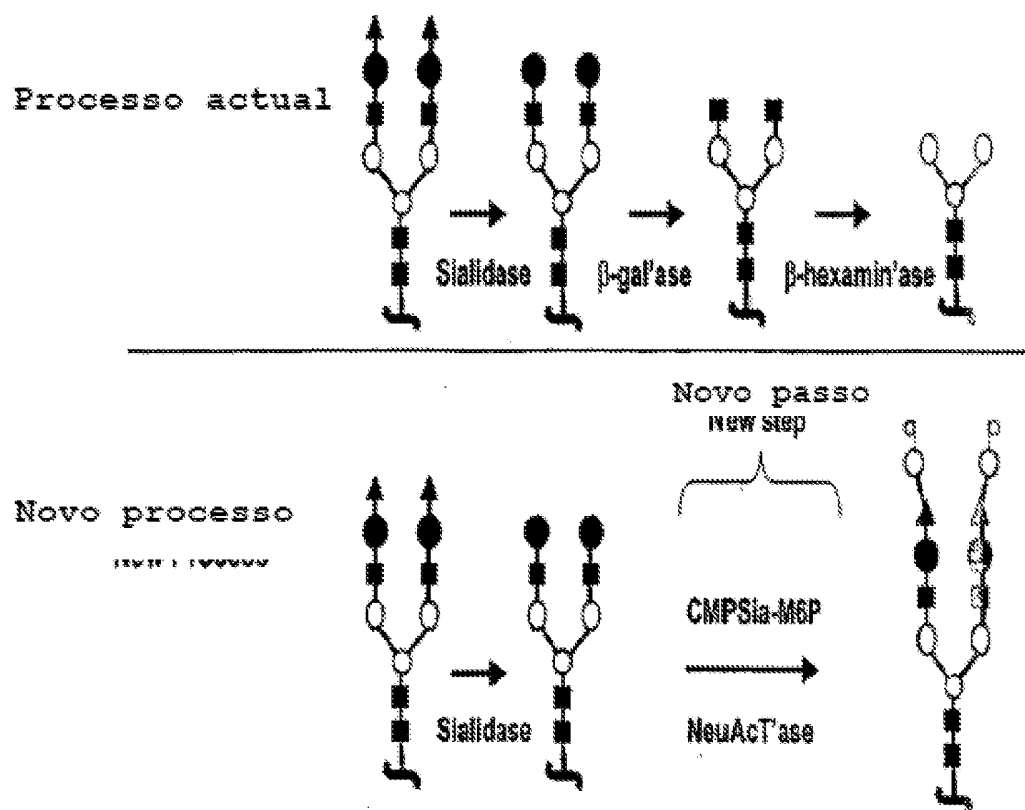


FIG. 26

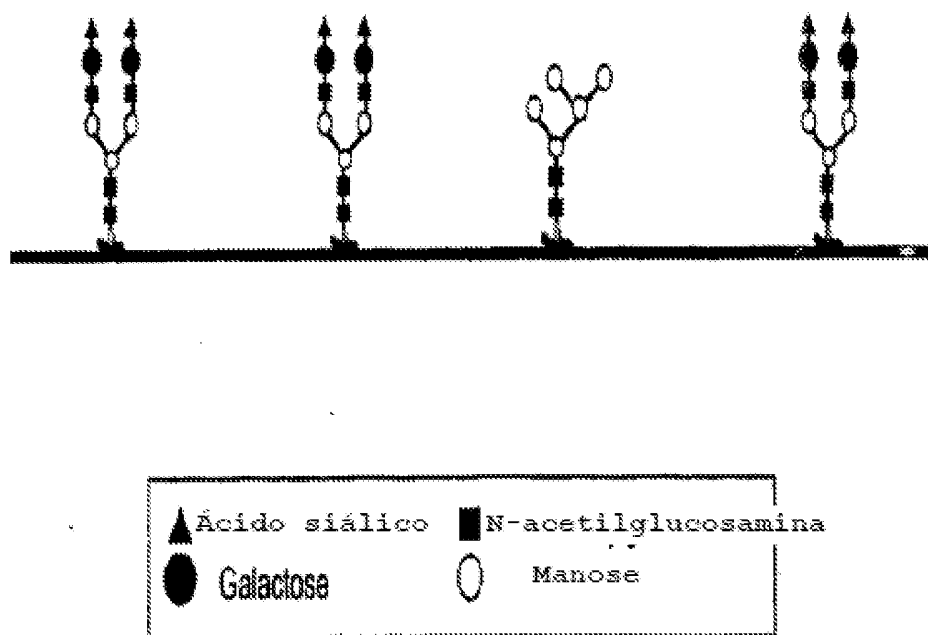
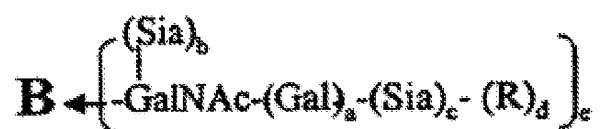
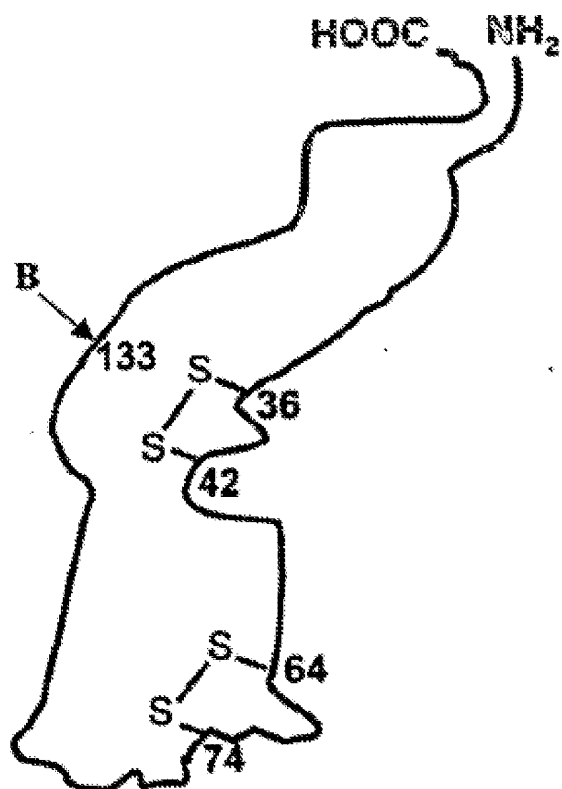


FIG. 27

Folistatina -Biotech Australia, Human Therapeutics	Glutamate descarboxilase - Genzyme Transgenics
folitropina alfa - Alkermes, Prolease, PowderJect, Serono, Akzo Nobel	Glicoproteína 83 - Kureha
Folitrpina beta - Bayer, Organon PB49	GM-CSF - Immunex
FSH - Ferring	GM-CSF -Powder Ject
FSH + LH - Ferring	Imunoterapêutico GnRH - Protherics
F-spondina - CeNeS	Goserelin (antagonista LhRH)- AstraZeneca
sistema de distribuição de proteínas de fusão - UAB Research Foundation	Antigénio gp75 - ImClone
toxinas de fusão - _Boston Life Sciences	Gp96 - Antigenics
G5598 - Genentech	GPI 0100 - Galenica
GAIL-Transkaryotic Therapies	GR 4001W93 - GlaxoSmithKline
Análogos do interferão gama-SRC VB VECTOR	Factor estimulador de coónias de granulócitos - Dong-A
Ganirelix - Roche	Conjugado de factor estimulador de coónias de granulócitos
Lipase gástrica - Meristem	Terapia de alergia a feno - Dynavax
Gavilimomab-	GRF1-44 - ICN
G-CSF - Amgen, SRC VB VECTOR	Factor de Crescimento - Chiron, Atrigel, Atrix, Innogenetics, Zymogenetics, Novo
GDF-1 - CeNeS	Péptidos de factor de crescimento - Biotherapeutics
GDF 5 - Biopharm	Hormona do crescimento, recombinante humana - Serono
GDNF (factor neurotrófico derivado da glia) - Amgen	GT 4086 - Glistech
Gelaolina - Biogen	GW 353430 - GlaxoSmithKline
Gemtuzumab ozogamicina - Celitech	GW 278884 - GlaxoSmithKline
Epoetina alfa activada por gene - Aventis Pharma - Transkaryotic Therapies	H11 - Viventia Biotech
Terapia génica de trombastenia de Glanzmann -	Vacina do virus da influenza A
Acetatode glatiramer - Yeda	HSN1 - Protein Sciences
Factor 2 de crescimento da glia- CeNeS	Hemoglobina - Biopure
GLP-1 - Amylin, Suntory, Thera Tech, Watson	Hemoglobina 3011, recombinante - Baxter Healthcare
Análogos do péptido GLP-1 - Zealand Pharmaceuticals	Crosumarilo de hemoglobin - Baxter Intl.
Glucagão - Eli Lilly, ZymoGenetics	Hemoglobina estabilizada - Ajinomoto
Péptido do tipo glucagão - Amylin	Hemoglobina, recombinante - Apex
Glucocerebrosidase - Genzyme	HAF - Resposta imunitária
	Vacina Hantavirus
	HB 10
	HSNF - Regeneron
	Hcc-1 - Pharis
	hCG Milkhaus

