



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0717505-1 B1



(22) Data do Depósito: 04/10/2007

(45) Data de Concessão: 02/06/2020

(54) Título: CONJUGADO DE PEPTÍDEO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 38/16.

(30) Prioridade Unionista: 04/10/2006 US 60/828,208.

(73) Titular(es): NOVO NORDISK A/S.

(72) Inventor(es): XIAO ZENG; SHAWN DEFREES.

(86) Pedido PCT: PCT US2007080471 de 04/10/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/060780 de 22/05/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 03/04/2009

(57) Resumo: CONJUGADO DE PEPTÍDEO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA A presente invenção fornece conjugados entre peptídeos e porções de PEG através de ligantes de glicerol.

CONJUGADO DE PEPTÍDEO E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**Referência cruzada a pedidos relacionados**

O presente pedido reivindica prioridade para Pedido de Patente Provisório U.S. No. 60/828.208, depositado em 4 de outubro de 2006, que é aqui incorporado em sua totalidade por referência para todos objetivos.

Sumário da invenção

Em uma modalidade de exemplo, moléculas "glicopeguiladas" da invenção são produzidas pela formação mediada por enzima de um conjugado entre um peptídeo glicosilado ou não glicosilado e uma porção sacaril enzimaticamente transferível que inclui um grupo de modificação, como um grupo de modificação polimérico como poli(etileno glicol), em sua estrutura. Em uma modalidade de exemplo, o peptídeo é um membro selecionado de proteínas morfogênicas do osso (por exemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15), neurotrofinas (por exemplo, NT-3, NT-4, NT-5), fatores de diferenciação do crescimento (por exemplo, GDF-5), fator neurotrófico derivado de linhagem de células (GDNF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento de nervos (NGF), protease de fator de von Willebrand (vWF), Fator VII, Fator VIIa, Fator VIII, Fator IX, Fator X, Fator XI, Fator VIII de domínio B deletado, proteína de fusão de vWF-Fator VIII que tem Fator VIII de comprimento total, proteína de fusão de vWF-Fator VIII que tem Fator VIII de domínio B deletado, eritropoietina (EPO), fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), Fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) interferon alfa,

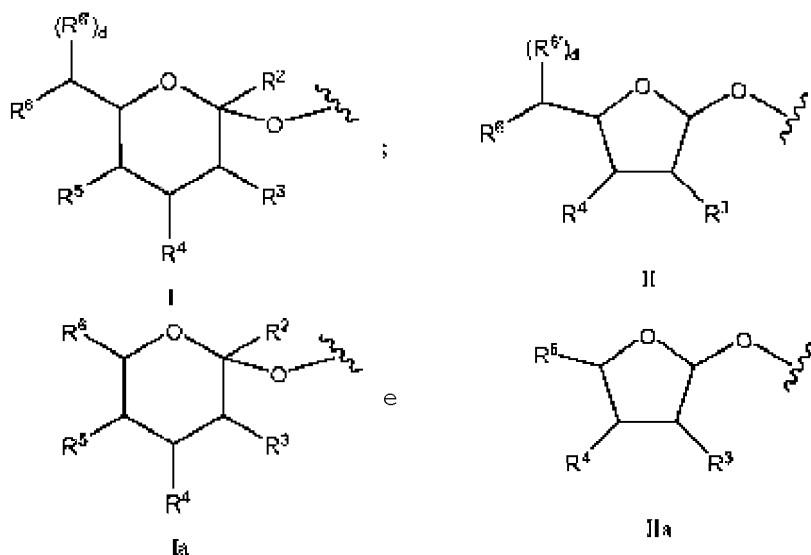
interferon beta, interferon gama, α 1-antitripsina (ATT, ou inibidor de α -1 protease), glicocerebrosidase, Ativador de plasminogênio de tipo tecidual (TPA), Interleucina-2 (IL-2), uroquinase, DNase humana, insulina, Proteína de superfície de Hepatite B (HbsAg), hormônio do crescimento humano, proteína de fusão de região Fc de Receptor de TNF-IgG (Enbrel™), anticorpo monoclonal anti-HER2 (Herceptin™), anticorpo monoclonal para Proteína F de Vírus sincicial respiratório (Synagis™), anticorpo monoclonal para TNF- α (Remicade™), anticorpo monoclonal para glicoproteína IIb/IIIa (Reopro™), anticorpo monoclonal para CD20 (Rituxan™), anti-trombina III (AT III), gonadotrofina coriônica humana (hCG), alfa-galactosidase (Fabrazyme™), alfa-iduronidase (Aldurazyme™), hormônio folículo-estimulante, beta-glicosidase, anticorpo monoclonal anti-TNF-alfa (MLB 5075), peptídeo-1 semelhante a glucagon (GLP-1), peptídeo-2 semelhante a glucagon (GLP-2), beta-glicosidase, alfa-galactosidase A e fator de crescimento de fibroblastos. O grupo de modificação polimérico é anexado à porção sacaril (ou seja, através de um grupo único formado pela reação de dois grupos reativos) ou através de uma porção de ligante, por exemplo, alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído etc.

Portanto, em um aspecto, a presente invenção fornece um conjugado entre uma porção PEG, por exemplo, PEG e um peptídeo que tem uma atividade *in vivo* similar ou de outro modo análoga ao peptídeo terapêutico reconhecido na técnica. No conjugado da invenção, a porção PEG é covalentemente ligada ao peptídeo por meio de um grupo de

ligação de glicosil intacto. Exemplos de grupos de ligação de glicosil intactos incluem porções de ácido siálico que são derivatizadas com PEG.

O grupo de modificação polimérico pode ser anexado em qualquer posição de uma porção glicosil em um peptídeo. Além disso, o grupo de modificação polimérico pode ser ligado a um resíduo de glicosil em qualquer posição na seqüência de aminoácidos de um peptídeo de tipo selvagem ou mutante.

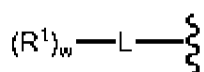
Em uma modalidade de exemplo, a invenção fornece um peptídeo que é conjugado através de um grupo de ligação de glicosil a um grupo de modificação polimérico. Exemplos de conjugados de peptídeo incluem um grupo de ligação de glicosil que tem uma fórmula selecionada de:



Nas Fórmulas I, Ia, II ou IIa, R² é H, CH₂OR⁷, COOR⁷, COO⁻ ou OR⁷, em que R⁷ representa H, alquil substituído ou não substituído ou heteroalquil substituído ou não substituído. Os símbolos R³, R⁴, R⁵, R⁶ e R⁶' independentemente compreendem H, alquil substituído ou não substituído, OR⁸, NHC(O)R⁹ e uma porção sacaril. O índice d

é 0 ou 1. R⁸ e R⁹ são independentemente selecionados de H, alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído, ácido siálico. Pelo menos um de R³, R⁴, R⁵, R⁶ ou R^{6'} inclui o grupo de modificação polimérico, por exemplo, PEG. Em uma modalidade de exemplo, R⁶ e R^{6'}, juntos com o carbono ao qual eles são anexados são componentes da cadeia lateral de uma porção sialil. Em uma modalidade de exemplo adicional, essa cadeia lateral é funcionalizada com o grupo de modificação polimérico.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de modificação polimérico é ligado ao grupo de ligação de glicosil, geralmente através de um heteroátomo no núcleo do glicosil (por exemplo, N, O), através de um ligante, L, como mostrado abaixo:



R¹ é o grupo de modificação polimérico e L é selecionado de uma ligação e um grupo de ligação. O índice w representa um número inteiro selecionado de 1-6, preferivelmente 1-3 e mais preferivelmente 1-2. Exemplos de grupos de ligação incluem porções de alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído e ácido siálico. Um exemplo de componente do ligante é uma porção acil. Um outro exemplo de grupo de ligação é um resíduo de aminoácido (por exemplo, cisteína, serina, lisina, e oligopeptídeos curtos, por exemplo, Lys-Lys, Lys-Lys-Lys, Cys-Lys, Ser-Lys, etc.).

Quando L é uma ligação, ela é formada por reação de um grupo funcional reativo em um precursor de R¹ e um grupo funcional reativo de reatividade complementar em um

precursor do grupo de ligação de glicosil. Quando L é um grupo de ligação de ordem não zero, L pode estar no lugar da porção glicosil antes da reação com o precursor de R¹. Alternativamente, os precursores de R¹ e L podem ser
5 incorporados em um cassete pré-formado que é subsequente anexo à porção de glicosil. Como aqui apresentado, a seleção e preparação de precursores com grupos funcionais reativos adequados estão dentro da capacidade daqueles habilitados na técnica. Além disso, a
10 ligação dos precursores prossegue por química que é bem compreendida na técnica.

Em uma modalidade de exemplo L é um grupo de ligação que é formado a partir de um aminoácido, ou peptídeo pequeno (por exemplo, 1-4 resíduos de aminoácido) gerando
15 um açúcar modificado em que a porção de modificação polimérica é anexada através de um ligante de alquil substituído. Exemplos de ligantes incluem glicina, lisina, serina e cisteína. Análogos de aminoácido, como aqui definido, são também de utilidade como componentes de
20 ligantes. O aminoácido pode ser modificado com um componente adicional de um ligante, por exemplo, alquil, heteroalquil, covalentemente anexo através de uma ligação de acil, por exemplo, uma amida ou uretano formado através de uma porção amina do resíduo de aminoácido.

25 Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil tem uma estrutura de acordo com Fórmulas I ou Ia e R⁵ inclui o grupo de modificação polimérico. Em outra modalidade de exemplo, R⁵ inclui o grupo de modificação polimérico e um ligante, L, unindo o grupo de modificação
30 polimérico ao núcleo de glicosil. L pode ser uma estrutura

linear ou ramificada. De modo similar, o grupo de modificação polimérico pode ser ramificado ou linear.

O grupo de modificação polimérico compreende duas ou mais unidades de repetição que podem ser hidrossolúveis ou
5 essencialmente insolúveis em água. Exemplos de polímeros hidrossolúveis de uso nos compostos da invenção incluem PEG, por exemplo, m-PEG, PPG, por exemplo, m-PPG, ácido polissilático, poliglutamato, poliaspartato, polilisina, polietilenoneimina, polímeros biodegradáveis (por exemplo,
10 polilactídeo, poliglicerídeo), e PEG funcionalizado, por exemplo, PEG terminal-funcionalizado.

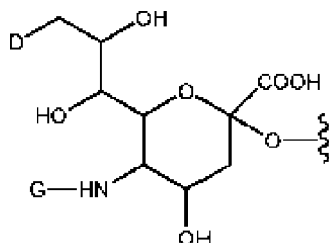
O núcleo de glicosil dos grupos de ligação de glicosil de uso nos conjugados de peptídeo é selecionado de furanoses e piranoses naturais e não naturais. Os
15 sacarídeos não naturais incluem opcionalmente uma porção hidroxil e/ou amina alquilada ou acilada, por exemplo, éteres, ésteres e substituintes de amida no anel. Outros sacarídeos não naturais incluem um H, hidroxil, éter, éster ou substituinte de amida em uma posição no anel em que tal
20 substituinte ao está presente no sacarídeo natural. Alternativamente, o carboidrato é desprovido de um substituinte que pode ser encontrado no carboidrato do qual seu nome é derivado, por exemplo, desoxi açúcares. Ainda outros exemplos de açúcares não naturais incluem
25 carboidratos oxidados (por exemplo, ácido -ônicos e -urônicos) e reduzidos (alcoóis de açúcar). A porção de açúcar pode ser um mono, oligo- ou poli-sacarídeo.

Exemplos de açúcares naturais de uso como componentes de grupos de ligação de glicosil na presente invenção
30 incluem glicose, glicosamina, galactose, galactosamina,

7/239

fucose, manose, manosamina, xilanose, ribose, N-acetil glicose, N-acetil glicosamina, N-acetil galactose, N-acetil galactosamina, e ácido siálico.

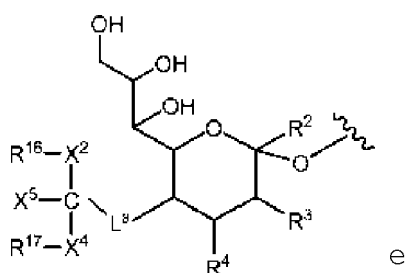
Em uma modalidade, a presente invenção fornece um
5 conjugado de peptídeo que compreende a porção:



10

em que D é um membro selecionado de -OH e R^1 -L-NH-; G é um membro selecionado de H e R^1 -L- e $-C(O)(C_1-C_6)$ alquil; R^1 é uma porção que compreende um resíduo de poli(etileno glicol) de cadeia linear ou ramificada ; e L é um ligante,
15 por exemplo, uma ligação ("de ordem zero"), alquil substituído ou não substituído e heteroalquil substituído ou não substituído. Em modalidades de exemplo, quando D é OH, G é R^1 -L-, e quando G é $-C(O)(C_1-C_6)$ alquil, D é R^1 -L-NH-.

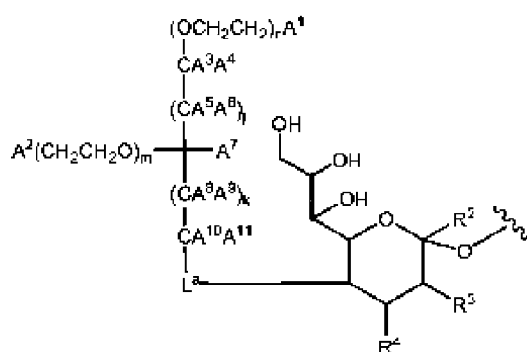
20 Em outro aspecto, a invenção fornece um conjugado de peptídeo que compreende um grupo de ligação de glicosil, em que o grupo de ligação de glicosil é anexado a um resíduo de aminoácido do referido peptídeo, e em que o referido grupo de ligação de glicosil compreende um grupo de ligação
25 de sialil que tem a fórmula que é um membro selecionado de:



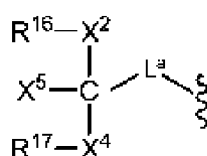
30

e

8/239



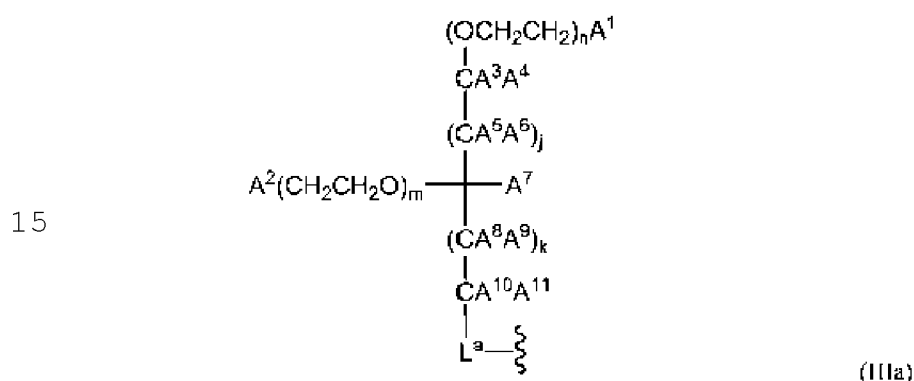
em que



são grupos de modificação. R^2 é um membro selecionado de H, CH_2OR^7 , COOR^7 , COO^- e OR^7 . R^7 é um membro selecionado de H, alquil substituído ou não substituído and heteroalquil substituído ou não substituído. R^3 e R^4 são membros independentemente selecionados de H, alquil substituído ou não substituído, OR^8 , e NHC(O)R^9 . R^8 e R^9 são independentemente selecionados de H, alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído e sialil. L^a é um ligante selecionado de uma ligação, alquil substituído ou não substituído and heteroalquil substituído ou não substituído. X^5 , R^{16} e R^{17} são independentemente selecionados de grupo não reativo e porções poliméricas (por exemplo óxido de poli(alquilenos), por exemplo, PEG). Grupos não reativos incluem grupos que são considerados como sendo essencialmente não reativos, neutros e/ou estáveis em pH fisiológico, por exemplo, H, alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído e outros. Um exemplo de porção polimérica inclui as estruturas ramificadas

apresentadas na Fórmula IIIa e seus exemplares, abaixo. Uma
 pessoa habilitada na técnica perceberá que a porção PEG
 nessas fórmulas pode ser substituída com outros polímeros.
 Exemplos de polímeros incluem aqueles da família de óxido
 5 de poli(alquilenos). X^2 e X^4 são fragmentos de ligação
 independentemente selecionados que unem as porções
 poliméricas R^{16} e R^{17} a C. O índice j é um número inteiro
 selecionado de 1 a 15.

Em outra modalidade de exemplo, o grupo de modificação
 10 polimérico tem a estrutura de acordo com a seguinte
 fórmula:

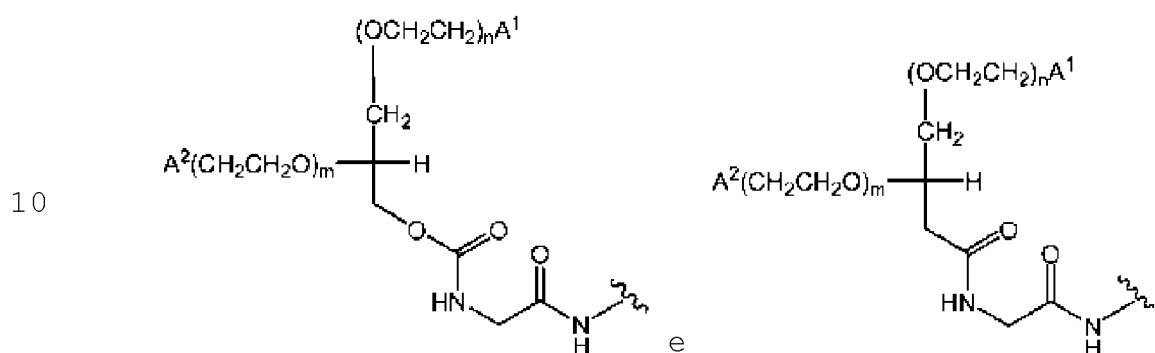


em que os índices m e n são números inteiros
 20 independentemente selecionados de 0 a 5.000. A^1 , A^2 , A^3 , A^4 ,
 A^5 , A^6 , A^7 , A^8 , A^9 , A^{10} e A^{11} são membros independentemente
 selecionados de H, alquil substituído ou não substituído,
 heteroalquil substituído ou não substituído, cicloalquil
 substituído ou não substituído, heterocicloalquil
 25 substituído ou não substituído, aril substituído ou não
 substituído, heteroaril substituído ou não substituído, -
 $\text{NA}^{12}\text{A}^{13}$, OA^{12} e $-\text{SiA}^{12}\text{A}^{13}$. A^{12} e A^{13} são membros
 independentemente selecionados de alquil substituído ou não
 substituído, heteroalquil substituído ou não substituído,
 30 cicloalquil substituído ou não substituído,

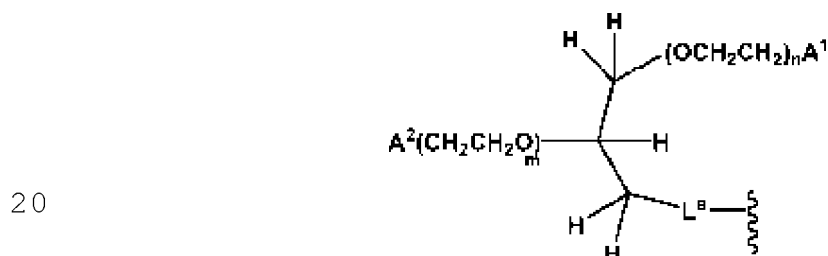
10/239

heterocicloalquil substituído ou não substituído, aril substituído ou não substituído, e heteroaril substituído ou não substituído.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de modificação polimérico tem uma estrutura que inclui a porção de acordo com as seguintes fórmulas:



Em outra modalidade de exemplo de acordo com a fórmula acima, o grupo de modificação polimérico tem uma estrutura de acordo com a seguinte fórmula:



Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros independentemente selecionados de cerca de 1 a cerca de 5.000, preferivelmente de cerca de 100 a cerca de 4.000, mais preferivelmente de cerca de 200 a cerca de 3.000, ainda mais preferivelmente de cerca de 300 a cerca de 2.000 e ainda mais preferivelmente de cerca de 400 a cerca de 1.000. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros independentemente selecionados de cerca de 1 a cerca de 500. Em uma modalidade de exemplo, m e n são

números inteiros independentemente selecionados de cerca de 1 a cerca de 70, cerca de 70 a cerca de 150, cerca de 150 a cerca de 250, cerca de 250 a cerca de 375 e cerca de 375 a cerca de 500. Em uma modalidade de exemplo, m e n são

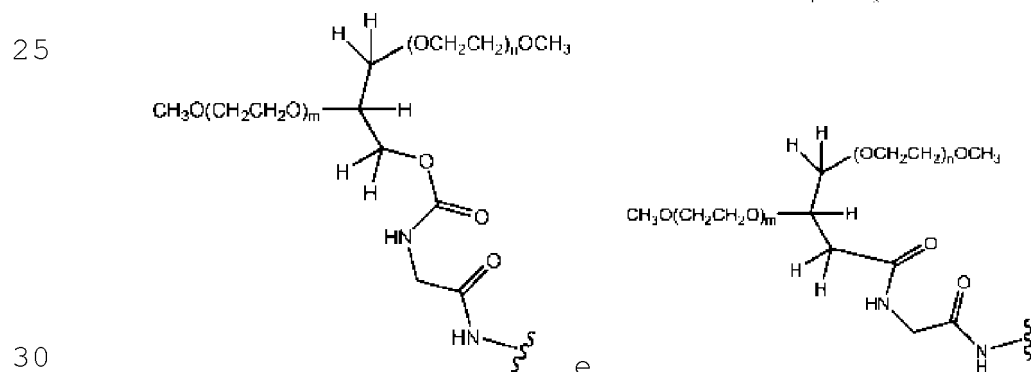
5 números inteiros independentemente selecionados de cerca de 10 a cerca de 35, cerca de 45 a cerca de 65, cerca de 95 a cerca de 130, cerca de 210 a cerca de 240, cerca de 310 a cerca de 370 e cerca de 420 a cerca de 480. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros

10 selecionados de cerca de 15 a cerca de 30. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 50 a cerca de 65. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 100 a cerca de 130. Em uma

15 modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 210 a cerca de 240. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 310 a cerca de 370. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros

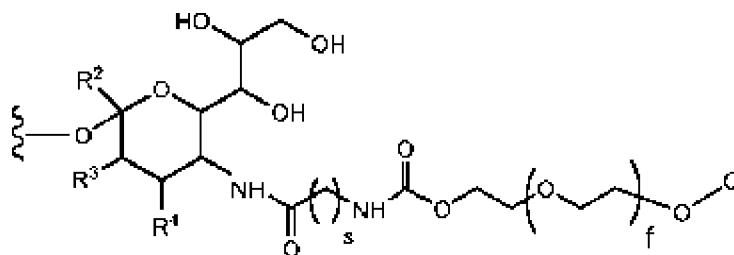
20 selecionados de cerca de 430 a cerca de 470. Em uma modalidade de exemplo, A¹ e A² são membros selecionados de -OH e -OCH₃.

Exemplos de grupos de modificação poliméricos de acordo com essa modalidade incluem a porção:



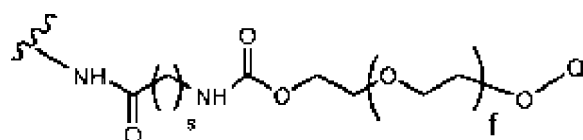
12/239

A invenção fornece um conjugado de peptídeo que compreende um grupo de ligação de glicosil, em que o grupo de ligação de glicosil é anexado a um resíduo de aminoácido do peptídeo, e em que o grupo de ligação de glicosil
5 compreende um grupo de ligação de sialil que tem a fórmula:



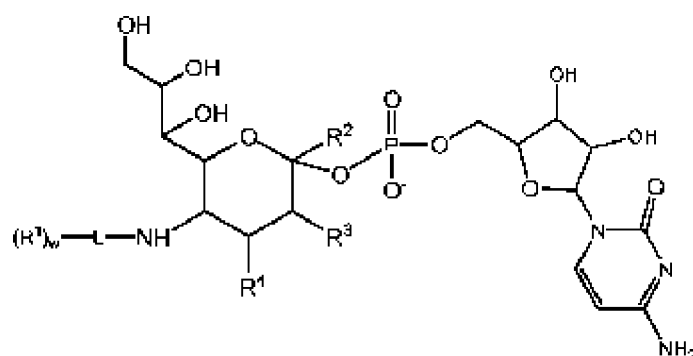
10

em que



15 é um grupo de modificação. O índice s é um número inteiro selecionado de 1 a 20. O índice f é um número inteiro selecionado de 1 a 2.500. Q é um membro selecionado de H e C₁-C₆ alquil substituído ou não substituído.

Em uma modalidade de exemplo, a invenção fornece um
20 açúcar modificado que tem a seguinte fórmula:



25

em que R¹ é a porção polimérica; L é selecionado de uma ligação e um grupo de ligação; R² é um membro selecionado
30 de H, CH₂OR⁷, COOR⁷ e OR⁷; R⁷ é um membro selecionado de H,

alquil substituído ou não substituído e heteroalquil substituído ou não substituído; R^3 e R^4 são membros independentemente selecionados de H, alquil substituído ou não substituído, OR^8 e $NHC(O)R^9$; e R^8 e R^9 são independentemente selecionados de H, alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído, ácido siálico e ácido polissialico. O índice w representa um número inteiro selecionado de 1-6, preferivelmente 1-3 e mais preferivelmente 1-2. Exemplos de grupos de ligação incluem porções de alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído e ácido siálico. Um exemplo de componente do ligante é uma porção acil.

A presente invenção fornece métodos de formação de conjugados de peptídeos. Os métodos incluem o contato de um peptídeo com um doador de açúcar modificado que porta um grupo de modificação covalentemente ligado a um açúcar. A porção de açúcar modificado é transferida do donor para um aminoácido ou resíduo de glicosil do peptídeo pela ação de uma enzima. Enzimas representativas incluem, sem limitação, glicosiltransferases, por exemplo, sialiltransferases. O método inclui o contato do peptídeo com: a) um doador de açúcar modificado; e b) uma enzima capaz de transferir uma porção de açúcar modificado do doador de açúcar modificado para um aminoácido ou resíduo de glicosil do peptídeo, sob condições adequadas para transferir uma porção de açúcar modificado do doador para um aminoácido ou resíduo de glicosil do peptídeo, assim sintetizando o referido conjugado de peptídeo.

Em uma modalidade preferida, antes da etapa a), o

peptídeo faz contato com uma sialidase, assim removendo pelo menos uma porção do ácido siálico no peptídeo.

Em outra modalidade preferida, o peptídeo faz contato com uma sialidase, uma glicosiltransferase e um doador de
5 açúcar modificado. Nessa modalidade preferida, o peptídeo está em contato com a sialidase, glicosiltransferase e doador de açúcar modificado essencialmente de modo simultâneo, não importando a ordem de adição dos vários componentes. A reação é realizada sob condições adequadas
10 para que a sialidase remova um resíduo de ácido siálico do peptídeo; e a glicosiltransferase transfira uma porção de açúcar modificado do doador de açúcar modificado a um aminoácido ou resíduo de glicosil do peptídeo.

Em outra modalidade preferida, a dessialilação e
15 conjugação são realizadas no mesmo frasco, e o peptídeo dessialilado é preferivelmente não purificado antes da etapa de conjugação. Em outra modalidade de exemplo, o método também compreende uma etapa de "capping" que envolve sialilação do conjugado de peptídeo. Essa etapa é realizada
20 no mesmo frasco de reação que contém a sialidase, sialiltransferase e doador de açúcar modificado sem purificação anterior.

Em outra modalidade preferida, a dessialilação do peptídeo é realizada, e o peptídeo assialo é purificado. O
25 peptídeo assialo purificado é então submetido a condições de reação de conjugação. Em outra modalidade de exemplo, o método também compreende uma etapa de "capping" que envolve a sialilação do conjugado de peptídeo. Essa etapa é realizada no mesmo frasco de reação que contém a sialidase,
30 sialiltransferase e doador de açúcar modificado sem

purificação anterior.

Em outra modalidade de exemplo, a etapa de "capping",
sialilação do conjugado de peptídeo, é realizada no mesmo
frasco de reação que contém a sialidase, sialiltransferase
5 e doador de açúcar modificado sem purificação anterior.

Em uma modalidade de exemplo, o contato é por um tempo
de menos que 20 horas, preferivelmente menos que 16 horas,
mais preferivelmente menos que 12 horas, ainda mais
preferivelmente menos que 8 horas, e ainda mais
10 preferivelmente menos que 4 horas.

Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece
uma mistura de reação de conjugado de peptídeo. A mistura
de reação compreende: a) uma sialidase; b) uma enzima que é
um membro selecionado de glicosiltransferase,
15 exoglicosidase e endoglicosidase; c) um açúcar modificado;
e d) um peptídeo.

Em outra modalidade de exemplo, a proporção da
sialidase ao peptídeo é selecionada de 0,1 U/L:2 mg/mL a 10
U/L:1 mg/mL, preferivelmente 0,5 U/L:2 mg/mL, mais
20 preferivelmente 1,0 U/L:2 mg/mL, ainda mais preferivelmente
10 U/L:2 mg/mL, ainda mais preferivelmente 0,1 U/L:1 mg/mL,
mais preferivelmente 0,5 U/L:1 mg/mL, ainda mais
preferivelmente 1,0 U/L:1 mg/mL, e ainda mais
preferivelmente 10 U/L:1 mg/mL.

25 Em uma modalidade de exemplo, pelo menos 10%, 20%,
30%, 40%, 50%, 60%, 70% ou 80% do referido conjugado de
peptídeo inclui no máximo duas porções PEG. As porções PEG
podem ser adicionadas em um processo de *one-pot*, ou elas
podem ser adicionadas depois de o assialo ser purificado.

30 Em outra modalidade de exemplo, pelo menos 10%, 20%,

30%, 40%, 50%, 60%, 70% ou 80% do conjugado de peptídeo inclui no máximo uma porção PEG. A porção PEG pode ser adicionada em um processo de *one-pot*, ou ela podem ser adicionada depois de o peptídeo assialo ser purificado.

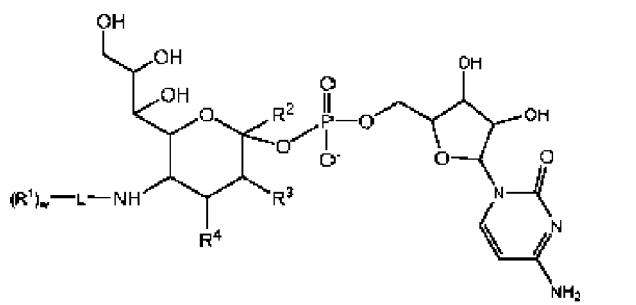
5 Em uma modalidade de exemplo adicional, o método também compreende "capping", ou adição de ácido siálico ao conjugado de peptídeo. Em outra modalidade de exemplo, sialidase é adicionada, seguida por um retardo de 30 minutos, 1 hora, 1,5 hora, ou 2 horas, seguido pela adição da glicosiltransferase, exoglicosidase, ou endoglicosidase.

10 Em outra modalidade de exemplo, sialidase é adicionada, seguida por um retardo de 30 minutos, 1 hora, 1,5 hora, ou 2 horas, seguido pela adição da glicosiltransferase, exoglicosidase, ou endoglicosidase. 15 Outros objetos e vantagens da invenção serão aparentes para aqueles habilitados na técnica a partir da descrição detalhada que se segue.

Em outra modalidade de exemplo, o método inclui: (a) o contato de um peptídeo que compreende um grupo glicosil selecionado de:



em que a é um número inteiro de 0 a 10, com um açúcar modificado que tem a fórmula:



e uma transferase adequadas que transfere o grupo de ligação de glicosil para um membro selecionado de GalNAc, Gal e Sia do referido grupo glicosil, sob condições adequadas para a referida transferência. Um exemplo de
5 açúcar modificado é CMP-ácido siálico modificado, através de uma porção de ligante, com um polímero, por exemplo, uma porção de poli(etileno glicol) de cadeia linear ou ramificada. Os radicais na fórmula acima são substancialmente a mesma identidade que aqueles encontrados
10 na fórmula idêntica acima.

O peptídeo pode ser adquirido de essencialmente qualquer fonte, no entanto, em uma modalidade, antes de ser modificado como acima discutido, o peptídeo é expresso em um hospedeiro adequado. Células de mamífero (por exemplo,
15 BHK, CHO), de bactérias (por exemplo, *E. coli*) e de inseto (por exemplo, Sf 9) são exemplos de sistemas de expressão que fornecem um peptídeo de uso nas composições e métodos aqui apresentados.

Outros objetos e vantagens da invenção serão aparentes
20 para aqueles habilitados na técnica a partir da descrição detalhada que se segue.

Descrição dos desenhos

FIG. 1 ilustra a preparação de CMP-ácido siálico-Glicerol PEG 40 kD.

25 FIG. 2 ilustra condições de reação para a preparação de CMP-ácido siálico-Glicerol PEG 40 kD.

FIG. 3 ilustra um processo de purificação para CMP-ácido siálico-Glicerol PEG 40 kD.

FIG. 4 ilustra um processo de purificação que envolve
30 Q-Sepharose para CMP-ácido siálico-Glicerol PEG 40 kD.

FIG. 5 é um espectro de ^1H RMN de CMP-ácido siálico-Glicerol PEG 40 kD.

FIG. 6 é uma tabela que fornece Exemplos de sialiltransferases de uso na formação de glicoconjugados da invenção, por exemplo, para peptídeos glicoPEGuilados com um ácido siálico modificado.

FIG. 7 é uma tabela do peptídeo ao qual um ou mais grupos de ligação de glicosil podem ser anexados para fornecer o conjugados de peptídeo da invenção.

10 Descrição detalhada da invenção e das modalidades preferidas

Abreviações

PEG, poli(etilenoglicol); PPG, poli(propilenoglicol); Ara, arabinosil; Fm, fructosil; Fuc, fucosil; Gal, galactosil; GalNAc, N-acetilgalactosaminil; Glc, glucosil; GlcNAc, N-acetilglicosaminil; Man, manosil; ManAc, manosaminil acetato; Xil, xilosil; NeuAc, sialil ou N-acetilneuraminil; Sia, sialil ou N-acetilneuraminil; e derivados e análogos desses.

20 Definições

A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui usados geralmente têm o mesmo significado como comumente compreendido por pessoa de habilidade comum na técnica à qual essa invenção pertence. Geralmente, a nomenclatura aqui usada e os procedimentos laboratoriais em cultura de células, genética molecular, química orgânica e química de ácido nucleico e hibridização são aqueles bem conhecidos e comumente empregados na técnica. Técnicas padrão são usadas para síntese de ácido nucleico e de peptídeo. As técnicas e procedimentos são

geralmente realizados de acordo com métodos convencionais na técnica e várias referências gerais (veja, geralmente, Sambrook e cols. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2^a ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., que é aqui incorporado por referência), que são fornecidas por todo esse documento. A nomenclatura aqui usada e os procedimentos laboratoriais em química analítica, e síntese orgânica descritos abaixo são aqueles bem conhecidos e comumente empregados na técnica. Técnicas padrão, ou modificações dessas, são usadas para síntese química e análise química.

Todos os oligossacarídeos aqui descritos são descritos com o nome ou abreviação para o sacarídeo não redutor (ou seja, Gal), seguido pela configuração da ligação glicosídica (α ou β), a ligação do anel (1 ou 2), a posição do anel do sacarídeo redutor envolvido na ligação (2, 3, 4, 6 ou 8), e então o nome ou abreviação do sacarídeo redutor (ou seja, GlcNAc). Cada sacarídeo é preferivelmente uma piranose. Para uma revisão de nomenclatura padrão de glicobiologia, veja, *Essentials of Glycobiology* Varki e cols. eds. CSHL Press (1999).

Oligossacarídeos são considerados como tendo uma extremidade redutora e uma extremidade não redutora, seja ou não o sacarídeo na extremidade redutora de fato um açúcar redutor. De acordo com a nomenclatura aceita, oligossacarídeos são aqui mostrados com a extremidade não redutora na esquerda e a extremidade redutora na direita.

O termo "ácido siálico" ou "sialil" refere-se a qualquer membro de uma família de açúcares carboxilatos de nove carbonos. O membro mais comum da família de ácido

siálico é ácido N-acetil neuramínico (ácido 2-ceto-5-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulopiranos-1-
ônico (frequentemente abreviado como Neu5Ac, NeuAc, ou NANA). Um segundo membro da família é ácido N-glicolil-
5 neuramínico (Neu5Gc ou NeuGc), em que o grupo N-acetil de NeuAc é hidroxilado. Um terceiro membro da família de ácido siálico é ácido 2-ceto-3-desoxi-nonulosônico (KDN) (Nadano e cols. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11.550-11.557; Kanamori e cols., J. Biol. Chem. 265:21.811-21.819 (1990)). Também
10 são incluídos ácidos siálicos 9-substituídos como 9-O-C₁-C₆ acil Neu5Ac como 9-O-lactil-Neu5Ac ou 9-O-acetil-Neu5Ac, 9-desoxi-9-flúor-Neu5Ac e 9-azido-9-desoxi-Neu5Ac. Para revisão da família de ácido siálico, veja, por exemplo, Varki, *Glicobiology* 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer- Verlag, New York (1992)). A síntese e uso de compostos de ácido siálico em um procedimento de sialilação é revelada no pedido internacional WO 92/16640, publicado em 1 de outubro de 1992.

20 "Peptídeo" refere-se a um polímero em que os monômeros são aminoácidos e são unidos através de ligações de amida, alternativamente referido como um polipeptídeo. Adicionalmente, aminoácidos não naturais, por exemplo, β -alanina, fenilglicina e homoarginina são também incluídos.
25 Aminoácidos que não são codificados por gene também podem ser usados na presente invenção. Além disso, aminoácidos que foram modificados para incluir grupos reativos, sítios de glicosilação, polímeros, porções terapêuticas, biomoléculas e outros também podem ser usados na invenção.
30 Todos os aminoácidos usados na presente invenção podem ser

o D- ou L-isômero. O L-isômero é geralmente preferido. Além disso, outros peptidomiméticos são também úteis nos peptídeos glicosilados e não glicosilados. Também são incluídos peptídeos que são incompletamente glicosilados por um sistema que expressa o peptídeo. Para uma revisão geral, veja, Spatola, A. F., em CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983). Uma listagem de alguns dos peptídeos da invenção é fornecida na FIG. 7.

O termo "conjugado de peptídeo", refere-se a espécies da invenção em que um peptídeo é conjugado com um açúcar modificado como aqui apresentado.

O termo "aminoácido" refere-se a aminoácidos de ocorrência natural e sintéticos, bem como a análogos de aminoácido e miméticos de aminoácido que funcionam em uma maneira similar aos aminoácidos de ocorrência natural. Aminoácidos de ocorrência natural são aqueles codificados pelo código genético, bem como aqueles aminoácidos que são posteriormente modificados, por exemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, e O-fosfoserina. Análogos de aminoácido refere-se a compostos que têm a mesma estrutura química básica que um aminoácido de ocorrência natural, ou seja, um α carbono que é ligado a um hidrogênio, um grupo carboxil, um grupo amino, e um grupo R, por exemplo, homosserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfônio. Tais análogos têm grupos R modificados (por exemplo, norleucina) ou esqueletos de peptídeo modificados, mas retêm a mesma estrutura química básica que um aminoácido de ocorrência natural. Miméticos de aminoácidos referem-se a compostos

químicos que têm uma estrutura que é diferente da estrutura química geral de um aminoácido, mas que funcionam em uma maneira similar a um aminoácido de ocorrência natural.

Como aqui usado, o termo "açúcar modificado", ou
5 "resíduo de açúcar modificado", refere-se a um carboidrato de ocorrência natural ou não natural que é enzimaticamente adicionado em um aminoácido ou um resíduo de glicosil de um peptídeo em um processo da invenção. O açúcar modificado é selecionado de substratos de enzima que incluem, sem
10 limitação, nucleotídeos de açúcar (mono-, di-, e trifosfatos), açúcares ativados (por exemplo, haletos de glicosil, mesilatos de glicosil) e açúcares que não são ativados nem nucleotídeos. O "açúcar modificado" é covalentemente funcionalizado com um "grupo de
15 modificação". Grupos de modificação úteis incluem, sem limitação, porções de PEG, porções terapêuticas, porções diagnósticas, biomoléculas e outros. O grupo de modificação é preferivelmente um carboidrato de ocorrência não natural, ou não modificado. O locus de funcionalização com o grupo
20 de modificação é selecionado de modo que ele não impeça o "açúcar modificado" de ser adicionado enzimaticamente a um peptídeo.

Como aqui usado, o termo "porção polimérica" refere-se a um polímero hidrossolúvel ou insolúvel em água. O termo
25 "hidrossolúvel" refere-se a porções que têm algum grau detectável de solubilidade em água. Métodos para detectar e/ou quantificar a solubilidade em água são bem conhecidos na técnica. Exemplos de polímeros hidrossolúveis incluem peptídeos, sacarídeos, poli(éteres), poli(aminas), ácidos
30 poli(carboxílicos) e outros. Peptídeos podem ter seqüências

mistas compostas de um aminoácido único, por exemplo, poli(lisina). Um exemplos de polisacarídeo é ácido poli(siálico). Um Exemplo de poli(éter) é poli(etileno glicol). Poli(etileno imina) é um exemplo de poliamina, e
5 ácido poli(acrílico) é um ácido poli(carboxílico) representativo. Polímeros hidrossolúveis preferidos são essencialmente não fluorescentes, ou emitem uma quantidade mínima de fluorescência que os tornam inadequados para uso como um marcador fluorescente em um ensaio. Polímeros que
10 não são açúcares de ocorrência natural podem ser usados. Em adição, o uso de um açúcar de ocorrência natural que é modificado por ligação covalente de uma outra entidade (por exemplo, poli(etileno glicol), poli(propileno glicol), poli(aspartato), biomolécula, porção terapêutica, porção
15 diagnóstica etc.) é também contemplado. O termo polímero hidrossolúvel também engloba espécies como sacarídeos (por exemplo, dextrano, amilose, ácido hialourônico, ácido poli(siálico), heparanos, heparinas etc.); poli(aminoácidos), por exemplo, ácido poli(glutâmico); ácidos
20 nucleicos; polímeros sintéticos (por exemplo, ácido poli(acrílico), poli(éteres), por exemplo, poli(etileno glicol); peptídeos, proteínas e outros. Polímeros insolúveis em água representativos incluem, sem limitação, polifosfazinas, alcoóis poli(vinílicos), poliamidas,
25 policarbonatos, polialquilenos, poliacrilamidas, polialquileno glicóis, óxidos de polialquileno, polialquileno tereftalatos, polivinil éteres, polivinil ésteres, polivinil haletos, polivinilpirrolidona, poliglicolídeos, polissiloxanos, poliuretanos, poli(metil
30 metacrilato), poli(etil metacrilato), poli(butil

metacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexil metacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), poli(octadecil acrilato) polietileno, polipropileno, poli(etileno glicol), óxido de poli(etileno), poli (etileno tereftalato), acetato de poli(vinila), cloreto de polivinila, poliestireno, polivinil pirrolidona, plurônicos e polivinilfenol e copolímeros desses. Em adição, o uso de um açúcar de ocorrência natural que é modificado por ligação covalente de uma outra entidade (por exemplo, poli(etileno glicol), poli(propileno glicol), poli(aspartato), biomolécula, porção terapêutica, porção diagnóstica etc.) é também contemplado. Exemplos adicionais de polímeros hidrossolúveis e insolúveis em água são descritos no pedido.

O esqueleto do polímero do polímero hidrossolúvel pode ser poli(etileno glicol) (ou seja PEG). No entanto, deve-se entender que outros polímeros relacionados são também adequados para uso na prática dessa invenção e que o uso do termo PEG ou poli(etileno glicol) é deve ser inclusivo e não exclusivo nesse caso. O termo PEG inclui poli(etileno glicol) em qualquer uma de suas formas, incluindo alcóxi PEG, PEG difuncional, PEG de multibraços, PEG em grafo, PEG ramificado, PEG pendente (ou seja PEG ou polímeros relacionados que têm um ou mais grupos funcionais pendentes ao esqueleto do polímero), ou PEG com ligações degradáveis nele.