FIG. 27 L



a-c, e (independentemente
seleccionados) = 0 ou 1;

d=0;

R=grupo de modificação, sialilo

FIG. 29A

células CHO, BHK, 293, G-CSF expressas em
células Vero
a-c, e (independentemente seleccionados) =0 ou
1; d=0;



1. Sialidase
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal1

a-d, e (independentemente seleccionados) =0 ou
1; _R=PEG;

FIG. 29B

G-CSF expressas em células de insecto
a, e (independentemente seleccionados) =0 ou
1; b, c, d=0.



1. Galactosiltransferase, UDP-Gal
2. CMP-SA-PEG, ST3Gal1

a, c, d, e (independentemente seleccionados) =
0 ou 1; R=PEG;

FIG. 29C

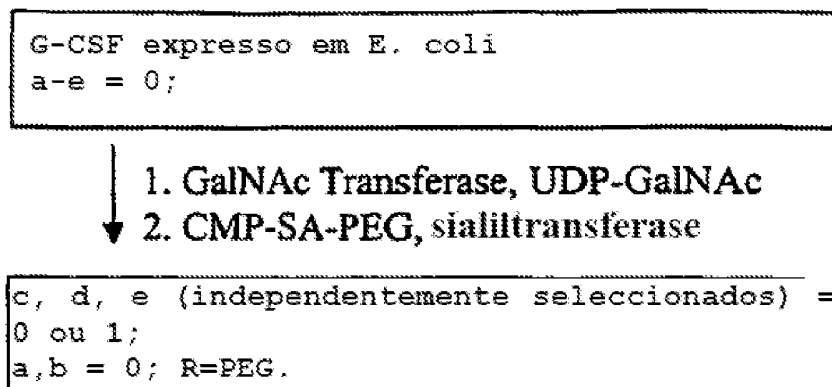


FIG. 29D

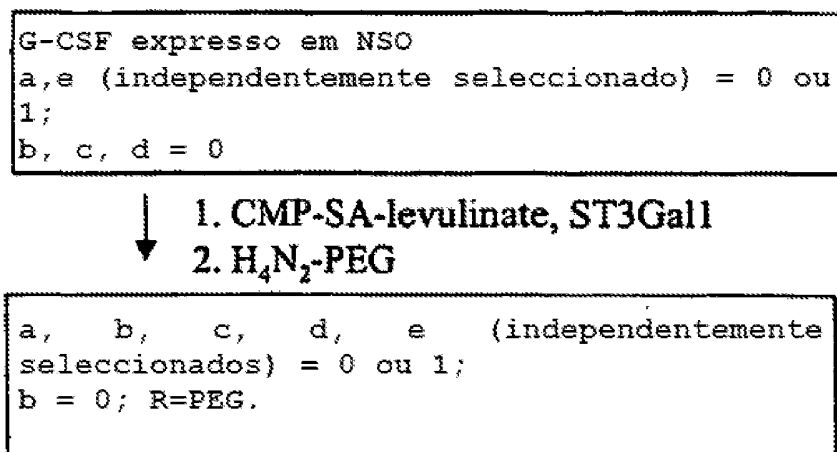


FIG. 29E

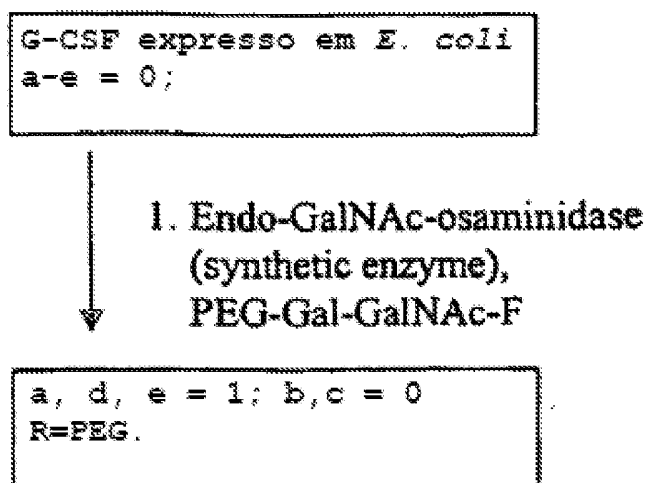


FIG. 29F

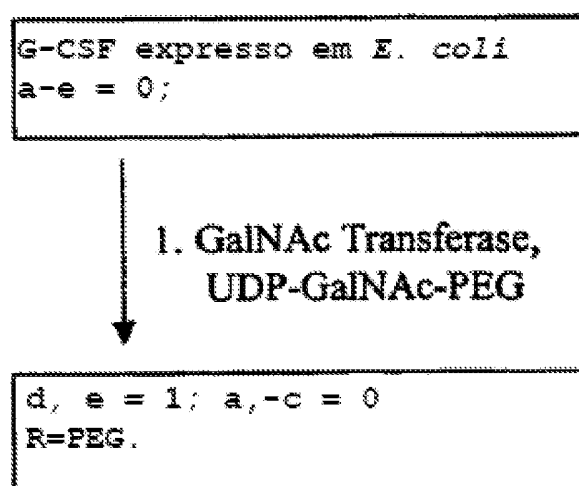


FIG. 29G

FIG. 58A

ACCCCCCTGGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAT
GCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAG
GAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGT
GCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTG
CCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATA
GCGGCCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCT
CCCCCGAGTTGGGTCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCG
ACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCC
CCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCT
TTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAG
CTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCCCTG
A

FIG. 58B

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu
Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr
Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro
Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser
Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe
Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro
Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val
Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His
Leu Ala Gln Pro

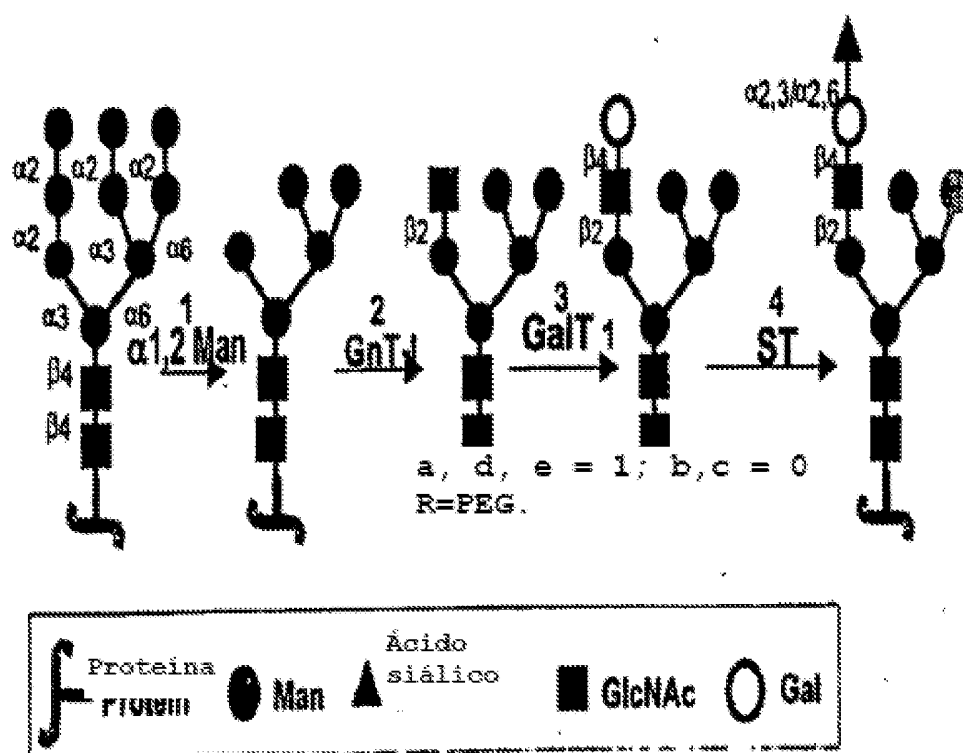


FIG. 181

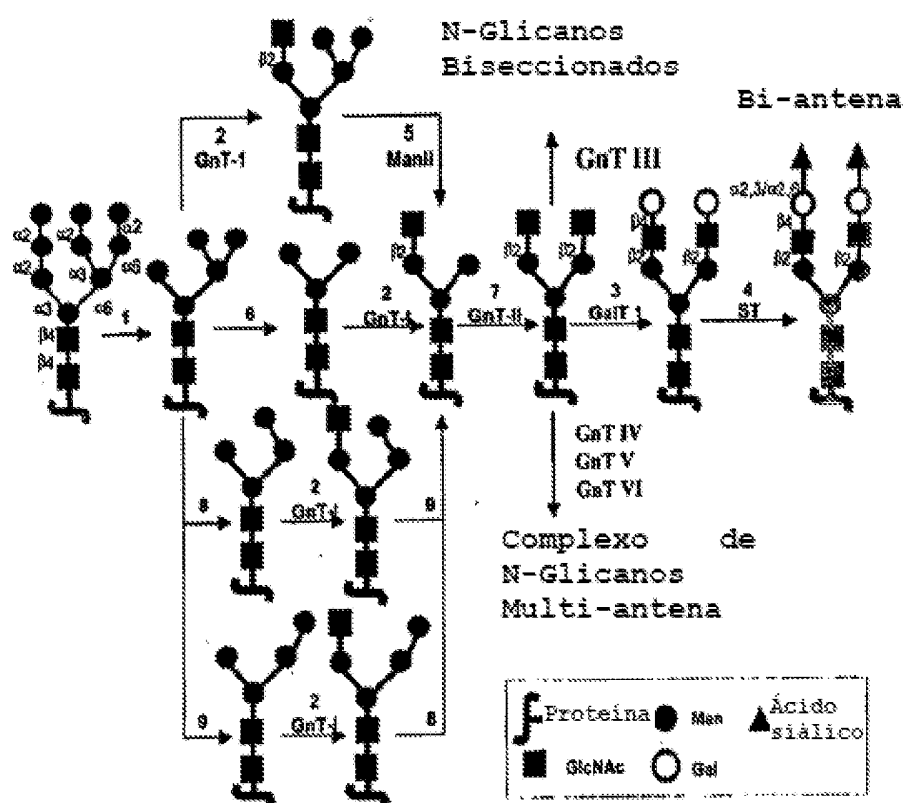


FIG. 188

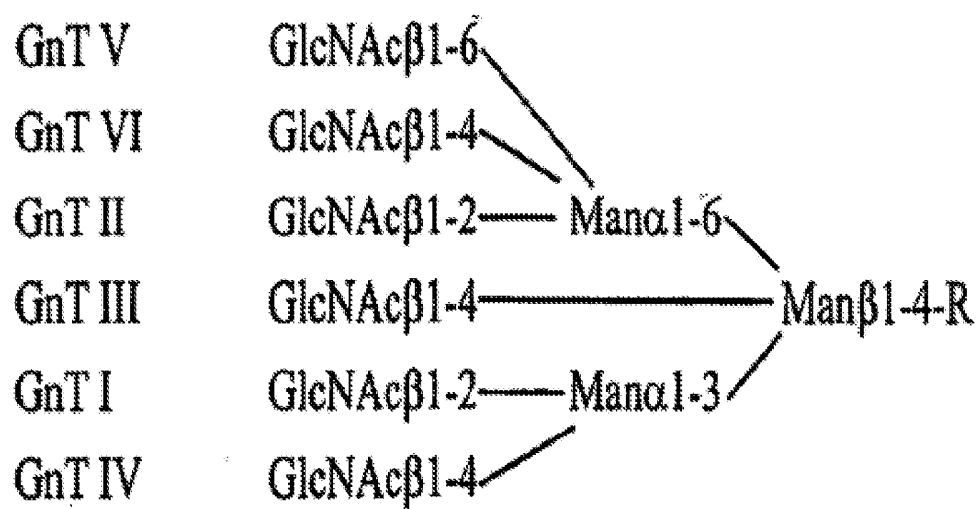


FIG. 189

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- | | |
|---------------------------|------------------------------|
| * WO 9922764 A | * US 5529914 A |
| * WO 9858964 A | * US 4522811 A, Eppstein |
| * WO 9954342 A | * US 4894330 A, Hershenson |
| * US 5047335 A | * WO 9615581 A |
| * US 4179337 A, Davis | * WO 9218135 A, Bednarski |
| * WO 8315189 A, Veronese | * US 5965106 A, Pomato |
| * US 4088538 A | * WO 9632491 A |
| * US 4496689 A | * US 5352870 A |
| * US 4414147 A | * US 5374541 A |
| * WO 8700056 A | * US 5545553 A |
| * EP 154316 A | * US 5658567 A |
| * US 4056635 A | * US 5580757 A |
| * WO 9405332 A, M'Timkulu | * US 6326458 B |
| * WO 9646731 A, Bona | * US 6217873 B |
| * US 5876980 A | * US 6174530 B |
| * US 6030815 A | * US 6001364 A |
| * US 5728554 A | * US 3969287 A |
| * US 5922577 A | * US 3691016 A |
| * WO 9831826 A | * US 5766883 A |
| * US 5716812 A, Wilthers | * US 5380712 A |
| * US 5405753 A, Brossmer | * US 5223409 A |
| * US 5432059 A, Bean | * US 5198346 A |
| * WO 9216640 A | * US 5096815 A |
| * WO 8705330 A | * US 6365410 B |
| * US 4806595 A, Noishiki | * US 6171820 B |
| * US 5672662 A | * US 5605793 A |
| * US 6376904 B | * US 5811238 A |
| * WO 9945964 A | * US 5830721 A |
| * WO 9621469 A | * US 5834252 A |
| * US 5932482 A | * US 5837458 A |
| * US 5446090 A | * US 5985408 A |
| * WO 9934833 A | * US 6180406 B |
| * WO 9914259 A | * US 6165793 A |
| * US 6348558 B | * US 6132970 A |
| * WO 9417039 A | * US 6117679 A |
| * US 5324844 A | * US 6096548 A |
| * WO 9418247 A | * US 6361974 B |
| * WO 9404193 A | * US 4683195 A, Mullis |
| * US 5219564 A | * US 4683202 A, Mullis |
| * US 5122614 A | * US 5374655 A |
| * WO 9013540 A | * US 4761371 A |
| * US 5281998 A | * US 5503744 B |
| * WO 9415625 A | * US 6096529 A |
| * WO 9409027 A | * US 6210933 B |
| * US 4412989 A | * WO 9949051 A |
| * US 4826945 A, Cohn | * US 20022042369 A |
| * US 4436253 A, Casey | * US 6168937 B, Eibalm |
| * US 5202413 A, Spina | * US PN5545553 A, Gotschlich |
| * US 5410016 A, Hubbell | * US 5032519 A |