O polímero pode ser linear ou ramificado. Polímeros

ramificados são geralmente conhecidos na técnica. Tipicamente, um polímero ramificado tem uma porção de núcleo de ramo central e uma pluralidade de cadeias de polímero linear ou ramificado ligadas ao núcleo do ramo central. PEG é comumente usado em formas ramificadas que podem ser preparadas por adição de óxido de etileno a vários polióis, como glicerol, pentaeritritol e sorbitol. A porção de ramo central também pode ser derivada de vários aminoácidos, como lisina. O poli(etileno glicol) ramificado pode ser representado em forma geral como $R(-\text{PEG}-\text{OH})_m$ em que R representa a porção de núcleo, como glicerol ou pentaeritritol, e m representa o número de braços. Moléculas de PEG de múltiplos braços, como aquelas descritas na Pat. U.S. No. 5.932.462, que é aqui incorporada em sua totalidade por referência, também podem ser usadas como o esqueleto do polímero. Em uma modalidade de exemplo, o polímero ramificado é em si anexado a uma porção de ramificação (por exemplo, cisteína, serina, lisina, e oligômeros de lisina).

Vários outros polímeros são também adequados para a invenção. Esqueletos de polímero que são não peptídicos e hidrossolúveis, em cerca de 2 a cerca de 300 lócus para anexação, são particularmente úteis na invenção. Exemplos de polímeros adequados incluem, sem limitação, outros poli(alquilenos glicóis), como polipropileno glicol ("PPG"), copolímeros de etileno glicol e propileno glicol e outros, poli(oxietilated poliols), álcool poli(olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), ácido poli(α -hidroxi), álcool poli(vinílico), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolino),

como descrito na Pat. U.S. No. 5.629.384, que é aqui incorporada em sua totalidade por referência, e copolímeros, terpolímeros, e misturas desses. Embora o peso molecular de cada cadeia do esqueleto do polímero possa variar, ele está tipicamente na faixa de cerca de 100 Da a 5 cerca de 100.000 Da, freqüentemente de cerca de 6.000 Da a cerca de 80.000 Da.

A "área sob a curva" ou "AUC", como aqui usado no contexto de administração de um medicamento de peptídeo a 10 um paciente, é definida como a área total sob a curva que descreve a concentração de medicamento em circulação sistêmica no paciente como uma função do tempo de zero ao infinito.

O termo "meia-vida" ou $T_{1/2}$ ", como aqui usado no 15 contexto de administração de um medicamento de peptídeo a um paciente, é definido como o tempo necessário para que a concentração plasmática de um medicamento em um paciente seja reduzida à metade. Há mais de uma meia-vida associada com o medicamento de peptídeo dependendo dos mecanismos de 20 clearance múltiplos, redistribuição, e outros mecanismos bem conhecidos na técnica. Comumente, alfa e beta meias-vidas são definidas de modo que a fase alfa é associada com redistribuição, e a fase beta é associada com clearance. No entanto, com medicamentos de proteína que são, na maior 25 parte do tempo, confinados à corrente sanguínea, pode haver pelo menos duas meias-vidas de clearance. Para alguns peptídeos glicosilados, clearance rápido de fase beta pode ser mediado por meio de receptores em macrófagos, ou células endoteliais que reconhecem galactose terminal, N- 30 acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, manose, ou

fucose. Clearance mais lento de fase beta pode ocorrer por meio de filtração glomerular renal para moléculas com um raio efetivo < 2 nm (aproximadamente 68 kD) e/ou retenção específica ou não específica e metabolismo em tecidos.

5 GlicoPEGuilação pode cobrir açúcares terminais (por exemplo, galactose ou N-acetilgalactosamina) e assim bloquear o clearance rápido de fase alfa por meio de receptores que reconhecem esses açúcares. Ele também conferir um maior raio efetivo e assim diminuir o volume de
10 distribuição e captação de tecido, assim prolongando a fase beta. Portanto, o impacto preciso da glicoPEGuilação sobre as meias-vidas de fase alfa e fase beta pode variar dependendo do tamanho, estado de glicosilação, e de outros parâmetros, como é bem conhecido na técnica. Uma explicação
15 adicional de "meia-vida" é encontrada em Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin and RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, pp 101 – 120).

O termo "glicoconjugação", como aqui usado, refere-se à conjugação enzimaticamente mediada de uma espécie de
20 açúcar modificado a um aminoácido ou resíduo de glicosil de um polipeptídeo, por exemplo, um peptídeo G-CSF da presente invenção. Um subgênero de "glicoconjugação" é "glico-PEGuilação", em que o grupo de modificação do açúcar modificado é poli(etileno glicol), e derivado de alquil
25 (por exemplo, m-PEG) ou derivado reativo (por exemplo, H₂N-PEG, HOOC-PEG) desses.

Os termos "grande escala" e "escala industrial" são usados de modo intercambiável e referem-se a um ciclo de reação que produz pelo menos cerca de 250 mg,
30 preferivelmente pelo menos cerca de 500 mg, e mais

preferivelmente pelo menos cerca de 1 grama de glicoconjugado no fim de um ciclo de reação único.

O termo, "grupo de ligação de glicosil", como aqui usado refere-se a um resíduo de glicosil ao qual um grupo
5 de modificação (por exemplo, porção PEG, porção terapêutica, biomolécula) é covalentemente anexado; o grupo de ligação de glicosil une o grupo de modificação ao restante do conjugado. Nos métodos da invenção, o "grupo de ligação de glicosil" torna-se covalentemente ligado a um
10 peptídeo glicosilado ou não glicosilado, assim ligando o agente a um aminoácido e/ou resíduo de glicosil no peptídeo. Um "grupo de ligação de glicosil" é geralmente derivado de um "açúcar modificado" pela anexação enzimática do "açúcar modificado" a um aminoácido e/ou resíduo de
15 glicosil do peptídeo. O grupo de ligação de glicosil pode ser uma estrutura derivada de sacarídeo que é degradada durante a formação do cassete grupo de modificação-açúcar modificado (por exemplo, oxidação→formação de base de Schiff→redução), ou o grupo de ligação de glicosil pode
20 estar intacto. Um "grupo de ligação de glicosil intacto" refere-se a um grupo de ligação que é derivado de uma porção de glicosil em que o monômero de sacarídeo que liga o grupo de modificação e o restante do conjugado não é degradado, por exemplo, oxidado, por exemplo, por sódio
25 metaperiodato. "Grupos de ligação de glicosil intactos" da invenção podem ser derivados de um oligossacarídeo de ocorrência natural por adição de unidades de glicosil ou remoção de uma ou mais unidades de glicosil de uma estrutura de sacarídeo parente.

30 O termo, "grupo de modificação não glicosídico", como

aqui usado, refere-se a grupos de modificação que não incluem um açúcar de ocorrência natural ligado diretamente ao grupo de ligação de glicosil.

O termo "porção de direcionamento" como aqui usado, refere-se a espécies que se localizarão seletivamente em um tecido ou região particular do corpo. A localização é mediada por reconhecimento específico de determinantes moleculares, tamanho molecular do agente de direcionamento ou conjugado, interações iônicas, interações hidrofóbicas e outros. Outros mecanismos de direcionamento de um agente a um tecido ou região em particular são conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Exemplos de porções de direcionamento incluem anticorpos, fragmentos de anticorpo, transferrina, HS-glicoproteína, fatores de coagulação, proteínas séricas, β -glicoproteína, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO e outros.

Como aqui usado, "porção terapêutica" significa qualquer agente útil para terapia incluindo, sem limitação, antibióticos, agentes antiinflamatórios, medicamentos antitumor, citotoxinas, e agentes radioativos. "Porção terapêutica" inclui pró-fármacos de agentes bioativos, construções em que mais de uma porção terapêutica é ligada a um veículo, por exemplo, agentes multivalentes. Porção terapêutica também inclui proteínas e construções que incluem proteínas. Exemplos de proteínas incluem, sem limitação, Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos (GCSF), Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos Macrófagos (GMCSF), Interferon (por exemplo, Interferon- α , - β , - γ), Interleucina (por exemplo, Interleucina II), proteínas séricas (por exemplo, Fatores VII, VIIa, VIII,

IX, e X), Gonadotrofina coriônica humana (HCG), Hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio Luteinizante ing (LH) e proteínas de fusão de anticorpo (por exemplo Receptor de Fator de Necrose Tumoral ((TNFR)/ proteína de fusão de domínio Fc)).

Como aqui usado, "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer material, que quando combinado com o conjugado retém a atividade do conjugados e é não reativo com o sistema imune do indivíduo. Exemplos incluem, sem limitação, qualquer um dos veículos farmacêuticos padrão l como solução salina tamponada por fosfato, água, emulsões como emulsão óleo em água, e vários tipos de agentes umectantes. Outros veículos também podem incluir soluções estéreis, comprimidos que incluem comprimidos revestidos e cápsulas. Tipicamente tais veículos contêm excipientes como amido, leite, açúcar, certos tipos de argila, gelatina, ácido esteárico ou sais desse, estearato de magnésio ou cálcio, talco, gorduras ou óleos vegetais, gomas, glicóis, ou outros excipientes conhecidos. Tais veículos também podem incluir aditivos de sabor e cor ou outros ingredientes. Composições que compreendem tais veículos são formuladas por métodos convencionais bem conhecidos.

Como aqui usado, "administração", significa administração oral, administração como um supositório, contato tópico, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intranasal ou administração subcutânea, ou o implante de um dispositivo de liberação lenta, por exemplo, uma bomba mini-osmótica, ao indivíduo. A administração é por qualquer via incluindo parenteral, e transmucosa (por exemplo, oral, nasal, vaginal, retal, ou

transdérmica). A administração parenteral inclui, por exemplo, intravenosa, intramuscular, intra-arteriolar, intradérmica, subcutânea, intraperitoneal, intraventricular, e intracraniana. Além disso, quando a
5 injeção é para tratar um tumor, por exemplo, induzir apoptose, a administração pode ser diretamente ao tumor e/ou em tecidos que circundam o tumor. Outros modos de liberação incluem, sem limitação, o uso de formulações lipossomais, infusão intravenosa, emplastos transdérmicos
10 etc.

O termo "melhoria" ou "melhorar" refere-se a qualquer indício de sucesso no tratamento de uma patologia ou condição, incluindo qualquer parâmetro objetivo ou subjetivo como redução, remissão ou diminuição dos sintomas
15 ou uma melhoria no bem estar físico ou mental do paciente. A melhoria de sintomas pode ser baseada em parâmetros objetivos ou subjetivos; incluindo os resultados de um exame físico e/ou uma avaliação psiquiátrica.

O termo "terapia" refere-se a "tratar" ou "tratamento"
20 de uma doença ou condição que inclui prevenir a ocorrência da doença ou condição em um animal que pode estar predisposto à doença mas que ainda não experimenta ou exhibe os sintomas da doença (tratamento profiláticos), inibição da doença (retardo ou interrupção de seu desenvolvimento),
25 alívio dos sintomas ou efeitos colaterais da doença (incluindo tratamento paliativo), e alívio da doença (causando regressão da doença).

O termo "quantidade eficaz" ou "uma quantidade eficaz para" ou uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou
30 qualquer termo gramaticalmente equivalente significa a

quantidade que, quando administrada a um animal para o tratamento de uma doença, é suficiente para efetuar o tratamento para aquela doença.

O termo "isolado" refere-se a um material que é substancialmente ou essencialmente livre de componentes, que são usados para produzir o material. Para conjugados de peptídeo da invenção, o termo "isolado" refere-se a material que é substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham o material na mistura usada para preparar o conjugado de peptídeo. "Isolado" e "puro" são usados de modo intercambiável. Tipicamente, conjugados de peptídeo isolados da invenção têm um nível de pureza preferivelmente expresso como uma faixa. A extremidade inferior da faixa de pureza para os conjugados de peptídeo é cerca de 60%, cerca de 70% ou cerca de 80% e a extremidade superior da faixa de pureza é cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90% ou mais que cerca de 90%.

Quando os conjugados de peptídeo são mais que cerca de 90% puros, suas purezas são também preferivelmente expressas como uma faixa. A extremidade inferior da faixa de pureza é cerca de 90%, cerca de 92%, cerca de 94%, cerca de 96% ou cerca de 98%. A extremidade superior da faixa de pureza é cerca de 92%, cerca de 94%, cerca de 96%, cerca de 98% ou cerca de 100% de pureza.

A pureza é determinada por qualquer método reconhecidos na técnica de análise (por exemplo, intensidade de banda em um gel corado por prata, eletroforese em gel de poliacrilamida, HPLC, ou um meio similar).

"Essencialmente cada membro da população", como aqui usado, descreve uma característica da população de conjugados de peptídeo da invenção em que uma percentagem selecionada dos açúcares modificados adicionados a um peptídeo são adicionados a sítios aceitadores múltiplos, idênticos no peptídeo. "Essencialmente cada membro da população" refere-se à "homogeneidade" dos sítios no peptídeo conjugado a um açúcar modificado e refere-se a conjugados da invenção, que são pelo menos cerca de 80%, preferivelmente pelo menos cerca de 90% e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% homogêneos.

"Homogeneidade", refere-se à consistência estrutural por toda a população de porções aceitadores às quais os açúcares modificados são conjugados. Assim, em um conjugado de peptídeo da invenção em que cada porção de açúcar modificado é conjugada a um sítio aceitador que tem a mesma estrutura que o sítio aceitador ao qual cada açúcar modificado é conjugado, o conjugado de peptídeo é dito como sendo cerca de 100% homogêneo. A homogeneidade é tipicamente expressa como uma faixa. A extremidade inferior da faixa de homogeneidade para o conjugados de peptídeo é cerca de 60%, cerca de 70% ou cerca de 80% e a extremidade superior da faixa de pureza é cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90% ou mais que cerca de 90%.

Quando os conjugados de peptídeo são mais ou igual a a cerca de 90% homogêneos, sua homogeneidade é também preferivelmente expressa como um faixa. A extremidade inferior da faixa de homogeneidade é cerca de 90%, cerca de 92%, cerca de 94%, cerca de 96% ou cerca de 98%. A extremidade superior da faixa de pureza é cerca de 92%,

cerca de 94%, cerca de 96%, cerca de 98% ou cerca de 100% de homogeneidade. A pureza dos conjugados de peptídeo é tipicamente determinada por um ou mais métodos conhecidos por aqueles de habilidade na técnica, por exemplo, 5 cromatografia líquidas-espectrometria de massa (LC-MS), espectrometria de vóo de massa de desabsorção de laser assistido por matriz (MALDITOF), eletroforese capilar, e outros.

“Glicoforma substancialmente uniforme” ou um “padrão 10 de glicosilação substancialmente uniforme”, quando em referência a uma espécie de glicopeptídeo, refere-se à percentagem de porções aceitadoras que são glicosiladas pela glicosiltransferase de interesse (por exemplo, fucosiltransferase). Por exemplo, no caso de uma $\alpha 1,2$ 15 fucosiltransferase, existe um padrão de fucosilação substancialmente uniforme se substancialmente todo (como abaixo definido) o $\text{Gal}\beta 1,4\text{-GlcNAc-R}$ e análogos sialilados desse são fucosilados em um conjugado de peptídeo da invenção. Nas estruturas fucosiladas aqui apresentadas, a 20 ligação Fuc-GlcNAc é geralmente $\alpha 1,6$ ou $\alpha 1,3$, com $\alpha 1,6$ geralmente preferida. Será entendido por pessoa habilitada na técnica, que o material de iniciação contém porções aceitadoras glicosiladas (por exemplo, porções $\text{Gal}\beta 1,4\text{-GlcNAc-R}$ fucosiladas). Portanto, o percentual de 25 glicosilação calculado incluirá porções aceitadoras que são glicosiladas pelos métodos da invenção, bem como porções aceitadoras já glicosiladas no material de iniciação.

O termo “substancialmente” nas definições acima de “substancialmente uniforme” geralmente significa que pelo 30 menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos

cerca de 80%, ou mais preferivelmente pelo menos cerca de 90%, e ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% das porções aceitadoras para uma glicosiltransferase particular são glicosiladas.

5 Quando grupos substituintes são especificados por suas fórmulas químicas convencionais, escritos da esquerda para a direita, eles englobam igualmente os substituintes quimicamente idênticos, que podem resultar da escrita da estrutura da direita para a esquerda, por exemplo, $-\text{CH}_2\text{O}-$
10 também deve referir-se a $-\text{OCH}_2-$.

O termo "alquil", em si ou como parte de outro substituinte significa, a menos que determinado de outra forma, uma cadeia linear ou ramificada, ou radical de hidrocarboneto cíclico, ou combinação desses, que pode ser
15 totalmente saturado, mono- ou poliinsaturado e pode incluir radicais di- e multivalentes, que têm o número de átomos de carbono designado (ou seja $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ significa um a dez carbonos). Exemplos de radicais de hidrocarboneto saturado incluem, sem limitação, grupos como metil, etil, n-propil,
20 isopropil, n-butil, t-butil, isobutil, sec-butil, ciclohexil, (ciclohexil)metil, ciclopropilmetil, homólogos e isômeros de, por exemplo, n-pentil, n-hexil, n-heptil, n-octil, e outros. Um grupo alquil insaturado é um que tem uma ou mais ligações duplas ou ligações triplas. Exemplos
25 de grupos alquil insaturados incluem, sem limitação, vinil, 2-propenil, crotil, 2-isopentenil, 2-(butadienil), 2,4-pentadienil, 3-(1,4-pentadienil), etinil, 1- e 3-propinil, 3-butinil, e os homólogos e isômeros superiores. O termo "alquil", a menos que notado de outra forma, também deve
30 incluir aqueles derivados de alquil definidos em maiores

detalhes abaixo, como "heteroalquil". Grupos alquil que são limitados a grupos de hidrocarboneto são denominados "homoalquil".

O termo "alquilenos" em si ou como parte de outro substituinte significa um radical divalente derivado de um alcano, como exemplificado, mas não limitado, por $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, e também inclui aqueles grupos descritos abaixo como "heteroalquilenos". Tipicamente, um grupo alquil (ou alquilenos) terá de 1 a 24 átomos de carbono, com aqueles grupos que têm 10 ou menos átomos de carbono sendo preferidos na presente invenção. Um "alquil inferior" ou "alquilenos inferior" é um grupo alquil ou alquilenos de cadeia mais curta, geralmente tendo oito ou menos átomos de carbono.

Os termos "alcoxi", "alquilamino" e "alquiltio" (ou tioalcoxi) são usados em seu sentido convencional, e referem-se àqueles grupos alquil anexados ao restante da molécula por meio de um átomo de oxigênio, um grupo amino, ou um átomo de enxofre, respectivamente.

O termo "heteroalquil", em si ou em combinação com outro termo, significa, a menos que determinado de outra forma, uma cadeia linear ou ramificada estável, ou radical de hidrocarboneto cíclico, ou combinações desses, que consiste no número determinado de átomos de carbono e pelo menos um heteroátomo selecionado do grupo que consiste em O, N, Si e S, e em que os átomos de nitrogênio e enxofre podem ser opcionalmente oxidados e o heteroátomo de nitrogênio pode ser opcionalmente quaternizado. Os heteroátomos O, N e S e Si podem ser colocados em qualquer posição interior do grupo heteroalquil ou na posição em que

o grupo alquil é anexado ao restante da molécula. Exemplos incluem, sem limitação, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHCH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$, e $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. Até dois heteroátomos podem ser consecutivos, como, por exemplo, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ e $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. De modo similar, o termo "heteroalquileno" em si ou como parte de outro substituinte significa um radical divalente derivado de heteroalquil, como exemplificado, mas não limitado por, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$. Para grupos heteroalquileno, os heteroátomos também podem ocupar cada um ou ambos terminais da cadeia (por exemplo, alquilenooxi, alquilenodioxí, alquilen amino, alquilenodiamino, e outros). Ainda adicionalmente, para grupos de ligação de alquileno e heteroalquileno, nenhuma orientação do grupo de ligação está indicada pela direção em que a fórmula do grupo de ligação é escrita. Por exemplo, a fórmula $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ representa tanto $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ quanto $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$.

Os termos "cicloalquil" e "heterocicloalquil", por si ou em combinação com outros termos, representam, a menos que determinado de outra forma, versões cíclicas de "alquil" e "heteroalquil", respectivamente. Adicionalmente, para heterocicloalquil, um heteroátomo pode ocupar a posição em que o heterociclo é anexado ao restante da molécula. Exemplos de cicloalquil incluem, sem limitação, ciclopentil, ciclohexil, 1-ciclohexenil, 3-ciclohexenil, cicloheptil, e outros. Exemplos de heterocicloalquil incluem, sem limitação, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridil), 1-piperidinil, 2-piperidinil, 3-piperidinil, 4-morfolinil, 3-morfolinil, tetrahidrofuran-2-il, tetrahidrofuran-3-il,

tetrahidrotien-2-il, tetrahidrotien-3-il, 1 -piperazinil, 2-piperazinil, e outros.

Os termos "halo" ou "halogênio", por si ou como parte de outro substituinte, significa, a menos que determinado de outra forma, um átomo de flúor, cloro, bromo, ou iodo. Adicionalmente, termos como "haloalquil", devem incluir monohaloalquil e polihaloalquil. Por exemplo, o termo "halo(C₁-C₄)alquil" deve incluir, mas não é limitado a, trifluormetil, 2,2,2-trifluoretil, 4-clorobutil, 3-bromopropil, e outros.

O termo "aril" significa, a menos que determinado de outra forma, um substituinte poliinsaturado, aromático que pode ser de anel único ou de múltiplos anéis (preferivelmente de 1 a 3 anéis), que são fundidos ou ligados covalentemente. O termo "heteroaril" refere-se a grupos aril (ou anéis) que contêm de um a quatro heteroátomos selecionado de N, O, e S, em que os átomos de nitrogênio e enxofre são opcionalmente oxidados, e os átomos de nitrogênio são opcionalmente quaternizados. Um grupo heteroaril pode ser anexado ao restante da molécula através de um heteroátomo. Exemplos não limitantes de grupos aril e heteroaril incluem fenil, 1-naftil, 2-naftil, 4-bifenil, 1-pirrolil, 2-pirrolil, 3-pirrolil, 3-pirazolil, 2-imidazolil, 4-imidazolil, pirazinil, 2-oxazolil, 4-oxazolil, 2-fenil-4-oxazolil, 5-oxazolil, 3-isoxazolil, 4-isoxazolil, 5-isoxazolil, 2-tiazolil, 4-tiazolil, 5-tiazolil, 2-furil, 3-furil, 2-tienil, 3-tienil, 2-piridil, 3-piridil, 4-piridil, 2-pirimidil, 4-pirimidil, 5-benzotiazolil, purinil, 2-benzimidazolil, 5-indolil, 1-isoquinolil, 5-isoquinolil, 2-quinoxalinil, 5-quinoxalinil,

3-quinolil, tetrazolil, benzo[b]furanil, benzo [b]tienil, 2,3-dihidrobenczo[1,4]dioxin-6-il, benzo[1,3]dioxol-5-il e 6-quinolil. Substituintes para cada um dos sistemas de anel de aril e heteroaril acima são selecionados do grupo de
5 substituintes aceitáveis como descrito abaixo.

Resumidamente, o termo "aril" quando usado em combinação com outros termos (por exemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquil) inclui anéis aril e heteroaril como acima definido. Portanto, o termo "arilalquil" deve incluir
10 aqueles radicais em que um grupo aril é anexado a um grupo alquil (por exemplo, benzil, fenetil, piridilmetil e outros) incluindo aqueles grupos alquil em que um átomo de carbono (por exemplo, um grupo metileno) foi substituído, por exemplo, por um átomo de oxigênio (por exemplo,
15 fenoximetil, 2-piridiloximetil, 3-(1-naftiloxi)propil, e outros).

Cada um dos termos acima (por exemplo, "alquil", "heteroalquil", "aril" e "heteroaril") deve incluir formas tanto substituídas quanto não substituídas do radical
20 indicado. Substituintes preferidos para cada tipo de radical são fornecidos abaixo.

Substituintes para os radicais alquil e heteroalquil (incluindo aqueles grupos freqüentemente referidos como alquilenos, alcenil, heteroalquilenos, heteroalcenil, alcinil, cicloalquil, heterocicloalquil, cicloalcenil, e
25 heterocicloalcenil) são genericamente referidos como "substituintes de grupo alquil", e eles podem ser um ou mais de vários grupos selecionados de, mas não limitados a:
-OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halogênio, -
30 SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -

OC(O)NR'R'' , $-\text{NR''C(O)R'}$, $-\text{NR'-C(O)NR''R''}$, $-\text{NR''C(O)}_2\text{R'}$, $-\text{NR-C(NR'R''R''')}=\text{NR''}$, $-\text{NR-C(NR'R'')}=\text{NR'}$, $-\text{S(O)R'}$, $-\text{S(O)}_2\text{R'}$, $-\text{S(O)}_2\text{NR'R''}$, $-\text{NRSO}_2\text{R'}$, $-\text{CN}$ e $-\text{NO}_2$ em um número que varia de zero a $(2m'+1)$, em que m' é o número total de átomos de carbono em tal radical. R' , R'' , R''' e R'''' referem-se preferivelmente independentemente a hidrogênio, heteroalquil substituído ou não substituído, aril substituído ou não substituído, por exemplo, aril substituído com 1-3 halogênios, alquil substituído ou não substituído, grupos alcoxi ou tioalcoxi, ou grupos arilalquil. Quando um composto da invenção inclui mais de um grupo R, por exemplo, cada um dos grupos R é independentemente selecionado como são cada grupo R' , R'' , R''' e R'''' quando mais de um desses grupos está presente. Quando R' e R'' são anexados ao mesmo átomo de nitrogênio, eles podem ser combinados com o átomo de nitrogênio para formar um anel de 5, 6 ou 7 membros. Por exemplo, $-\text{NR'R''}$ deve incluir, mas não é limitado a, 1-pirrolidinil e 4-morfolinil. A partir da discussão acima de substituintes, a pessoa habilitada na técnica compreenderá que o termo "alquil" deve incluir grupos que incluem átomos de carbono ligados a grupos outros que não grupos hidrogênio, como haloalquil (por exemplo, $-\text{CF}_3$ e $-\text{CH}_2\text{CF}_3$) e acil (por exemplo, $-\text{C(O)CH}_3$, $-\text{C(O)CF}_3$, $-\text{C(O)CH}_2\text{OCH}_3$, e outros).

Similar aos substituintes descritos para o radical alquil, substituintes para os grupos aril e heteroaril são genericamente referidos como "substituintes de grupo aril". Os substituintes são selecionados de, por exemplo: halogênio, $-\text{OR'}$, $=\text{O}$, $=\text{NR'}$, $=\text{N-OR'}$, $-\text{NR'R''}$, $-\text{SR'}$, halogênio, $-\text{SiR'R''R'''}$, $-\text{OC(O)R'}$, $-\text{C(O)R'}$, $-\text{CO}_2\text{R'}$, $-\text{CONR'R''}$,

$-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$, $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''$, $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''')=\text{NR}''$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NRSO}_2\text{R}'$, $-\text{CN}$ e $-\text{NO}_2$, $-\text{R}'$, $-\text{N}_3$, $-\text{CH}(\text{Ph})_2$, fluor($\text{C}_1\text{-C}_4$)alcoxi, e flúor($\text{C}_1\text{-C}_4$)alquil, em um número que varia de zero ao número total de valências abertas no sistema de anel aromático; e quando R' , R'' , R''' e R' são preferivelmente independentemente selecionados de hidrogênio, alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído, aril substituído ou não substituído e heteroaril substituído ou não substituído. Quando um composto da invenção inclui mais de um grupo R, por exemplo, cada um dos grupos R é independentemente selecionado como são cada grupo R' , R'' , R' e R' quando mais de um desses grupos está presente. Nos esquemas que se seguem, o símbolo X representa "R" como acima descrito.

Dois dos substituintes em átomos adjacentes do anel aril ou heteroaril podem ser opcionalmente substituídos com um substituinte de fórmula $-\text{T}-\text{C}(\text{O})-(\text{CRR}')_u-\text{U}-$, em que T e U são independentemente $-\text{NR}-$, $-\text{O}-$, $-\text{CRR}'-$ ou uma ligação única, e u é um número inteiro de 0 a 3. Alternativamente, dois dos substituintes em átomos adjacentes do anel aril ou heteroaril podem ser opcionalmente substituídos com um substituinte de fórmula $-\text{A}-(\text{CH}_2)_r-\text{B}-$, em que A e B são independentemente $-\text{CRR}'-$, $-\text{O}-$, $-\text{NR}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'-$ ou uma ligação única, e r é um número inteiro de 1 a 4. Uma das ligações únicas do novo anel assim formado pode ser opcionalmente substituída por uma ligação dupla. Alternativamente, dois dos substituintes em átomos adjacentes do anel aril ou heteroaril podem ser

opcionalmente substituídos com um substituinte de fórmula $-(CRR')_z-X-(CR''R''')_d-$, em que z e d são independentemente números inteiros de 0 a 3, e X é $-O-$, $-NR'-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, ou $-S(O)_2NR'-$. Os substituintes R , R' , R'' e R''' são
5 preferivelmente independentemente selecionados de hidrogênio ou (C_1-C_6) alquil substituído ou não substituído.

Como aqui usado, o termo "heteroátomo" deve incluir oxigênio (O), nitrogênio (N), enxofre (S) e silício (Si).

Como aqui usado, peptídeo de Fator VII refere-se aos
10 peptídeos de Fator VII e Fator VIIa. Os termos geralmente referem-se a variantes e mutantes desses peptídeos, incluindo mutantes de adição, deleção, substituição e de proteína de fusão. Quando Fator VII e Fator VIIa são usados, o so deve ser ilustrativo de duas espécies do
15 gênero "peptídeo de Fator VII".

A invenção deve incluir sais dos compostos da invenção que são preparados com ácido ou bases relativamente não tóxicos, dependendo dos substituintes particulares encontrados nos compostos descritos nessa. Quando os
20 compostos da presente invenção contêm funcionalidades relativamente ácidas, sais de adição básica podem ser obtidos por contato da forma neutra de tais compostos com uma quantidade suficiente da base desejada, pura ou em um solvente inerte adequado. Exemplos de sais de adição básica
25 incluem sais de sódio, potássio, lítio, cálcio, amônio, amino orgânico, ou de magnésio, ou um sal similar. Quando os compostos da presente invenção contêm funcionalidades relativamente básicas, sais de adição ácida podem ser obtidos por contato da forma neutra de tais compostos com
30 uma quantidade suficiente do ácido desejado, puro ou em um

solvente inerte adequado. Exemplos de sais de adição ácida incluem auqueles derivados de ácidos inorgânicos como ácidos clorídrico, hidrobrômico, nítrico, carbônico, monohidrogencarbônico, fosfórico, monohidrogenfosfórico, dihidrogenfosfórico, sulfúrico, monohidrogensulfúrico, hidriódico, ou de fósforo e outros, bem como os sais derivados de ácidos orgânicos relativamente não tóxicos como acético, propiônico, isobutírico, maleico, malônico, benzóico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, benzenossulfônico, p-tolilsulfônico, cítrico, tartárico, metanossulfônico, e outros. Também são incluídos sais de aminoácidos como arginato e outros, e sais de ácidos orgânicos como ácidos glicurônico ou galactunônico e outros (veja, por exemplo, Berge e cols., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science 66: 1-19 (1977)). Certos compostos específicos da presente invenção contêm funcionalidades básicas e ácidas que permitem que os compostos sejam convertidos em sais de adição básica ou ácida.

As formas neutras dos compostos são preferivelmente regeneradas por contato do sal com uma base ou ácido e isolamento dos compostos parentes de maneira convencional. A forma parente do composto difere das várias formas de sal em certas propriedades físicas, como solubilidade em solventes polares.

"Contra-íon de sal", como aqui usado, refere-se a íons positivamente carregados que se associam com um composto da invenção quando uma de suas porções é negativamente carregada (por exemplo COO⁻). Exemplos de contra-íons de sal incluem H⁺, H₃O⁺, amônio, potássio, cálcio, lítio,

magnésio e sódio.

Como aqui usado, o termo "CMP-SA-PEG" é uma molécula de citidina monofosfato que é conjugada a um ácido siálico que compreende uma porção de polietileno glicol. Se um comprimento da cadeia de polietileno glicol não é especificado, então qualquer comprimento de cadeia de PEG é possível (por exemplo 1 kD, 2 kD, 5 kD, 10 kD, 20 kD, 30 kD, 40 kD). Um exemplo de CMP-SA-PEG é o composto 5 no Esquema 1.

10 I. Introdução

Para melhorar a eficácia de peptídeos recombinantes usados para objetivos terapêuticos, a presente invenção fornece conjugados de peptídeos glicosilado e não glicosilado com um grupo de modificação. Os grupos de modificação podem ser selecionados de grupos de modificação poliméricos como, por exemplo, PEG (m-PEG), PPG (m-PPG) etc., porções terapêuticas, porções diagnósticas, porções de direcionamento e outros. A modificação do peptídeo, por exemplo, com um grupo de modificação polimérico hidrossolúvel pode melhorar a estabilidade e tempo de retenção dos peptídeos recombinantes na circulação do paciente, e/ou reduzir a antigenicidade dos peptídeos recombinantes.

O conjugados de peptídeo da invenção pode ser formado pela anexação enzimática de um açúcar modificado ao peptídeo glicosilado ou não glicosilado. Um sítio de glicosilação e/ou um grupo glicosil modificado fornece um locus para conjugação de um açúcar modificado que porta um grupo de modificação ao peptídeo, por exemplo, por glicoconjugação.

Os métodos da invenção também tornam possível montar conjugados de peptídeo e glicoconjugados de peptídeo que têm um padrão de derivatização substancialmente homogêneo. As enzimas usadas na invenção são geralmente seletivas para um resíduo de aminoácido particular, combinação de resíduos de aminoácidos, particular resíduos de glicosil, ou combinações de resíduo de glicosil do peptídeo. Os métodos são também práticos para a produção em larga escala de conjugados de peptídeo. Portanto, os métodos da invenção fornecem um meio prático para a preparação em larga escala de conjugados de peptídeo que têm padrões de derivatização uniformes pré-selecionados. Os métodos são particularmente bem adequados para a modificação de peptídeos terapêuticos, que incluem, sem limitação, glicopeptídeos que são incompletamente glicosilados durante a produção em células de cultura de células (por exemplo, células de mamífero, células de inseto, células de planta, células fúngicas, células de levedura, ou células procarióticas) ou plantas ou animais transgênicos.

A presente invenção também fornece conjugados de peptídeos glicosilados e não glicosilados com meia-vida terapêutica aumentada devido, por exemplo, à taxa de clearance reduzida, ou taxa reduzida de captação pelo sistema imune ou reticuloendotelial (RES). Além disso, os métodos da invenção fornecem um meio para mascarar determinantes antigênicos em peptídeos, assim reduzindo ou eliminando uma resposta imune do hospedeiro contra o peptídeo. Anexação seletiva de agentes de direcionamento também pode ser usada para direcionar um peptídeo a um receptor de superfície de tecido ou célula particular que é

específico para o agente de direcionamento particular.

A determinação de condições ótimas para a preparação de conjugados de peptídeo com polímeros hidrossolúveis, por exemplo, envolve a otimização de numerosos parâmetros, que
5 são dependentes da identidade do peptídeo e do polímero hidrossolúvel. Por exemplo, quando o polímero é poli(etileno glicol), por exemplo, um poli(etileno glicol) ramificado, um equilíbrio é preferivelmente estabelecido entre a quantidade de polímero utilizada na reação e a
10 viscosidade da mistura de reação atribuível à presença do polímero: se o polímero é muito concentrado, a mistura de reação torna-se viscosa, retardando a taxa de transferência de massa e reação.

Além disso, embora seja intuitivamente aparente a
15 adição de um excesso de enzima, os presentes inventores reconheceram que, quando a enzima está presente em grande excesso, a enzima em excesso torna-se um contaminante cuja remoção requer etapas extra de purificação e material e aumentos desnecessários do custo do produto final.

20 Além disso, é geralmente desejado a produção de um peptídeo com um nível controlado de modificação. Em alguns casos, é desejável adicionar um açúcar modificado preferencialmente. Em outros casos, é desejável adicionar dois açúcares modificados preferencialmente. Assim, as
25 condições de reação são preferivelmente controladas para influenciar o grau de conjugação dos grupos de modificação ao peptídeo.

A presente invenção fornece condições sob as quais o rendimento de um peptídeo, tendo o nível desejado de
30 conjugação, é maximizado. As condições nos exemplos de

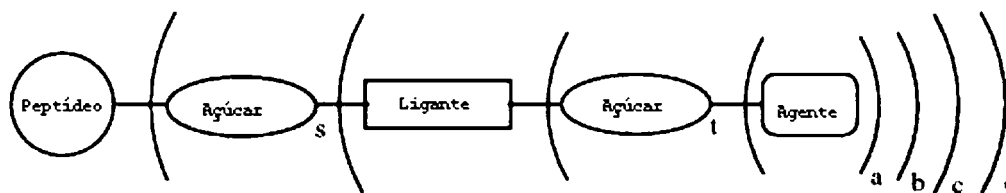
modalidades da invenção também reconhecem o consumo dos vários reagentes e os materiais e tempo necessários para purificar o produto: as condições de reação aqui apresentadas são otimizadas para fornecer excelentes
5 rendimentos do produto desejado, enquanto minimizam o desperdício de reagentes caros.

II. As composições de matéria/conjugados de peptídeo

Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um conjugado entre um açúcar modificado e um peptídeo. A
10 presente invenção também fornece um conjugado entre um grupo de modificação e um peptídeo. Um conjugado de peptídeo pode ter uma de várias formas. Em uma modalidade de exemplo, um conjugado de peptídeo pode compreender um peptídeo e um grupo de modificação ligado a um aminoácido
15 do peptídeo através de um grupo de ligação de glicosil. Em outra modalidade de exemplo, um conjugado de peptídeo pode compreender um peptídeo e um grupo de modificação ligado a um resíduo de glicosil do peptídeo através de um grupo de ligação de glicosil. Em um outro exemplo de modalidade, o
20 conjugado de peptídeo pode compreender um peptídeo e um grupo de ligação de glicosil que é ligado a um carboidrato de glicopeptídeo e diretamente a um resíduo de aminoácido do esqueleto do peptídeo. Ainda em outro exemplo de modalidade, um conjugado de peptídeo pode compreender um
25 peptídeo e um grupo de modificação ligado diretamente a um resíduo de aminoácido do peptídeo. Nessa modalidade preferida, o conjugado de peptídeo pode não compreender um grupo glicosil. Em qualquer dessas modalidades, o peptídeo pode ou não ser glicosilado.

30 Os conjugados da invenção corresponderão tipicamente à

estrutura geral:



5

em que os símbolos a, b, c, d e s representam um número inteiro positivo, diferente de zero; e t é 0 ou um número inteiro positivo. O "agente", ou grupo de modificação, pode ser um agente terapêutico, um agente bioativo, um rótulo detectável, um grupo de modificação polimérico como um polímero hidrossolúvel (por exemplo, PEG, m-PEG, PPG, e m-PPG) ou outros. O "agente", ou grupo de modificação, pode ser um peptídeo, por exemplo, enzima, anticorpo, antígeno etc. O ligante pode ser qualquer um de uma grande variedade de grupos de ligação, infra. Alternativamente, o ligante pode ser uma ligação única ou um "ligante de ordem zero".

15 II. A. Peptídeo

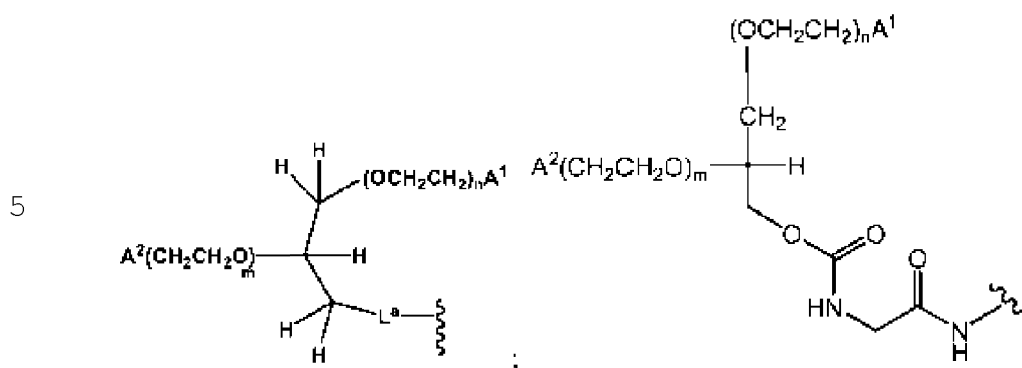
O peptídeo no conjugado de peptídeo é um membro selecionado do peptídeo na FIG. 7. Nesses casos, o peptídeo no conjugado de peptídeo é um membro selecionado de proteínas morfogênicas do osso (por exemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15), neurotrofinas (por exemplo, NT-3, NT-4, NT-5), fatores de diferenciação do crescimento (por exemplo, GDF-5), fator neurotrófico derivado de linhagem de células da glia (GDNF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento de nervos (NGF), fator de von Willebrand (vWF) protease, Fator VII, Fator VIIa, Fator VIII, Fator IX,

30

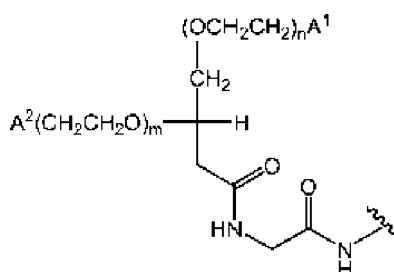
Fator X, Fator XI, Fator VIII de domínio B deletado, proteína de fusão de vWF-Fator VIII que tem Fator VIII de comprimento total, proteína de fusão de vWF-Fator VIII que tem Fator VIII de domínio B deletado, eritropoietina (EPO),
5 fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), Fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interferon alfa, interferon beta, interferon gama, α_1 -antitripsina (ATT, ou inibidor de α_1 protease, glicocerebrosidase, ativador de plasminogênio de tipo
10 tecidual (TPA), Interleucina-2 (IL-2), uroquinase, DNase humana, insulina, Proteína de superfície de Hepatite B (HbsAg), hormônio do crescimento humano, proteína de fusão de receptor de TNF-região Fc de IgG (Enbrel™), anticorpo monoclonal anti-HER2 (Herceptin™), anticorpo monoclonal
15 para Proteína F de Vírus Sincicial Respiratório (Synagis™), anticorpo monoclonal para TNF- α (Remicade™), anticorpo monoclonal para glicoproteína IIb/IIIa (Reopro™), anticorpo monoclonal para CD20 (Rituxan™), anti-trombina III (AT III), gonadotrofina coriônica humana
20 (hCG), alfa-galactosidase (Fabrazyme™), alfa-iduronidase (Aldurazyme™), hormônio folículo-estimulante, beta-glicosidase, anticorpo monoclonal anti-TNF-alfa, peptídeo-1 semelhante a glucagon (GLP-1), peptídeo-2 semelhante a glucagon (GLP-2), beta-glicosidase, alfa-galactosidase A, e
25 fato de crescimento de fibroblastos. Em certas modalidades, o peptídeo no conjugado de peptídeo é Fator VIII. Em outras modalidades, o peptídeo no conjugado de peptídeo é interferon alfa.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de modificação
30 polimérico tem uma estrutura que inclui uma porção de

acordo com as seguintes fórmulas:



10



e

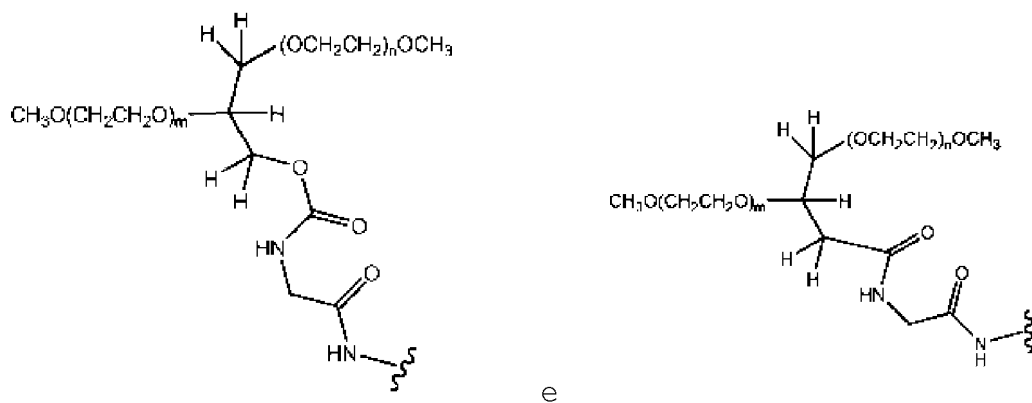
Em uma modalidade de exemplo, m e n são números
 15 inteiros independentemente selecionados de cerca de 1 a
 cerca de 5.000, preferivelmente de cerca de 100 a cerca de
 4.000, mais preferivelmente de cerca de 200 to 20 cerca de
 3.000, ainda mais preferivelmente de cerca de 300 a cerca
 de 2000 e ainda mais preferivelmente de cerca de 400 a
 20 cerca de 1.000. Em uma modalidade de exemplo, m e n são
 números inteiros independentemente selecionados de cerca de
 1 a cerca de 500. Em uma modalidade de exemplo, m e n são
 números inteiros independentemente selecionados de cerca de
 1 a cerca de 70, cerca de 70 a cerca de 150, cerca de 150 a
 25 cerca de 250, cerca de 250 a cerca de 375 e cerca de 375 a
 cerca de 500. Em uma modalidade de exemplo, m e n são
 números inteiros independentemente selecionados de cerca de
 10 a cerca de 35, cerca de 45 a cerca de 65, cerca de 95 a
 cerca de 130, cerca de 210 a cerca de 240, cerca de 310 a
 30 cerca de 370 e cerca de 420 a cerca de 480. Em uma

modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 15 a cerca de 30. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 50 a cerca de 65. Em uma

5 modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 100 a cerca de 130. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 210 a cerca de 240. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros

10 selecionados de cerca de 310 a cerca de 370. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 430 a cerca de 470. Em uma modalidade de exemplo, A¹ e A₂ são membros selecionados de -OH e -OCH₃.