- US 5641668 A
- CA 9801180 W
- WO 9931224 A
- EP 45573 A
- US 4931373 A, Kawasaki
- US 4599311 A, Kawasaki
- US 784653 A, Irani and Kilgore
- CA 1304020
- EP 284044 A
- WO 9717450 A
- WO 9717451 A
- WO 9802536 A
- WO 9802565 A
- US 5252726 A
- US 4935349 A
- EP 0244234 A
- EP 96430 A
- EP 96910 A
- EP 361991 A
- EP 413822 A
- US 5633146 A
- WO 8304050 A1
- EP 0096910 A
- EP 0241435 A
- EP 0301670 A
- EP 0361991 A
- WO 0020555 A
- EP 394538 A
- US 5162228 A
- US 4486533 A
- EP 385391 A
- US 4713339 A
- US 4784950 A
- US 4579821 A
- US 4656134 A
- US 6210966 B
- US 6090584 A
- US 5871986 A
- US 5759809 A
- US 5753220 A
- US 5750383 A
- US 5731182 A
- US 5728580 A
- US 5583023 A
- US 5571708 A
- US 5521299 A
- US 5516657 A
- US 5475090 A
- US 5472858 A
- US 5348886 A
- US 5322774 A
- US 5278050 A
- US 5244805 A
- US 5229293 A
- US 5194376 A
- US 5179007 A
- US 5169784 A
- US 5162222 A
- US 5155037 A
- US 5147788 A
- US 5110729 A
- US 5077214 A
- US 5023328 A
- US 4878236 A
- US 4745051 A
- US 20020100077 A
- US 5767379 A
- US 5650554 A
- US 5792922 A
- US 5948682 A
- US 6288304 B
- US 20020037303 A
- US 5856452 A
- US 5811634 A
- US 6210736 B
- US 5849992 A
- US 5843705 A
- US 5827690 A
- US 6222094 B
- US 5162215 A
- US 6423488 B
- US 20020064835 A
- US 6245539 B
- US 5606031 A
- US 5420027 A
- US 5151511 A
- US RE33853 E
- US 20020137134 A
- US 5034506 A
- US 6166183 A
- US 6004548 A
- US 5580755 A
- US 5582823 A
- US 5676941 A
- US 5416195 A
- US 5399345 A
- US 4810643 A
- US 4897268 A
- US 5075109 A
- US 4295871 A
- US 4501728 A
- US 4837028 A
- US 4957773 A
- US 4603044 A
- US 60328523 B
- US 60334233 B
- US 60334301 B
- US 60344692 B
- US 60387292 B
- US 60391777 B
- US 60396594 B
- US 60404249 B
- US 60407527 B
- US 0232263 W
- US 10360779 B
- US 10360770 B

- US 10287994 B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- TANNER et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, vol. 906, 81-91
- HOUNSELL et al. *Glycoconj. J.*, 1996, vol. 13, 19-26
- SCHACHTER ; BROCKHAUSEN. The Biosynthesis of Branched O-Linked Glycans. Society for Experimental Biology, 1989, 1-26
- TAKEDA et al. *Trends Biochem. Sci.*, 1995, vol. 20, 367-371
- UDENFRIEND et al. *Ann. Rev. Biochem.*, 1995, vol. 64, 593-591
- ABUCHOWSKI et al. *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 252, 3578
- CROUT et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, vol. 2, 98-111
- WONG et al. *J. Org. Chem.*, 1982, vol. 47, 5416-5418
- KEVIN et al. *Chem. Eur. J.*, 1996, vol. 2, 1359-1362
- ICHIKAWA et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, vol. 114, 9283-9298
- KOELLER et al. *Nature Biotechnology*, 2000, vol. 18, 835-841
- SINGH et al. *Chem. Commun.*, 1998, 993-994
- WANG et al. *Tetrahedron Lett.*, vol. 37, 1975-1978
- HANEDA et al. *Carbohydr. Res.*, 1996, vol. 292, 61-70
- WITTE K. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, vol. 119, 2114-2118
- YAMAMOTO. *Carbohydr. Res.*, 1998, vol. 305, 415-422
- GROSS et al. *Analyt. Biochem.*, 1990, vol. 186, 127
- TSUBOI et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 27213
- CASARES et al. *Nature Biotech.*, 2001, vol. 19, 142
- MAHAL. *Science*, 1997, vol. 276, 1126
- SAXON et al. *Science*, 2000, vol. 287, 2007
- HANG et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, vol. 123, 1242
- YAREMA et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 273, 31166
- CHARTER et al. *Glycobiology*, 2000, vol. 10, 1049
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- HARLOW et al. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- HARLOW et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, 1989
- HOUSTON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 85, 5879-5883
- BIRD et al. *Science*, 1988, vol. 242, 423-426
- *Essentials of Glycobiology*. CSHL Press, 1999
- NADANO et al. *J. Biol. Chem.*, 1986, 11550-11557
- KANAMORI et al. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 21611-21619
- VARKI. *Glycobiology*, 1992, vol. 2, 26-40
- *Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function*. Springer-Verlag, 1992
- *Pharmaceutical Biotechnology*. Harwood Publishers, 1997, 101-120
- KARLIN ; ALTSCHUL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 2264-2268
- KARLIN ; ALTSCHUL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 90, 5873-5877
- ALTSCHUL et al. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410
- ALTSCHUL et al. *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402
- SPATOLA, A. F. *CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS*. Marcel Dekker, 1983, 267
- The Design of Chelating Agents for the Treatment of Iron Overload. PITT et al. *INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE*. American Chemical Society, 1980, 279-312
- LINDOY. *THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES*. Cambridge University Press, 1989
- DUGAS. *BIOORGANIC CHEMISTRY*. Springer-Verlag, 1989
- Properties of In Vivo Chelate-Tagged Proteins and Polypeptides. MEARES et al. *MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS*. American Chemical Society, 1982, 370-387
- KASINA et al. *Bioconjugate Chem.*, 1998, vol. 9, 106-117
- SONG et al. *Bioconjugate Chem.*, 1997, vol. 8, 249-255
- MISTRY et al. *Lancet*, 1996, vol. 348, 1555-1559
- BIJSTERBOSCH et al. *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 237, 344-349
- *Guide to Protein Purification*. Harcourt Brace Jovanovich, 1990
- HAKIMUDDIN et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52

- EDGE et al. *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131
- THOTAKURA et al. *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350
- APLIN ; WRISTON. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-308
- SADLER et al. *Methods in Enzymology*, 1982, vol. 83, 458-514
- Structure and Biosynthesis of Glycopeptides. MON-TREUIL. *Polysaccharides in Medicinal Applications*. Marcel Dekker, 1996, 273-327
- Structure and Synthesis of Glycopeptides. MON-TREUIL. *Polysaccharides in Medicinal Applications*. Marcel Dekker, 1996, 273-327
- MARCHAL et al. *Biol. Chem.*, 2001, vol. 382, 151-159
- GEMMILL ; TRIMBLE. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, vol. 1426, 227-237
- ABUCHOWSKI et al. *Cancer Biochem. Biophys.*, 1984, vol. 7, 175-186
- ABUCHOWSKI et al. *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 252, 3582-3586
- JACKSON et al. *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 165, 114-127
- KOIDE et al. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 111, 659-667
- NILSSON et al. *Methods Enzymol.*, 1984, vol. 104, 56-69
- DELGADO et al. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1990, vol. 12, 119-128
- BUCKMANN et al. *Makromol. Chem.*, 1981, vol. 182, 1379-1384
- JOPPICH et al. *Makromol. Chem.*, 1979, vol. 180, 1381-1384
- KATRETT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, vol. 84, 1487-1491
- KITAMURA et al. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 4310-4315
- BOCCU et al. *Z. Naturforsch.*, 1983, vol. 38C, 94-99
- ZALIPSKY et al. *POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY: BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS*. Plenum Press, 1992, 347-370
- ZALIPSKY et al. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1992, vol. 15, 100-114
- VERONESE et al. *Appl. Biochem. Biotech.*, 1985, vol. 11, 141-152
- BEAUCHAMP et al. *Anal. Biochem.*, 1983, vol. 131, 25-33
- BERGER et al. *Blood*, 1988, vol. 71, 1641-1647
- WOGHIREN et al. *Bioconjugate Chem.*, 1993, vol. 4, 314-318
- BYUN et al. *ASAIO Journal*, 1992, M649-M-653
- VERONESE et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1985, vol. 11, 141-152
- VOCADLO et al. *CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOLOGY*. Wiley-VCH Verlag, 2000, vol. 2
- KODAMA et al. *Tetrahedron Lett.*, 1993, vol. 34, 6419
- LOUGHEED et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 37717
- R. F. TAYLOR. *PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS*. Marcel Dekker, 1991
- S. S. WONG. *CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING*. CRC Press, 1992
- G. T. HERMANSON et al. *IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES*. Academic Press, 1993
- POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS. ACS Symposium Series. American Chemical Society, 1991, vol. 469
- VERONESE. *App. Biochem. Biotech.*, 1985, vol. 11, 141-45
- HARRIS. *Macromol. Chem. Phys.*, 1985, vol. C25, 325-373
- SCOUTEN. *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 135, 30-85
- WONG et al. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, vol. 14, 866-874
- DELGADO et al. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1992, vol. 9, 249-304
- ZALIPSKY. *Bioconjugate Chem.*, 1995, vol. 6, 150-165
- BHADRA et al. *Pharmazie*, 2002, vol. 57, 5-29
- CHAFFEE et al. *J. Clin. Invest.*, 1992, vol. 89, 1643-1651
- PYATAK et al. *Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol*, 1980, vol. 29, 113-127
- KATRE et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1987, vol. 84, 1487-1491
- KITAMURA et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, vol. 28, 1367-1394
- J.G. WAGNER. *Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist*. Technomic Publishing Company, Inc, 1993
- YOUNES et al. *J Biomed. Mater. Res.*, 1987, vol. 21, 1301-1316
- COHN et al. *J Biomed. Mater. Res.*, 1988, vol. 22, 993-1009
- SAWHNEY et al. *Macromolecules*, 1993, vol. 26, 581-587
- CHRISSEY et al. *Nucleic Acids Res.*, 1996, vol. 24, 3031-3039
- PENICHET et al. *J. Immunol.*, 1999, vol. 163, 4421-4426
- PARDRIDGE. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2002, vol. 513, 397-430
- ARAP et al. *PNAS*, 2002, vol. 99, 1527-1531

- MCINTOSH et al. *PNAS*, 2002, vol. 99, 1996-2001
- YU et al. *J. Neuroimmunol.*, 1996, vol. 64 (1), 91-100
- SCHMIDT, J. *J. Neurosci. Res.*, 2001, vol. 65 (1), 59-67
- WENDER et al. *Folia Neuropathol.*, 2001, vol. 39 (2), 91-93
- MARTIN et al. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1996, vol. 18 (1), 1-24
- TAKANE et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000, vol. 294 (2), 746-752
- SBURLATI et al. *Biotechnol. Prog.*, 1996, vol. 14, 189-192
- DODD et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, vol. 787, 183-187
- EDELBAUM et al. *J. Interferon Res.*, 1992, vol. 12, 449-453
- CONRADT et al. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262 (30), 14600-14605
- CIVAS et al. *Eur. J. Biochem.*, 1988, vol. 173, 311-316
- DEMOLDER et al. *J. Biotechnol.*, 1994, vol. 32, 179-189
- SEDMAK et al. *J. Interferon Res.*, 1989, vol. 9 (1), S81-S85
- KAGAWA et al. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263 (33), 17508-17515
- JAYARAM et al. *J. Interferon Res.*, 1983, vol. 3 (2), 177-180
- MENGE et al. *Develop. Biol. Standard*, 1987, vol. 68, 391-401
- VONK et al. *J. Interferon Res.*, 1983, vol. 3 (2), 169-175
- ADOLF et al. *J. Interferon Res.*, 1990, vol. 10, 255-267
- ASANO et al. *Eur. J. Cancer*, 1991, vol. 27 (4), 521-525
- NAGY et al. *Anticancer Research*, 1988, vol. 8 (3), 467-470
- DRON et al. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 1989, vol. 3 (1), 13-19
- HABIB et al. *Am. Surg.*, March 2001, vol. 67 (3), 267-269
- SUGIYAMA et al. *Eur. J. Biochem.*, 1993, vol. 217, 921-927
- NOHYNEK et al. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1997, vol. 39, 259-265
- LORD et al. *Clinical Cancer Research*, July 2001, vol. 7 (7), 2085-2090
- ROTONDARO et al. *Molecular Biotechnology*, 1999, vol. 11 (2), 117-128
- BÖNIG et al. *Bone Marrow Transplantation*, 2001, vol. 28, 259-264
- GARNETT. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, vol. 53, 171-216
- ULUDAG ; YANG. *Biotechnol. Prog.*, 2002, vol. 18, 604-611
- VYAS et al. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System*, 2001, vol. 18, 1-76
- SRINIVASACHAR ; NEVILLE. *Biochemistry*, 1989, vol. 28, 2501-2509
- WELLHONER et al. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266, 4309-4314
- HERMANSON. *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*. Academic Press, 1996
- JUNG et al. *Biochem. Biophys. Acta*, 1983, vol. 761, 152-162
- JOSHI et al. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 14518-14525
- ZARLING et al. *J. Immunol.*, 1980, vol. 124, 913-920
- BOUIZAR et al. *Eur. J. Biochem.*, 1986, vol. 155, 141-147
- PARK et al. *J. Biol. Chem.*, 1986, vol. 261, 205-210
- BROWNING et al. *J. Immunol.*, 1989, vol. 143, 1859-1867
- SMITH ; MARCH. *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*. John Wiley & Sons, 2001
- MODIFICATION OF PROTEINS. FEENEY et al. *Advances in Chemistry Series*. American Chemical Society, 1982, vol. 198
- GREENE et al. *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*. John Wiley & Sons, 1981
- ELHALABI et al. *Curr. Med. Chem.*, 1999, vol. 6, 93
- SCHAFER et al. *J. Org. Chem.*, 2000, vol. 65, 24
- KEPPLER et al. *Glycobiology*, 2001, vol. 11, 11R
- POLY (ETHYLENE GLYCOL CHEMISTRY : BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS. Plenum Pub. Corp. 1992
- POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMICAL AND BIOLOGICAL APPLICATIONS. ACS Symposium Series No. 689. American Chemical Society, 1997
- LEE et al. *Biochemistry*, 1989, vol. 28, 1856
- BHATIA et al. *Anal. Biochem.*, 1989, vol. 178, 408
- JANDA et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, vol. 112, 8886
- WOLD, F. *Meth. Enzymol.*, 1972, vol. 25, 623-651
- WEETALL, H. H. ; COONEY, D. A. *ENZYMES AS DRUGS*. Wiley, 1981, 395-442
- JI, T. H. *Meth. Enzymol.*, 1983, vol. 91, 580-609
- MATTSON et al. *Mol. Biol. Rep.*, 1993, vol. 17, 167-183
- YAMADA et al. *Biochemistry*, 1961, vol. 20, 4836-4842
- KEANA et al. *J. Org. Chem.*, 1990, vol. 55, 3640-3647