15 Exemplos de grupos de modificação poliméricos de acordo com essa modalidade incluem a porção:



Em uma modalidade de exemplo, em que o grupo de

25 modificação é um polímero hidrossolúvel ramificado, como aqueles acima mostrados, é geralmente preferível que a concentração de sialidase seja cerca de 1,5 a cerca de 2,5 U/L de mistura de reação. Mais preferivelmente a quantidade de sialidase é cerca de 2 U/L.

30 Em outra modalidade de exemplo, cerca de 5 a cerca de

9 gramas de substrato de peptídeo faz contato com as quantidades de sialidase acima apresentadas.

O açúcar modificado está presente na mistura de reação em uma quantidade de cerca de 1 grama a cerca de 6 gramas, preferivelmente de cerca de 3 gramas a cerca de 4 gramas. É geralmente preferível manter a concentração de um açúcar modificado que tem uma porção de modificação de polímero hidrossolúvel ramificado, por exemplo, a porção acima mostrada, em menos que cerca de 0,5 mM.

10 Em certas modalidades, o grupo de modificação é um óxido de poli(alquileno) ramificado, por exemplo, poli(etileno glicol), que tem um peso molecular de cerca de 20 kD a cerca de 60 kD, mais preferivelmente, de cerca de 30 kD a cerca de 50 kD, e ainda mais preferivelmente cerca
15 de 40 kD. Em outras modalidades, o grupo de modificação é um óxido de poli(alquileno) ramificado, por exemplo, poli(etileno glicol), que tem um peso molecular de pelo menos cerca de 80 kD, preferivelmente pelo menos cerca de 100 kD, mais preferivelmente pelo menos cerca de 120 kD,
20 pelo menos cerca de 140 kD ou pelo menos cerca de 160 kD. Ainda em outra modalidade, o óxido de poli(alquileno) ramificado, por exemplo, poli(etileno glicol) é de pelo menos cerca de 200 kD, como de pelo menos cerca de 80 kD a pelo menos cerca de 200 kD, incluindo pelo menos cerca de
25 160 kD e pelo menos cerca de 180 kD. Como aqueles habilitados perceberão, o peso molecular dos polímeros é freqüentemente polidisperso, assim, a frase "cerca de" no contexto de peso molecular preferivelmente engloba uma escala de valores em torno do número determinado. Por
30 exemplo, um grupo de modificação preferido que tem um peso

molecular de cerca de 40 kD é um que tem um peso molecular de cerca de 35 kD a cerca de 45 kD. Aqueles habilitados perceberão que a confiança em estruturas de PEG ramificado acima apresentadas é simplesmente para clareza de
5 ilustração, o PEG pode ser substituído por substancialmente qualquer porção polimérica, incluindo, sem limitação aquelas espécies apresentadas na definição de "porção polimérica" encontrada nessa.

Com relação à concentração de glicosiltransferase, em
10 uma modalidade atualmente preferida, com o uso do grupo de modificação acima apresentado, a proporção de glicosiltransferase para peptídeo é de cerca de 40 µg/mL de transferase a cerca de 200 µM de peptídeo.

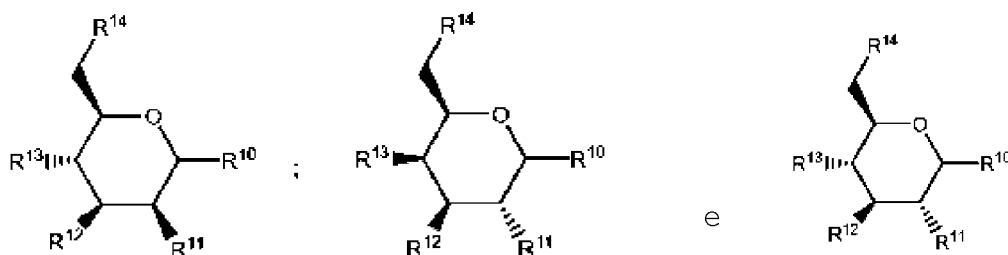
II. B. Açúcar modificado

15 Em uma modalidade de exemplo, os peptídeos da invenção, como Fator VIII, interferon alfa, e os peptídeos listados na FIG. 7, reagem com um açúcar modificado, assim formando um conjugado de peptídeo. um açúcar modificado compreende uma "porção doadora de açúcar" bem como uma
20 "porção de transferência de açúcar". A porção doadora de açúcar é qualquer porção do açúcar modificado que será anexada ao peptídeo, através de uma porção de glicosil ou porção de aminoácido, como um conjugado da invenção. A porção doadora de açúcar inclui aqueles átomos que são
25 quimicamente alterados durante sua conversão do açúcar modificado ao grupo de ligação de glicosil do conjugado de peptídeo. A porção de transferência de açúcar é qualquer porção do açúcar modificado que não será anexada ao peptídeo como um conjugado da invenção. Por exemplo, um
30 açúcar modificado da invenção é o nucleotídeo de açúcar

PEGuilado, PEG-ácido siálico CMP. Para PEG-ácido siálico CMP, a porção doadora de açúcar, ou porção doadora de PEG-sialil, compreende PEG-ácido siálico enquanto a porção de transferência de açúcar, ou porção de transferência de sialil, compreende CMP.

Em açúcares modificados de uso na invenção, a porção sacaril é preferivelmente um sacarídeo, um desoxi-sacarídeo, um amino-sacarídeo, ou um N-acil sacarídeo. O termo "sacarídeo" e seus equivalentes, "sacaril", "açúcar", e "glicosil" referem-se a monômeros, dímeros, oligômeros e polímeros. A porção de açúcar é também funcionalizada com um grupo de modificação. O grupo de modificação é conjugado à porção sacaril, tipicamente, através de conjugação com uma amina, sulfidril ou hidroxil, por exemplo, hidroxil primário, porção no açúcar. Em uma modalidade de exemplo, o grupo de modificação é anexado através de uma porção amina no açúcar, por exemplo, através de uma amida, um uretano ou uma uréia que é formada através da reação da amina com um derivado reativo do grupo de modificação.

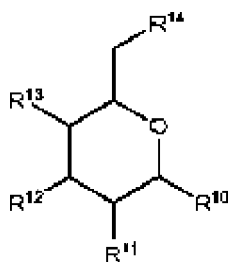
Qualquer porção sacaril pode ser utilizada como a porção doadora de açúcar do açúcar modificado. A porção sacaril pode ser um açúcar conhecido, como manose, galactose ou glicose, ou uma espécie que tem a estereoquímica de um açúcar conhecido. As fórmulas gerais desses açúcares modificados são:



Outras porções sacaril que são úteis na formação das composições da invenção incluem, sem limitação fucose e ácido siálico, bem como açúcares de amino como glicosamina, galactosamina, manosamina, o análogo de 5-amina de ácido siálico e outros. A porção sacaril pode ser a estrutura encontrada na natureza ou ela pode ser modificada para fornecer um sítio para conjugação do grupo de modificação. Por exemplo, em uma modalidade, o açúcar modificado fornece um derivado de ácido siálico em que a porção 9-hidroxi é substituída com uma amina. A amina é facilmente derivatizada com um análogo ativado de um grupo de modificação selecionado.

Exemplos de açúcares modificados de uso na invenção são descritos no Pedido de Patente PCT No. PCT/US05/002522, que é aqui incorporado por referência.

Em uma modalidade de exemplo adicional, a invenção utiliza açúcares modificados em que a posição 6-hidroxil é convertida à porção de amina correspondente, que porta um cassete de ligante-grupo de modificação como aqueles acima apresentados. Exemplos de grupos glicosil que podem ser usados como o núcleo desses açúcares modificados incluem Glu, Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc, Fuc, Xyl, Man, e outros. Um açúcar modificado representativo de acordo com essa modalidade tem a fórmula:

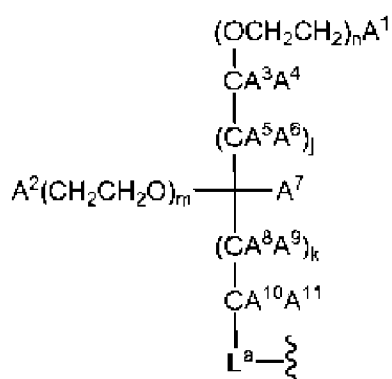


em que R¹¹-R¹⁴ são membros independentemente

selecionados de H, OH, C(O)CH₃, NH, e NHC(O)CH₃. R¹⁰ é uma
 ligação a um outro resíduo de glicosil (-O-glicosil) ou a
 um aminoácido do peptídeo Fator VII/Fator VIIa (-NH-(Fator
 VII/Fator VIIa)). R¹⁴ é ORI, NHR¹ ou NH-L-R¹. R¹ e NH-L-R¹
 5 são como acima descrito.

II. C. Grupos de ligação de glicosil

Em uma modalidade de exemplo, a invenção fornece um
 conjugado de peptídeo formado entre um açúcar modificado da
 invenção e um peptídeo. Em outra modalidade de exemplo,
 10 quando o grupo de modificação no açúcar modificado inclui a
 porção:

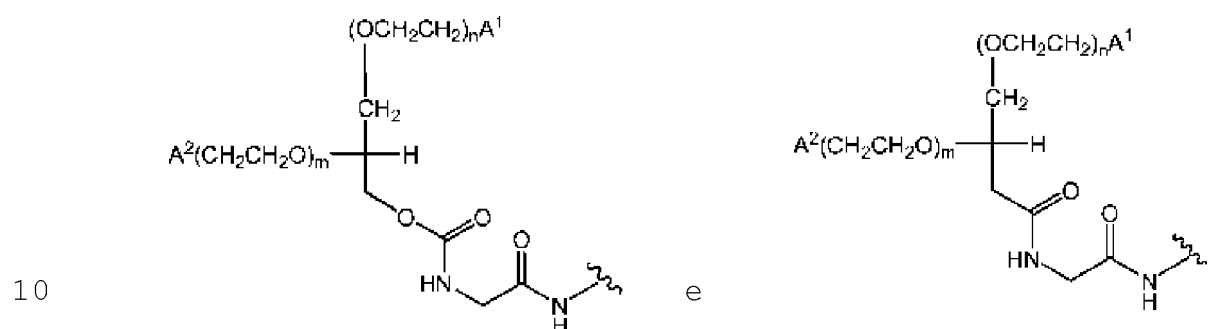


e o peptídeo no conjugado de peptídeo é um membro
 20 selecionado dos peptídeos na FIG. 7. Ainda em outra
 modalidade de exemplos, o peptídeo no conjugado de peptídeo
 é um membro selecionado de proteínas morfogênicas do osso
 (por exemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6,
 BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-
 25 14, BMP-15), neurotrofinas (por exemplo, NT-3, NT-4, NT-5),
 fatores de diferenciação do crescimento (por exemplo, GDF-
 5), fator neurotrófico derivado de linhagem de células
 (GDNF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF),
 fator de crescimento de nervos (NGF), fator de von
 30 Willebrand (vWF) protease, Fator VII, Fator VIIa, Fator

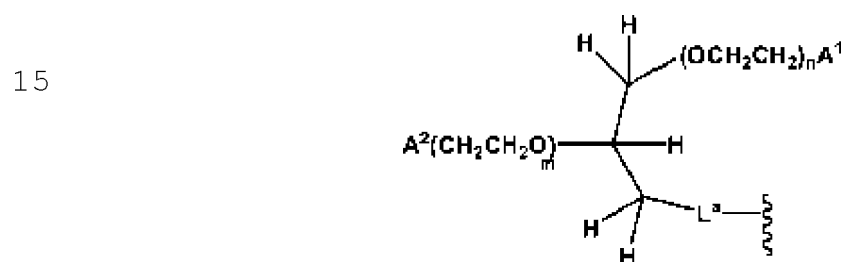
VIII, Fator IX, Fator X, Fator XI, Fator VIII de domínio B deletado, proteína de fusão de vWF-Fator VIII que tem Fator VIII de comprimento total, proteína de fusão de vWF-Fator VIII tendo Fator VIII de domínio B deletado, eritropoietina
5 (EPO), fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), Fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interferon alfa, interferon beta, interferon gama, α 1-antitripsina (ATT, ou inibidor de α -1 protease), glicocerebrosidase, Ativador de plasminogênio de
10 tipo tecidual (TPA), Interleucina-2 (IL-2), uroquinase, DNase humana, insulina, Proteína de superfície de Hepatite B (HbsAg), hormônio do crescimento humano, proteína de fusão de receptor de TNF-região Fc de IgG (Enbrel™), anticorpo monoclonal anti-HER2 (Herceptin™), anticorpo
15 monoclonal para Proteína F de Vírus Sincicial Respiratório (Synagis™), anticorpo monoclonal para TNF- α (Remicade™), anticorpo monoclonal para glicoproteína IIb/IIIa (Reopro™), anticorpo monoclonal para CD20 (Rituxan™), anti-trombina III (AT III), gonadotrofina coriônica humana
20 (hCG), alfa-galactosidase (Fabrazyme™), alfa-iduronidase (Aldurazyme™), hormônio folículo-estimulante, beta-glicosidase, anticorpo monoclonal anti-TNF-alfa, peptídeo-1 semelhante a glucagon (GLP-1), peptídeo-2 semelhante a glucagon (GLP-2), beta-glicosidase, alfa-galactosidase A, e
25 fato de crescimento de fibroblastos. Em certas modalidades o peptídeo é Fator VIII ou interferon alfa. Nessa modalidade preferida, o porção doadora de açúcar (como a porção sacaril e o grupo de modificação) do açúcar modificado torna-se um "grupo de ligação de glicosil". O
30 "grupo de ligação de glicosil" pode referir-se

alternativamente à porção de glicosil que é interposta entre o peptídeo e o grupo de modificação.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de modificação polimérico inclui uma porção que tem a estrutura de acordo com as seguintes fórmulas:

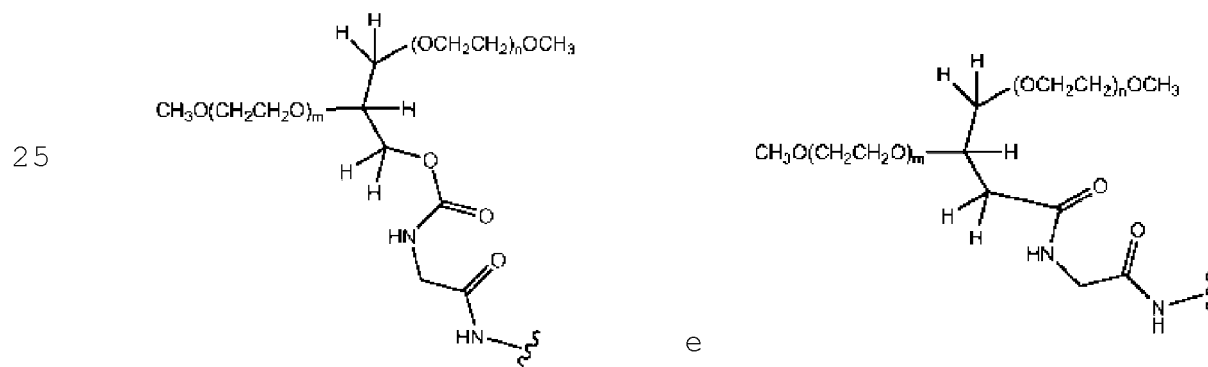


Em uma modalidade de exemplo, grupo de modificação no açúcar modificado inclui a porção:



Em uma modalidade de exemplo, A^1 e A^2 são membros selecionados de $-OH$ and $-OCH_3$.

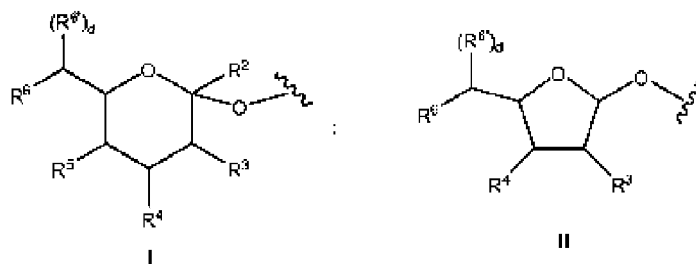
Exemplos de grupos de modificação poliméricos de acordo com essa modalidade incluem a porção:

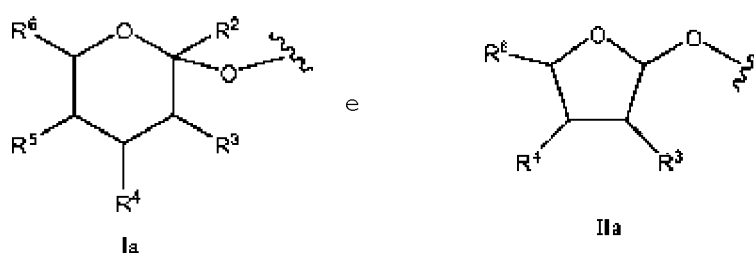


Como será percebido por aqueles de habilidade na técnica, as porções PEG em cada uma das estruturas acima

Devido à versatilidade dos métodos disponíveis para adição e/ou modificação de resíduos de glicosil em um peptídeo, os grupos de ligação de glicosil pode ter substancialmente qualquer estrutura. Na discussão que se segue, a invenção é ilustrada em referência ao uso de derivados selecionados de furanose e piranose. Aqueles habilitados na técnica reconhecerão que o foco da discussão é para clareza de ilustração e que as estruturas e composições apresentadas são geralmente aplicáveis por todos os gêneros de grupos de ligação de glicosil e açúcares modificados. O grupo de ligação de glicosil pode compreender virtualmente qualquer mono- ou oligossacarídeo. Os grupos de ligação de glicosil podem ser anexados a um aminoácido através da cadeia lateral ou através do esqueleto do peptídeo. Alternativamente os grupos de ligação de glicosil pode ser anexado ao peptídeo através de uma porção sacaril. Essa porção sacaril pode ser a porção de uma estrutura de glicano ligada em O ou ligada em N no peptídeo.

Em uma modalidade de exemplo, a invenção fornece um conjugado de peptídeo que compreende um grupo de ligação de glicosil intacto que tem a fórmula que é seleccionada de:

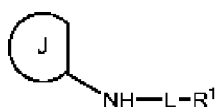




5

Nas Fórmulas I e Ia R^2 é H, CH_2OR^7 , COOR^7 ou OR^7 , em que R^7 representa H, alquil substituído ou não substituído ou heteroalquil substituído ou não substituído. Quando COOR^7 é um ácido carboxílico ou carboxilato, ambas formas são representadas pela designação da estrutura única COO^- ou COOH . Nas Fórmulas I, Ia, II ou IIa, os símbolos R^3 , R^4 , R^5 , R^6 e R^6' representam independentemente H, alquil substituído ou não substituído, OR^8 , $\text{NHC(O)}R^9$. O índice d é 0 ou 1. R^8 e R^9 são independentemente selecionados de H, alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído, ácido siálico ou ácido polissialico. Pelo menos um de R^3 , R^4 , R^5 , R^6 e R^6' inclui um grupo de modificação. Esse grupo de modificação pode ser uma porção de modificação polimérica por exemplo, PEG, ligada através de uma ligação ou um grupo de ligação. Em uma modalidade de exemplo, R^6 e R^6' , junto com o carbono ao qual eles são anexados são componentes da cadeia lateral de piruvil de ácido siálico. Em uma modalidade de exemplo adicional, a cadeia lateral de piruvil é funcionalizada com o grupo de modificação polimérico. Em outros exemplos de modalidade, R^6 e R^6' , junto com o carbono ao qual eles são anexados são componentes da cadeia lateral de ácido siálico e o grupo de modificação polimérico é um componente de R^5 .

Em uma modalidade de exemplo, a invenção utiliza um grupo de ligação de glicosil que tem a fórmula:



em que J é a porção de glicosil, L é uma ligação ou um
ligante e R¹ é um grupo de modificação, por exemplo, um
5 grupo de modificação polimérico. Exemplos de ligações são
aquelas que são formadas entre uma porção NH₂ na porção de
glicosil e um grupo de reatividade complementar no grupo de
modificação. Por exemplo, quando R¹ inclui uma porção de
ácido carboxílico, essa porção pode ser ativada e ligada
10 com a porção NH₂ on o resíduo de glicosil gerando uma
ligação que tem a estrutura NHC(O)R¹. J é preferivelmente
uma porção de glicosil que é "intacto", não tendo sido
degradada por exposição a condições que clivam a estrutura
de piranose ou furanose, por exemplo, condições oxidativas,
15 por exemplo, periodato de sódio.

Exemplos de ligantes incluem porções alquil e
heteroalquil. Os ligantes incluem grupos de ligação, por
exemplo, grupos de ligação com base em acil, por exemplo, -
C(O)NH-, -OC(O)NH- e outros. Os grupos de ligação são
20 ligações formadas entre componentes das espécies da
invenção, por exemplo, entre a porção de glicosil e o
ligante (L), ou entre o ligante e o grupo de modificação
(R'). Outros Exemplos de grupos de ligação são éteres,
tioéteres e aminas. Por exemplo, em uma modalidade, o
25 ligante é um resíduo de aminoácido, como um resíduo de
glicina. A porção de ácido carboxílico da glicina é
convertida à amida correspondente por reação com uma amina
no resíduo de glicosil, e a amina da glicina é convertida à
amida correspondente ou uretano por reação com um ácido
30 carboxílico ativado ou carbonato do grupo de modificação.

Uma espécie de exemplo de NH-L-R^1 tem a fórmula: -
 $\text{NH}\{\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_a\text{NH}\}_s\{\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NH}\}_t\text{R}^1$, em que os
 índices s e t são independentemente 0 ou 1. Os índices a , b
 e d são independentemente números inteiros de 0 a 20, e c é
 5 um número inteiro de 1 a 2.500. Outros ligantes similares
 são baseados em espécies em que uma porção $-\text{NH}$ é
 substituída por outro grupo, por exemplo, $-\text{S}$, $-\text{O}$ ou $-\text{CH}_2$.
 como aqueles habilitados perceberão uma ou mais das porções
 entre chaves que correspondem aos índices s e t podem ser
 10 substituídas com uma porção de alquil ou heteroalquil
 substituído ou não substituído.

Mais particularmente, a invenção utiliza compostos em
 que $\text{NH-L-R}'$ é:

$\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_a\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$,
 15 $\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$,
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_a\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$, $\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b\text{NHR}^1$,

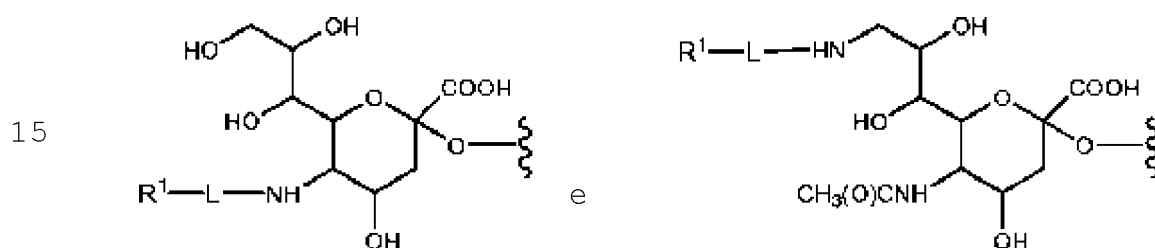
$\text{NH}(\text{CH}_2)_a\text{NHR}^1$, e NHR^1 . Nessas fórmulas, os índices a , b e d
 são independentemente selecionados dos números inteiros de
 0 a 20, preferivelmente de 1 a 5. O índice c é um número
 20 inteiro de 1 a cerca de 2.500.

Em uma modalidade de exemplo, c é selecionado de modo
 que a porção PEG é aproximadamente 1 kD, 5 kD, 10, kD, 15
 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 35 kD, 40 kD ou 45 kD.

Para objetivos de conveniência, os grupos de ligação
 25 de glicosil no restante dessa seção serão baseados em uma
 porção sialil. No entanto, uma pessoa habilitada na técnica
 reconhecerá que outra porção de glicosil, como manosil,
 galactosil, glucosil, ou fucosil, pode ser usada no lugar
 da porção sialil.

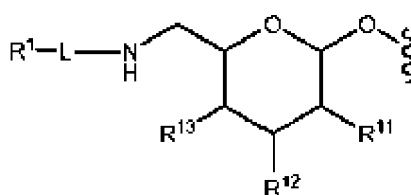
30 Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de

glicosil é um grupo de ligação de glicosil intacto, em que a porção de glicosil ou porções que formam o grupo de ligação não são degradadas por processos químicos (por exemplo, metaperiodato de sódio) ou enzimáticos (por exemplo, oxidase). Conjugados selecionados da invenção incluem um grupo de modificação que é anexado à porção amina de um amino-sacarídeo, por exemplo, manosamina, glicosamina, galactosamina, ácido siálico etc. Exemplos de cassetes de grupo de modificação-grupo de ligação de glicosil intacto de acordo com esse motivo são baseados em uma estrutura de ácido siálico, como aquelas que têm as fórmulas:



Nas fórmulas acima, R^1 e L são como acima descrito. Detalhes adicionais sobre a estrutura de exemplo de grupos R^1 são fornecidos abaixo.

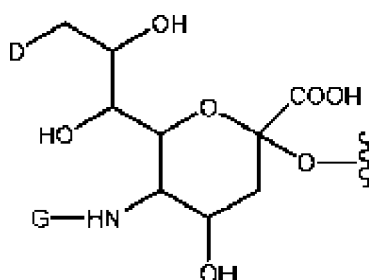
Ainda em uma modalidade de exemplo adicional, o conjugado é formado entre um peptídeo e um açúcar modificado em que o grupo de modificação é anexado através de um ligante na posição 6-carbono do açúcar modificado. Portanto, grupos de ligação de glicosil ilustrativos de acordo com essa modalidade têm a formula:



em que the radicais são como acima discutido. Grupos de ligação de glicosil incluem, sem imitação, glicose, glicosamina, N-acetil-glicosamina, galactose, galactosamina, N-acetilgalactosamina, manose, manosamina, N-acetil-manosamina, e outros.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece um conjugado de peptídeo que compreende o grupo de ligação de glicosil a seguir:

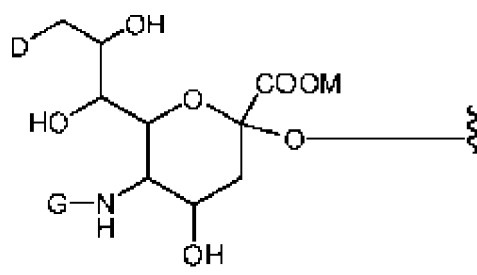
10



em que D é um membro selecionado de -OH e R^1 -L-NH-; G é um membro selecionado de H e R^1 -L- e $-C(O)(C_1-C_6)$ alquil; R^1 é uma porção que compreende um resíduo de poli(etileno glicol) de cadeia linear ou ramificada ; e L é um ligante, por exemplo, uma ligação ("de ordem zero"), alquil substituído ou não substituído e heteroalquil substituído ou não substituído. Em modalidades de exemplo, quando D é OH, G é R^1 -L-, e quando G é $-C(O)(C_1-C_6)$ alquil, D é R^1 -L-NH-.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece um conjugado de peptídeo que compreende o seguinte grupo de ligação de glicosil:

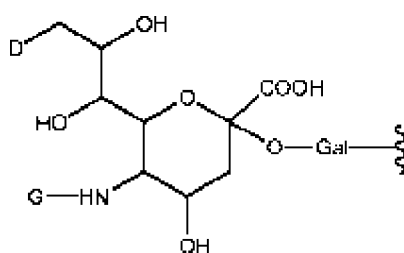
30



D é um membro selecionado de -OH e R^1 -L-NH-; G é um membro selecionado de R^1 -L- e $-C(O)(C_1-C_6)$ alquil- R^1 ; R^1 é uma porção que compreende um membro selecionado de um resíduo de poli(etileno glicol) de cadeia linear e resíduo de poli(etileno glicol) ramificado; e M é um membro selecionado de H, um contra-íon de sal e uma carga negativa única; L é um ligante que é um membro selecionado de uma ligação, alquil substituído ou não substituído e heteroalquil substituído ou não substituído. Em uma modalidade de exemplo, quando D é OH, G é R^1 -L-. Em outra modalidade de exemplo, quando G é $-C(O)(C_1-C_6)$ alquil, D é R^1 -L-NH-.

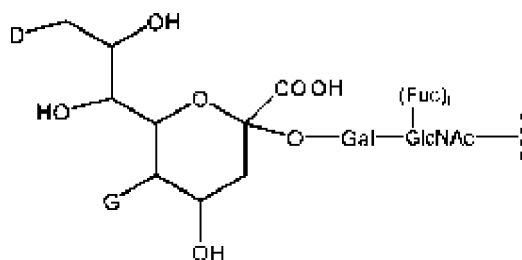
Em qualquer um dos compostos da invenção, um grupo COOH pode ser alternativamente COOM, em que M é um membro selecionado de H, uma carga negativa, e um contra-íon de sal

A invenção fornece um conjugado de peptídeo que inclui um grupo de ligação de glicosil que tem a fórmula:



em que D e G são como acima descritos.

Em outras modalidades, o grupo de ligação de glicosil tem a fórmula:

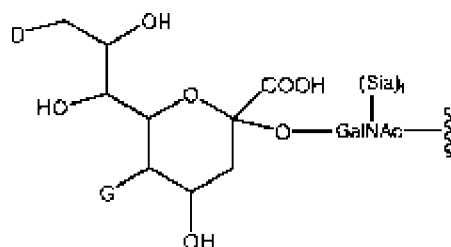


66/239

em que D e G são como acima descrito e o índice t é 0 ou 1.

Ainda em outra modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil tem a fórmula:

5

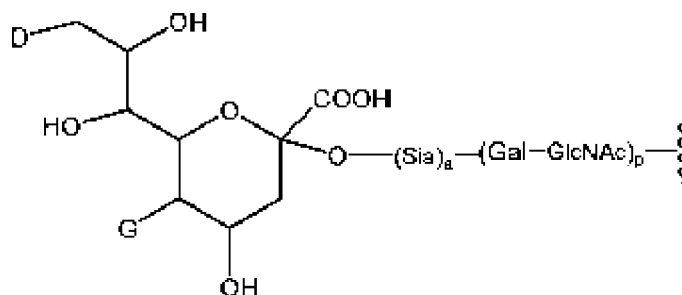


10

em que D e G são como acima descrito e o índice t é 0 ou 1.

Ainda em outra modalidade, o grupo de ligação de glicosil tem a fórmula:

15

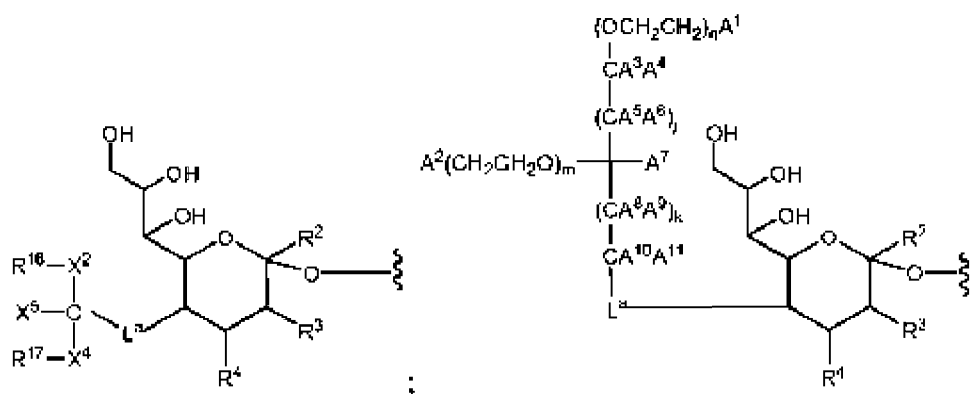


em que D e G são como acima descrito e o índice p representa um número inteiro de 1 a 10; e a é 0 ou 1.

20

Em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo compreende uma porção glicosil selecionada das fórmulas:

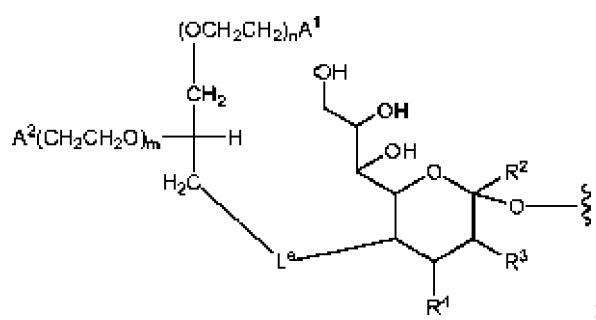
25



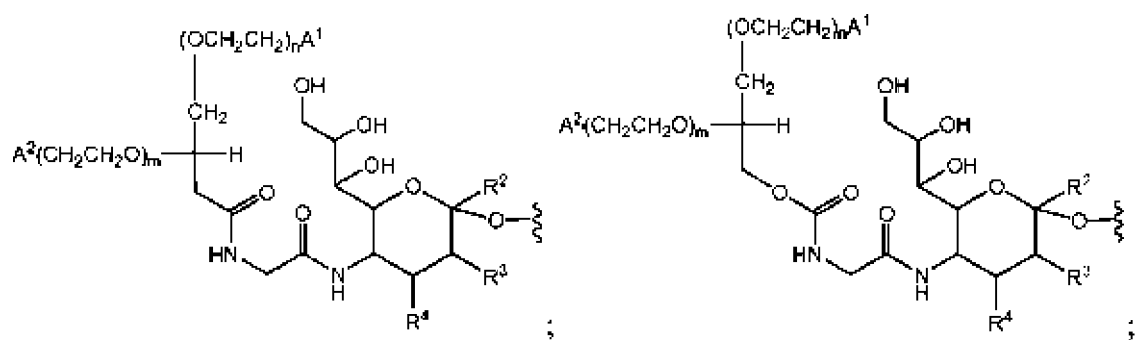
30

67/239

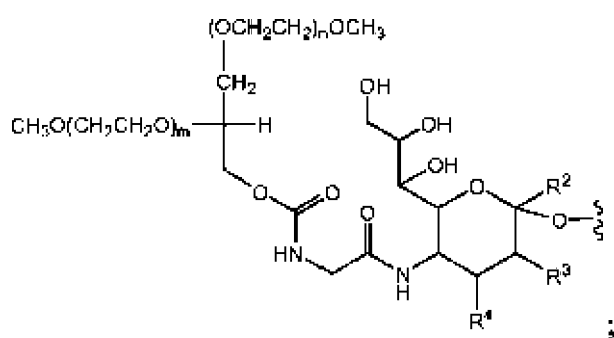
5



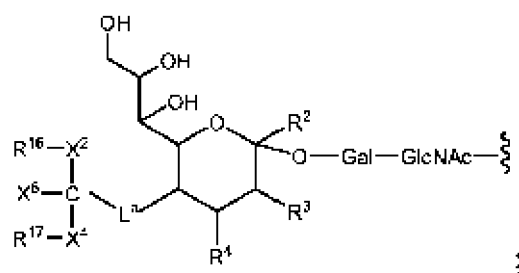
10



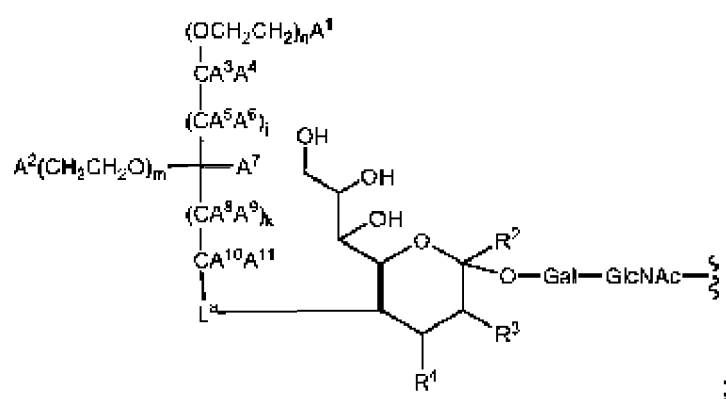
15



20

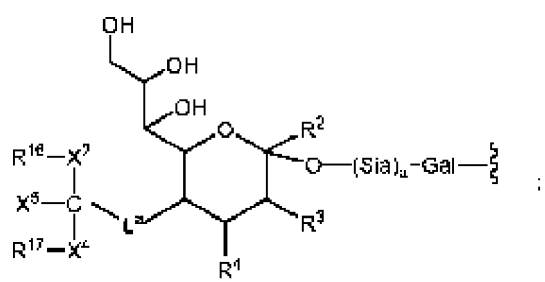
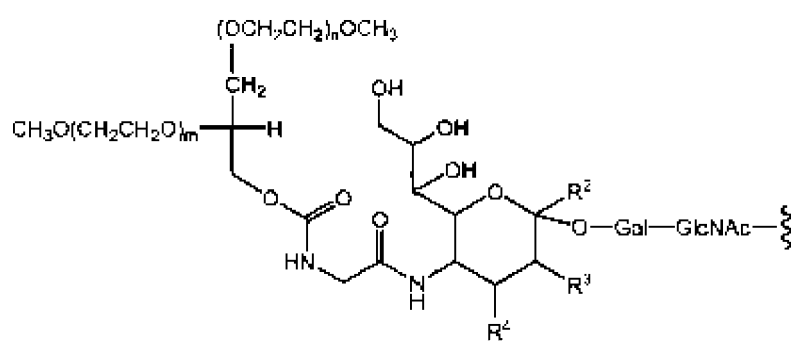
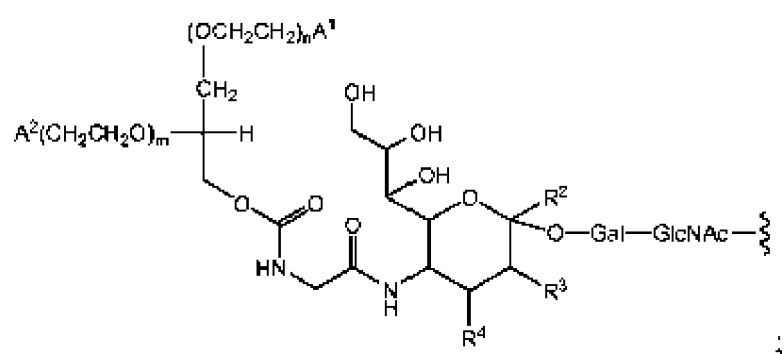
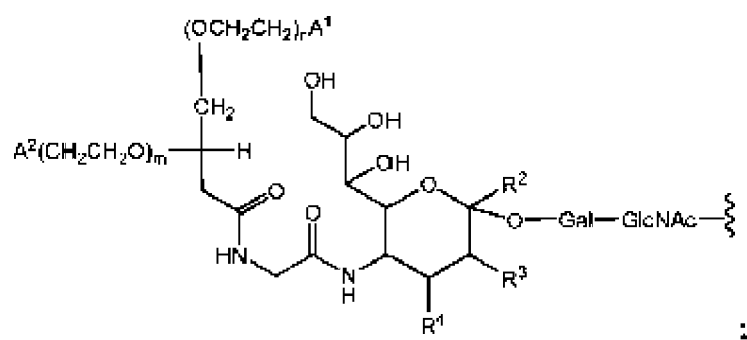
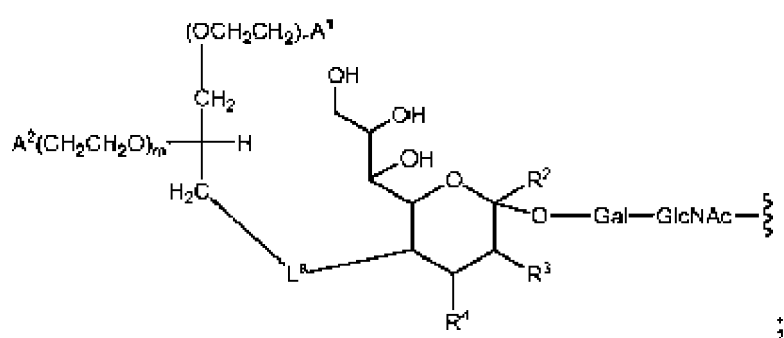