- MCKENZIE et al. *Protein Chem.*, 1986, vol. 7, 581-592
- SHEN et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 102, 1048
- ITO et al. *Pure Appl. Chem.*, 1993, vol. 65, 753
- PAULSON et al. *J. Biol. Chem.*, 1976, vol. 253, 5617-5624
- THE METABOLIC AND MOLECULAR BASIS OF INHERITED DISEASE. McGraw Hill, 1995, vol. II
- DE DUVE. *Fed Proc.*, 1964, vol. 23, 1045
- DAWSON et al. *Ped Res.*, 1973, vol. 7 (8), 684-690
- MAPES et al. *Science*, 1970, vol. 169, 987
- MAPES et al. *Science*, 1970, vol. 169, 987-989
- BRADY et al. *N. Eng. J. Med.*, 1973, vol. 279, 1163
- DESNICK et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1979, vol. 76, 5326-5330
- BISHOP et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1986, vol. 83, 4859-4863
- MEDIN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1996, vol. 93, 7917-7922
- NOVO, F. J. *Gene Therapy*, 1997, vol. 4, 488-492
- OHSHIMA et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1997, vol. 94, 2540-2544
- SUGIMOTO et al. *Human Gene Therapy*, 1995, vol. 6, 905-915
- GLICK ; PASTERNAK. *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA*. ASM Press, 1994
- ITAKURA et al. *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323 [0437]
- CLIMIE et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 633
- KUNKEL et al. *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 154, 367-382
- TOMIC et al. *Nucl. Acids Res.*, 1990, vol. 12, 1656
- UPENDER et al. *Biotechniques*, 1995, vol. 18, 29-31
- MICHAEL. *Biotechniques*, 1994, vol. 16, 410-412
- R. MERRIFIELD. *Solid Phase Peptide Synthesis: The Synthesis of a Tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154
- MERRIFIELD. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149
- STEWART et al. *Solid Phase Peptide Synthesis*. Pierce Chemical Co, 1984
- BAYER ; RAPP. *Chem. Pept. Prot.*, 1986, vol. 3, 3
- ATHERTON et al. *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. IRL Press, 1989
- Solid-Phase Peptide Synthesis. FIELDS ; COLOWICK. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1997, vol. 269
- LLOYD-WILLIAMS et al. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Peptides*. CRC Press, Inc, 1997
- DAWSON et al. *Science*, 1994, vol. 266, 776
- HACKENG et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 7845
- DAWSON. *Methods Enzymol.*, 1997, vol. 287, 34
- MUIR et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 6705
- SEVERINOV ; MUIR. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 16205
- T. E. CREIGHTON. *Peptides—Structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman and Company, 1993
- WOLD, F. *Post-translational Covalent Modification of Peptides*. Academic Press, 1983, 1-12
- SEIFTER et al. *Meth. Enzymol.*, 1990, vol. 182, 626-646
- RATTAN et al. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, vol. 663, 48-62
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001
- DECLERCK et al. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 301, 1041-1057
- IGARASHI et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999, vol. 63, 1535-1540
- ZHU et al. *Peptide Eng.*, 1999, vol. 12, 635-638
- AKANUMA et al. *Eur. J. Biochem.*, 1999, vol. 260, 499-504
- ROJKOVA et al. *FEBS Lett.*, 1999, vol. 445, 183-188
- SAMBROOK ; RUSSELL. *Molecular Cloning. A Laboratory Approach*. Cold Spring Harbor Press, 2001
- AUSUBEL et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 2002
- LEUNG et al. *Technique*, 1989, vol. 1, 11-15
- MAYERS et al. *Science*, 1985, vol. 229, 242
- NARANG, SA. *Tetrahedron*, 1983, vol. 39, 3
- Recombinant DNA, Proc 3rd Cleveland Sympos. ITAKURA et al. *Macromolecules*. Elsevier, 1981, 273-289
- ITAKURA et al. *Science*, 1984, vol. 198, 1056
- IKE et al. *Nucleic Acid Res.*, 1983, vol. 11, 477
- SCOTT et al. *Science*, 1990, vol. 249, 386-390
- ROBERTS et al. *PNAS*, 1992, vol. 89, 2429-2433
- DEVLIN et al. *Science*, 1990, vol. 249, 404-406
- CWIRLA et al. *PNAS*, 1990, vol. 87, 6378-6382

- CALDWELL ; JOYCE. *PCR Methods Appl.*, 1994, vol. 2, 28-33
- KE ; MADISON. *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3371-3372
- REIDHAAR-OLSON et al. *Methods Enzymol.*, 1991, vol. 208, 564-586
- SELIFONOVA et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, vol. 67, 3645-3649
- LONG-MCGIE et al. *Biotech. Bioeng.*, 2000, vol. 68, 121-125
- STEMMER et al. *Nature*, 1994, vol. 370 (6488), 389-391
- CRAMERI et al. *Nature*, 1998, vol. 391 (6664), 288-291
- ZHANG et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94 (9), 4504-4509
- STEMMER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91 (22), 10747-10751
- PATTEN et al. *Curr. Opinion Biotechnol.*, 1997, vol. 8, 724-33
- HARAYAMA. *Trends Biotechnol.*, 1998, vol. 16 (2), 76-82
- HANSSON et al. *J. Mol. Biol.*, 1999, vol. 287, 265-76
- LORENZO ; BLASCO. *Biotechniques*, 1998, vol. 24 (2), 308-13
- PEKRUN et al. *J. Virol.*, 2002, vol. 76 (6), 2924-35
- RAILLARD et al. *Chem Biol.*, 2001, vol. 8 (9), 891-896
- POWELL et al. *Nat Biotechnol.*, 2000, vol. 18 (12), 1279-1282
- MERZ et al. *Biochemistry*, 2000, vol. 39 (5), 880-889
- STEMLER. *Nature*, 1994, vol. 370, 389-391
- STEMLER. *PNAS*, 1994, vol. 91, 10747-10751
- KOLKMAN ; STEMLER. *Nat. Biotech.*, 2001, vol. 19, 423-428
- COCO et al. *Nat. Biotechnol.*, 2001, vol. 19, 354-359
- ZHAO et al. *Nat. Biotechnol.*, 1998, vol. 16, 258-261
- ABECASSIS et al. *Nucleic Acids Res.*, 2000, vol. 28, E88
- KIKUCHI et al. *Gene*, 2000, vol. 243, 133-137
- SIEBER et al. *Nat. Biotechnol.*, 2001, vol. 19, 456-460
- LUTZ et al. *Nucleic Acids Res.*, 2001, vol. 29, E16
- OSTERMEIER et al. *Nat. Biotechnol.*, 1999, vol. 17, 1205-1209
- LUTZ ; BENKOVIC. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, vol. 11, 319-324
- JACOB ; SCUDDER. *Methods in Enzymol.*, 1994, vol. 230, 280-300
- Glycobiology, A Practical Approach. Oxford University Press Inc. 1993 [0481]
- TYAGARAJAN et al. *Glycobiology*, 1996, vol. 6, 83-93 [0482]
- PALCIC et al. *Carbohydrate Res.*, 1989, vol. 190, 1-11 [0491]
- PRIEELS et al. *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, 10456-10463 [0491]
- NUNEZ et al. *Can. J. Chem.*, 1981, vol. 59, 2086-2095 [0491]
- DUMAS et al. *Bioorg. Med. Letters*, 1991, vol. 1, 425-428 [0491]
- KUKOWSKA-LATALLO et al. *Genes and Development*, 1990, vol. 4, 1288-1303
- MOLLICONE et al. *Eur. J. Biochem.*, 1990, vol. 191, 169-176
- DABKOWSKI et al. *Transplant Proc.*, 1993, vol. 25, 2921
- YAMAMOTO et al. *Nature*, 1990, vol. 345, 229-233
- JOZIASSE et al. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 14290-14297
- LARSEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 8227-8231
- STRAHAN et al. *Immunogenetics*, 1995, vol. 41, 101-105
- YAMAMOTO et al. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 1146-1151
- D'AGOSTARO et al. *Eur. J. Biochem.*, 1989, vol. 183, 211-217
- MASRI et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, vol. 157, 657-663
- NAKAZAWA et al. *J. Biochem.*, 1988, vol. 104, 165-168
- STAHL et al. *J. Neurosci. Res.*, 1994, vol. 38, 234-242
- CHAPPELL et al. *Mol. Biol. Cell*, 1994, vol. 5, 519-528
- TANIGUCHI et al. *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*. Springer, 2002
- GUO et al. *Glycobiology*, 2001, vol. 11 (10), 813-820
- BRETON et al. *J. Biochem.*, 1998, vol. 123, 1000-1009
- TSUJI et al. *Glycobiology*, 1996, vol. 6, v-xiv
- VAN DEN EIJNDEN et al. *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, 3159
- WEINSTEIN et al. *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 13845
- WEN et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 21011
- REARICK et al. *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, 4444
- GILLESPIE et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 21004
- KUROSAWA et al. *Eur. J. Biochem.*, 1994, vol. 219, 375-381

- GOOCHEE et al. *BioTechnology*, 1991, vol. 9, 1347-1355
- YAMAMOTO et al. *J. Biochem.*, 1996, vol. 120, 104-110
- GILBERT et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 28271-28276
- VAN DEN EIJNDEN et al. *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 3159
- SASAKI et al. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 22782-22787
- KITAGAWA ; PAULSON. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 1394-1401
- KITAGAWA et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 931-938
- STAGLJOV et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 5977
- HEESSEN et al. *Eur. J. Biochem.*, 1994, vol. 224, 71
- NAGATA et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 12062-12069
- SMITH et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 15162
- HOMA et al. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 12609
- HULL et al. *BBRC*, 1991, vol. 176, 608
- IHARA et al. *J. Biochem.*, 1993, vol. 113, 692
- SHOREIBAH et al. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 15381
- BIERHUIZEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 9326
- RAJPUT et al. *Biochem. J.*, 1992, vol. 285, 985
- KORNFELD et al. *Annu. Rev. Biochem.*, 1985, vol. 54, 631-684
- RODGERS et al. *Biochem. J.*, 1992, vol. 286, 817-822
- ICHIKAWA et al. *JACS*, 1992, vol. 114, 9283
- WONG et al. *J. Org. Chem.*, 1992, vol. 57, 4343
- ICHIKAWA et al. CARBOHYDRATES AND CARBOHYDRATE POLYMERS. ATL Press, 1993
- PRESTON et al. *Critical Reviews in Microbiology*, 1996, vol. 23 (3), 139-189
- SCHOLTEN et al. *J. Med. Microbiol.*, 1994, vol. 41, 236-243
- JENNINGS et al. *Mol. Microbiol.*, 1995, vol. 18, 729-740
- GOTSHLICH. *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 180, 2181-2190
- WAKARCHUK et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 19166-73
- WAKARCHUK et al. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271 (45), 28271-278
- MARTIN et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 21349-21356
- TANIGUCHI et al. Handbook of glycosyltransferases and related genes. Springer, 2002
- FUKUTA et al. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 18575-18580
- DIXON et al. *Genomics*, 1995, vol. 26, 239-241
- ORELLANA et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 2270-2276
- ERIKSSON et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 1043, 8-10443
- ROTH. *Molecular Approaches to Supracellular Phenomena*, 1990
- LARSEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 8227-8231
- FRANCISCO et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 2713-2717
- BOURNE ; HENRISSAT. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, vol. 11, 583-600
- Structure and Biosynthesis of Cell Surface Carbohydrates. KABATA ; TAKASAKI. Cell Surface Carbohydrates and Cell Development. CRC Press, 1991, 1-24
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- GLOVER et al. *DNA Cloning: A Practical Approach*, 1985, vol. I, II
- GAIT et al. *Oligonucleotide Synthesis*, 1985
- HAMES ; HIGGINS. *Nucleic Acid Hybridization*, 1985
- HAMES ; HIGGINS. *Transcription And Translation*, 1984
- FRESHNEY et al. *Animal Cell Culture*, 1986
- PERBAL. *Immobilized Cells And Enzymes*. IRL Press, 1986
- PERBAL. *A Practical Guide To Molecular Cloning*, 1984
- AUSUBEL et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, 2002
- Biology and Activities of Yeast. Soc. App. Bacteriol. Symp. Series No. 9, 1980
- Biochemistry and Genetics of Yeast. Academic Press, 1978
- ROSE ; HARRISON. *The Yeasts*. Academic Press, 1987
- HINNEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, 1919-1933
- BEGGS. *Nature*, 1978, vol. 275 (5676), 104-109
- BECKER ; GAURANTE. *Methods Enzymol.*, 1991, vol. 194, 162-187
- GIETZ et al. *Methods Enzymol.*, 2002, vol. 350, 87-96
- MOUNT et al. *Methods Mol Biol.*, 1996, vol. 53, 139-145
- WANG et al. *Crit Rev Biotechnol.*, 2001, vol. 21 (3), 177-218
- BARR et al. *Yeast genetic engineering*. Butterworths, 1989

- KJELDSEN. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, vol. 54, 277-286
- STARK ; BOYD. *EMBO J.*, 1986, vol. 5, 1995-2002
- KURJAN ; HERSKOWITZ. *Cell*, 1982, vol. 30, 933
- BRAKE et al. *Yeast*, 1988, vol. 4, S436
- KINGHORN ; TURNER. *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*. Blackie Academic and Professional, 1992
- MARTINELLI ; KINGHORN. *Aspergillus : 50 years*. Elsevier, 1994
- STRUHL et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 76, 1035-1039
- BROACH et al. *Gene*, 1979, vol. 8, 121-133
- BEGGS. *Nature*, 1978, vol. 275, 104-108
- HITZEMAN et al. *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 12073-12080
- ALBER ; KAWASAKI. *J. Mol. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 419-434
- YOUNG et al. *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*. Plenum, 1982, 355
- AMMERER. *Meth. Enzymol.*, 1983, vol. 101, 192-201
- RUSSELL et al. *Nature*, 1983, vol. 304, 852-854
- BOTSTEIN et al. *Gene*, 1979, vol. 8, 17-24
- BRAKE et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 4642-4646
- STNICHOMB et al. *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 158, 157
- The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1981
- FISCHER et al. *Biotechnol Appl Biochem.*, 1999, vol. 30, 117-120
- CARREZ et al. *Gene*, 1990, vol. 94, 147-154
- CONTRERAS. *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 378-381
- YELTON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474
- TILBURN et al. *Gene*, 1983, vol. 26, 205-221
- KELLY ; HYNES. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475-479
- BALLANCE et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1983, vol. 112, 284-289
- BUXTON et al. *Gene*, 1985, vol. 37, 207-214
- DRICKAMER. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 9557-9560
- HARKKI. *Bio/Technology*, 1989, vol. 7, 596-601
- UUSITALO. *J. Biotech.*, 1991, vol. 17, 35-50
- YEH. *J. Cell. Biochem.*, vol. 14C, 68
- FLEER. *Yeast*, 1990, vol. 6, S449
- ITO et al. *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 153, 163-168
- VAN DEN BERG. *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135-139
- SCHAFFRATH et al. *FEMS Microbiol Lett.*, 1999, vol. 178 (2), 201-210
- GIGA-HAMA ; KUMAGAI. *Foreign gene expression in fission yeast: Schizosaccharomyces pombe*. Springer, 1997
- MOREMEN. *Glycobiology*, 1994, vol. 4, 113-125
- STANLEY et al. *Somatic Cell Mol. Genet.*, 1990, vol. 16, 211-223
- GRAHAM et al. *Gen. Viral.*, 1977, vol. 36, 59-72
- CORSARO ; PEARSON. *Somatic Cell Genetics*, 1981, vol. 7, 603
- HAWLEY-NELSON et al. *Focus*, 1993, vol. 15, 73
- CICCARONE et al. *Focus*, 1993, vol. 15, 80
- MILLER ; ROSMAN. *BioTechniques*, 1989, vol. 7, 980-90
- WANG ; FINER. *Nature Med.*, 1996, vol. 2, 714-6
- KOAT ; CONDREAY. *Trends Biotechnol.*, 2002, vol. 20, 173-180
- HAUSER et al. *Mammalian Cell Biotechnology*. Walter de Gruyter, Inc, 1997
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, 2001
- ALTMANN et al. *Glycoconjugate J.*, 1999, vol. 16, 109-123
- Baculovirus Expression Protocols. RICHARDSON. *Methods in Molecular Biology*. Humana Pr, 1998, vol. 39
- O'REILLY et al. *Baculovirus Expression Vectors : A Laboratory Manual*. Oxford Univ Press, 1994
- KING ; POSSEE. *The Baculovirus Expression System : A Laboratory Guide*. Chapman & Hall, 1992
- LUCKLOW. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1993, vol. 4, 564-572
- MILLER. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1993, vol. 3, 97-101
- CHARGELEGUE et al. *Transgenic Res.*, 2000, vol. 9 (3), 187-194
- VON SCHAEWEN et al. *Plant Physiology*, 1983, vol. 102, 1109-1118
- KUSNADI et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, vol. 56, 473-484
- KHOUDI et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 135-143
- HOOD et al. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1999, vol. 464, 127-147
- FISCHER et al. *J. Biol. Regul. Homest. Agents*, 2000, vol. 14, 83-92
- LEE et al. *Mol. Cell*, 1997, vol. 7, 783-787
- POTRYKUS. *Gene transfer to plants*. Springer, 1995
- NICKOLOFF. *Plant cell electroporation and electrofusion protocols*. Humana Press, 1995
- DRAPER. *Plant genetic transformation*. Oxford Press, 1988