25

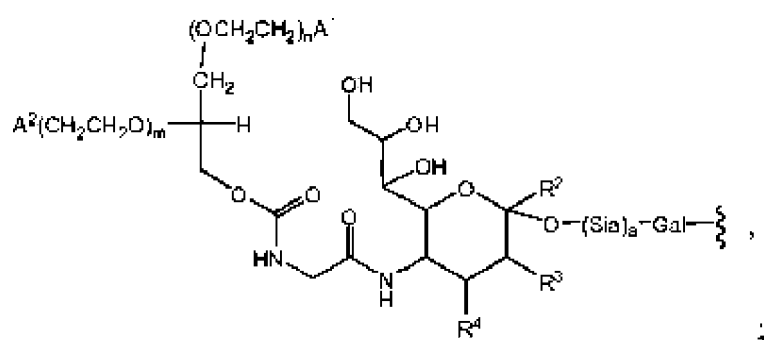
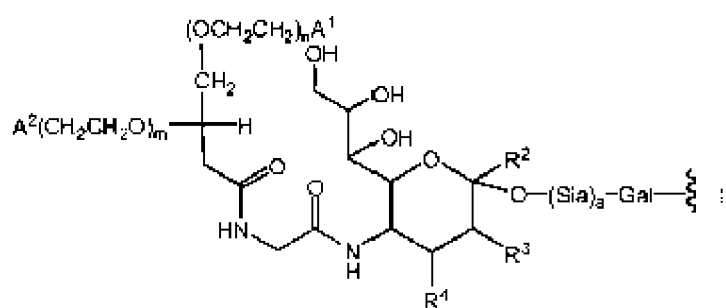
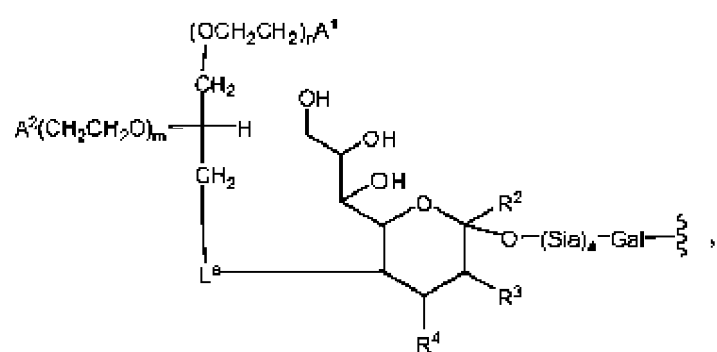
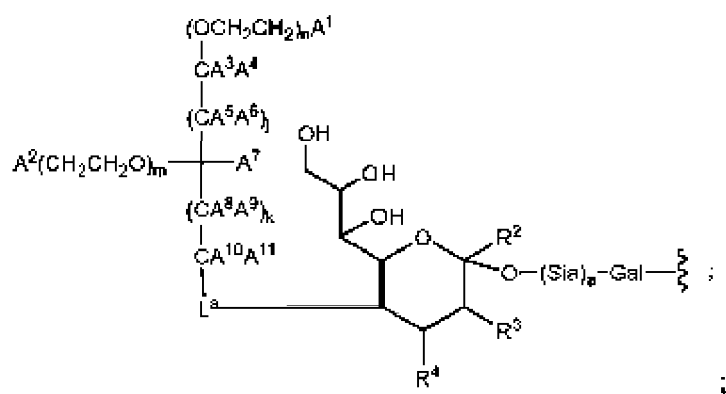


30

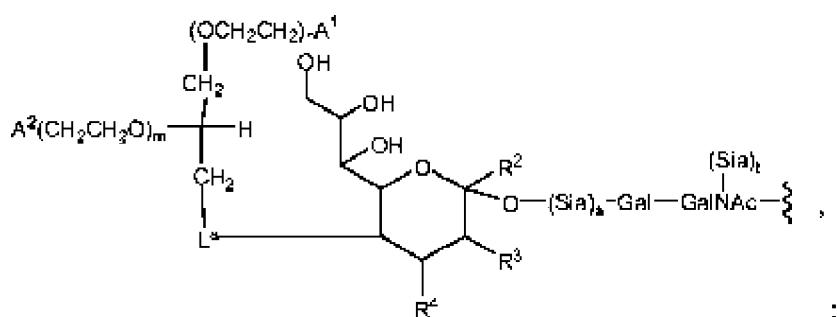
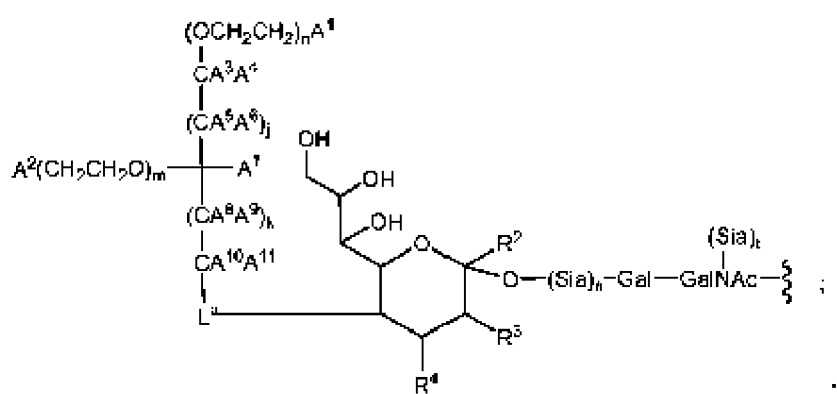
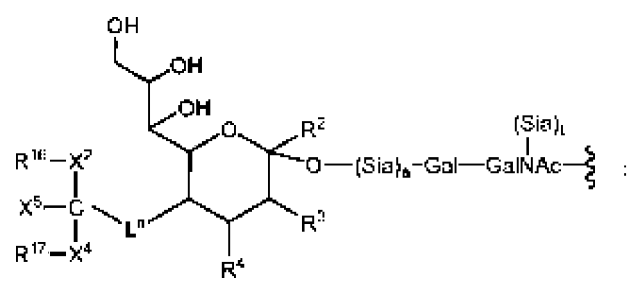
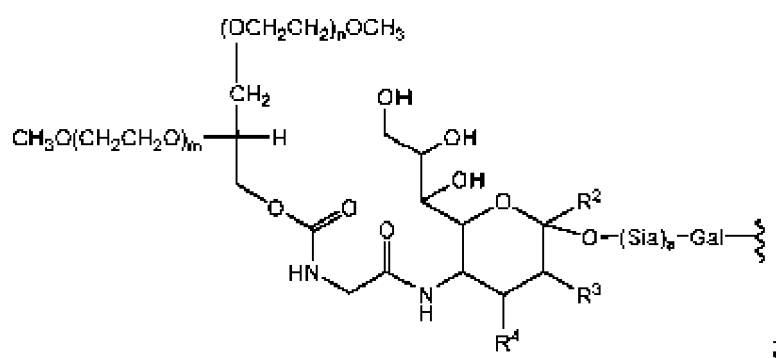
68/239

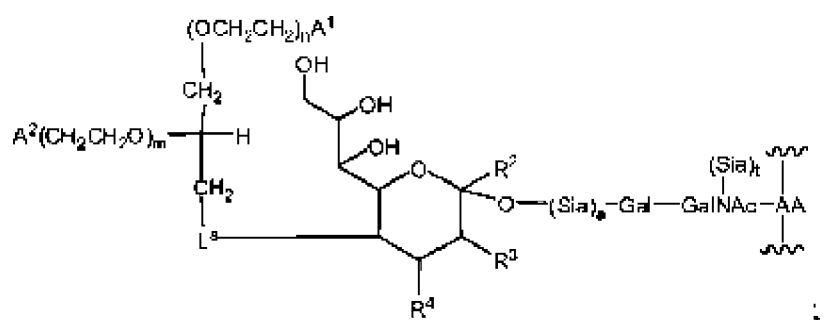
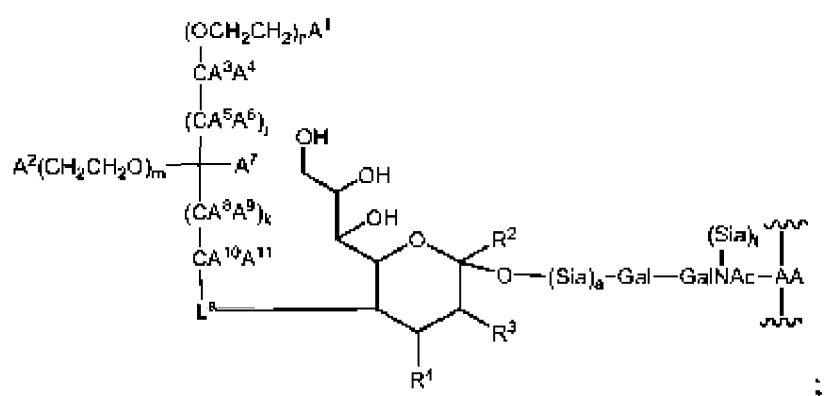
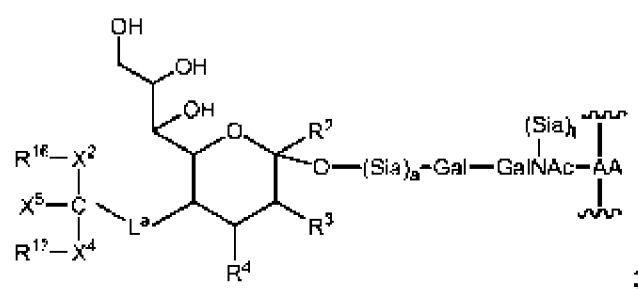
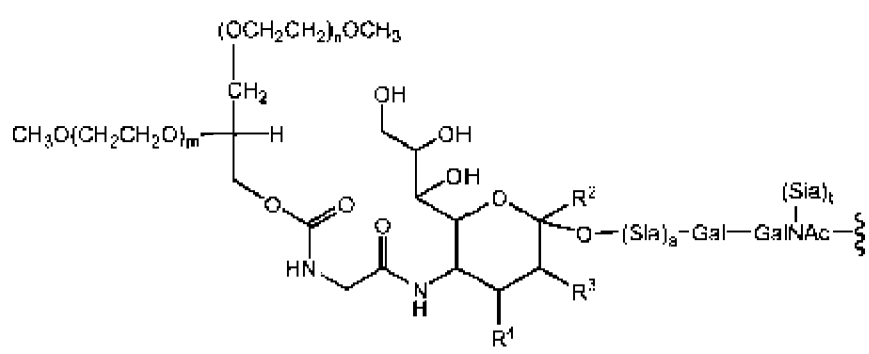
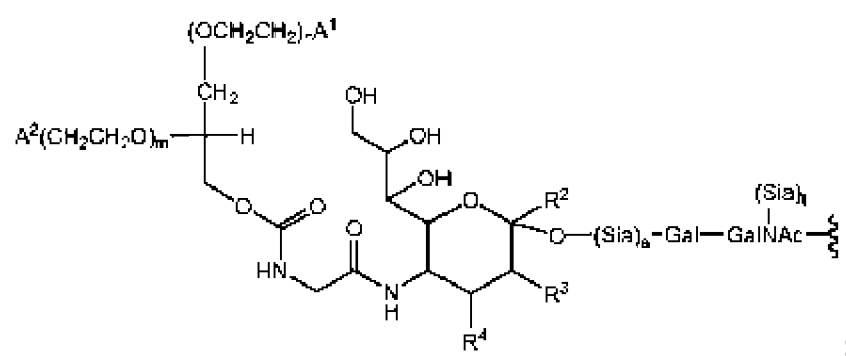


30

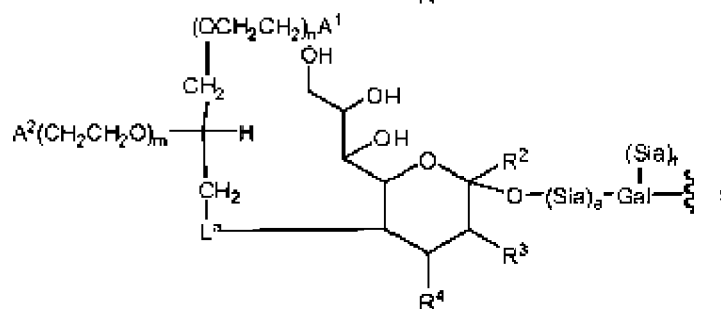
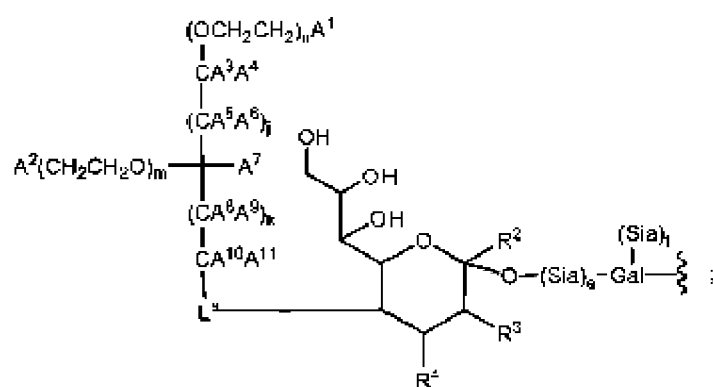
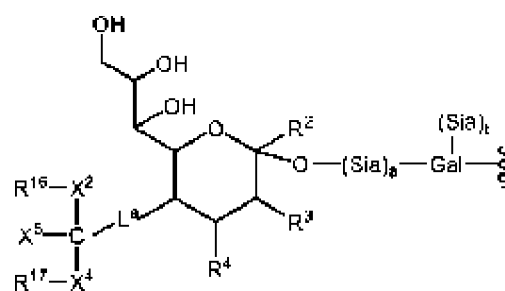
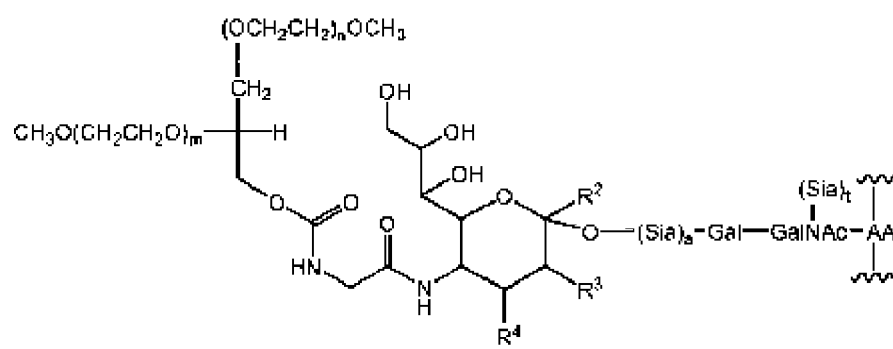
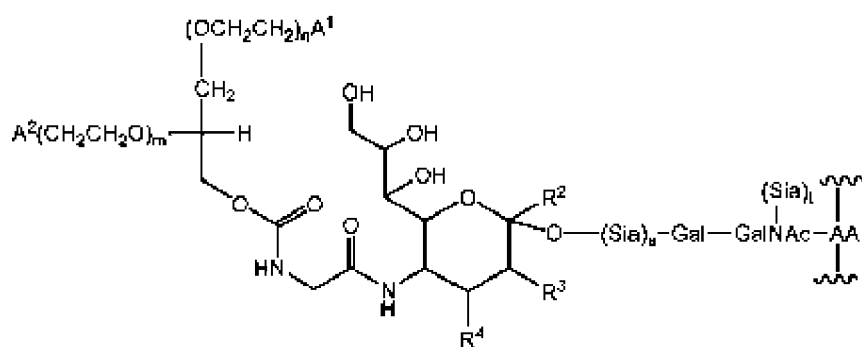


70/239



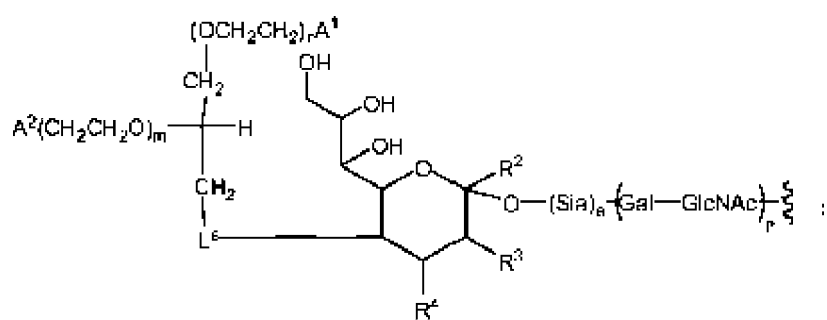
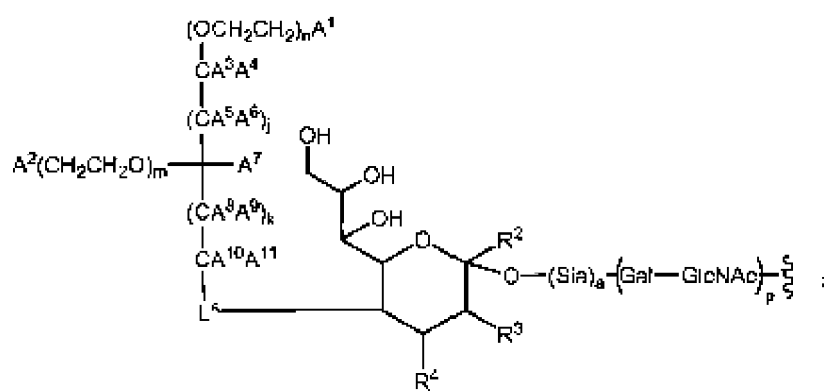
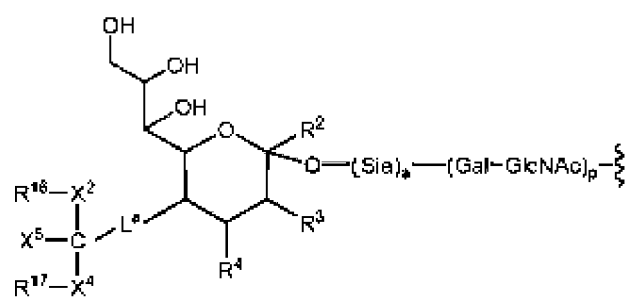
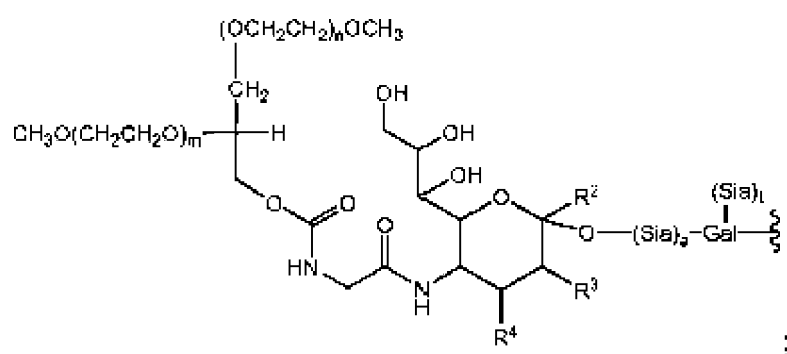
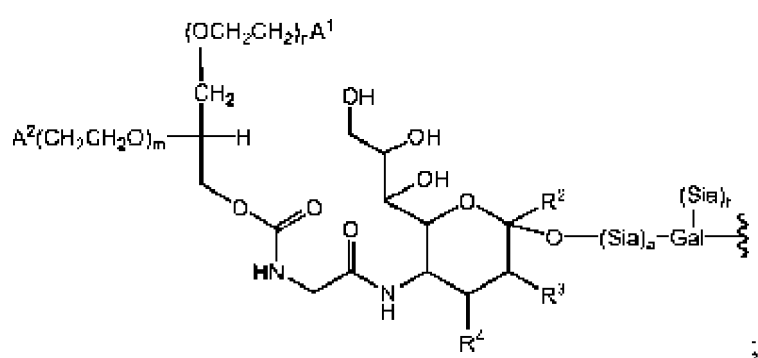


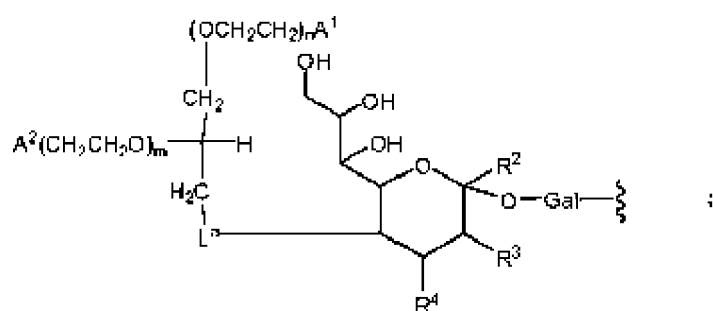
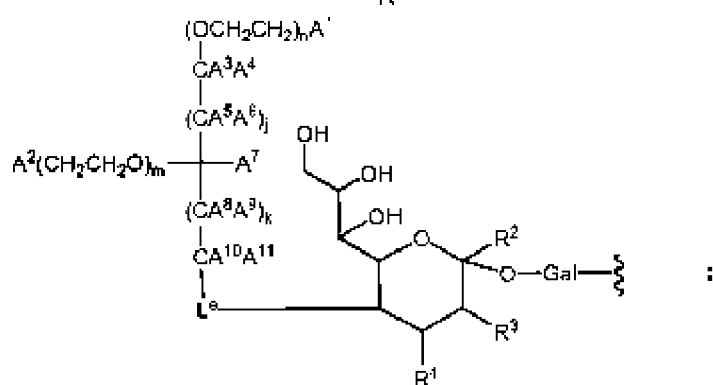
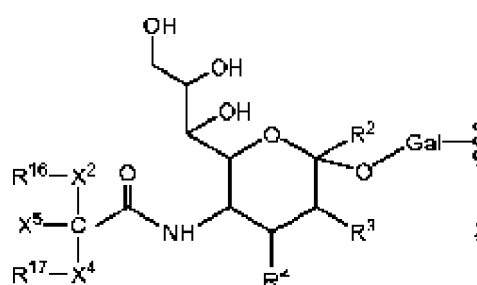
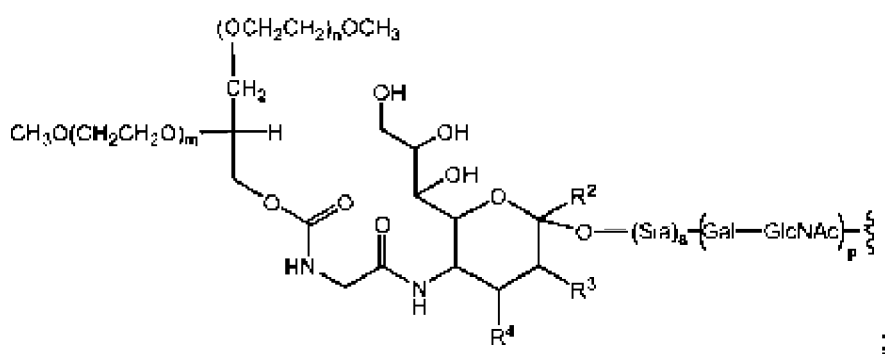
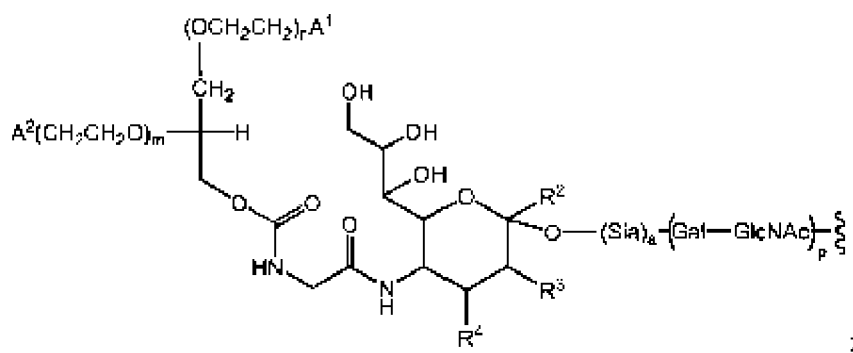
72/239



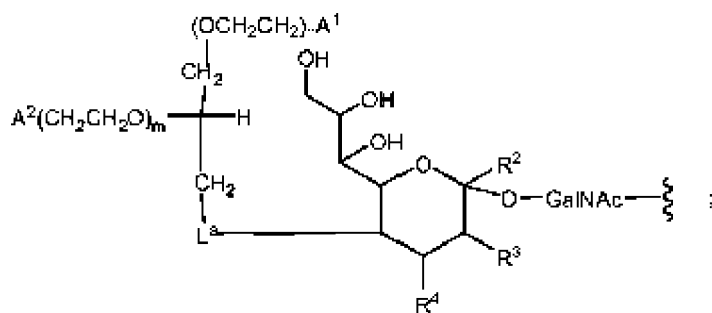
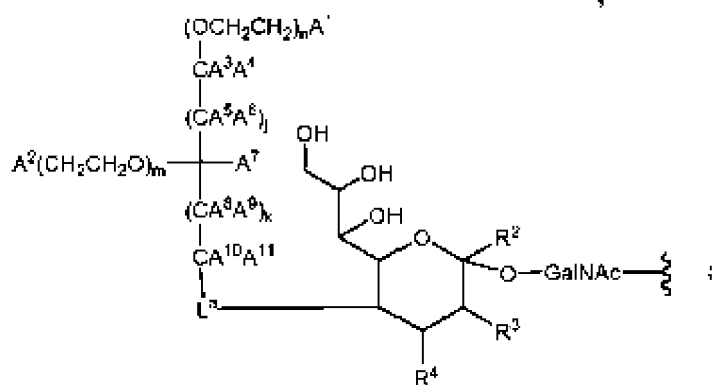
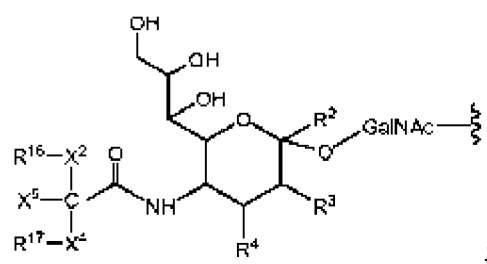
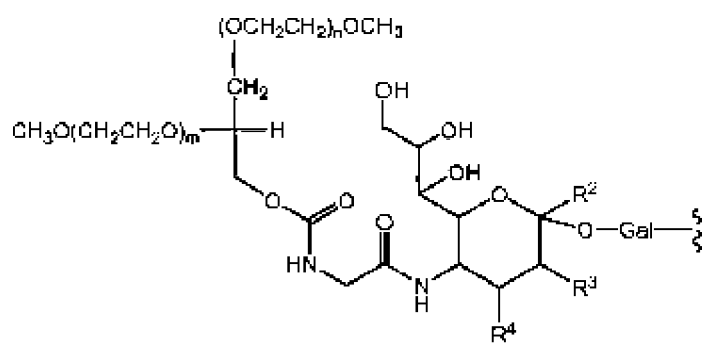
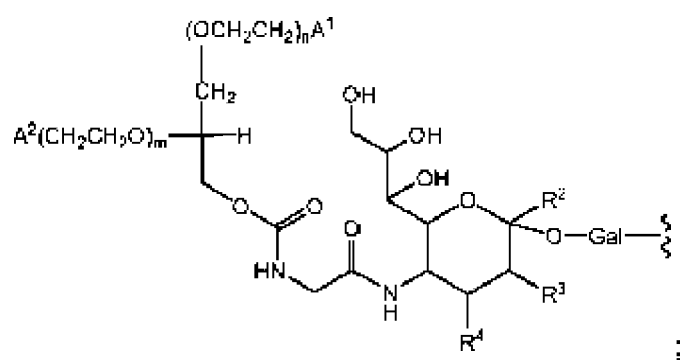
30

73/239

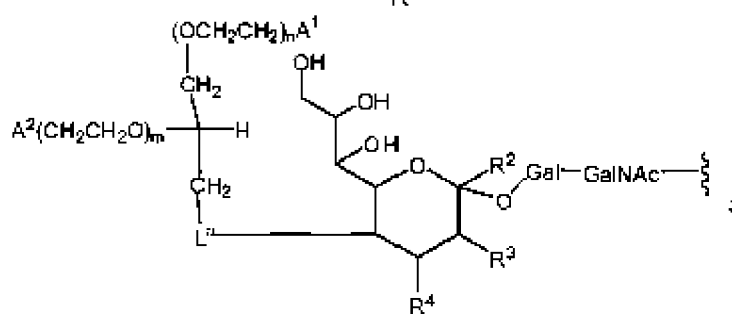
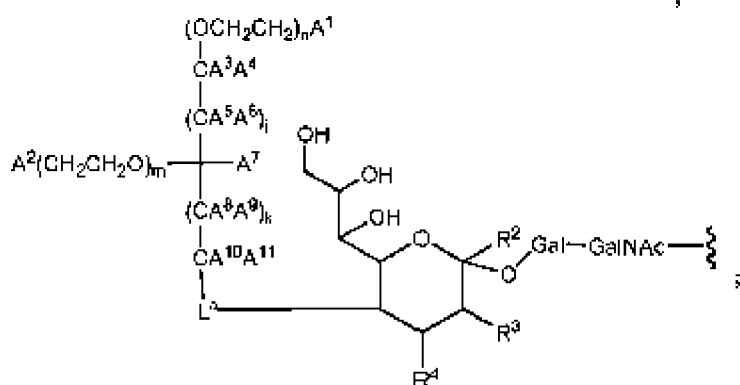
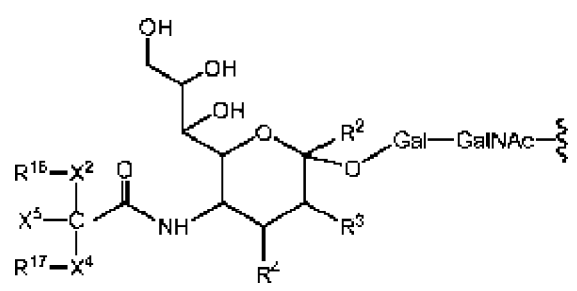
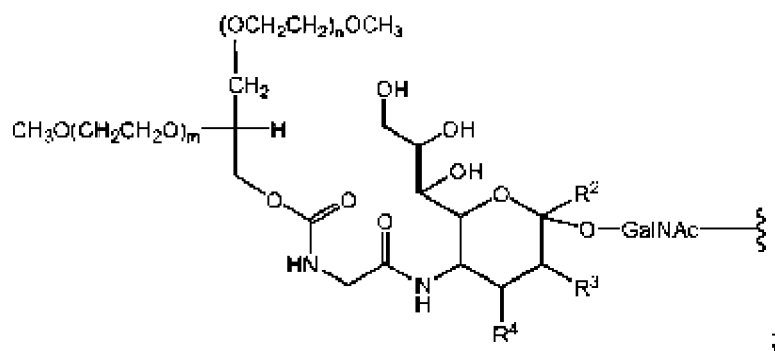
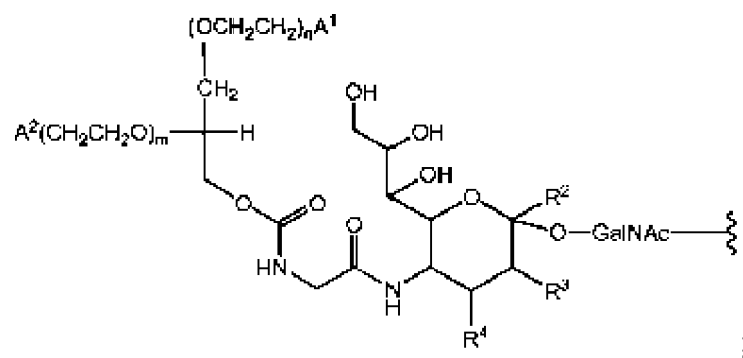




75/239

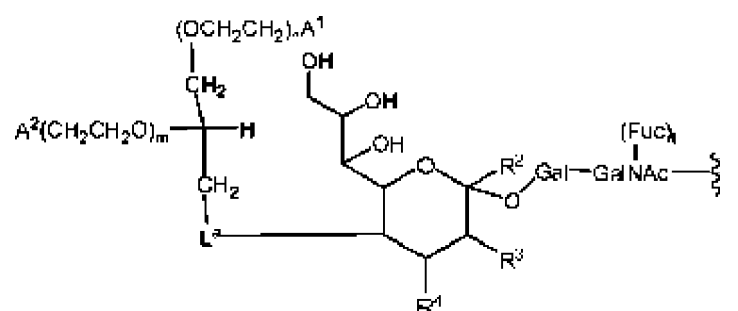
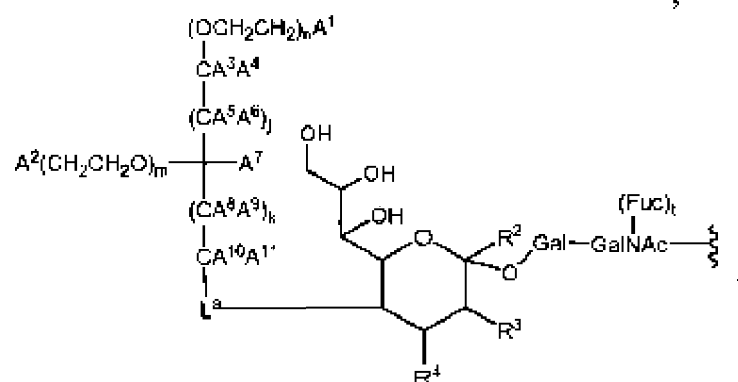
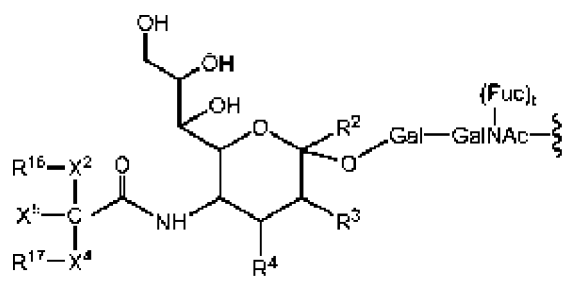
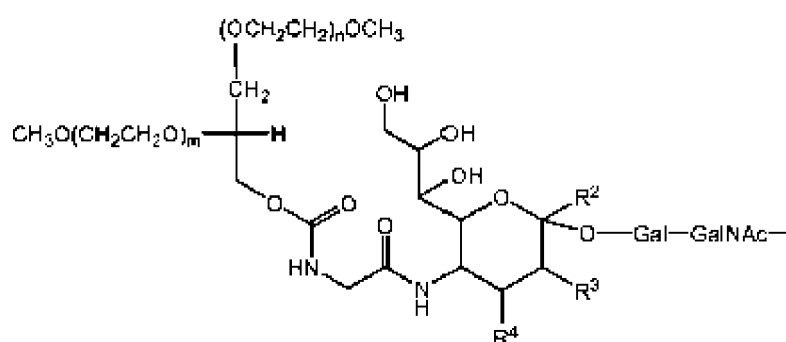
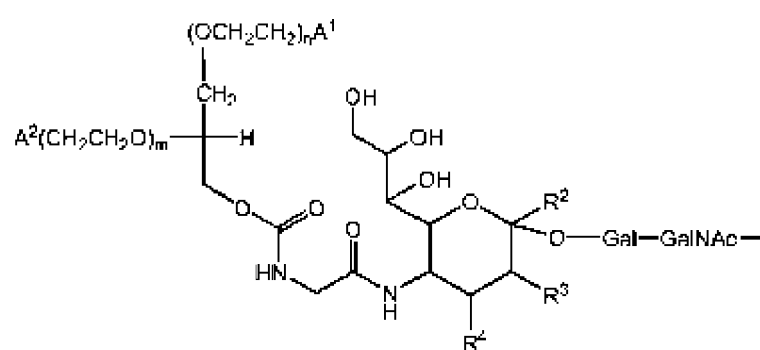


76/239

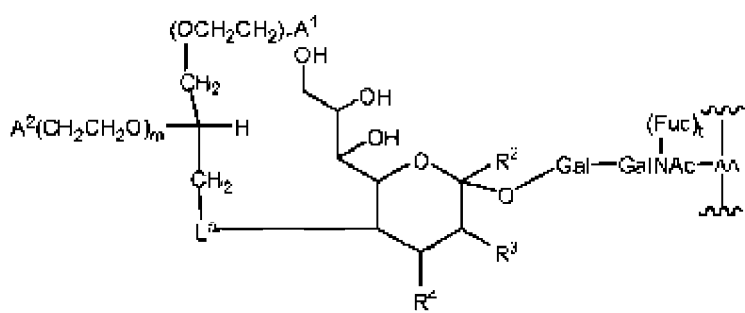
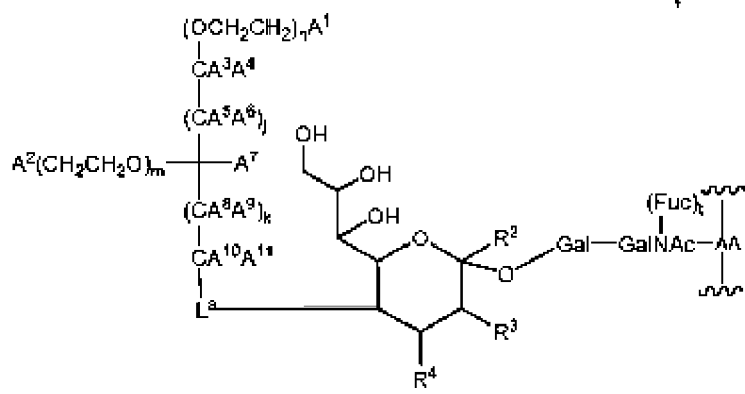
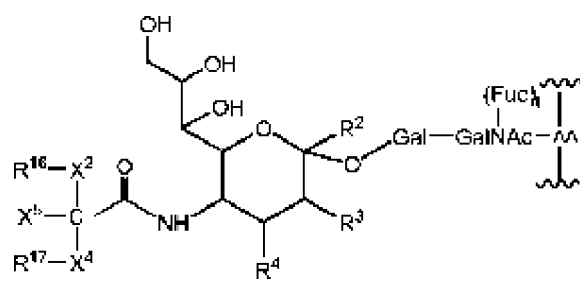
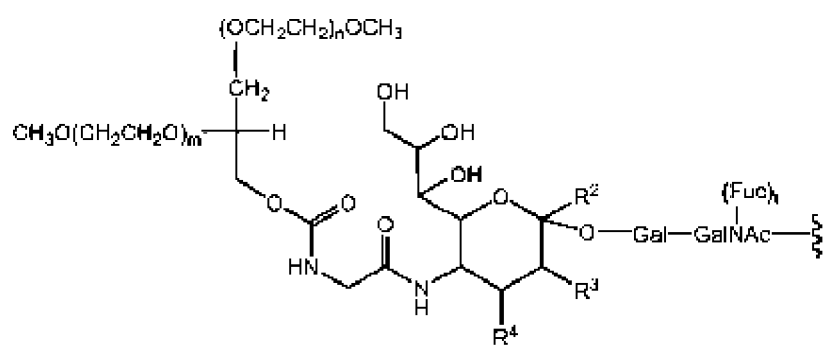
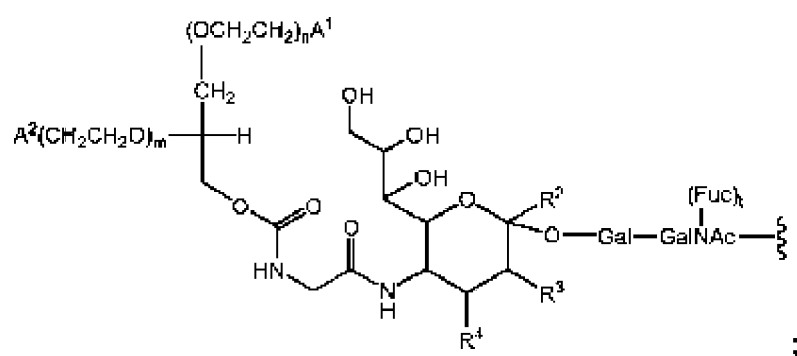


30

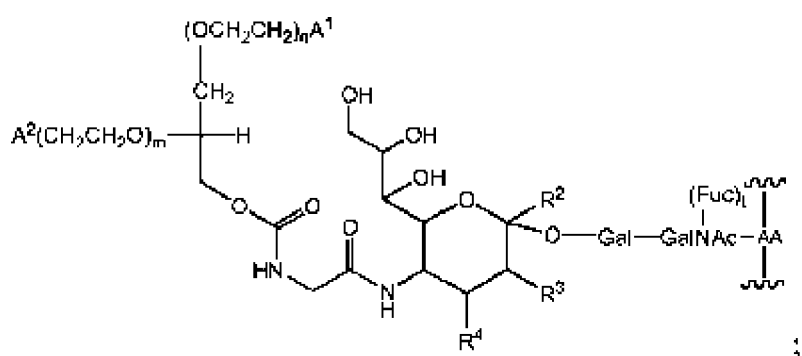
77/239



78/239



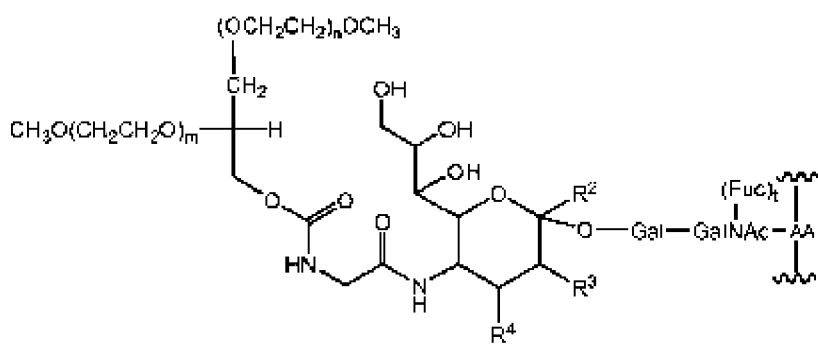
5



;

e

10



;

em que o índice a e o ligante L^a são como acima
 15 discutido. O índice p é um número inteiro de 1 a 10. Os
 índices t e a são independentemente selecionados de 0 ou 1.
 Cada um desses grupos pode ser incluído como componentes
 das estruturas de sacarídeo mono-, bi, tri e tetra-
 antenário acima apresentadas. AA é um resíduo de aminoácido
 20 do peptídeo. Uma pessoa habilitada na técnica perceberá que
 a porção PEG nessas fórmulas pode ser substituída com
 outros grupo não reativo e porções poliméricas. Exemplos de
 polímeros incluem aqueles da família de óxido de
 poli(alquilenos). Grupos não reativos incluem grupos que são
 25 considerados como sendo essencialmente não reativos,
 neutros e/ou estáveis em pH fisiológico, por exemplo, H,
 alquil substituído ou não substituído, heteroalquil
 substituído ou não substituído e outros. Um exemplo de
 porção polimérica inclui as estruturas ramificadas
 30 apresentadas na Fórmula IIIa e seus exemplares.

Em uma modalidade de exemplo, a porção PEG tem um peso molecular de cerca de 20 kD. Em outra modalidade de exemplo, a porção PEG tem um peso molecular de cerca de 5 kD. Em outra modalidade de exemplo, a porção PEG tem um peso molecular de cerca de 10 kD. Em outra modalidade de exemplo, a porção PEG tem um peso molecular de cerca de 40 kD. Em outras modalidades, o grupo de modificação é um óxido de poli(alquilenos) ramificado, por exemplo, poli(etileno glicol), que tem um peso molecular de pelo menos cerca de 80 kD, preferivelmente pelo menos cerca de 100 kD, mais preferivelmente pelo menos cerca de 120 kD, pelo menos cerca de 140 kD ou pelo menos cerca de 160 kD. Ainda em outra modalidade, o óxido de poli(alquilenos) ramificado, por exemplo, poli(etileno glicol) é pelo menos cerca de 200 kD, como de pelo menos cerca de 80 kD a pelo menos cerca de 200 kD, incluindo pelo menos cerca de 160 kD e pelo menos cerca de 180 kD. Em uma modalidade de exemplo, o polímero ramificado é em si anexado a uma porção de ramificação (por exemplo, cisteína, serina, lisina, e oligômeros de lisina).

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção de SA-PEG-10 kD ramificado com base em um resíduo de cisteína, e um ou dois desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente ligados ao peptídeo. Em outra modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção de SA-PEG-10 kD ramificado com base em um resíduo de lisina, e um ou dois desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente ligados ao peptídeo. Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção de SA-PEG-10 kD ramificado com base

em um resíduo de cisteína, e um ou dois desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente ligados ao peptídeo.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção de SA-PEG-10 kD ramificado com base

5 em um resíduo de lisina, e um ou dois desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente ligados ao peptídeo.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção de SA-PEG-5 kD ramificado com base em

10 um resíduo de cisteína, e um, dois ou três desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente ligados ao peptídeo.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção de SA-PEG-5 kD ramificado com base em

um resíduo de lisina, e um, dois ou três desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente ligados ao peptídeo.

15 Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção de SA-PEG-40 kD ramificado com base

em um resíduo de cisteína, e um ou dois desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente ligados ao peptídeo.