- RUIZ ; BLUMWALD. *Planta*, 2002, vol. 214, 985-989
- DENG et al. *Cell. Res.*, 2001, vol. 11, 156-160
- SPENCER ; SNOW. *Heredity*, 2001, vol. 86, 694-702
- LAMBLIN et al. *Physiol Plant*, 2001, vol. 112, 223-232
- HOOD et al. *Mol. Breed.*, 1997, vol. 3, 291-306
- PETOLINO et al. *Transgenic Research*, 2000, vol. 9, 1-9
- KHOUDI et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, vol. 64, 135-143
- WRIGHT et al. *Transgenic Res.*, vol. 10, 177-181
- FRIGERIO et al. *Plant Physiol.*, 2000, vol. 123, 1483-1493
- CRAMER et al. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1996, vol. 792, 62-871
- CABANES-MACHETEAU et al. *Glycobiology*, 1999, vol. 9, 365-372
- RUGGIERO et al. *FEBS Lett.*, 2000, vol. 469, 132-136
- BAI et al. *Biotechnol. Prog.*, 2001, vol. 17, 168-174
- ZHANG et al. *J. Anim. Sci.*, 2000, vol. 78, 2868-2878
- TACKET et al. *J. Infect. Dis.*, 1998, vol. 182, 302-305
- RICHTER et al. *Nat. Biotechnol.*, 2000, vol. 18, 1167-1171
- CHONG et al. *Transgenic Res.*, 2000, vol. 9, 71-78
- WIGDOROVITZ et al. *Virology*, 1999, vol. 255, 347-353
- PERRIN et al. *Mol. Breed.*, 2000, vol. 6, 345-352
- STÖGER et al. *Plant Mol. Biol.*, 2000, vol. 42, 583-590
- KORNIEYEV et al. *Physiol Plant*, 2001, vol. 113, 323-331
- PETERSEN et al. *Plant Mol Biol*, 2002, vol. 49, 45-58
- PELLEGRINESCHI et al. *Genome*, 2002, vol. 45, 421-430
- SAALBACH et al. *Mol Gen Genet*, 1994, vol. 242, 226-236
- SMITH. *Plant tissue culture : techniques and experiments*. Academic Press, 2000
- BHOJWANI ; RAZDAN. *Plant tissue culture : theory and practice*. Elsevier Science Pub, 1996
- ISLAM. *Plant tissue culture*. Oxford & IBH Pub. Co, 1996
- DODDS ; ROBERTS. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press, 1995
- BHOJWANI. *Plant tissue culture : applications and limitations*. Elsevier, 1990
- TRIGIANO ; GRAY. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. CRC Press, 2000
- LINDSEY. *Plant tissue culture manual : fundamentals and applications*. Kluwer Academic, 1991
- WRIGHT et al. *Transgenic Res.*, 2001, vol. 10, 177-181
- GUDA. *Plant Cell Res.*, 2000, vol. 19, 257-262
- PARMENTER. *Plant Mol. Biol.*, 1995, vol. 29, 1167-1180
- HAGER ; BECK. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, vol. 54, 302-310
- STAUB et al. *Nat. Biotechnol.*, 2000, vol. 18, 333-338
- HOGAN et al. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986
- GORDON et al. *PNAS*, 1980, vol. 77, 7380-7384
- GORDON ; RUDDLE. *Science*, 1981, vol. 214, 1244-1246
- BRINSTER et al. *Cell*, 1981, vol. 27, 223-231
- COSTANTINI ; LACY. *Nature*, 1981, vol. 284, 92-94
- JAENISCH ; MINTZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974, vol. 71, 1250-1254
- JAENISCH et al. *Hamatol Bluttransfus.*, 1976, vol. 19, 341-356
- STUHLMANN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1984, vol. 81, 7151-7155
- GOSSLER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986, vol. 83, 9065-9069
- LAVITRANO et al. *Cell*, 1989, vol. 57, 717-723
- CID-ARREGUI ; GARCÍA-CARRANCA. *Microinjection and Transgenesis : Strategies and Protocols*. Springer, 1998
- CLARKE. *Transgenesis Techniques : Principles and Protocols*. Humana Press, 2002
- PINKERT. *Transgenic Animal Technology : A Laboratory Handbook*. Academic Press, 1994
- NEWTON. *J. Immunol. Methods*, 1999, vol. 231, 159-167
- EBERT et al. *Biotechnology*, 1991, vol. 9, 835-838
- THORAVAL et al. *Transgenic Research*, 1995, vol. 4, 369-376
- BOSSELMAN et al. *Science*, 1989, vol. 243, 533-535
- PETROPOULOS et al. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, 3391-3397
- BRAZOLOT et al. *Mol. Reprod. Dev.*, 1991, vol. 30, 304-312
- FRASER et al. *Int. J. Dev. Biol.*, 1993, vol. 37, 381-385
- PETITTE et al. *Development*, 1990, vol. 108, 185-189
- HARVEY et al. *Poult. Sci.*, 2002, vol. 81, 202-212

- HARVEY et al. *Nat. Biotechnol.*, 2002, vol. 20 (4), 396-399
- COHEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1972, vol. 69, 2110-2114
- HANAHAN. *J. Mol. Biol.*, 1983, vol. 166, 557-580
- MANDEL ; HIGA. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 53, 159-162
- SHIGEKAWA ; DOWER. *Biotechniques*, 1988, vol. 8, 742-751
- SAUNDERS ; SAUNDERS. *Microbial Genetics Applied to Biotechnology: Principles and Techniques of Gene Transfer and Manipulation*. Croom Helm, 1987
- PÜHLER. *Genetic Engineering of Microorganisms*, 1993
- LEE et al. *Metabolic Engineering*. Marcel Dekker, 1999
- ADOLPH. *Microbial Genome Methods*. CRC Press, 1996
- BIRREN ; LAI. *Nonmammalian Genomic Analysis : A Practical Guide*. Academic Press, 1996
- BALBAS. *Mol. Biotechnol.*, 2001, vol. 19, 251-267
- AILOR et al. *Glycobiology*, 2000, vol. 10 (8), 837-847
- JARVIS et al. *In vitro Conference*, March 1999
- HOLLISTER ; JARVIS. *Glycobiology*, 2001, vol. 11 (1), 1-9
- PALACPAC et al. *PNAS USA*, 1999, vol. 96, 4697
- JARVIS et al. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1998, vol. 9, 528-533
- BETTLER et al. *Glycoconj. J.*, 1999, vol. 16, 205-212
- PRIEM et al. *Glycobiology*, 2002, vol. 12, 235-240
- YOSHIDA et al. *Glycobiology*, 1999, vol. 9 (1), 53-58
- KALSNER et al. *Glycoconj. J.*, 1995, vol. 12, 360-370
- SCHWIENIEK ; ERNST. *Gene*, 1994, vol. 145 (2), 299-303
- CHIBA et al. *Biochem J.*, 1995, vol. 308, 405-409
- URDAL et al. *J. Chromatog.*, 1984, vol. 295, 171
- NIELSEN et al. *Science*, 1991, vol. 254, 1497
- AUSUBEL et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Green & Wiley, 1997
- VENTUA et al. *Blood*, 1983, vol. 61, 781
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*. Macmillan Publishing Company, 1985
- LANGER. *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533
- SZOKA et al. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1980, vol. 9, 467
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*. Mack, 1980
- SZOKA et al. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1980, vol. 9, 467
- DEAMER et al. *LIPIDOMES*. Marcel Dekker, 1983
- HOPE et al. *Chem. Phys. Lipids*, 1986, vol. 40, 89