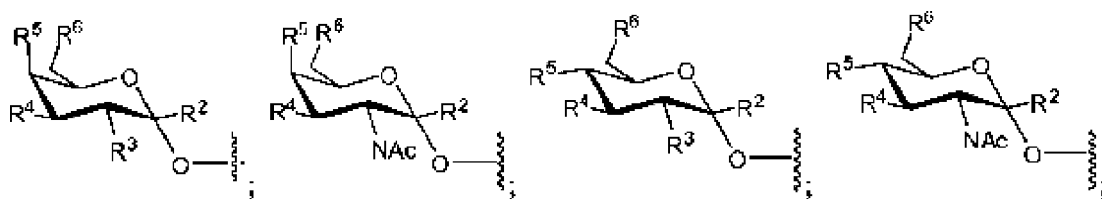
Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de

20 glicosil é uma porção de SA-PEG-40 kD ramificado com base em um resíduo de lisina, e um ou dois desses grupos de

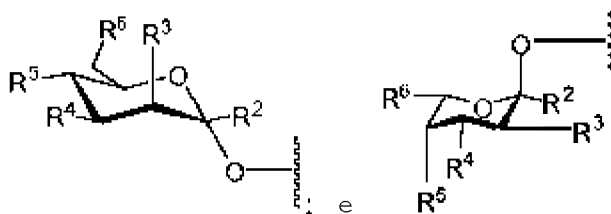
ligação de glicosil são covalentemente ligados ao peptídeo.

Em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo compreende uma porção de glicosil selecionada das

25 fórmulas:

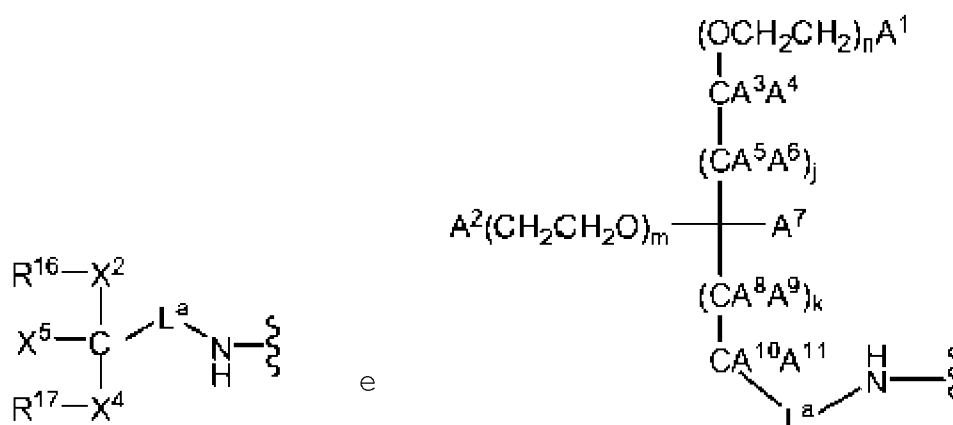


82/239



5

em que pelo menos um de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 ou R^6 tem uma estrutura que é um membro selecionado de



10

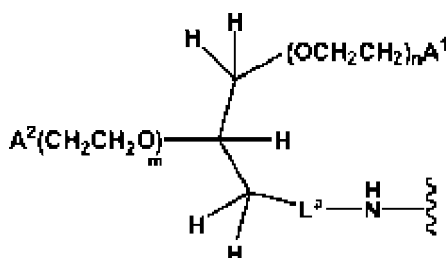
15

em que as variáveis são como acima descrito. aqueles habilitados perceberão que a confiança em estruturas de PEG ramificado acima apresentadas é simplesmente para clareza de ilustração, o PEG pode ser substituído por substancialmente qualquer porção polimérica, incluindo, sem limitação aquelas espécies apresentadas na definição de “porção polimérica” aqui encontrada.

20

Em uma modalidade de exemplo, pelo menos um de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 ou R^6 tem uma estrutura de acordo com a seguinte fórmula:

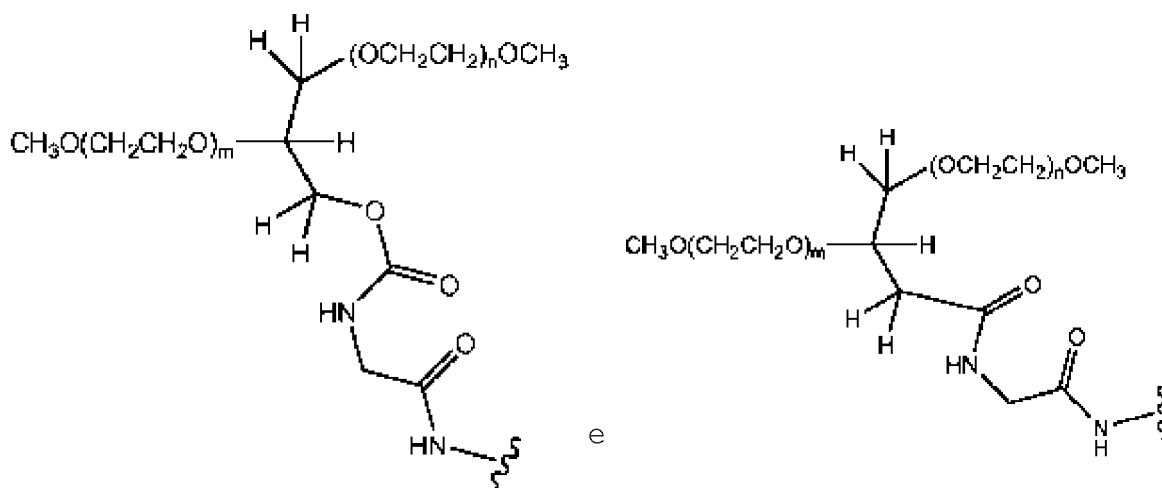
25



30

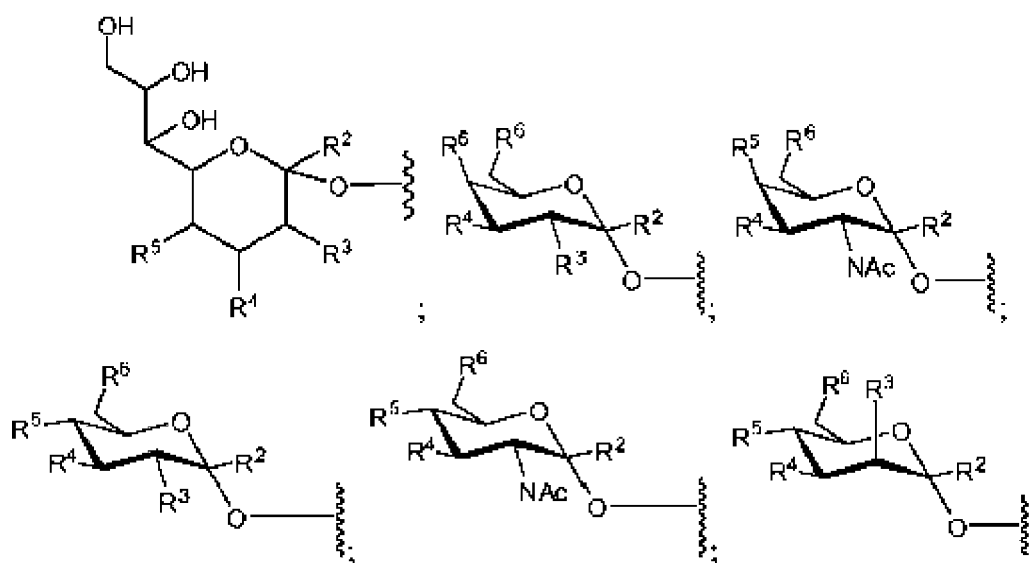
Em uma modalidade de exemplo, A^1 e A^2 são selecionados de $-OH$ e $-OCH_3$.

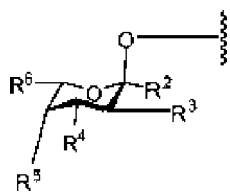
Exemplos de grupos de modificação poliméricos de acordo com essa modalidade incluem:



Em uma modalidade de exemplo, apenas um de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 ou R^6 tem uma estrutura que inclui os grupos de modificação acima descritos.

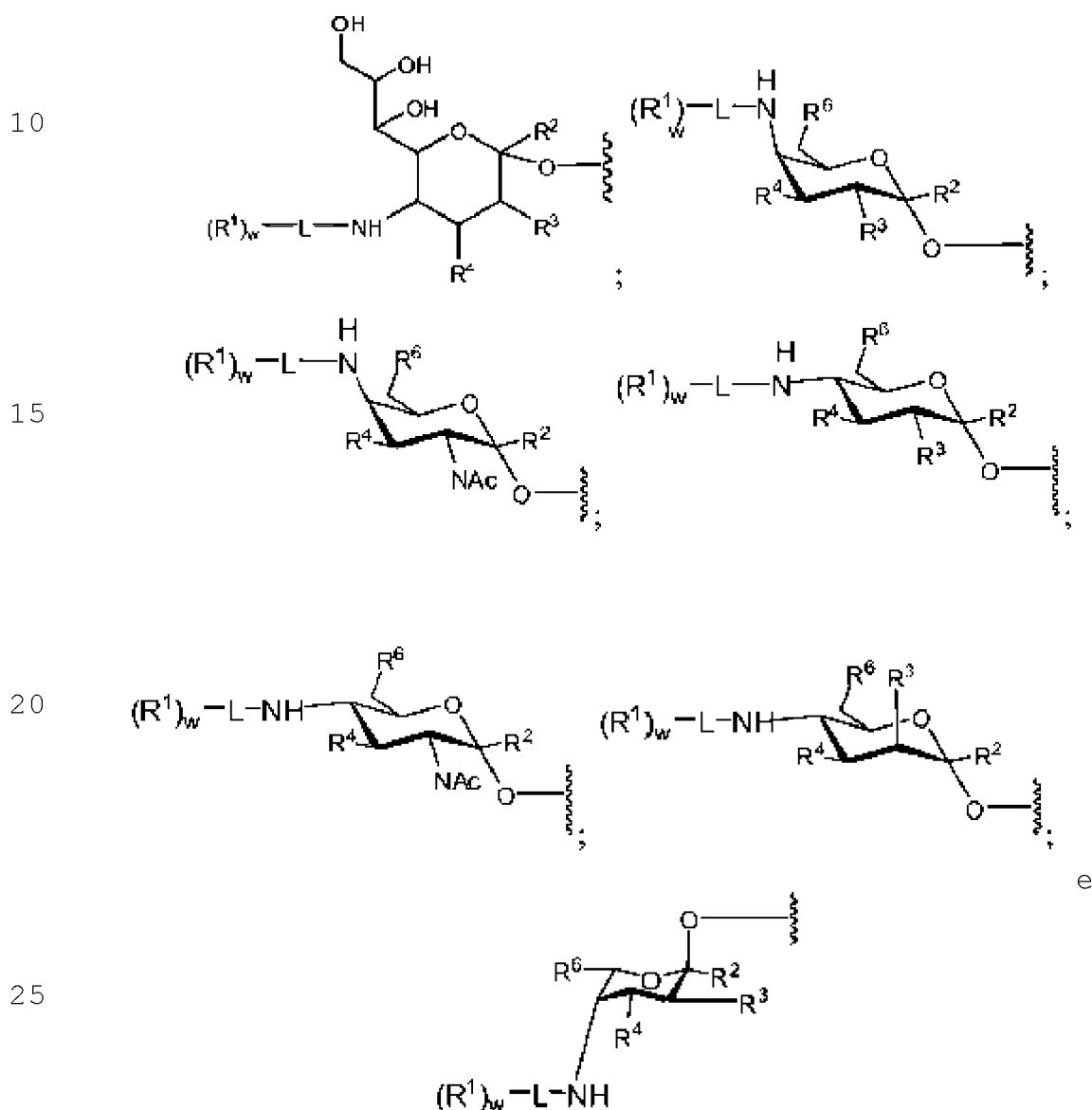
Em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo compreende uma porção de glicosil selecionada das fórmulas:





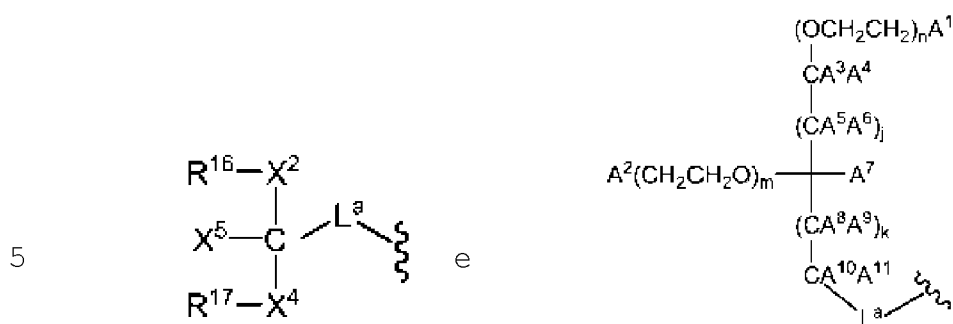
em que R^2 , R^3 , R^4 , R^5 ou R^6 são como acima descrito.

5 Em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo compreende uma porção de glicosil selecionada das fórmulas:



em que $L-(R^1)_w$ é um membro selecionado de

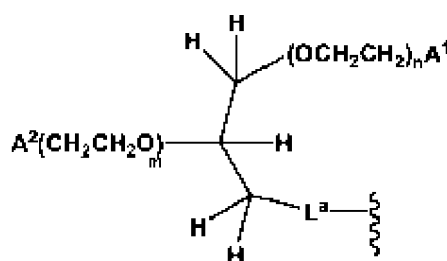
85/239



em que as variáveis são como acima descrito.

Em uma modalidade de exemplo, $L-(R^1)_w$ tem uma estrutura de acordo com a seguinte fórmula:

10

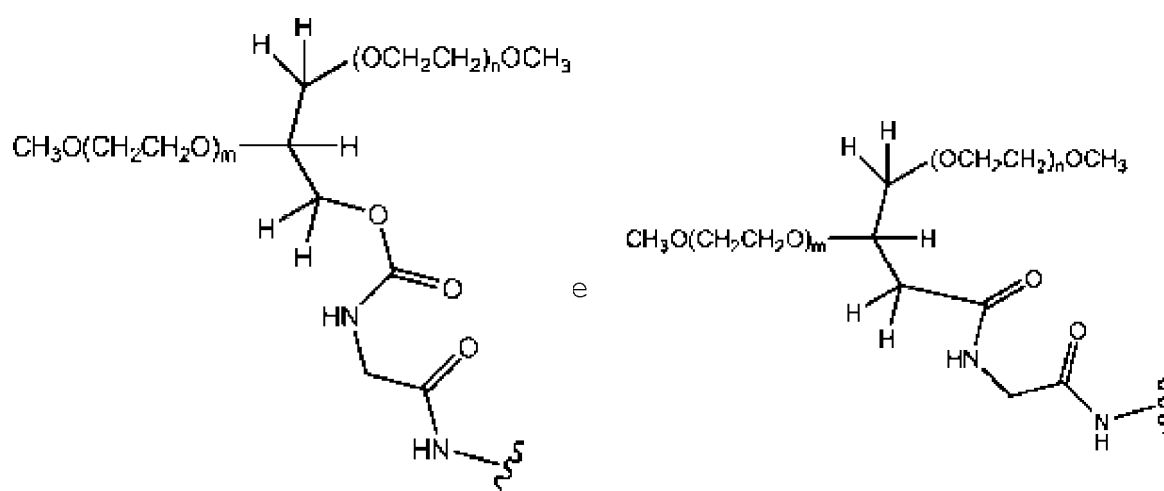


15

Em uma modalidade de exemplo, A^1 e A^2 são selecionados de $-OH$ e $-OCH_3$.

Exemplos de grupos de modificação poliméricos de acordo com essa modalidade incluem:

20



30

Em uma modalidade de exemplo, m e n são números

inteiros independentemente selecionados de cerca de 1 a cerca de 1.000. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros independentemente selecionados de cerca de 1 a cerca de 500. Em uma modalidade de exemplo, m e n são

5 números inteiros independentemente selecionados de cerca de 1 a cerca de 70, cerca de 70 a cerca de 150, cerca de 150 a cerca de 250, cerca de 250 a cerca de 375 e cerca de 375 a cerca de 500. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros independentemente selecionados de cerca de

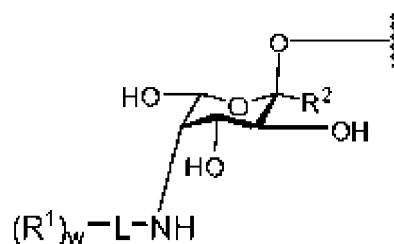
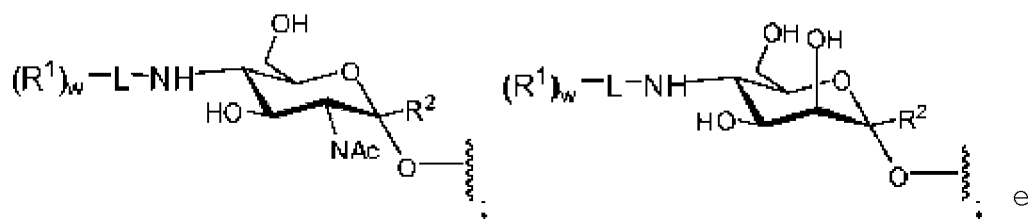
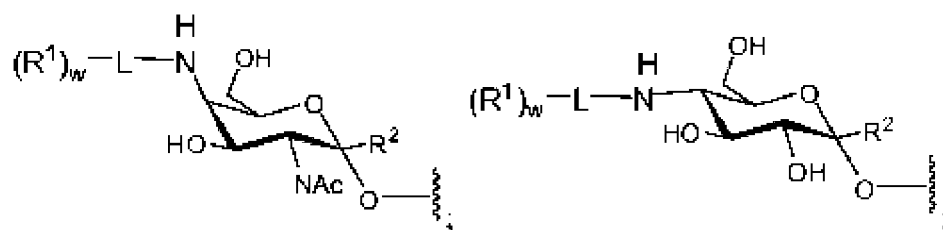
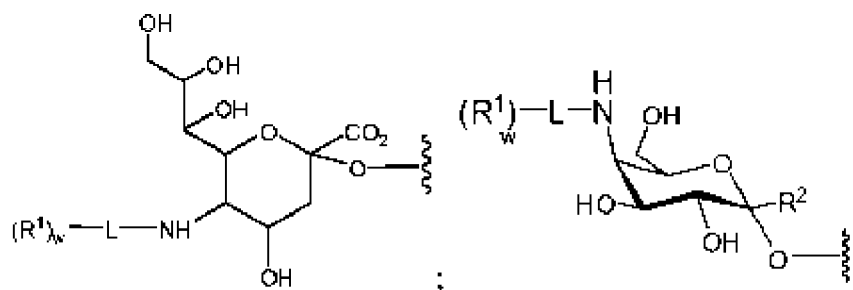
10 10 a cerca de 35, cerca de 45 a cerca de 65, cerca de 95 a cerca de 130, cerca de 210 a cerca de 240, cerca de 310 a cerca de 370 e cerca de 420 a cerca de 480. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 15 a cerca de 30. Em uma

15 modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 50 a cerca de 65. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 100 a cerca de 130. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros

20 selecionados de cerca de 210 a cerca de 240. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 310 a cerca de 370. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 430 a cerca de 470.

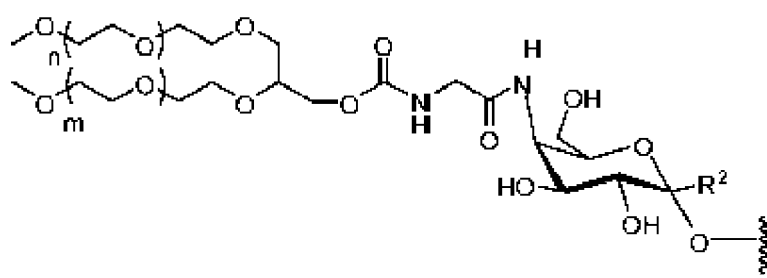
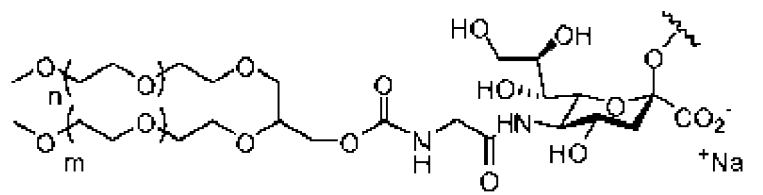
25 Em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo compreende uma porção de glicosil selecionada das fórmulas:

87/239

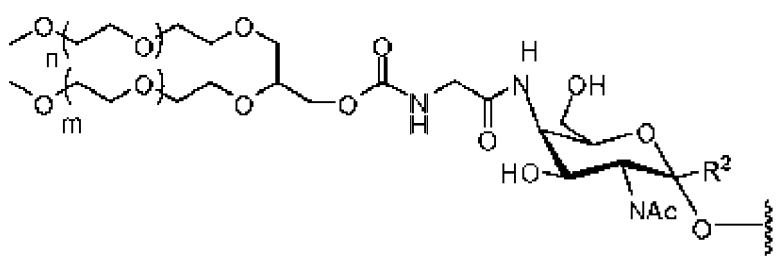


em que as variáveis são como acima descrito.

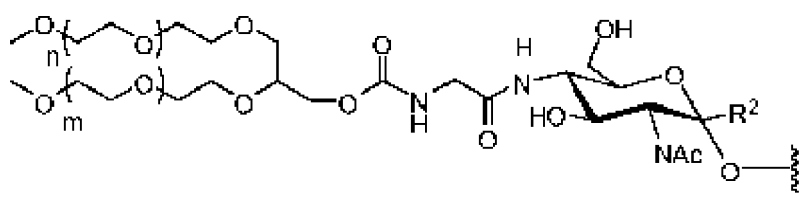
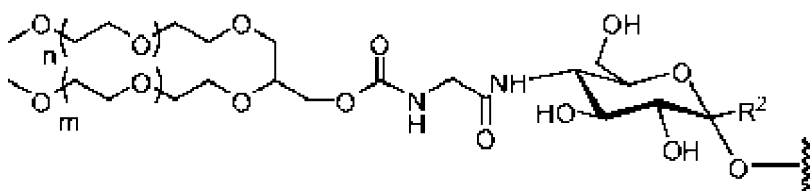
Em outra modalidade de exemplo, espécies de acordo com
essa modalidade incluem:



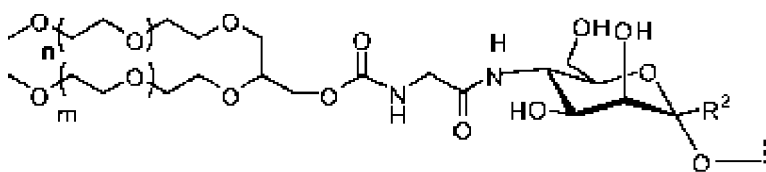
88/239



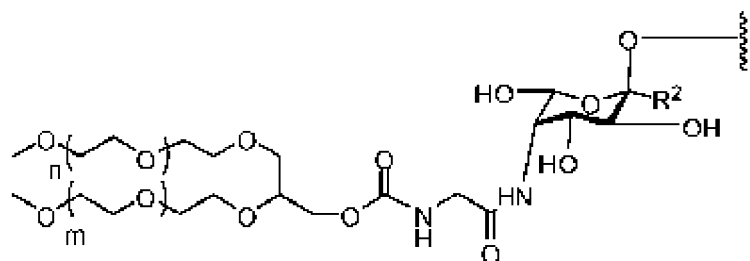
5



10



15

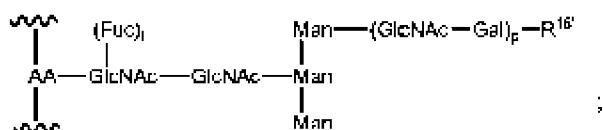


20

em que as variáveis são as acima discutidas.

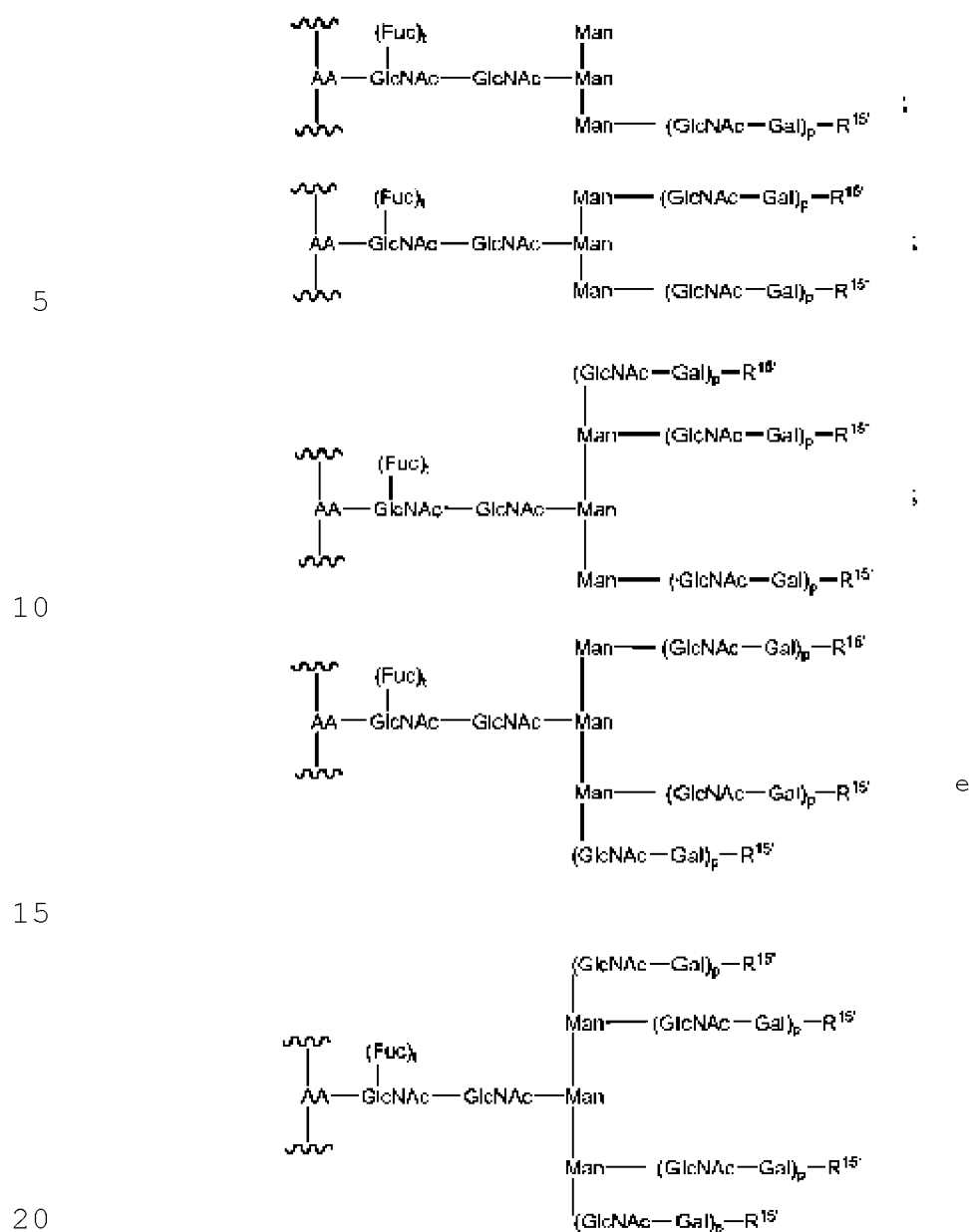
Em uma modalidade de exemplo, um conjugado de peptídeo glicopeguilado da invenção é selecionado das fórmulas apresentadas abaixo:

25



30

89/239



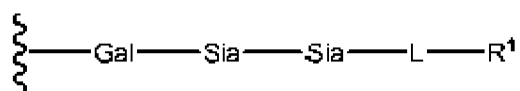
em que as variáveis são como acima descrito.

Nas fórmulas acima, o índice t é um número inteiro e 0 a 1 e o índice p é um número inteiro de 1 a 10. O símbolo $\text{R}^{15'}$ representa H, OH (por exemplo, Gal-OH), uma porção sialil, um grupo de ligação de sialil (ou seja, grupo de ligação de sialil-grupo de modificação polimérico (Sia-L- R^1), ou uma porção sialil à qual é ligada uma porção de sialil modificada por polímero (por exemplo, Sia-Sia-L- R^1) ("Sia-Sia^p"), uma porção galactosil, um grupo de ligação de galactosil (ou seja, grupo de ligação de galactosil -

grupo de modificação polimérico (Gal-L-R¹), ou uma porção de sialil à qual é ligada uma porção de galactosil modificada por polímero (por exemplo, Sia-Gal-L-R¹) ("Sia-Gal^P")), uma porção galactosaminil, um grupo de ligação de galactosaminil (ou seja, grupo de ligação de galactosaminil -grupo de modificação polimérico (GalNAc-L-R¹), ou uma porção sialil à qual é ligada uma porção galactosaminil modificada por polímero (por exemplo, Sia-GalNAc-L-R¹) ("Sia-GalNAc^P")), uma porção glicosil, um grupo de ligação de glicosil (ou seja, grupo de ligação de glicosil -grupo de modificação polimérico (Glc-L-R¹), ou uma porção sialil à qual é ligada uma porção glicosil modificada por polímero (por exemplo, Sia-Glc-L-R¹) ("Sia-Glc^P")), uma porção glicosaminil, um grupo de ligação de glicosaminil (ou seja, grupo de ligação de glicosaminil -grupo de modificação polimérico (GlcNAc-L-R¹), ou uma porção sialil à qual é ligada uma porção glicosaminil modificada por polímero (por exemplo, Sia-GlcNAc-L-R¹) ("Sia-GlcNAc^P")), uma porção manosil, um grupo de ligação de manosil (ou seja, grupo de ligação de manosil -grupo de modificação polimérico (Man-L-R¹), ou uma porção sialil à qual é ligada uma porção manosil modificada por polímero (por exemplo, Sia-Man-L-R¹) ("Sia-Man^P")), uma porção fucosil, um grupo de ligação de fucosil (ou seja, grupo de ligação de fucosil -grupo de modificação polimérico (Fuc-L-R¹), ou uma porção sialil à qual é ligada uma porção fucosil modificada por polímero (por exemplo, Sia-Fuc-L-R¹) ("Sia-Fuc^P")). Exemplos de porções sacaril modificadas por polímero têm a estrutura de acordo com Fórmulas I, Ia, II ou IIa. Um exemplo de conjugado de peptídeo da invenção incluirá pelo

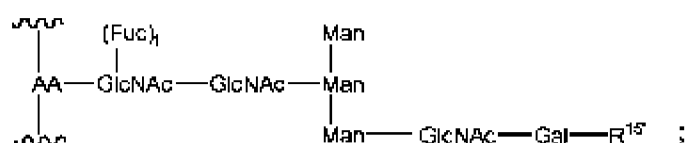
menos um glicano que tem um R^{15'} que inclui a estrutura de acordo com Fórmulas I, Ia, II e IIa. O oxigênio, com a Valência aberta, de Fórmulas I, Ia, II ou IIa é preferivelmente anexado através de uma ligação glicosídica a um carbono de uma porção Gal ou GalNAc. Em uma modalidade de exemplo adicional, o oxigênio é anexado ao carbono na posição 3 de um resíduo de galactose. Em um exemplos de modalidade, o ácido siálico modificado é ligado α 2,3- ao resíduo de galactose. Em outra modalidade de exemplo, o ácido siálico é ligado α 2,6-ao resíduo de galactose.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de sialil é uma porção sialil à qual é ligada uma porção sialil modificada por polímero (por exemplo, Sia-Sia-L-R¹) ("Sia-Sia^P"). Aqui, o grupo de ligação de glicosil é ligado a uma porção galactosil através de uma porção sialil:



Um exemplo de espécie de acordo com esse motivo é preparado por conjugação de Sia-L-R¹ a um ácido siálico terminal de um glicano usando uma enzima que forma ligações Sia-Sia, por exemplo, CST-II, ST8Sia-II, ST8Sia-III e ST8Sia-IV.

Em outra modalidade de exemplo, os glicanos nos conjugados de peptídeo têm a fórmula que é selecionada do grupo:





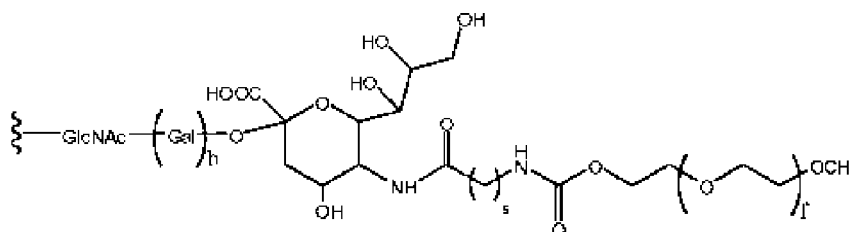
Em cada uma das fórmulas acima, R^{15'} é como acima discutido. Além disso, um exemplo de conjugado de peptídeo da invenção incluirá pelo menos um glicano com uma porção R¹⁵ que tem a estrutura de acordo com Fórmulas I, Ia, II ou IIa.

15



20

25



Em uma modalidade de exemplo, o grupo de modificação
30 polimérico é PEG. Em outra modalidade de exemplo, a porção

PEG tem um peso molecular de cerca de 20 kD. Em outra modalidade de exemplo, a porção PEG tem um peso molecular de cerca de 5 kD. Em outra modalidade de exemplo, a porção PEG tem um peso molecular de cerca de 10 kD. Em outra

5 modalidade de exemplo, a porção PEG tem um peso molecular de cerca de 40 kD. Em outras modalidades, o grupo de modificação é um óxido de poli(alquilenos) ramificado, por exemplo, poli(etileno glicol), que tem um peso molecular de pelo menos cerca de 80 kD, preferivelmente pelo menos cerca

10 de 100 kD, mais preferivelmente pelo menos cerca de 120 kD, pelo menos cerca de 140 kD ou pelo menos cerca de 160 kD. Ainda em outra modalidade, o óxido de poli(alquilenos) ramificado, por exemplo, poli(etileno glicol) tem pelo menos cerca de 200 kD, como de pelo menos cerca de 80 kD a

15 pelo menos cerca de 200 kD, incluindo pelo menos cerca de 160 kD e pelo menos cerca de 180 kD.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção de SA-PEG-10 kD linear, e um ou dois desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente

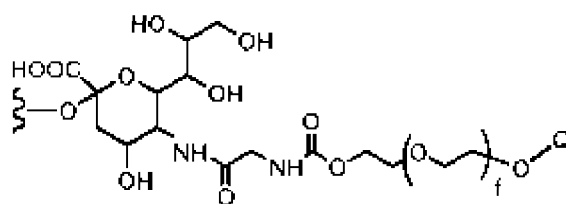
20 ligados ao peptídeo. Em outra modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção SA-PEG-20 kD linear, e um ou dois desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente ligados ao peptídeo. Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção SA-

25 PEG-5 kD linear, e um, dois ou três desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente ligados ao peptídeo. Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é uma porção SA-PEG-40 kD linear, e um ou dois desses grupos de ligação de glicosil são covalentemente

30 ligados ao peptídeo.

Em outra modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil é um grupo de ligação de sialil que tem a fórmula:

5



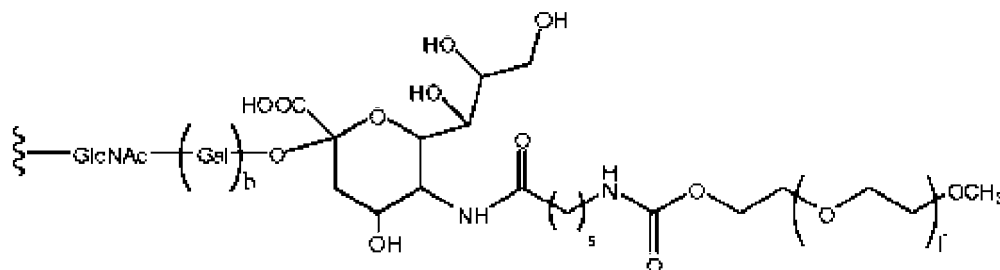
Em outra modalidade de exemplo, Q é um membro selecionado de H e CH₃. Em outra modalidade de exemplo, em que o referido grupo de ligação de glicosil tem a fórmula:

10



em que R¹⁵ é o referido grupo de ligação de sialil; e o índice p é um número inteiro selecionado de 1 a 10. Em uma modalidade de exemplo, o grupo de ligação de glicosil compreende a fórmula:

20



em que o índice b é um número inteiro selecionado de 0 e 1. Em uma modalidade de exemplo, o índice s é 1; e o índice f é um número inteiro selecionado de cerca de 200 a cerca de 300.

25

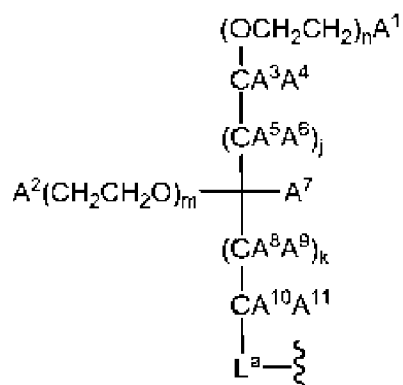
II. D. Grupos de modificação

O conjugados de peptídeo da invenção compreende um grupo de modificação. Esse grupo pode ser covalentemente ligado a um peptídeo através de um aminoácido ou um grupo de ligação de glicosil. Em outra modalidade de exemplo,

30

quando o grupo de modificação inclui a porção:

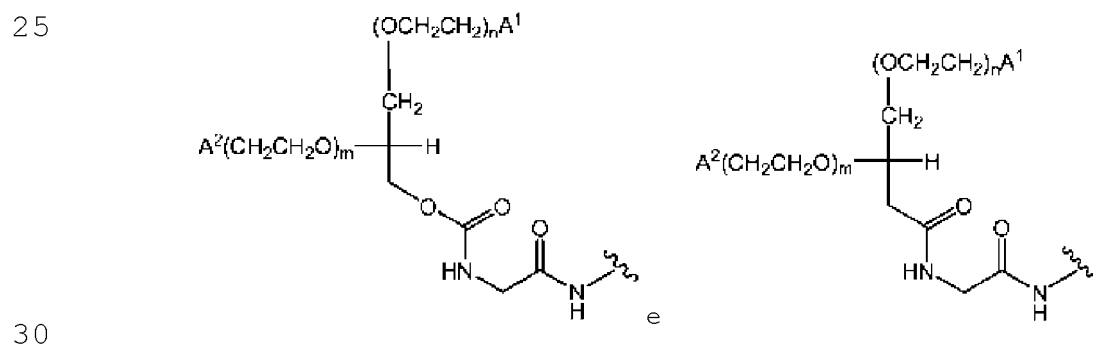
5



e o peptídeo no conjugado de peptídeo é um membro
 10 selecionado dos peptídeos na FIG. 7. Em outra modalidade de
 exemplo, o peptídeo no conjugado de peptídeo é um membro
 selecionado das proteínas morfogênicas do osso (por
 exemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7,
 BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-
 15 15), neurotrofinas (por exemplo, NT-3, NT-4, NT-5), fatores
 de diferenciação do crescimento (por exemplo, GDF-5), fator
 neurotrófico derivado de linhagem de células (GDNF), fator
 neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de
 crescimento de nervos (NGF), fator de von Willebrand (vWF)
 20 protease, Fator VII, Fator VIIa, Fator VIII, Fator IX,
 Fator X, Fator XI, Fator VIII de domínio B deletado,
 proteína de fusão de vWF-Fator VIII que tem Fator VIII de
 comprimento total, proteína de fusão de vWF-Fator VIII
 tendo Fator VIII de domínio B deletado, eritropoietina
 25 (EPO), fator estimulante de colônia de granulócitos (G-
 CSF), Fator estimulante de colônia de granulócitos-
 macrófagos (GM-CSF), interferon alfa, interferon beta,
 interferon gama, α 1-antitripsina (ATT, ou inibidor de α -1
 protease), glicocerebrosidase, Ativador de plasminogênio de
 30 tipo tecidual (TPA), Interleucina-2 (IL-2), uroquinase,

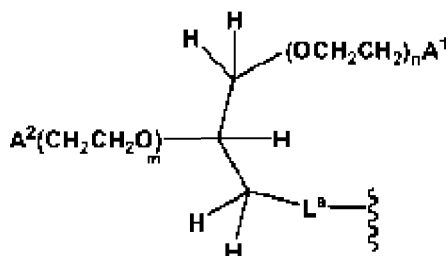
DNase humana, insulina, Proteína de superfície de Hepatite B (HbsAg), hormônio do crescimento humano, proteína de fusão de receptor de TNF-região Fc de IgG (Enbrel™), anticorpo monoclonal anti-HER2 (Herceptin™), anticorpo monoclonal para Proteína F de Vírus Sincicial Respiratório (Synagis™), anticorpo monoclonal para TNF- α (Remicade™), anticorpo monoclonal para glicoproteína IIb/IIIa (Reopro™), anticorpo monoclonal para CD20 (Rituxan™), anti-trombina III (AT III), gonadotrofina coriônica humana (hCG), alfa-galactosidase (Fabrazyme™), alfa-iduronidase (Aldurazyme™), hormônio folículo-estimulante, beta-glicosidase, anticorpo monoclonal anti-TNF-alfa, peptídeo-1 semelhante a glucagon (GLP-1), peptídeo-2 semelhante a glucagon (GLP-2), beta-glicosidase, alfa-galactosidase A, e fato de crescimento de fibroblastos. "Grupos de modificação" podem englobar uma variedade de estruturas que incluem porções de direcionamento, porções terapêuticas, biomoléculas. Adicionalmente, "grupos de modificação" incluem grupos de modificação poliméricos, que são polímeros que podem alterar uma propriedade do peptídeo como sua biodisponibilidade ou sua meia-vida no corpo.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de modificação polimérico tem uma estrutura que inclui uma porção de acordo com as seguintes fórmulas:



Em outra modalidade de exemplo de acordo com a fórmula acima, o grupo de modificação polimérico inclui uma porção de acordo com a seguinte fórmula:

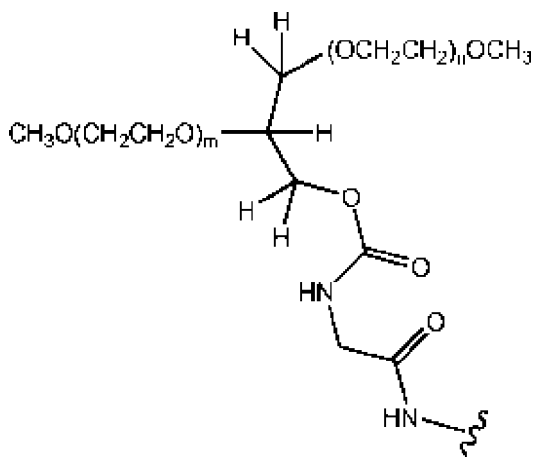
5



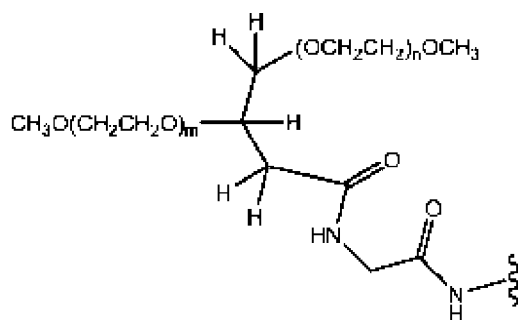
Em uma modalidade de exemplo, A¹ e A² são membros selecionados de -OH and -OCH₃.

Exemplos de grupos de modificação poliméricos de acordo com essa modalidade incluem a porção:

15



20



Para objetivos de conveniência, o grupos de modificação no restante dessa seção será baseado em grupos de modificação poliméricos como polímeros hidrossolúveis e insolúveis em água. no entanto, uma pessoa habilitada na técnica reconhecerá que outros grupos de modificação, como porções de direcionamento, porções terapêuticas e biomoléculas, podem ser usados no lugar dos grupos de modificação poliméricos. Em adição, aqueles habilitados perceberão que a confiança em estruturas de PEG ramificado acima apresentadas é simplesmente para clareza de

30

ilustração, o PEG pode ser substituída por substancialmente qualquer porção polimérica, incluindo, sem limitação àquelas espécies apresentadas na definição de "porção polimérica" aqui encontrada.

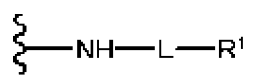
5 II. D. i. Ligantes dos grupos de modificação

Os ligantes do grupo de modificação servem para anexar o grupo de modificação (ou seja, grupos de modificação poliméricos, porções de direcionamento, porções terapêuticas e biomoléculas) ao peptídeo. Em uma modalidade de exemplo, o grupo de modificação polimérico é ligado a um grupo de ligação de glicosil, geralmente através de um heteroátomo, por exemplo, nitrogênio, no núcleo através de um ligante, L, como mostrado abaixo:



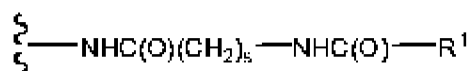
R^1 é uma porção polimérica e L é selecionado de uma ligação e um grupo de ligação. O índice w representa um número inteiro selecionado de 1-6, preferivelmente 1-3 e mais preferivelmente 1-2. Exemplos de grupos de ligação incluem porções de alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído e ácido siálico. Um exemplo de componente do ligante é uma porção acil.

Um composto de exemplo de acordo com a invenção tem uma estrutura de acordo com as Fórmulas I, Ia, II ou IIa acima, em que pelo menos um de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 ou $R^{6'}$ tem a fórmula:



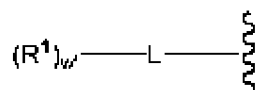
30 Em outro exemplo de acordo com essa modalidade pelo

menos um de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 ou $R^{6'}$ tem a fórmula:



em que s é um número inteiro de 0 a 20 e R^1 é uma
5 porção de modificação polimérica linear.

Em uma modalidade de exemplo, a construção de grupo de
modificação polimérico-ligante é uma estrutura ramificada
que inclui duas ou mais cadeias poliméricas anexadas à
porção central. Nessa modalidade preferida, a construção
10 tem a fórmula:



em que R^1 e L são como acima discutidos e w' é um
número inteiro de 2 a 6, preferivelmente de 2 a 4 e mais
15 preferivelmente de 2 a 3.

Quando L é uma ligação, ele é formado entre um grupo
funcional reativo em um precursor de R^1 e um grupo
funcional reativo de reatividade complementar no núcleo do
sacaril. Quando L é um ligante de ordem não zero, um
20 precursor de L pode estar no lugar em uma porção de
glicosil antes da reação com o precursor de R^1 .
Alternativamente, os precursores de R^1 e L podem ser
incorporados em um cassete pré-formado que é
subseqüentemente anexado a uma porção de glicosil. Como
25 apresentado nessa, a seleção e preparação de precursores
com grupos funcionais reativos adequados estão dentro da
capacidade daqueles habilitados na técnica. Além disso, a
ligação de precursores prossegue por química que é bem
compreendida na técnica.

30 Em uma modalidade de exemplo, L é um grupo de ligação

que é formado a partir de um aminoácido, ou peptídeo pequeno (por exemplo, 1-4 resíduos de aminoácido) gerando um açúcar modificado em que o grupo de modificação polimérico é anexado através de um ligante de alquil substituído. Exemplos de ligantes incluem glicina, lisina, serina e cisteína. A porção PEG pode ser anexada à porção de amina do ligante através de uma ligação de amida ou uretano. O PEG é ligado aos átomos de enxofre ou oxigênio de cisteína e serina através de ligações de tioéter ou éter, respectivamente.

Em uma modalidade de exemplo, R⁵ inclui o grupo de modificação polimérico. Em outra modalidade de exemplo, R⁵ inclui o grupo de modificação polimérico e um ligante, L, que une o grupo de modificação ao restante da molécula. Como acima discutido, L pode ser uma estrutura linear ou ramificada. De modo similar, o grupo de modificação polimérico pode ser ramificado ou linear.

II. D. ii. Polímeros hidrossolúveis

Vários polímeros hidrossolúveis são conhecidos por aqueles habilitados na técnica e são úteis na prática da presente invenção. O termo polímero hidrossolúvel engloba espécies como sacarídeos (por exemplo, dextrano, amilose, ácido hialurônico, ácido poli(sialico), heparanos, heparinas etc.); poli (aminoácidos), por exemplo, ácido poli(aspártico) e ácido poli(glutâmico); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (por exemplo, ácido poli(acrílico), poli(éteres), por exemplo, poli(etileno glicol); peptídeos, proteínas e outros. A presente invenção pode ser praticada com qualquer polímero hidrossolúvel com a única limitação sendo que o polímero deve incluir um ponto em que o

restante do conjugado possa ser anexado.

Métodos para ativação de polímeros também podem ser encontrados em WO 94/17039, Pat. U.S. No. 5.324.844, WO 94/18247, WO 94/04193, Pat. U.S. No. 5.219.564, Pat. U.S. No. 5.122.614, WO 90/13540, Pat. U.S. No. 5.281.698, e mais WO 93/15189, e para a conjugação entre polímeros ativados e peptídeos, por exemplo, Fator de coagulação VIII (WO 94/15625), hemoglobina (WO 94/09027), molécula que porta oxigênio (Pat. U.S. No. 4.412.989), ribonuclease e superóxido dismutase (Veronese e cols., *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-45 (1985)).

Exemplos de polímeros hidrossolúveis são aqueles em que uma proporção substancial das moléculas do polímero em uma amostra do polímero são de aproximadamente o mesmo peso molecular; uma vez que polímeros são "homodispersos".

A presente invenção é também ilustrada por referência a um conjugado de poli(etileno glicol). Várias revisões e monografias sobre a funcionalização e conjugação de PEG são disponíveis. Veja, por exemplo, Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong e cols., *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado e cols., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995); and Bhadra, e cols., *Pharmazie*, 57:5-29 (2002). Vias para a preparação de moléculas reativas de PEG e formação de conjugados que usam as moléculas reativas são conhecidas na técnica. Por exemplo, Patente U.S. No. 5.672.662 revela um conjugado a hidrossolúvel e isolável de um éster ativo de um ácido de polímero selecionado de óxidos de poli(alquilenos), polióis

poli(oxietilados), alcoóis poli(olefínicos), e poli(acrilomorfolino) lineares ou ramificados.

A Patente U.S. No. 6.376.604 apresenta um método para a preparação de éster de 1-benzotriazolilcarbonato hidrossolúvel de um polímero hidrossolúvel e não peptídico por reação de um hidroxil terminal do polímero com di(1-benzotriazoil)carbonato em um solvente orgânico. O éster ativo é usado para formar conjugados com um agente biologicamente ativo como uma proteína ou peptídeo.

WO 99/45964 descreve um conjugado que compreende um agente biologicamente ativo e um polímero hidrossolúvel ativado que compreende um esqueleto de polímero que tem pelo menos um terminal ligado ao esqueleto do polímero através de uma ligação estável, em que pelo menos um terminal compreende uma porção de ramificação que tem grupos reativos proximais ligados à porção de ramificação, em que o agente biologicamente ativo é ligado a pelo menos um dos grupos reativos proximais. Outros poli(etileno glicóis) ramificados são descritos em WO 96/21469, Patente U.S. No. 5.932.462 descreve um conjugado formado com uma molécula de PEG ramificado que inclui um terminal ramificado que inclui grupos funcionais reativos. Os grupos livres reativos são disponíveis para reagir com uma espécie biologicamente ativa, como uma proteína ou peptídeo, formando conjugados entre o poli(etileno glicol) e a espécie biologicamente ativa. A Patente U.S. No. 5.446.090 descreve um ligante de PEG bifuncional e seu uso na formação de conjugados que têm um peptídeo em cada um dos terminais de ligante de PEG.

Conjugados que incluem ligações degradáveis de PEG são

descritos em WO 99/34833; e WO 99/14259, bem como na Patente U.S. No. 6.348.558. Tais ligações degradáveis são aplicáveis na presente invenção.

Os métodos reconhecidos na técnica de ativação de polímero acima apresentados são de uso no contexto da presente invenção na formação dos polímeros ramificados aqui apresentados e também para a conjugação desses polímeros ramificados a outras espécies, por exemplo, açúcares, nucleotídeos de açúcar e outros.

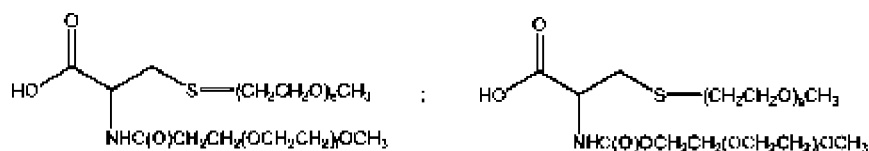
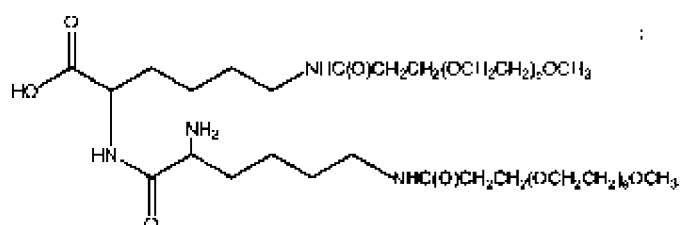
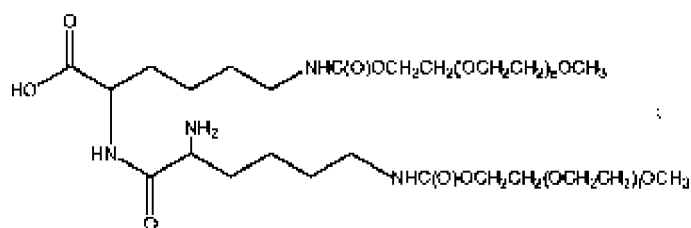
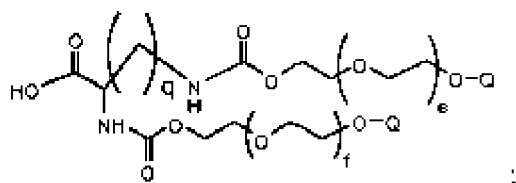
Um exemplo de polímero hidrossolúvel é poli(etileno glicol), por exemplo, metoxi poli(etileno glicol). O poli(etileno glicol) usado na presente invenção não é restrito a qualquer forma particular ou faixa de peso molecular. Para moléculas de poli(etileno glicol) não ramificado o peso molecular é preferivelmente entre 500 e 100.000. Um peso molecular de 2.000-60.000 é preferivelmente usado e preferivelmente de cerca de 5.000 a cerca de 40.000.

II. D. iii. Polímeros hidrossolúveis ramificados

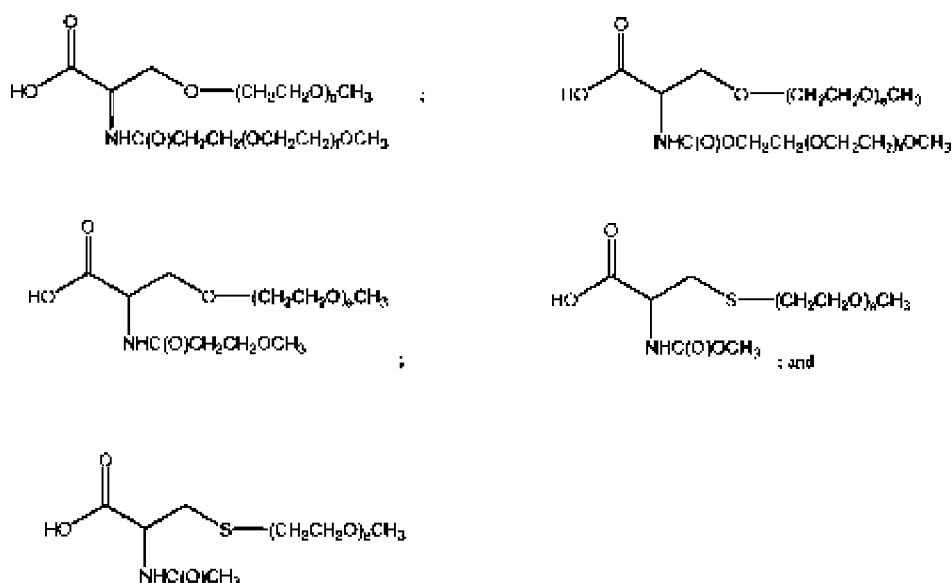
Em outra modalidade a porção de modificação polimérica é uma estrutura de PEG ramificado que tem mais de uma porção de PEG linear ou ramificado anexada. Exemplos de PEGs ramificados são descritos na Pat. U.S. No. 5.932.462; Pat. U.S. No. 5.342.940; Pat. U.S. No. 5.643.575; Pat. U.S. No. 5.919.455; Pat. U.S. No. 6.113.906; Pat. U.S. No. 5.183.660; WO 02/09766; Kodera Y., *Bioconjugate Chemistry* 5: 283-288 (1994); e Yamasaki e cols., *Agric. Biol. Chem.*, 52: 2.125-2.127, 1998.

Porções de modificação de polímero representativas incluem estruturas que são baseadas em aminoácidos que

contêm cadeia lateral, por exemplo, serina, cisteína, lisina, e peptídeos pequenos, por exemplo, lys-lys. Em algumas modalidades, a porção de modificação polimérica é uma porção de PEG ramificado que é baseada em um oligopeptídeo, como um peptídeo tri-lisina. Exemplos de aminoácidos adequados para uso incluem lisina, cisteína, e serina. Em tais modalidades, cada subunidade polimérica anexada à estrutura do peptídeo pode ser uma porção de PEG linear ou uma porção de PEG ramificada. Por exemplo, a tri-lisina pode ser mono-, di-, tri-, ou tetra-PEG-ilada com porções de PEG linear, porções de PEG ramificadas, ou uma combinação de porções de PEG linear e ramificada. Exemplos de estruturas ramificadas incluem as seguintes porções:



105/239



Aqueles habilitados perceberão que a amina livre mas estruturas de di-lisina também podem ser peguiladas através de uma ligação de amida ou uretano com uma porção de PEG linear ou uma porção de PEG ramificada.

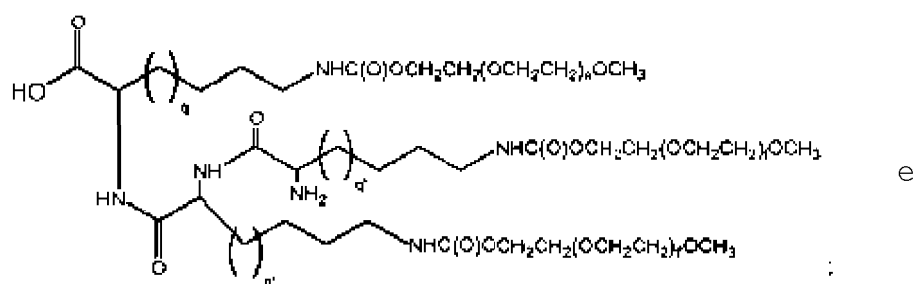
Será percebido por uma pessoa habilitada na técnica que em adição às estruturas lineares de PEG acima mostradas, os polímeros ramificados exemplificados na seção prévia também podem ser anexados a uma porção de ramificação (por exemplo, cisteína, serina, lisina, e oligômeros de lisina) no lugar de uma ou mais das estruturas de PEG linear. Além disso, aqueles habilitados perceberão que a confiança nas estruturas de PEG acima apresentadas é simplesmente para clareza de ilustração, o PEG pode ser substituído por substancialmente qualquer porção polimérica, que inclui, sem limitação, aquelas espécies apresentadas na definição de "porção polimérica" aqui encontrada.

PEG de qualquer peso molecular, por exemplo, 1 kD, 2 kD, 5 kD, 10 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 35 kD, 40 kD e 45 kD é de uso na presente invenção. PEG de um peso

molecular maior também pode ser usado na presente invenção, incluindo até cerca de 200 kD, como pelo menos cerca de 180 kD, cerca de 160 kD, cerca de 140 kD, cerca de 120 kD, cerca de 100 kD, cerca de 90 kD, cerca de 80 kD, e cerca de 70 kD. Em certas modalidades o peso molecular de PEG é cerca de 80 kD. Em outras modalidades, o peso molecular de PEG é pelo menos cerca de 200 kD, pelo menos cerca de 180 kD, pelo menos cerca de 160 kD, ou pelo menos cerca de 140 kD.

Cada porção PEG da porção de modificação polimérica ramificada pode ter um peso molecular como acima definido ou o peso molecular total de todas as porções PEG da porção de modificação polimérica pode ser como acima definido. Por exemplo, em certas modalidades cada porção PEG da porção de modificação polimérica ramificada pode ser cerca de 80 kD ou o peso molecular total de todas as porções PEG da porção de modificação polimérica pode ser cerca de 80 kD. Do mesmo modo, em certas modalidades cada porção PEG da porção de modificação polimérica ramificada pode ser cerca de 200 kD ou o peso molecular total de todas as porções PEG da porção de modificação polimérica pode ser cerca de 200 kD.

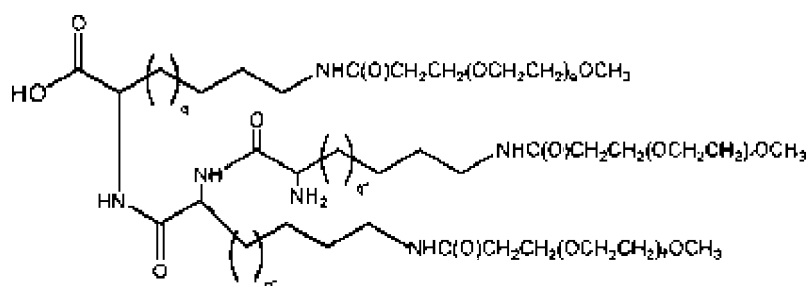
Exemplos de espécies de acordo com essa modalidade têm as fórmulas:



25

30

5



em que os índices e , f and f' são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500; e os índices q , q' e q'' são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 20.

10 Como será aparente para aqueles habilitados, os polímeros ramificados de uso na invenção incluem variações nos temas acima apresentados. Por exemplo o conjugado di-lisina-PEG acima mostrado pode incluir três subunidades poliméricas, a terceira ligada à α -amina mostrada como não
15 modificada na estrutura acima. De modo similar, o uso de uma tri-lisina funcionalizada com três ou quatro subunidades poliméricas rotuladas com uma porção de modificação polimérica em uma maneira desejada está dentro do escopo da invenção.

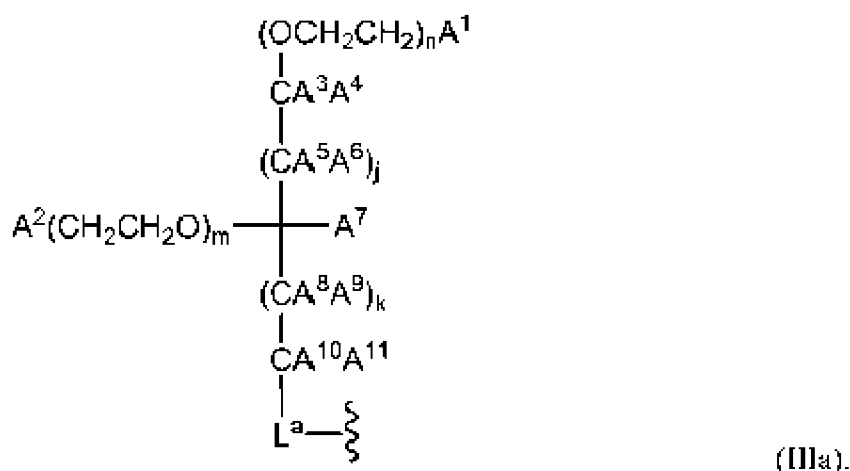
20 Como aqui discutido, o PEG de uso nos conjugados da invenção podem ser lineares ou ramificados. Um exemplo de precursor de uso para formar o PEG ramificado que contém conjugados de peptídeo de acordo com essa modalidade da invenção tem a fórmula:

25



Um outro exemplo de precursor de uso para formar o PEG
30 ramificado que contém conjugados de peptídeo de acordo com

essa modalidade da invenção tem a fórmula:



As espécies de polímero ramificado de acordo com essa fórmula são essencialmente polímeros hidrossolúveis puros. X^{3'} é uma porção que inclui um grupo funcional reativo ionizável (por exemplo, OH, COOH, H₂PO₄, HSO₃, HPO₃, e sais desses etc.) ou outro grupo funcional reativo, por exemplo, infra. C é carbono. X⁵, R¹⁶ e R¹⁷ são independentemente selecionados de grupos não reativos e porções poliméricas (por exemplo óxido de poli(alquilenos), por exemplo, PEG). Grupos não reativos incluem grupos que são considerados como sendo essencialmente não reativos, neutros e/ou estáveis em pH fisiológico, por exemplo, H, alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído e outros. Um exemplo de porção polimérica inclui as estruturas ramificadas apresentadas na Fórmula IIIa e seus exemplares. Uma pessoa habilitada na técnica perceberá que a porção PEG nessas fórmulas pode ser substituída com outros polímeros. Exemplos de polímeros incluem aqueles da família de óxido de poli(alquilenos) (por exemplo, H, alquil não substituído, heteroalquil não substituído) e braços poliméricos (por exemplo, PEG). X² e

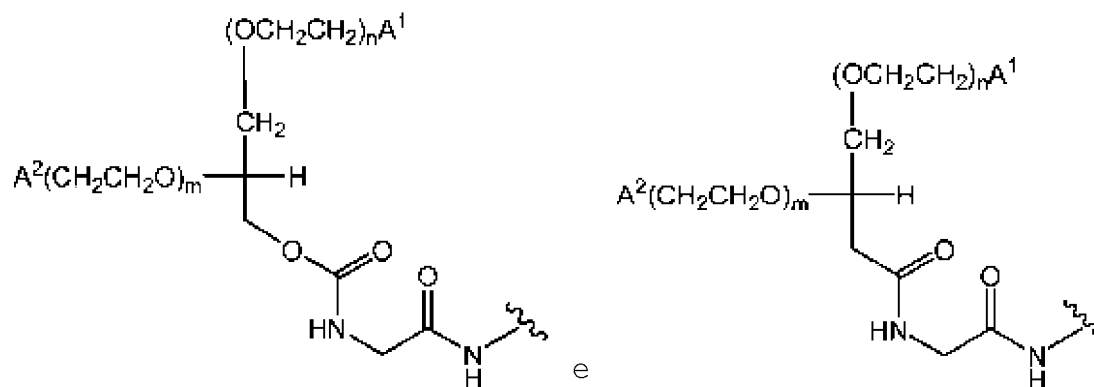
X⁴ são fragmentos de ligação que são preferivelmente essencialmente não reativos sob condições fisiológicas, que pode ser as mesmas ou diferentes. Um exemplo de ligante não inclui porções aromáticas nem de éster. Alternativamente, essas ligações podem incluir uma ou mais porções que são desenhadas para se degradar sob condições fisiologicamente relevantes, por exemplo, ésteres, dissulfetos etc. X² e X⁴ unem braços poliméricos R¹⁶ e R¹⁷ a C. Quando X^{3'} reage com um grupo funcional reativo de reatividade complementar em um ligante, açúcar ou cassete ligante-açúcar, X^{3'} é convertido a um componente de fragmento de ligação de X³. Exemplos de fragmentos de ligação para X², X³ e X⁴ são independentemente selecionados e incluem S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH e NHC(O)O, e OC(O)NH, CH₂S, CH₂O, CH₂CH₂O, CH₂CH₂S, (CH₂)_oO, (CH₂)_oS ou (CH₂)_oY'-PEG em que, Y' é S, NH, NHC(O), C(O)NH, NHC(O)O, OC(O)NH, ou O e o é um número inteiro de 1 a 50. Em uma modalidade de exemplo, os fragmentos de ligação X² e X⁴ são fragmentos de ligação diferentes.

Em uma modalidade de exemplo, o precursor (Fórmula III), ou um derivado ativado desse, reage com, e assim se liga a um açúcar, um açúcar ativado ou um nucleotídeo de açúcar através de uma reação entre X^{3'} e um grupo de reatividade complementar na porção de açúcar, por exemplo, uma amina. Alternativamente, X^{3'} reage com um grupo funcional reativo em um precursor para ligante, L. Um ou mais de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ ou R^{6'} de Fórmulas I, Ia, II ou IIa podem incluir a porção de modificação polimérica ramificada, ou essa porção ligada através de L.

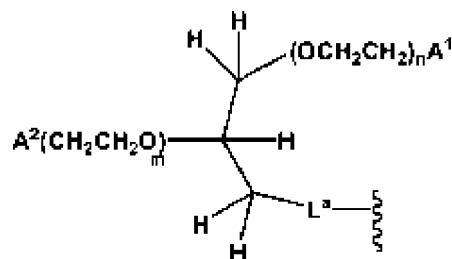
Em uma modalidade de exemplo, o grupo de modificação

110/239

polimérico tem uma estrutura que inclui uma porção de acordo com as seguintes fórmulas:

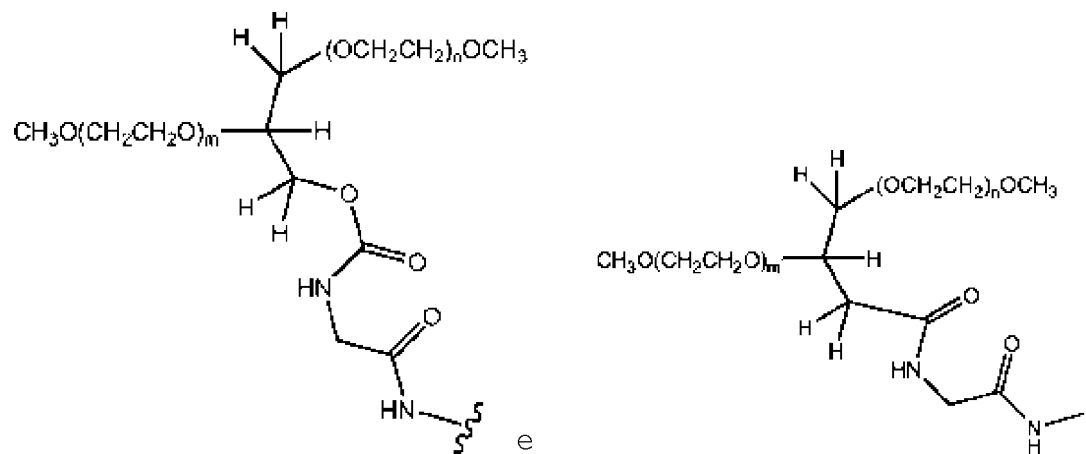


Em outra modalidade de exemplo de acordo com a fórmula acima, o polímero ramificado tem uma estrutura de acordo com a seguinte fórmula:

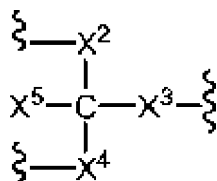


Em uma modalidade de exemplo, A¹ e A² são selecionados de -OH e -OCH₃.

Exemplos de grupos de modificação poliméricos de acordo com essa modalidade incluem a porção:



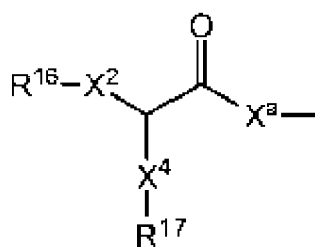
Em uma modalidade de exemplo, a porção:



5

É o braço do ligante, L. Nessa modalidade preferida, um exemplo de ligante é derivado de um aminoácido natural ou não natural, análogo de aminoácido ou mimético de aminoácido, ou um peptídeo pequeno formado a partir de uma ou mais de tais espécies. Por exemplo, certos polímeros ramificados encontrados nos compostos da invenção têm a fórmula:

10



15

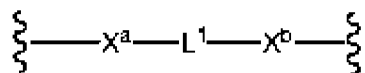
(IV).

X^a é um fragmento de ligação que é formado pela reação de um grupo funcional reativo, por exemplo, $X^{3'}$, em um precursor da porção de modificação polimérica ramificada e um grupo funcional reativo na porção de açúcar, ou um precursor para um ligante. Por exemplo, quando $X^{3'}$ é um ácido carboxílico, ele pode ser ativado e ligado diretamente a um grupo amina pendente a partir de um amino-sacarídeo (por exemplo, Sia, GalNH₂, GlcNH₂, ManNH₂ etc.), formando X^a que é uma amida. Exemplos adicionais de grupos funcionais reativos e precursores ativados são descritos abaixo. O índice c representa um número inteiro de 1 a 10. Os outros símbolos têm a mesma identidade que aqueles acima discutidos.

25

30

Em outra modalidade de exemplo, X^a é uma porção de ligação formada com outro ligante:

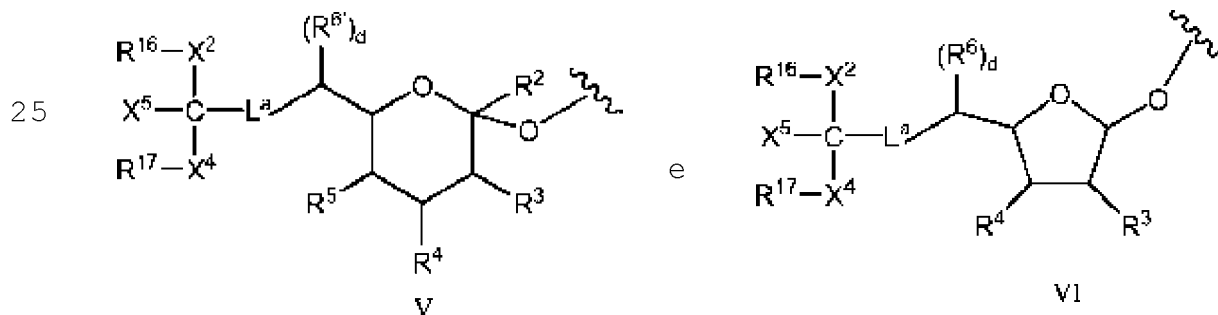


em que X^b é um segundo fragmento de ligação e é independentemente selecionado daqueles grupos apresentados para X^a , e , similar a L, L^1 é uma ligação, alquil substituído ou não substituído ou heteroalquil substituído ou não substituído.

Exemplos de espécies para X^a e X^b incluem S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), C(O)NH e NHC(O)O, e OC(O)NH.

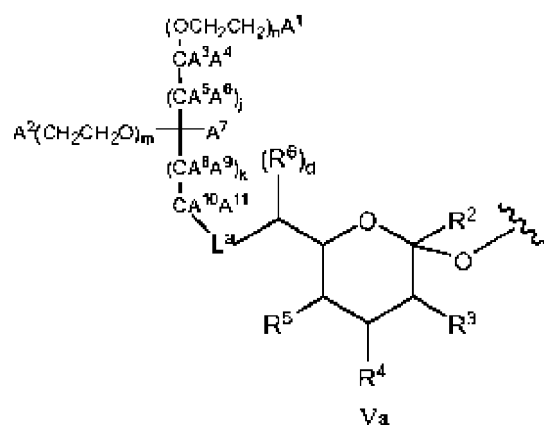
Em outra modalidade de exemplo, X^4 é uma ligação de peptídeo a R^{17} , que é um aminoácido, di-peptídeo (por exemplo,, Lys-Lys) ou tri-peptídeo (por exemplo, Lys-Lys-Lys) em que a porção alfa-amina (ies) e/ou heteroátomo(s) de cadeia lateral são modificados com a porção de modificação polimérica.

Em uma modalidade de exemplo adicional, os conjugados de peptídeo da invenção incluem uma porção, por exemplo, uma porção R^{15} que tem a fórmula que é selecionada de:

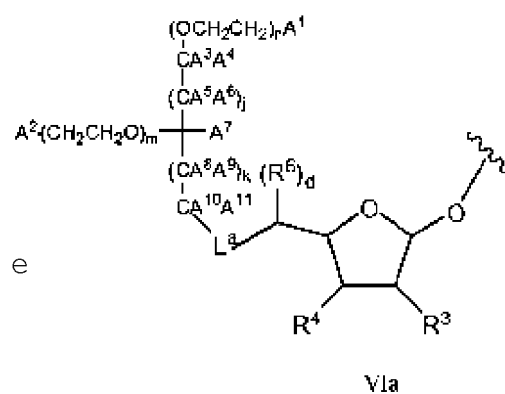


113/239

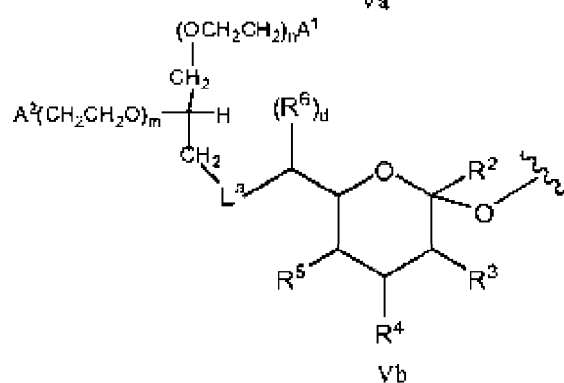
5



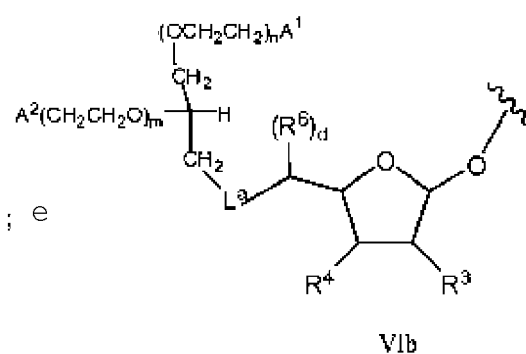
e



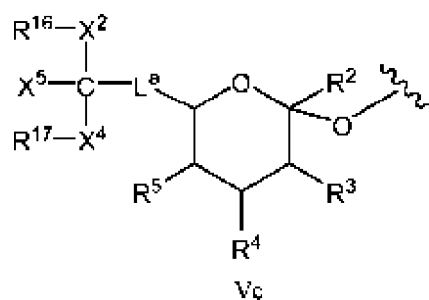
10



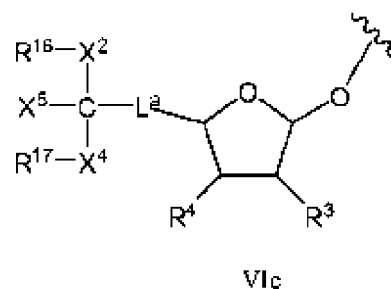
; e



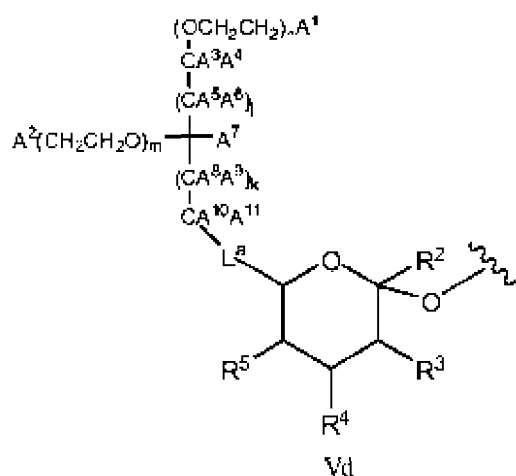
15



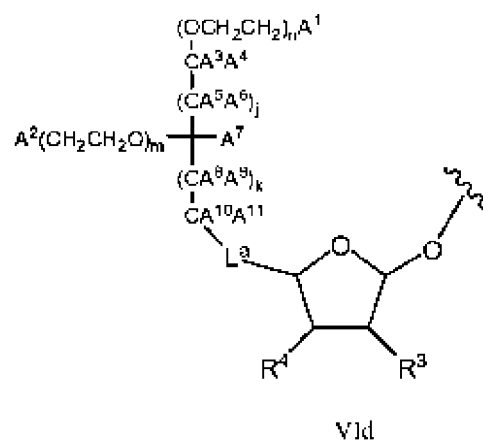
; e



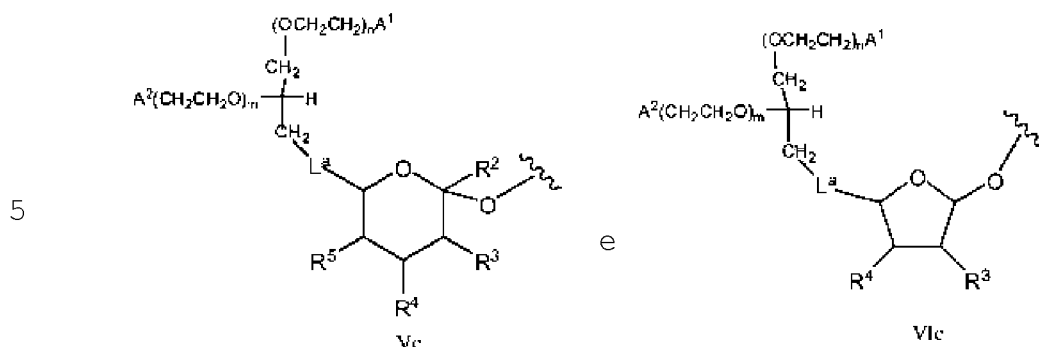
20



e

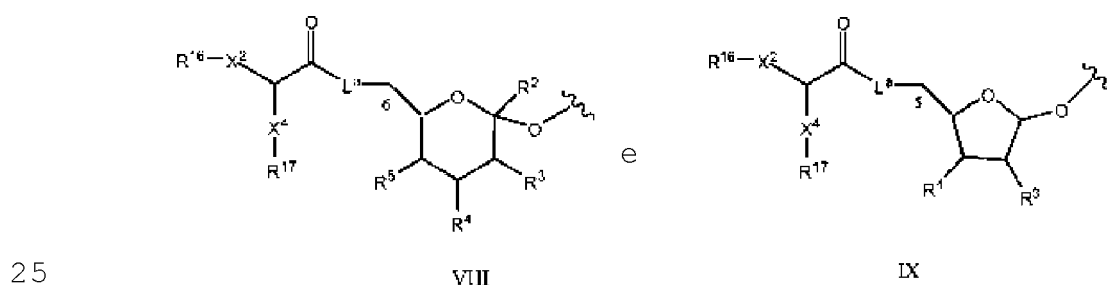


30



em que a identidade dos radicais representados pelos vários símbolos é a mesma que a discutida acima. L^a é uma
 10 ligação ou um ligante como acima discutido para L e L^1 , por exemplo, porção alquil substituído ou não substituído ou heteroalquil substituído ou não substituído. Em uma modalidade de exemplo, L^a é uma porção da cadeia lateral de ácido siálico que é funcionalizado com uma porção de
 15 modificação polimérica como mostrado. Exemplos de porções L^a incluem cadeias de alquil substituído ou não substituído que incluem um ou mais OH ou NH_2 .

Ainda em outra modalidade de exemplo, a invenção fornece conjugados de peptídeo que têm uma porção, por
 20 exemplo, uma porção R^{15} com fórmula:

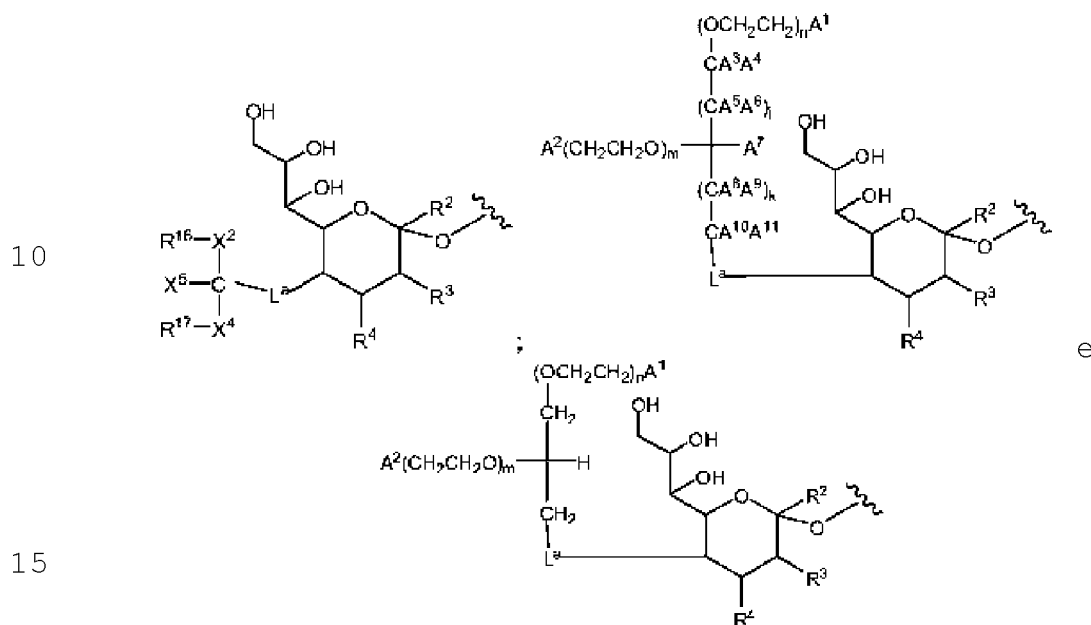


A identidade dos radicais representados pelos vários símbolos é a mesma que a discutida acima. Como aqueles habilitados perceberão, o braço de ligante nas Fórmulas VIII e IX é igualmente aplicável a outros açúcares
 30 modificados aqui apresentados. Em exemplos de modalidade,

115/239

as espécies de Fórmulas VIII e IX são as porções R¹⁵ anexadas às estruturas de glicano aqui apresentadas.

Ainda em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo inclui uma porção R¹⁵ com uma fórmula que é um
5 membro selecionado de:



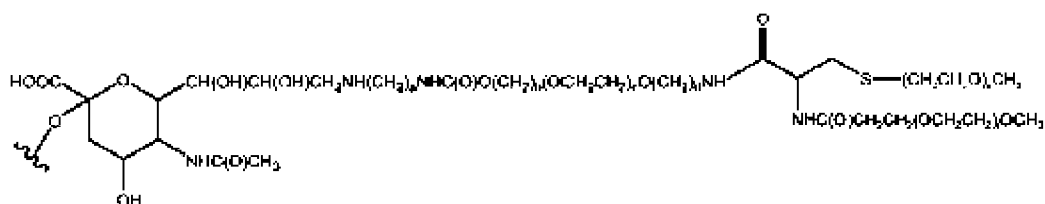
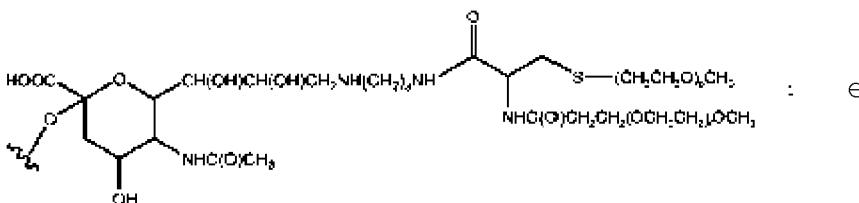
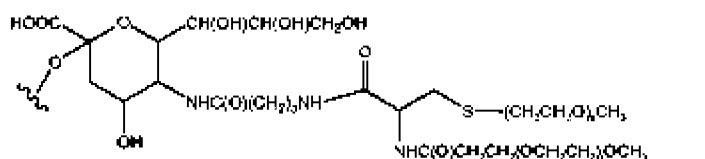
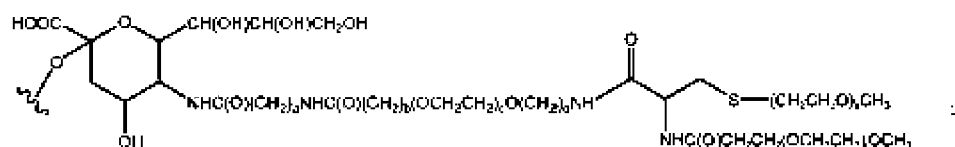
em que as identidades dos radicais são como acima discutido. Um exemplo de espécie para L^a é - (CH₂)_jC(O)NH(CH₂)_hC(O)NH-, em que os índices h e j são
20 números inteiros independentemente selecionados de 0 a 10. Um exemplo adicional de espécies é -C(O)NH-. Os índices m e n são números inteiros independentemente selecionados de 0 a 5.000. A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, A⁸, A⁹, A¹⁰ e A¹¹, são membros independentemente selecionados de H, alquil
25 substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído, cicloalquil substituído ou não substituído, heterocicloalquil substituído ou não substituído, aril substituído ou não substituído, heteroaril substituído ou não substituído, -NA¹²A¹³, -OA¹² e
30 -SiA¹²A¹³. A¹² e A¹³ são membros independentemente

selecionados de alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído, cicloalquil substituído ou não substituído, heterocicloalquil substituído ou não substituído, aril substituído ou não substituído, e heteroaril substituído ou não substituído.

As modalidades da invenção acima apresentadas são também exemplificadas por referência a espécies em que o polímero é um polímero hidrossolúvel, particularmente poli(etileno glicol) ("PEG"), por exemplo, metoxi-poli(etileno glicol).

Aqueles habilitados perceberão que o foco nas seções que se seguem é para clareza de ilustração e os vários motivos apresentados que usam PEG como um exemplo de polímero são igualmente aplicáveis a espécies em que um polímero diferente de PEG é utilizado.

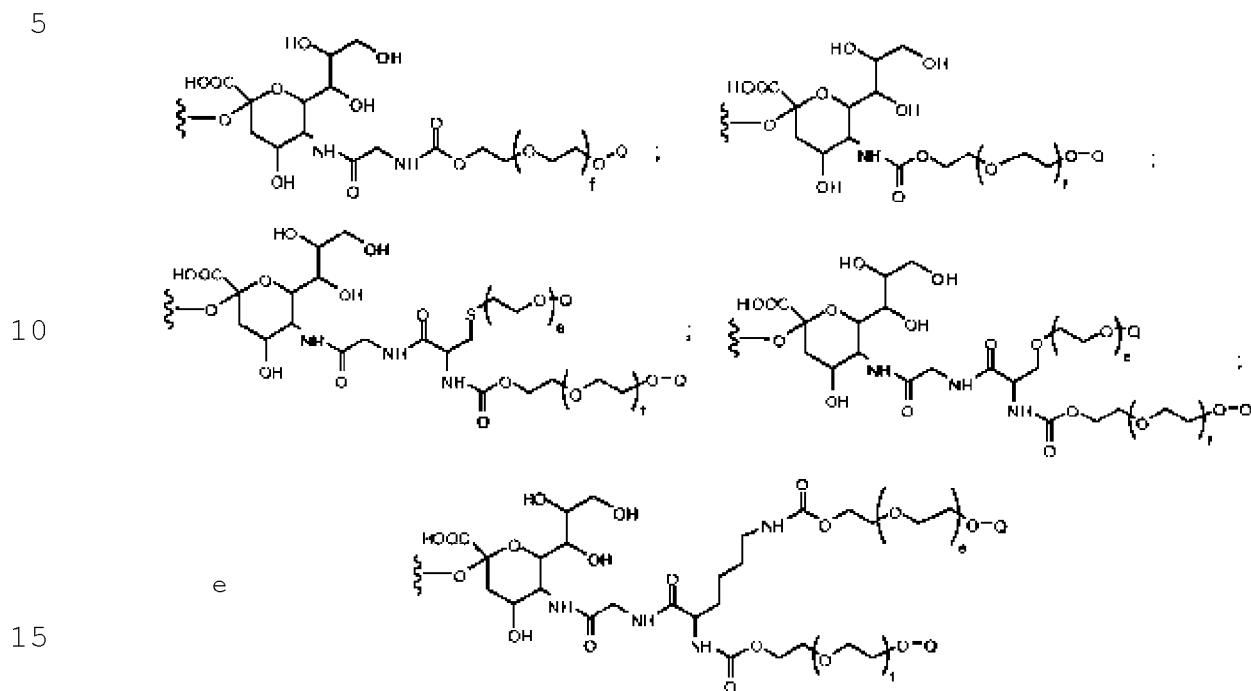
Em uma modalidade de exemplo, a porção R^{15} tem a fórmula que é um membro selecionado de o grupo:



117/239

Em cada uma das estruturas acima, o fragmento de ligante $-\text{NH}(\text{CH}_2)_a-$ pode estar presente ou ausente.

Em outras modalidades de exemplo, o conjugado de peptídeo inclui uma porção R^{15} selecionada do grupo:

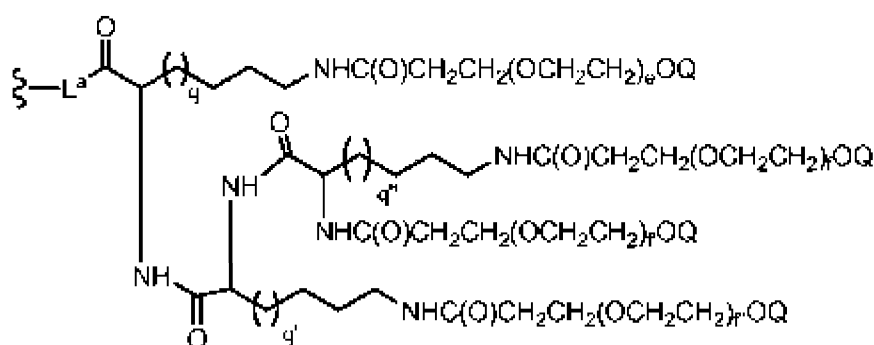


Em cada uma das fórmulas acima, os índices e e f são independentemente selecionadas dos números inteiros de 1 a 2.500. Em modalidades de exemplo adicionais, e e f são selecionados para fornecer uma porção PEG que é de cerca de 1 kD, 2 kD, 5 kD, 10 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 35 kD, 40 kD e 45 kD. PEG de maior peso molecular também pode ser usado na presente invenção, incluindo de até cerca de 200 kD, como pelo menos cerca de 180 kD, cerca de 160 kD, cerca de 140 kD, cerca de 120 kD, cerca de 100 kD, cerca de 90 kD, cerca de 80 kD, e cerca de 70 kD. Em certas modalidades o peso molecular de PEG é cerca de 80 kD. Em outras modalidades, o peso molecular de PEG é pelo menos cerca de 200 kD, pelo menos cerca de 180 kD, pelo menos cerca de 160 kD, pelo menos cerca de 140 kD, ou pelo menos cerca de 10 kD. O símbolo Q

Outros polímeros ramificados têm estruturas com base
5 em peptídeos di-lisina (Lys-Lys), por exemplo:



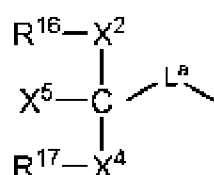
5



Em cada uma das figures acima, os índices e, f, f' e f'' representam números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500. Os índices q, q' e q'' representam números inteiros independentemente selecionados de 1 a 20. deve ser percebido por uma pessoa habilitada na técnica que além das estruturas de PEG linear mostradas acima, os polímeros ramificados exemplificados nas seções
15 prévias também podem ser anexados a uma porção de ramificação (por exemplo, lisina, e oligômeros de lisina) no lugar de uma ou mais das estruturas de PEG linear.

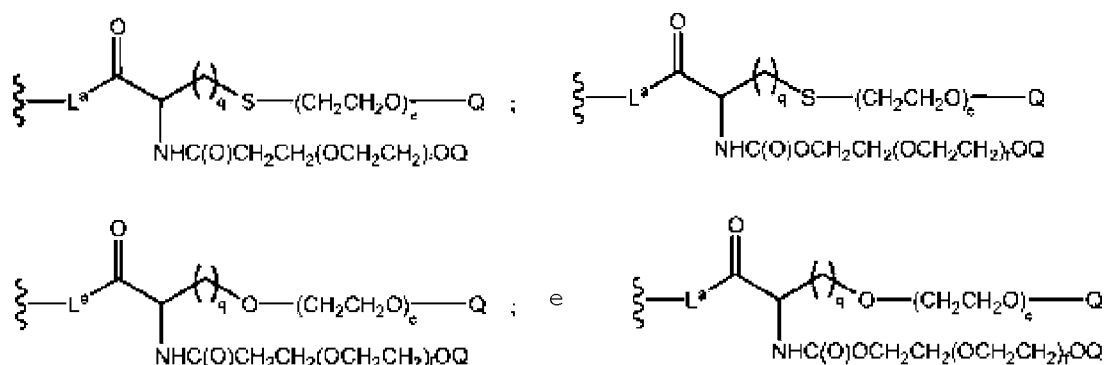
Em outra modalidade de exemplo, o grupo de modificação:

20



tem a fórmula que é um membro selecionado de:

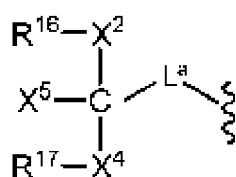
25



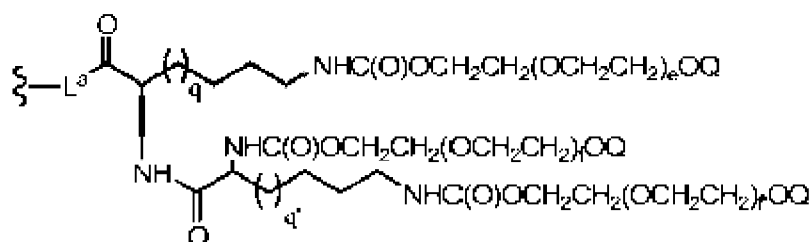
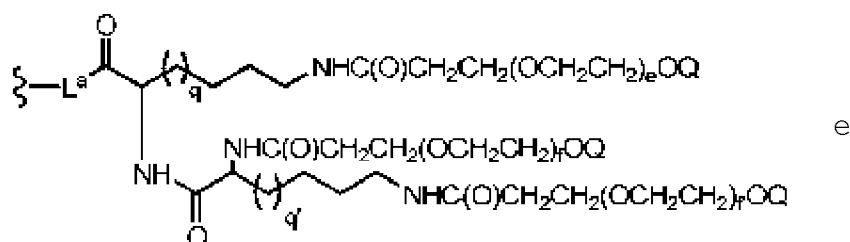
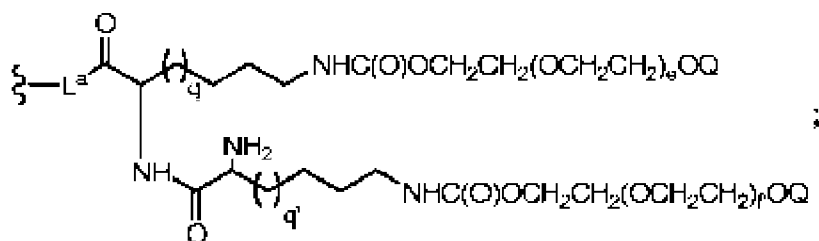
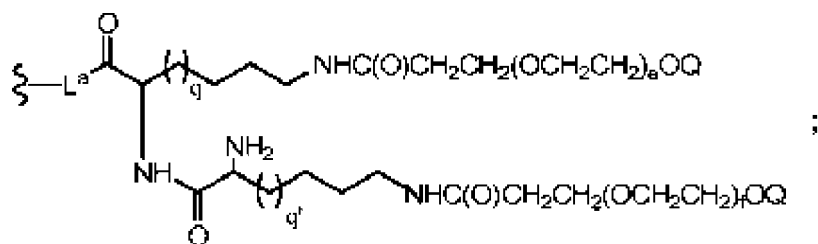
30

em que Q é um membro selecionado de H e C₁-C₆ alquil substituído ou não substituído. Os índices e e f são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500, e o índice q é um número inteiro selecionado de 0 a 20.

Em outra modalidade de exemplo, o grupo de modificação:

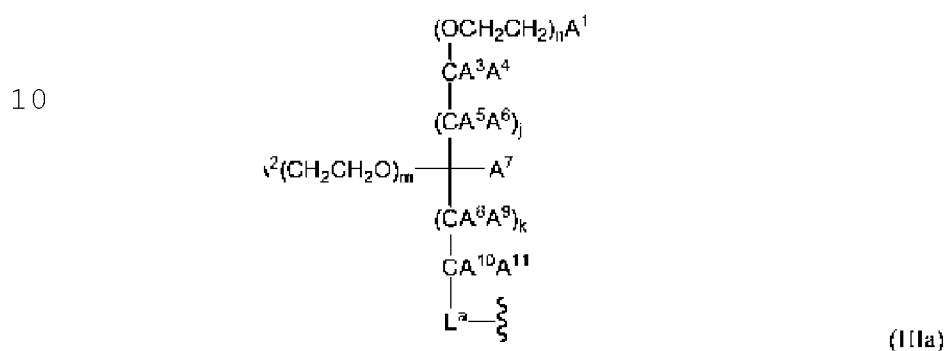


tem a fórmula que é um membro selecionado de:



em que Q é um membro selecionado de H e C₁-C₆ alquil substituído ou não substituído. Os índices e, f e f' são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500, e q e q' são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 20.

Em outra modalidade de exemplo, o polímero ramificado tem uma estrutura que inclui uma porção de acordo com a seguinte fórmula:



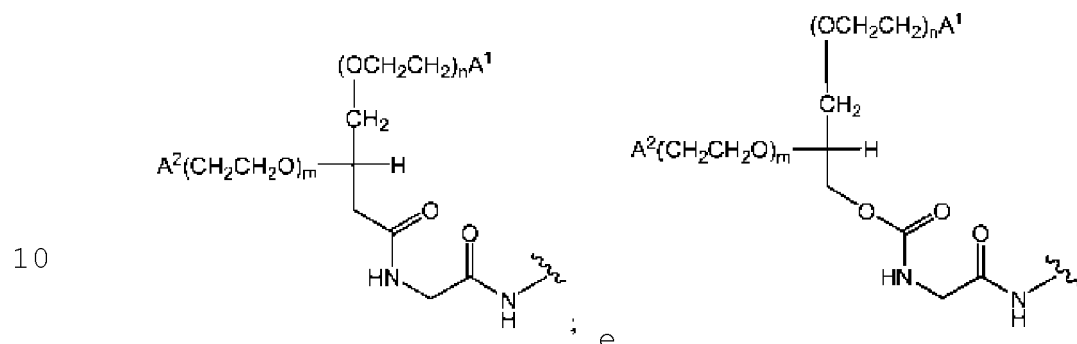
em que os índices m e n são números inteiros independentemente selecionados de 0 a 5.000. A¹, A², A³, A⁴, A⁵, A⁶, A⁷, A⁸, A⁹, A¹⁰ e A¹¹, são membros independentemente selecionados de H, alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído, cicloalquil substituído ou não substituído, heterocicloalquil substituído ou não substituído, aril substituído ou não substituído, heteroaril substituído ou não substituído, -NA¹²A¹³, -OA¹² e -SiA¹²A¹³. A¹² e A¹³ são membros independentemente selecionados de alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído, cicloalquil substituído ou não substituído, heterocicloalquil substituído ou não substituído, aril substituído ou não substituído, e heteroaril substituído ou não substituído.

Fórmula IIIa é um subconjunto de Fórmula III. As

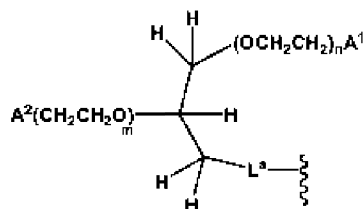
122/239

estruturas descritas pela Fórmula IIIa são também englobadas pela Fórmula III.

Em uma modalidade de exemplo, o grupo de modificação polimérico tem uma estrutura que inclui uma porção de
5 acordo com as seguintes fórmulas:

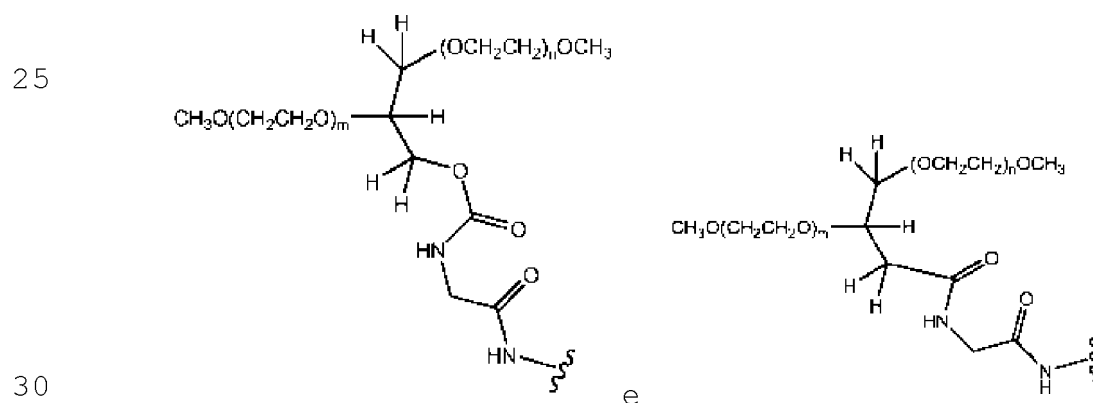


Em outra modalidade de exemplo de acordo com a fórmula acima, o polímero ramificado tem uma estrutura que inclui
15 uma porção de acordo com a seguinte fórmula:



20 Em uma modalidade de exemplo, A¹ e A² são membros independentemente selecionados de -OH e -OCH₃.

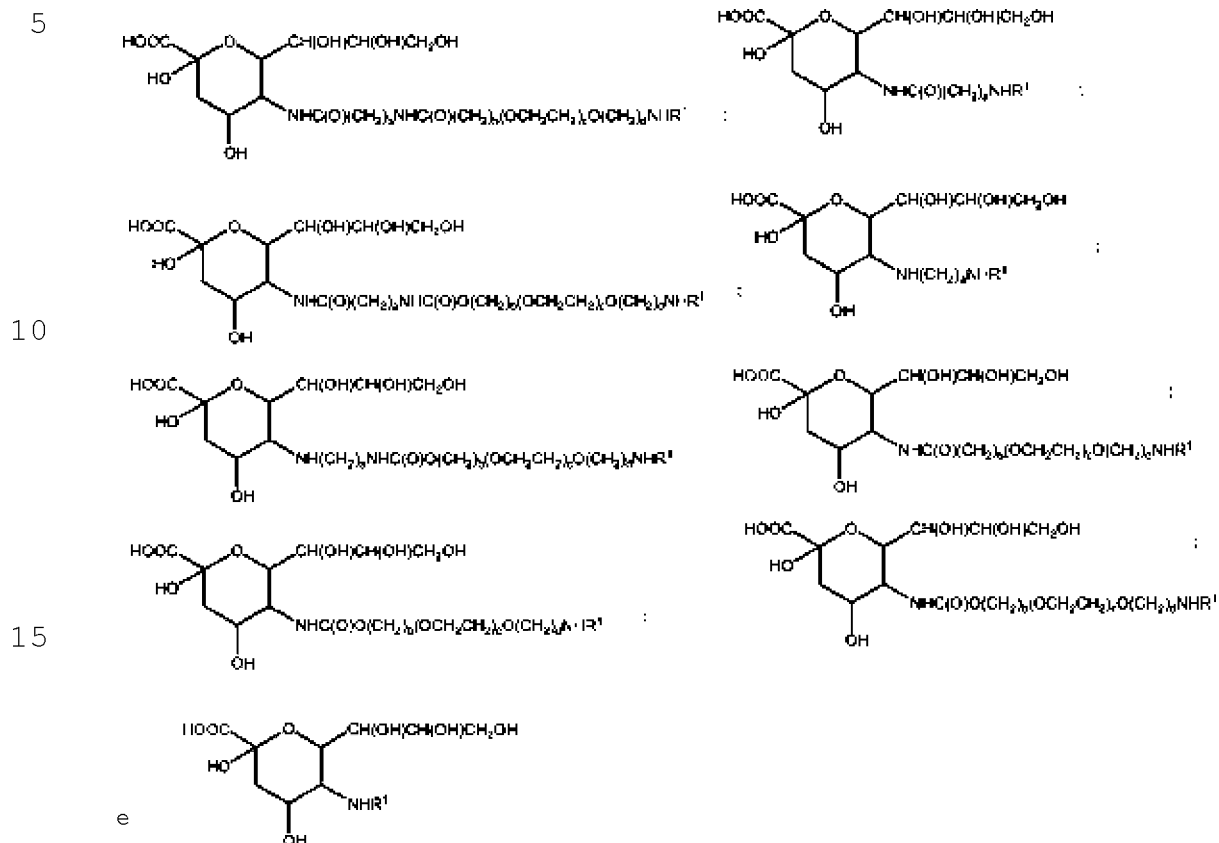
Exemplos de grupos de modificação poliméricos de acordo com essa modalidade incluem a porção:



123/239

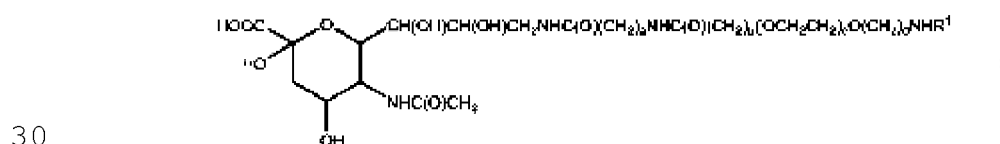
em que as variáveis são como acima descrito.

Em uma modalidade ilustrativa, o açúcar modificado é ácido siálico e compostos de açúcar modificado selecionados de uso na invenção têm as fórmulas:

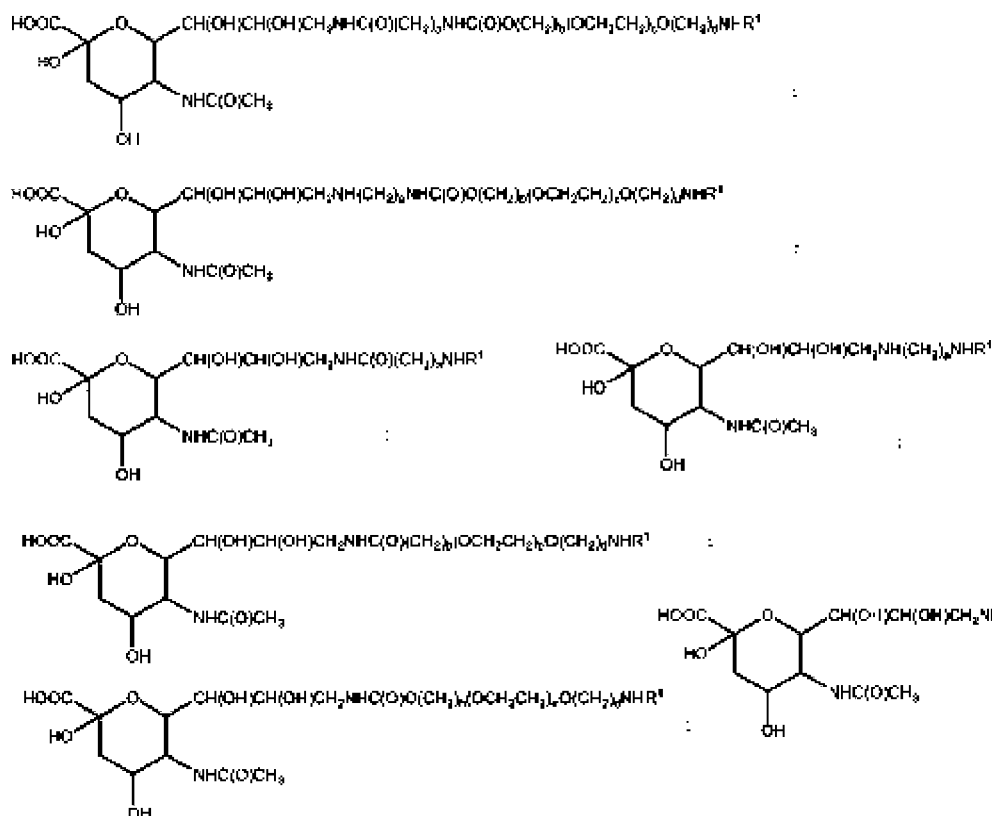


Os índices a, b e d são números inteiros de 0 a 20. O índice c é um número inteiro de 1 a 2.500. As estruturas acima apresentadas podem ser componentes de R¹⁵.

Em outra modalidade ilustrativa, uma porção hidroxil primária do açúcar é funcionalizada com o grupo de modificação. Por exemplo, o 9-hidroxil de ácido siálico pode ser convertido à amina correspondente e funcionalizada para fornecer um composto de acordo com a invenção. Fórmulas de acordo com essa modalidade incluem:



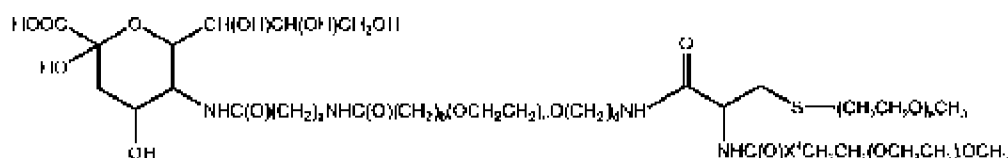
124/239

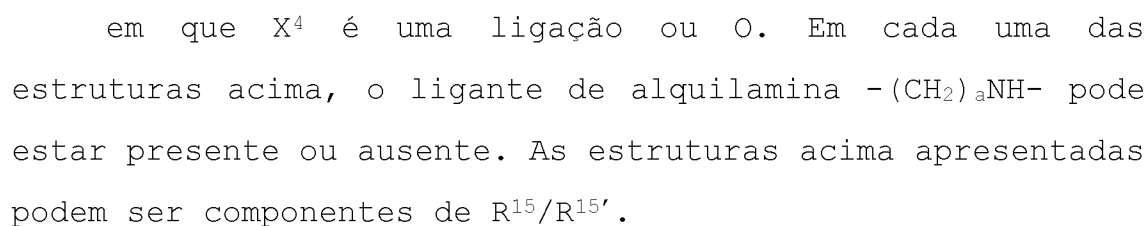


As estruturas acima apresentadas podem ser componentes de R¹⁵.

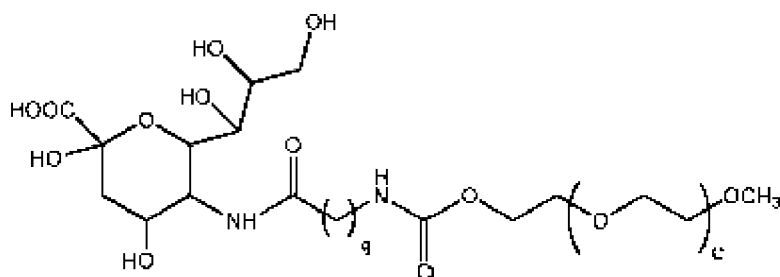
Embora a presente invenção seja exemplificada nas seções anteriores por referência a PEG, como aqueles habilitados perceberão, um arranjo de porções de modificação poliméricas é de uso nos compostos e métodos aqui apresentados.

Em modalidades selecionadas, R¹ ou L-R¹ é um PEG ramificado, por exemplo, uma das espécies acima apresentadas. Em uma modalidade de exemplo, a estrutura de PEG ramificado é baseada em um peptídeo de cisteína. Açúcares modificados ilustrativos de acordo com essa modalidade incluem:





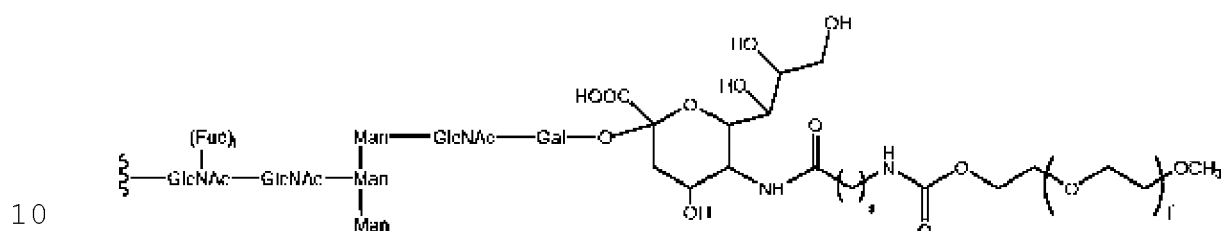
Como aqui discutido, o polímero-ácido siálico modificado de uso na invenção também podem ser estruturas lineares. Portanto, a invenção fornece conjugados que incluem uma porção de ácido siálico derivada da estrutura como:



em que os índices α e e são como acima discutido.

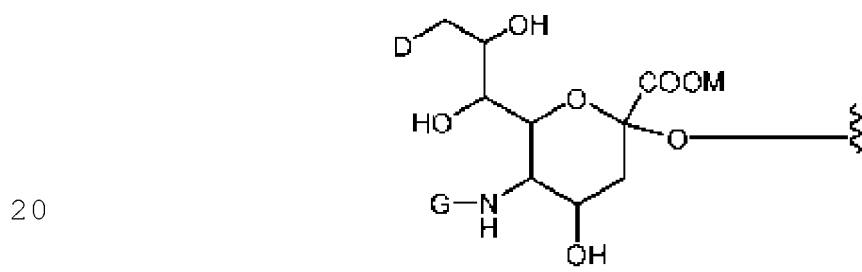
Exemplos de açúcares modificados são modificados com polímeros hidrossolúveis ou insolúveis em água. Exemplos de polímero útil são também exemplificados abaixo.

Em outra modalidade de exemplo, o peptídeo é derivada de células de inseto, remodeladas por adição de GlcNAc e Gal ao núcleo de manose e glicopeguilado com o uso de um ácido que siálico que tem uma porção de PEG linear, gerando um peptídeo que compreende pelo menos uma porção que tem a fórmula:



em que o índice t é um número inteiro de 0 a 1; o índice s representa um número inteiro de 1 a 10; e o índice f representa um número inteiro de 1 a 2.500.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece um conjugado de peptídeo que compreende o grupo de ligação de glicosil a seguir:



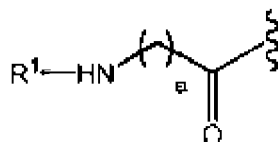
D é um membro selecionado de $-OH$ and $R^1-L-HN-$; G é um membro selecionado de R^1-L- e $-C(O)(C_1-C_6)alquil-R^1$; R^1 é uma porção que compreende um membro selecionado de um resíduo de poli(etileno glicol) de cadeia linear e resíduo de poli(etileno glicol) ramificado; e M é um membro selecionado de H , um contra-íon de sal e uma carga negativa única; L é um ligante que é um membro selecionado de uma ligação, alquil substituído ou não substituído e heteroalquil substituído ou não substituído. Em uma

127/239

modalidade de exemplo, quando D é OH, G é R¹-L-. Em outra modalidade de exemplo, quando G é -C(O)(C₁-C₆)alquil, D é R¹-L-NH-.

Em uma modalidade de exemplo, L-R¹ tem a fórmula:

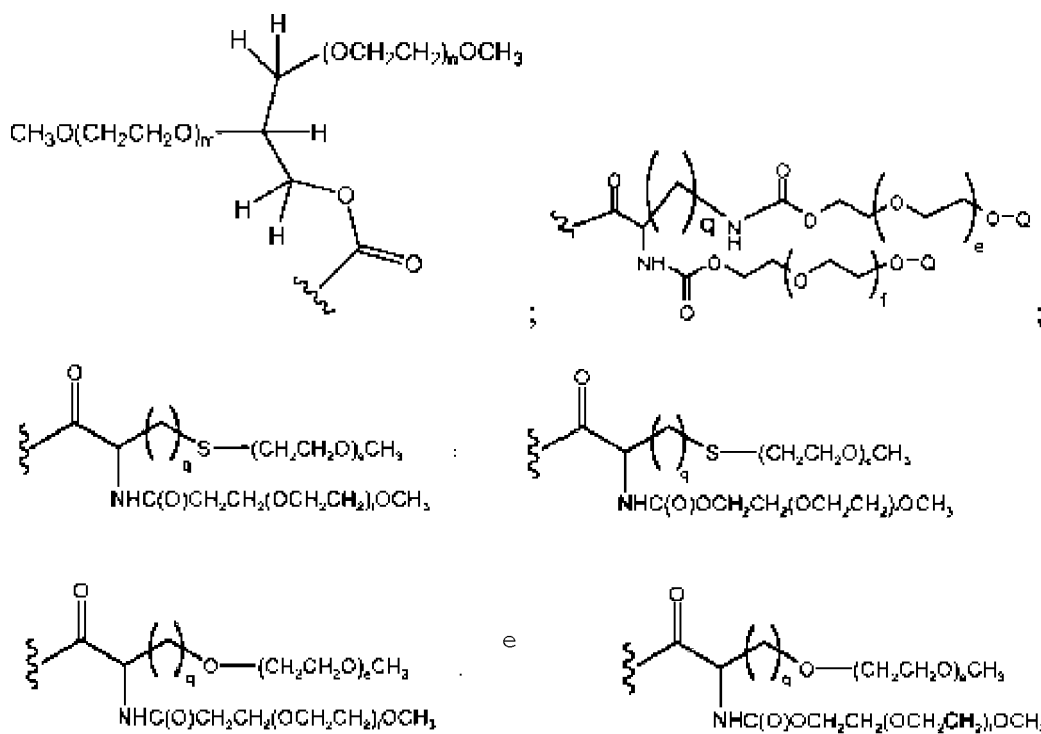
5



em que a é um número inteiro selecionado de 0 a 20.

Em uma modalidade de exemplo, R¹ tem uma estrutura que
10 inclui uma porção selecionada de:

15



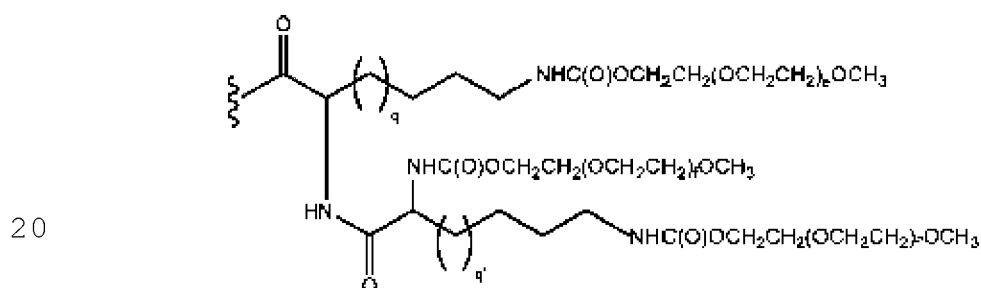
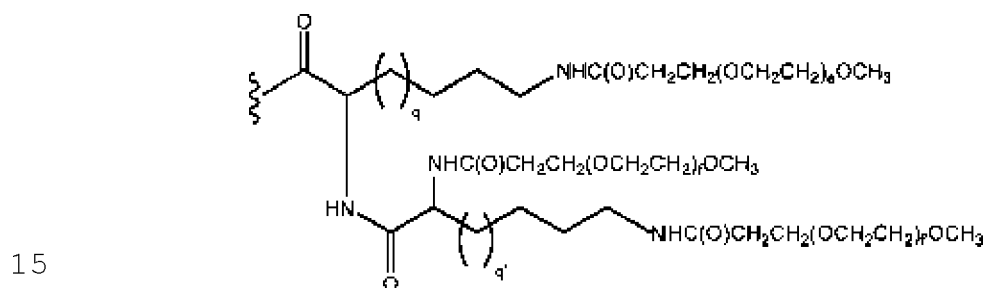
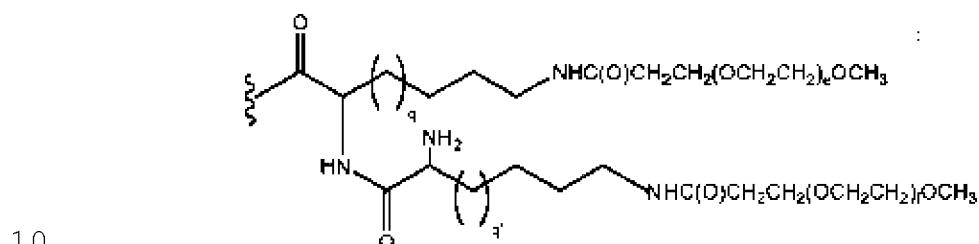
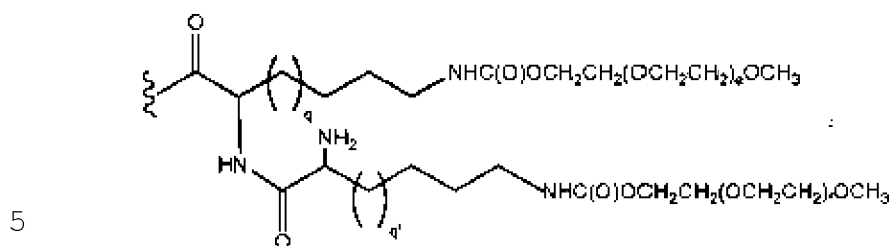
20

25

em que e, f, m e n são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500; e q é um número inteiro selecionado de 0 a 20.

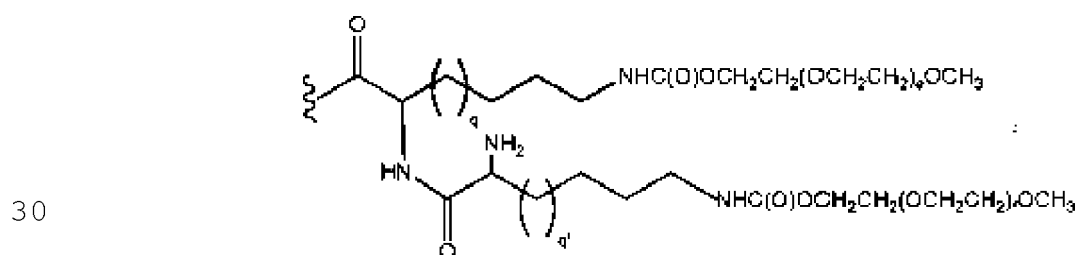
Em uma modalidade de exemplo, R¹ tem uma estrutura que é um membro selecionado de:

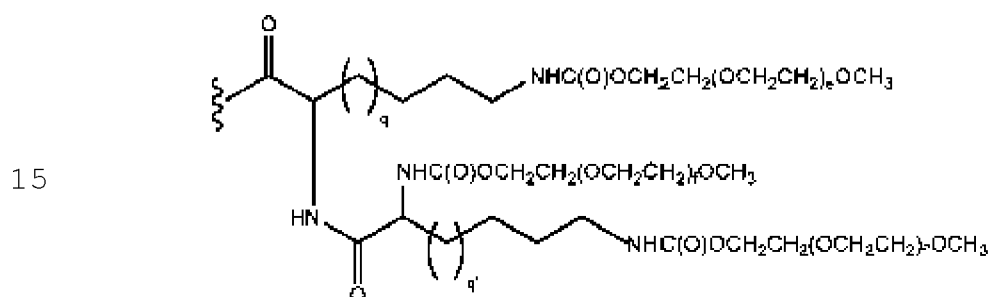
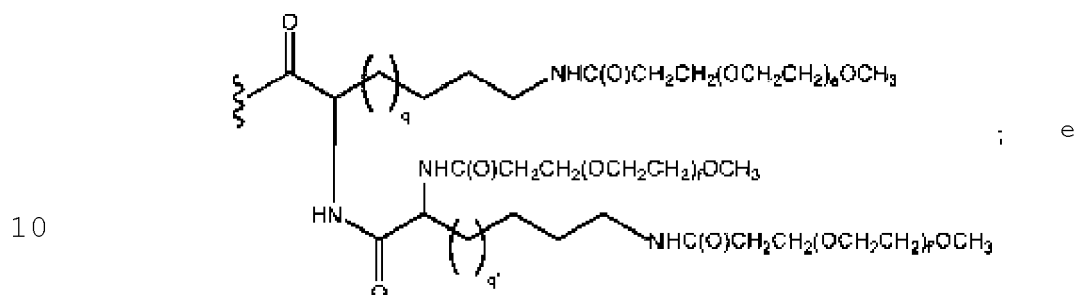
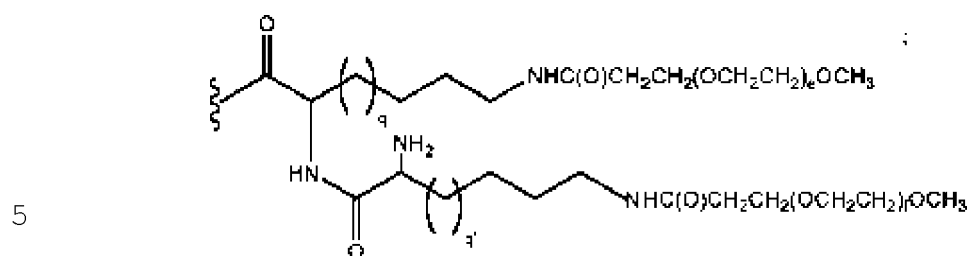
30



em que e , f e f' são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500; e q e q' são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 20.

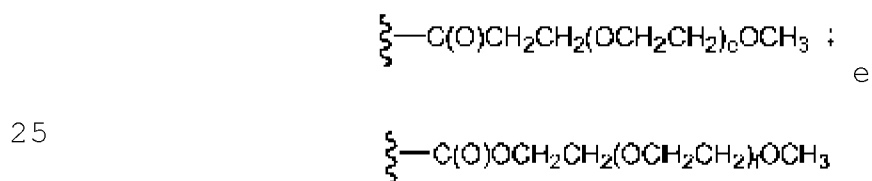
25 Em outra modalidade de exemplo, R^1 tem uma estrutura que é um membro selecionado de:





em que e, f e f' são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500; e q e q' são
20 números inteiros independentemente selecionados de 1 a 20.

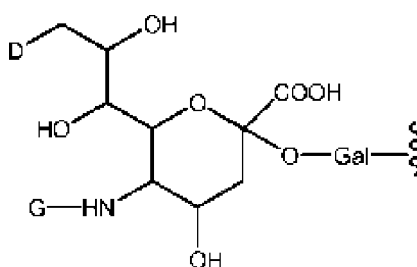
Em outra modalidade de exemplo, R¹ tem uma estrutura que é um membro selecionado de:



em que e e f são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500.

Em outra modalidade de exemplo, o ligante de glicosil
30 tem a fórmula:

130/239

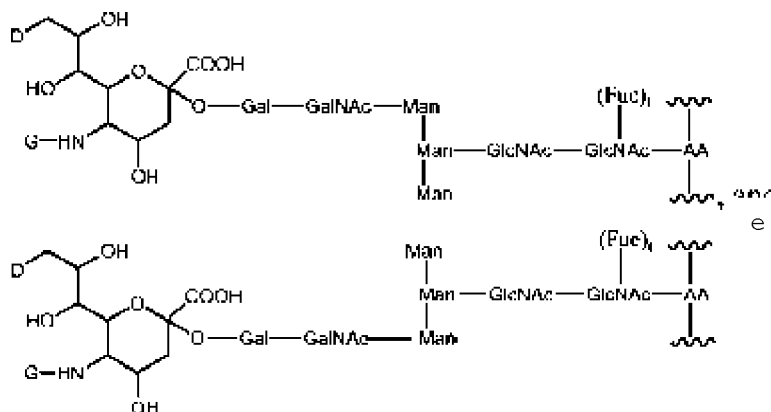


5

em que as variáveis são como acima descrito.

Em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo compreende pelo menos um dos referidos ligantes de glicosil de acordo com a fórmula seleccionada de:

10



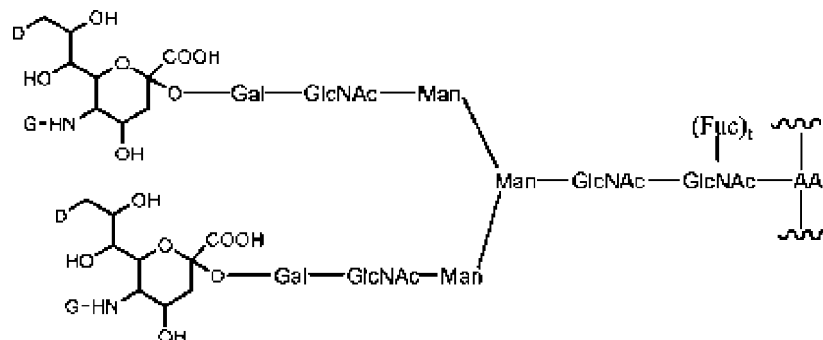
15

em que D e G são como acima descrito, AA é um resíduo de aminoácido do referido conjugado de peptídeo e t é um número inteiro seleccionado de 0 e 1.

20

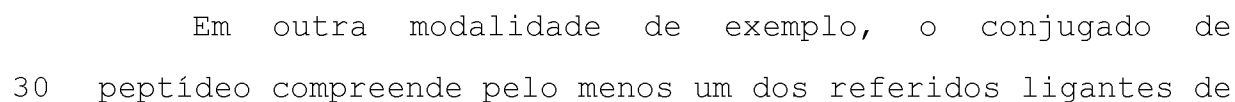
Em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo compreende pelo menos um dos referidos ligantes de glicosil em que cada um dos referidos ligantes de glicosil tem uma estrutura que é um membro independentemente seleccionado das seguintes fórmulas:

25

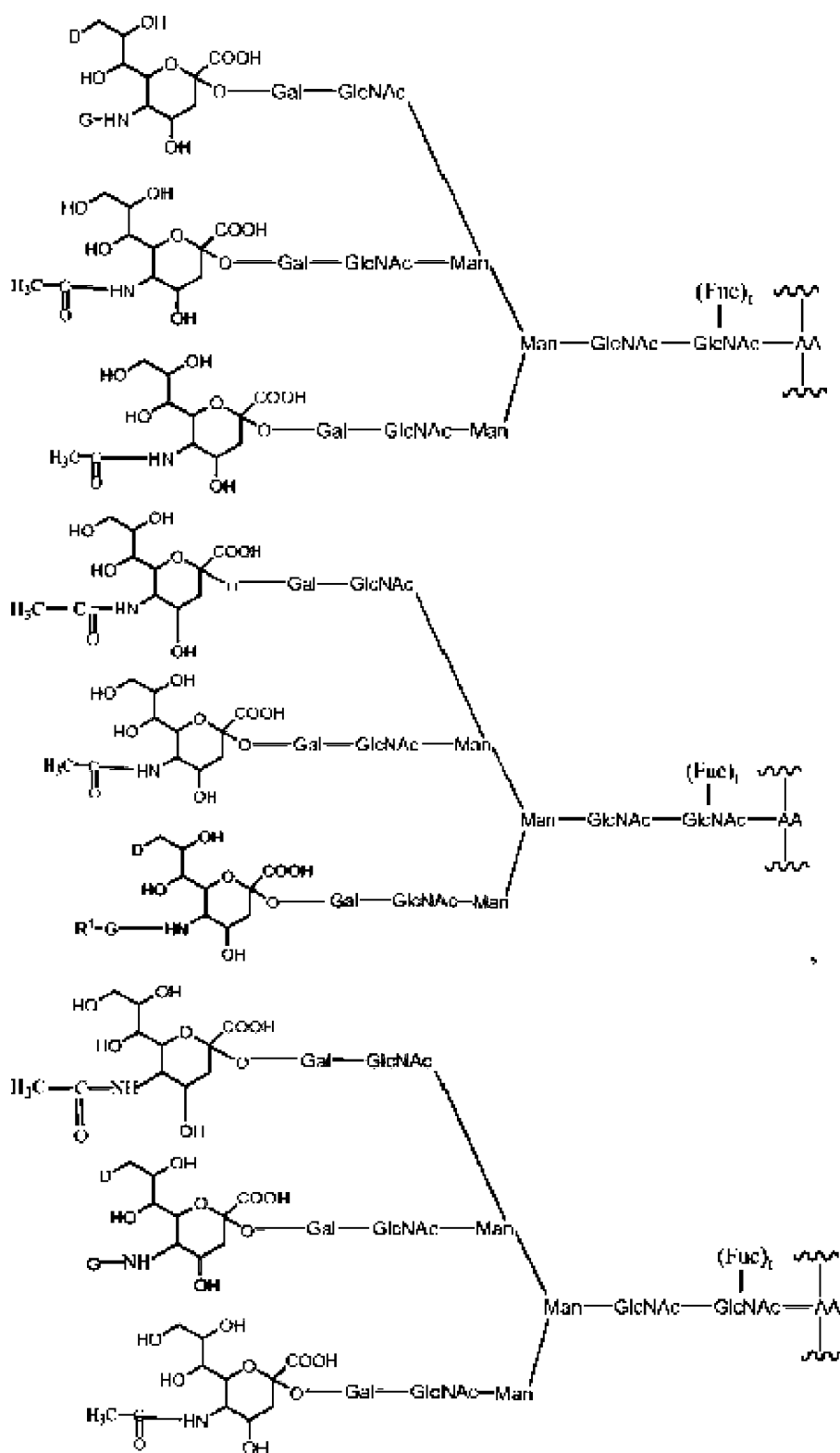


30

;



glicosil de acordo com uma fórmula selecionada de:



133/239

5

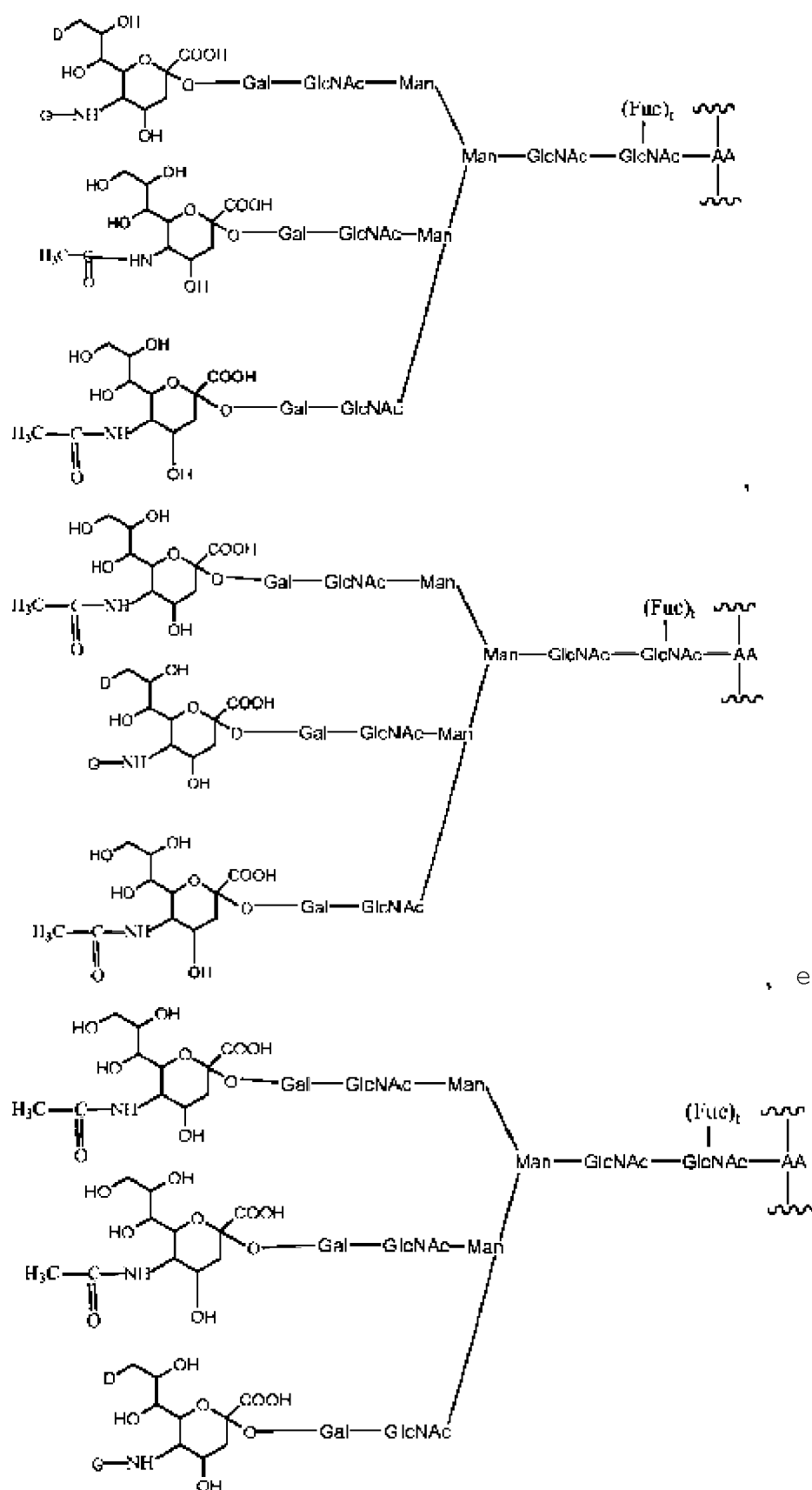
10

15

20

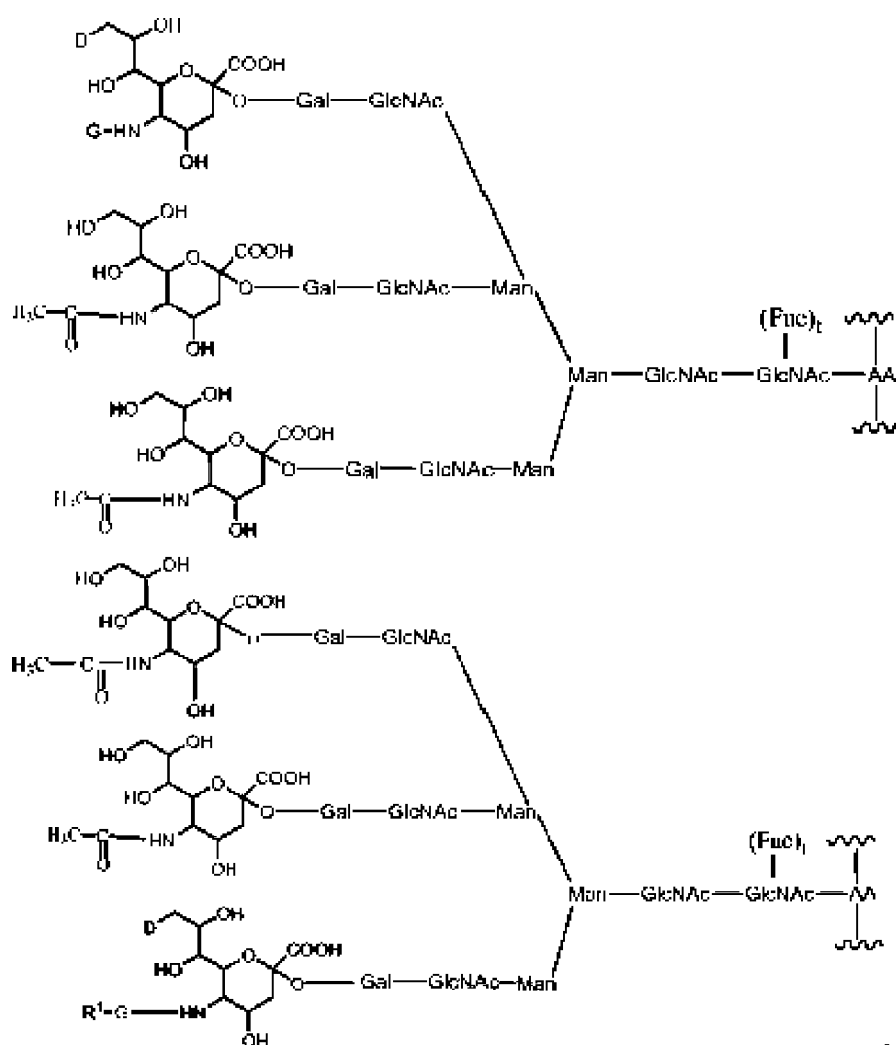
25

30

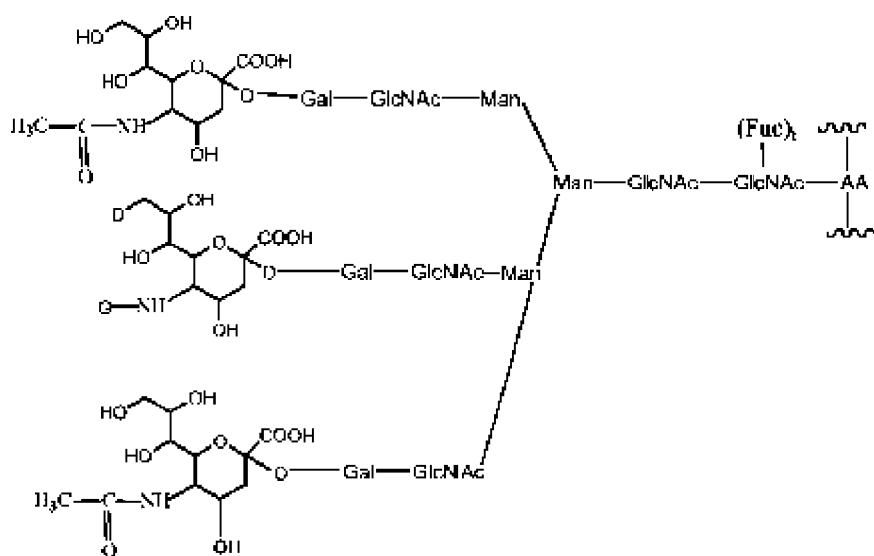
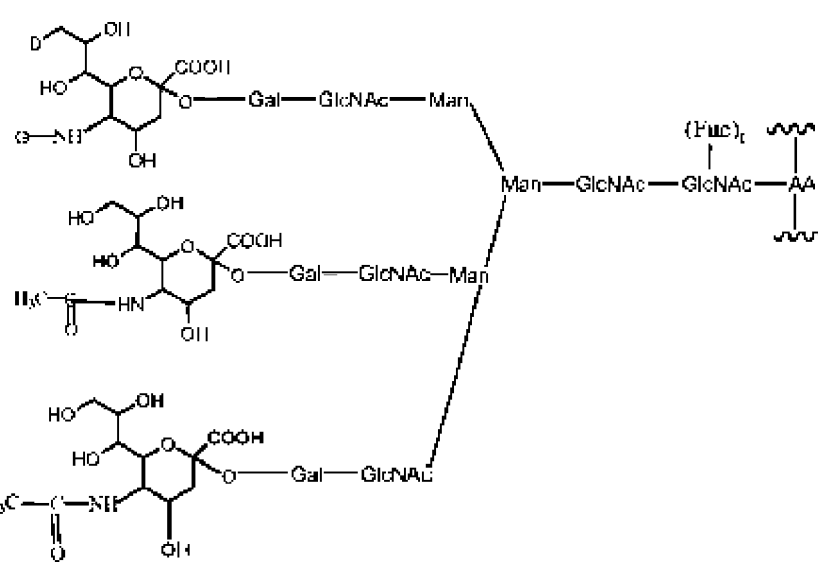
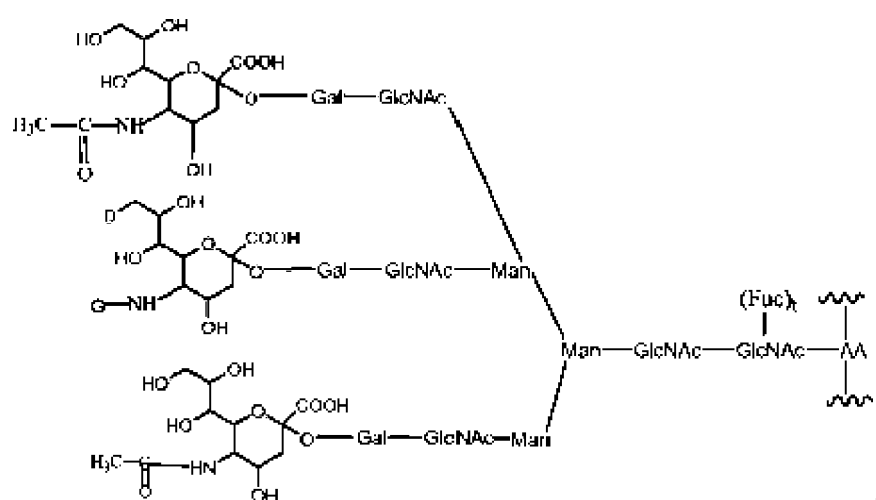


em que D e G são como acima descrito, AA é um resíduo de aminoácido do referido conjugado de peptídeo e t é um número inteiro selecionado de 0 e 1. Em uma modalidade de exemplo, um membro selecionado de 0 e 2 das porções sialil que não compreendem G são ausentes. Em uma modalidade de exemplo, um membro selecionado de 1 e 2 das porções sialil que não compreendem G são ausentes.

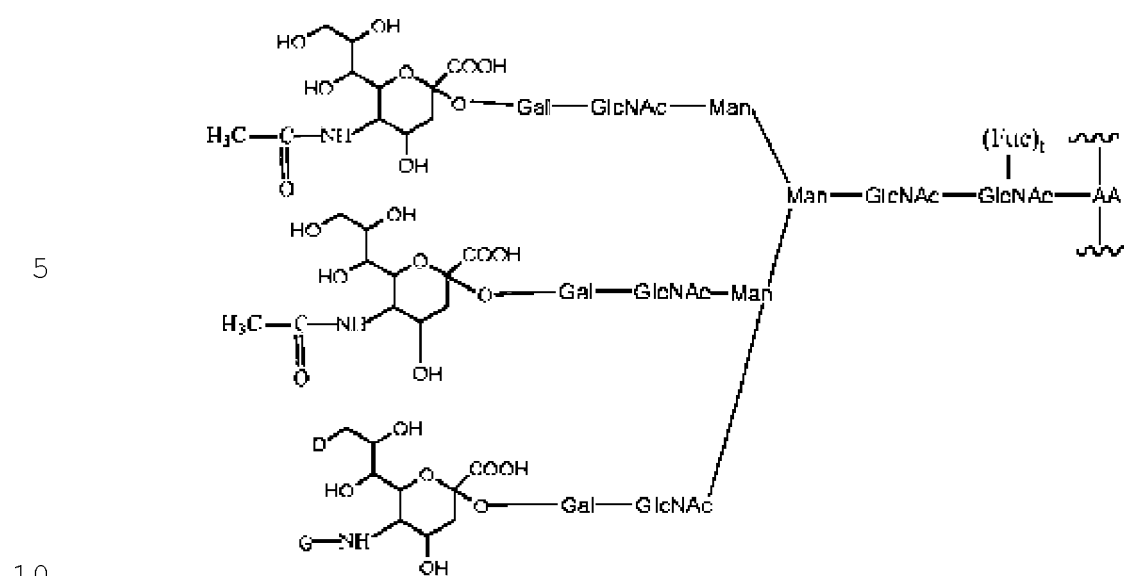
Em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo compreende pelo menos um dos referidos ligantes de glicosil de acordo com a fórmula selecionada de:



135/239

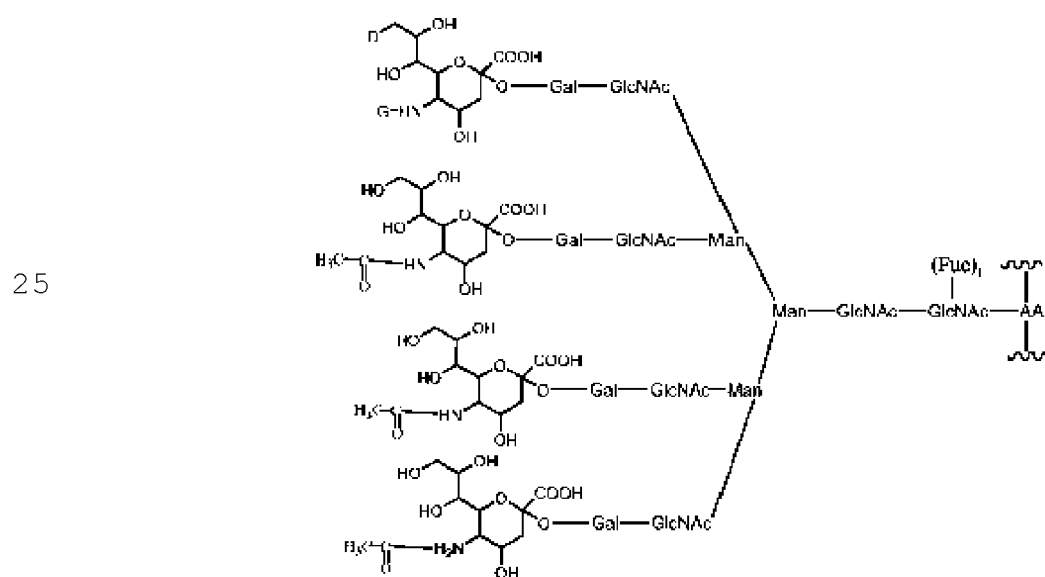


136/239

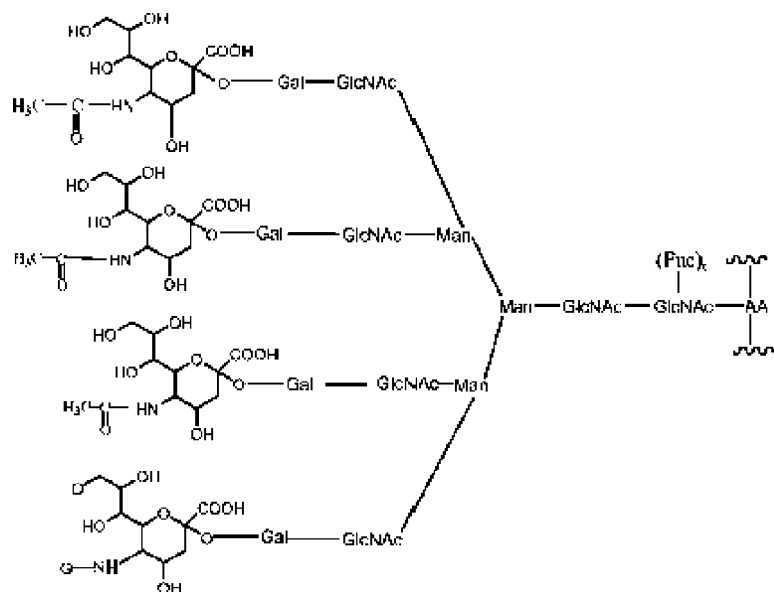
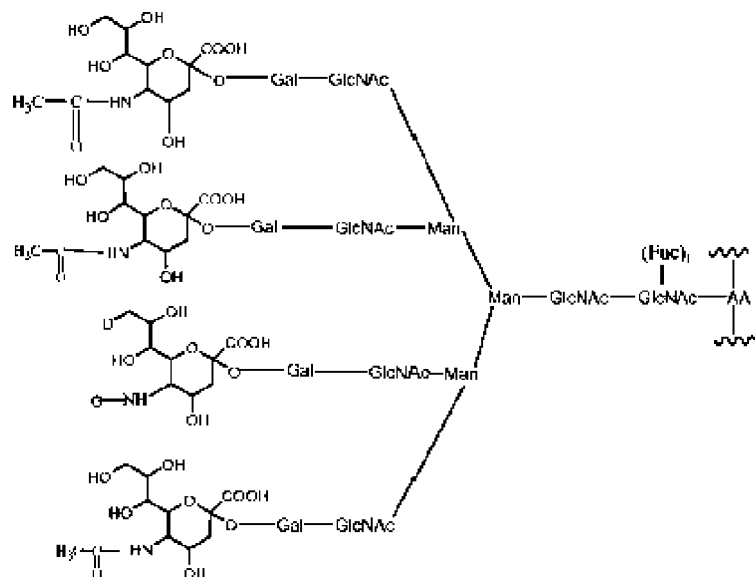
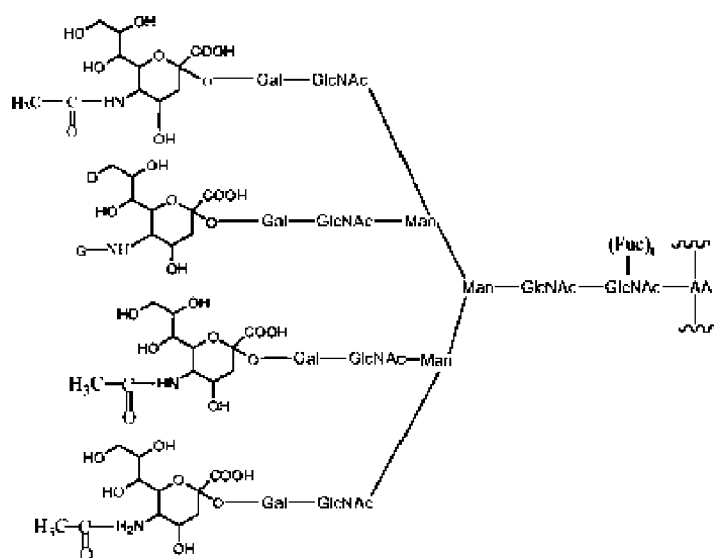


em que D e G são como acima descrito, AA é um resíduo de aminoácido do referido conjugado de peptídeo e t é um número inteiro selecionado de 0 e 1. Em uma modalidade de exemplo, um membro selecionado de 0 e 2 das porções sialil que não compreendem G são ausentes. Em uma modalidade de exemplo, um membro selecionado de 1 e 2 das porções sialil que não compreendem G são ausentes.

Em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo compreende pelo menos um ligante de glicosil de acordo com a fórmula selecionada de:



137/239

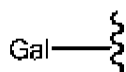


em que D e G são como acima descrito, AA é um resíduo de aminoácido do referido conjugado de peptídeo e t é um número inteiro selecionado de 0 e 1. Em uma modalidade de exemplo, um membro selecionado de 0 e 2 das porções sialil
 5 que não compreendem G são ausentes. Em um exemplo de modalidade, um membro selecionado de 1 e 2 das porções sialil que não compreendem G são ausentes.

Em outra modalidade de exemplo, a invenção fornece um peptídeo que é produzido em um hospedeiro adequado. A
 10 invenção também fornece métodos de expressão desse peptídeo. Em outra modalidade de exemplo, o hospedeiro é um sistema de expressão de mamífero.

Em outra modalidade de exemplo, a invenção fornece um método de tratamento de uma condição em um indivíduo em
 15 necessidade desse, a referida condição caracterizada por potência de coagulação comprometida no referido indivíduo, o referido método compreende a etapa de administração ao indivíduo de uma quantidade do conjugado de peptídeo da invenção, eficaz para melhorar a referida condição no
 20 referido indivíduo. Em outra modalidade de exemplo, o método compreende a administração ao referido mamífero de uma quantidade do conjugado de peptídeo produzido de acordo com os métodos aqui descritos.

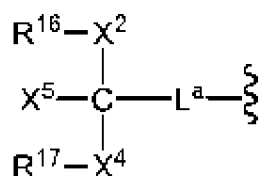
Em outro aspecto, a invenção fornece um método de
 25 confecção de um conjugado de peptídeo que compreende um ligante de glicosil aqui descrito. O método compreende (a) contato de um peptídeo que compreende a porção de glicosil:



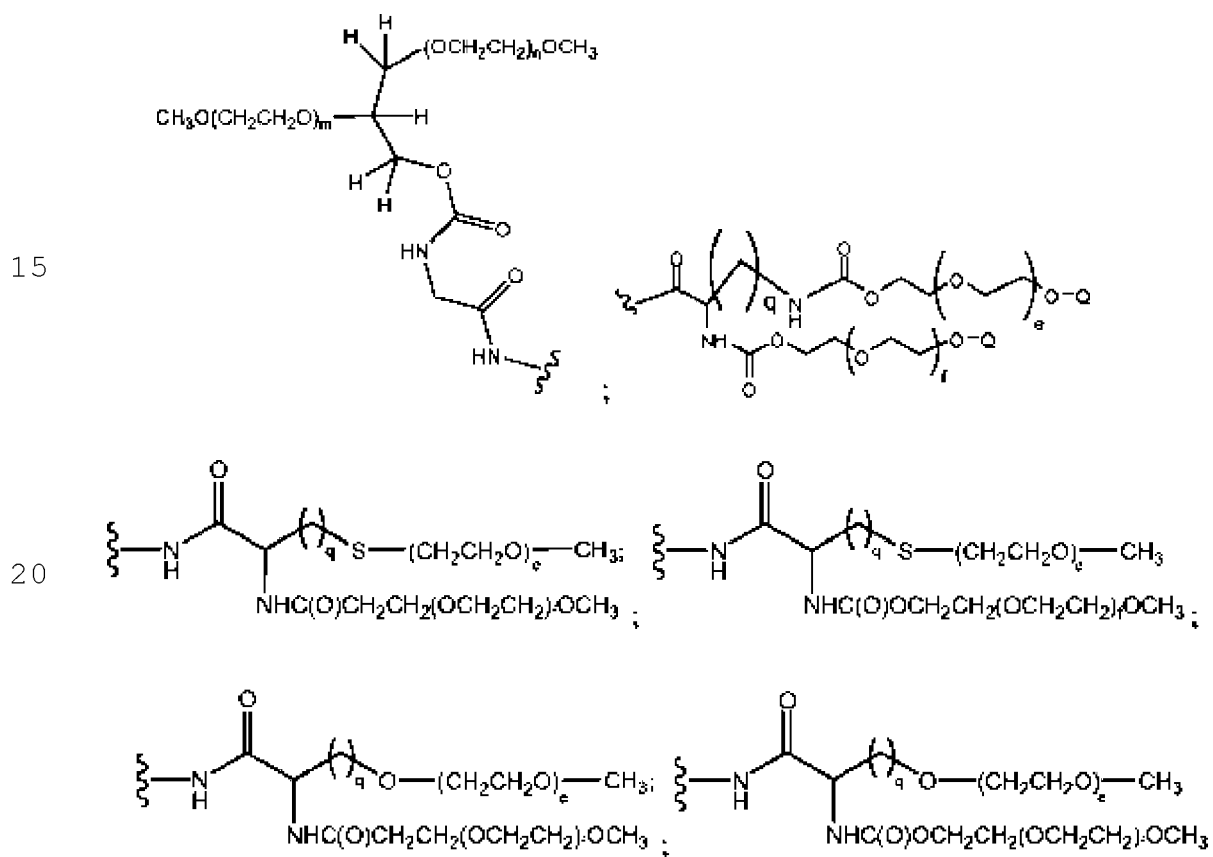
139/239

Com um açúcar de nucleotídeo PEGuilado aqui descrito e uma enzima que transfere o açúcar PEGuilado para Gal da referida porção de glicosil, sob condições adequadas para a referida transferência.

5 Em outra modalidade de exemplo, a porção:



10 tem a fórmula que é um membro selecionado de:

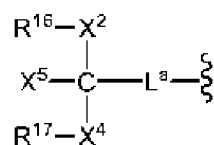


em que e, f, m e n são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500; e q é um número inteiro selecionado de 0 a 20.

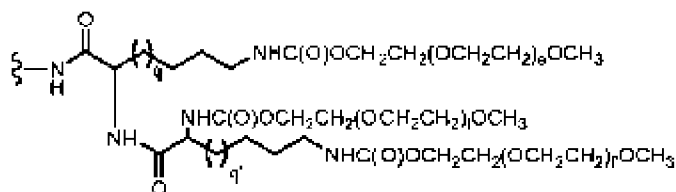
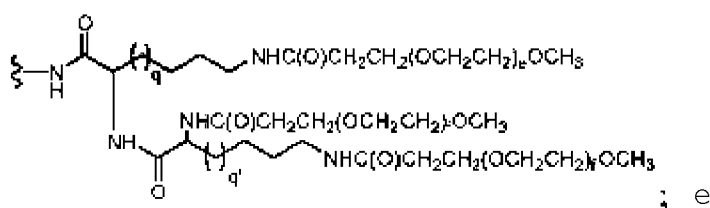
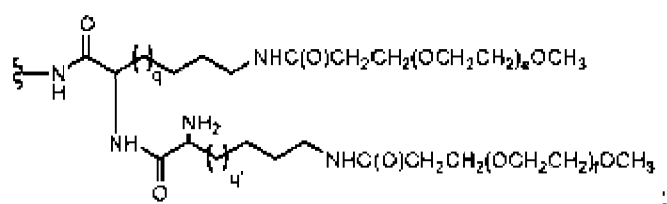
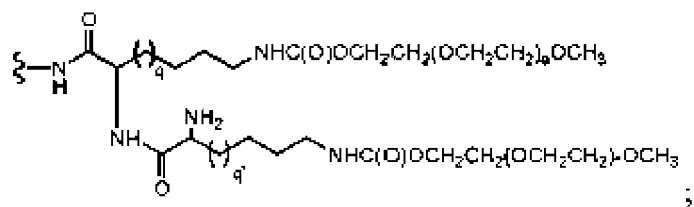
Em outra modalidade de exemplo, a porção:

30

140/239

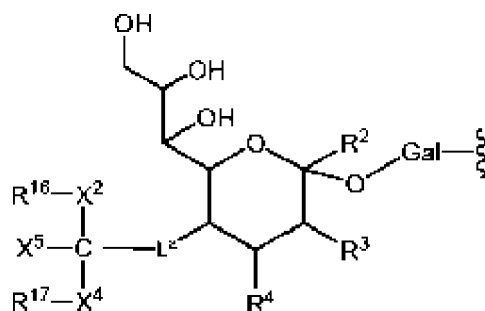


tem a fórmula que é um membro selecionado de:

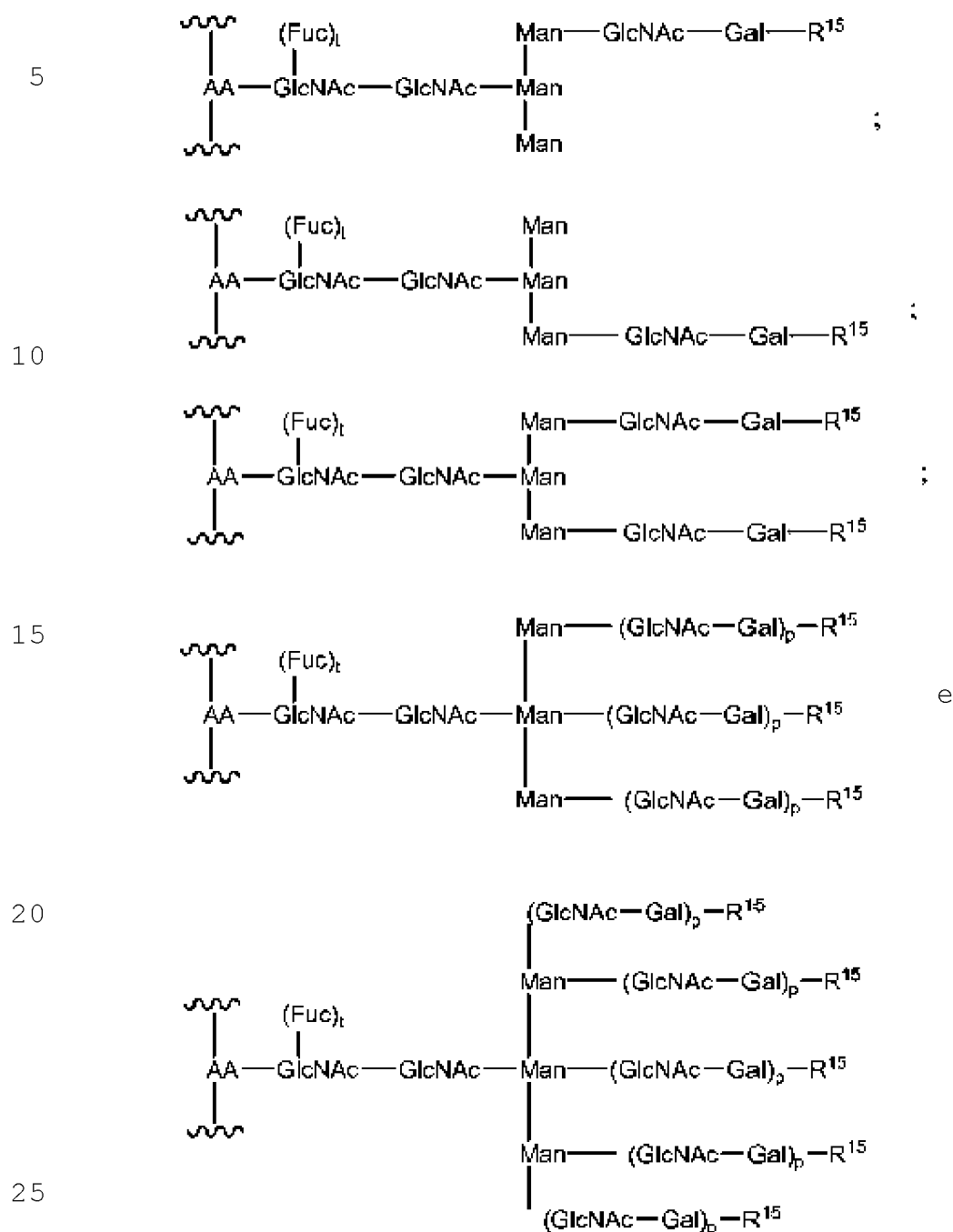


em que e, f e f são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500; e q e q' são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 20.

Em outra modalidade de exemplo, o ligante de glicosil compreende a fórmula:



Em outra modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo compreende pelo menos um ligante de glicosil que tem a fórmula:



em que AA é um resíduo de aminoácido do referido peptídeo; t é um número inteiro selecionado de 0 e 1; e R¹⁵ é a porção de sialil modificada.

Em outra modalidade de exemplo, o método compreende,

antes da etapa (a): (b) expressão do peptídeo em um hospedeiro adequado.

II. D. iv. Polímeros insolúveis em água

Em outra modalidade, análoga àquelas acima discutidas, os açúcares modificados incluem um polímero insolúvel em água, em vez de um polímero hidrossolúvel. Os conjugados da invenção também podem incluir um ou mais polímeros insolúveis em água. Essa modalidade da invenção é ilustrada pelo uso do conjugado como um veículo com o qual há a liberação de um peptídeo terapêutico em uma maneira controlada. Sistemas de liberação de medicamento polimérico são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Dunn e cols., Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Aqueles habilitados na técnica perceberão que substancialmente qualquer sistema de liberação de medicamento conhecido é aplicável aos conjugados da presente invenção.

Os motivos acima para R^1 , $L-R^1$, R^{15} , $R^{15'}$ e outros radicais são igualmente aplicáveis a polímeros insolúveis em água, que podem ser incorporados nas estruturas lineares e ramificadas sem limitação com a utilização de química prontamente acessível para aqueles de habilidade na técnica.

Polímeros insolúveis em água representativos incluem, sem limitação, polifosfazinas, alcoóis poli(vinílicos), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poliacrilamidas, polialquileno glicóis, polialquileno óxidos, polialquileno tereftalatos, polivinil éteres, polivinil ésteres, polivinil haletos, polivinilpirrolidona,

poliglicolídeos, polissiloxanos, poliuretanos, poli(metil metacrilato), poli(etil metacrilato), poli(butil metacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexil metacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), poli(octadecil acrilato) polietileno, polipropileno, poli(etileno glicol), poli(etileno óxido), poli(etileno tereftalato), poli(vinil acetato), cloreto de polivinila, poliestireno, polivinil pirrolidona, plurônicos e polivinilfenol e copolímeros desses.

Polímeros naturais sinteticamente modificados de uso em conjugados da invenção incluem, sem limitação, alquil celulosas, hidroxialquil celulosas, éteres de celulose, ésteres de celulose, e nitrocelulosas. Membros particularmente preferidos das amplas classes de polímeros naturais sinteticamente modificados incluem, sem limitação, metil celulose, etil celulose, hidroxipropil celulose, hidroxipropil metil celulose, hidroxibutil metil celulose, acetato de celulose, propionato de celulose, acetato ftalato de celulose, carboximetil celulose, triacetato de celulose, sal de sódio de sulfato de celulose, e polímeros de ésteres acrílicos e metacrílicos e ácido algínico.

Esses e outros polímeros discutidos nessa podem ser prontamente obtidos a partir de fontes comerciais como Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.), Polisciencas (Warrenton, PA.), Aldrich (Milwaukee, WI.), Fluka (Ronkonkoma, NY), e BioRad (Richmond, CA), ou sintetizados a partir de monômeros obtidos a partir desses fornecedores

com o uso de técnicas padrão.

Polímeros biodegradáveis representativos de uso nos conjugados da invenção incluem, sem limitação, polilactides, poliglicolídeos e copolímeros desses, 5 poli(etileno tereftalato), ácido poli(butírico), ácido poli(valérico), poli(lactide-cocaprolactona), poli(lactide-co-glicolídeo), polianidridos, poliortoésteres, misturas e copolímeros desses. De uso particular são composições que formam géis, como aquelas que incluem colágeno, plurônicos 10 e outros.

Os polímeros de uso na invenção incluem "polímeros híbridos" que incluem materiais insolúveis em água que têm em pelo menos uma porção de sua estrutura, uma molécula bio-reabsorvível. Um exemplo de tal polímero é um que 15 inclui um copolímero insolúvel em água, que uma região bio-reabsorvível, uma região hidrofílica e uma pluralidade de grupos funcionais entrecruzáveis por cadeia de polímero.

Para objetivos da presente invenção, "materiais insolúveis em água" incluem materiais que são 20 substancialmente insolúveis em água ou ambientes que contêm água. Portanto, embora certas regiões ou segmentos do copolímero possam ser hidrofílicas ou mesmo hidrossolúveis, a molécula do polímero, como um todo, não se dissolve em água.

25 Para objetivos da presente invenção, o termo "molécula bio-reabsorvível" inclui uma região que é capaz de ser metabolizada ou quebrada e reabsorvida e/ou eliminada através de vias excretoras normais pelo corpo. Tais metabólitos ou produtos da quebra são preferivelmente 30 substancialmente não tóxicos para o corpo.

A região bio-reabsorvível pode ser hidrofóbica ou hidrofílica, desde que a composição do copolímero como um todo não seja transformada em hidrossolúvel. Assim, a região bio-reabsorvível é selecionada com base na preferência de que o polímero, como um todo, permanece insolúvel em água. Portanto, as propriedades relativas, ou seja, os tipos de grupos funcionais contidos, e as proporções relativas da região bio-reabsorvível, e a região hidrofílica são selecionados para assegurar que composições bio-reabsorvíveis úteis permaneçam insolúveis em água.

Exemplos de polímeros reabsorvíveis incluem, por exemplo, copolímeros em bloco reabsorvíveis sinteticamente produzidos de ácido poli(α -hidroxi-carboxílico)/poli(oxialquilenos), (veja, Cohn e cols., Patente U.S. No. 4.826.945). Esses copolímeros não são entrecruzados e são hidrossolúveis de modo que o corpo pode excretar as composições de copolímero em bloco degradado. Veja, Younes e cols., *J Biomed. Mater. Res.* 21: 1.301-1.316 (1987); e Cohn e cols., *J Biomed. Mater. Res.* 22: 993-1.009 (1988).

Polímeros reabsorvíveis atualmente preferidos incluem um ou mais componentes selecionados de poli(ésteres), ácidos poli(hidroxi), poli(lactonas), poli(amidas), poli(éster amidas), poli(aminoácidos), poli(anidridos), poli(ortoésteres), poli(carbonatos), poli(fosfazinas), poli(fosfoésteres), poli(tioésteres), polissacarídeos e misturas desses. Ainda mais preferivelmente, o polímero bio-reabsorvível inclui um componente de ácido poli(hidroxi). Dos ácidos poli(hidroxi), ácido polilático, ácido poliglicólico, ácido policapróico, ácido polibutírico, ácido polivalérico e copolímeros e misturas

desses são preferidos.

Além da formação de fragmentos que são absorvidos *in vivo* ("bio-reabsorvíveis"), revestimentos poliméricos preferidos para uso nos métodos da invenção também podem
5 formar um fragmento excretável e/ou metabolizável.

Copolímeros de ordem superior também podem ser usados na presente invenção. Por exemplo, Casey e cols., Patente U.S. No. 4.438.253, emitida em 20 de março de 1984, revela copolímeros em tri-bloco produzidos a partir da
10 transesterificação de ácido poli(glicólico) e um poli(alquilenoglicol) de extremidade hidroxil. Tais composições são reveladas para uso como suturas de monofilamento reabsorvíveis. A flexibilidade de tais composições é controlada pela incorporação de um
15 ortocarbonato aromático, como tetra-p-tolil ortocarbonato na estrutura do copolímero.

Outros polímeros com base em ácido láctico e/ou glicólico também podem ser utilizados. Por exemplo, Spinu, Patente U.S. No. 5.202.413, emitida em 13 de abril de 1993,
20 revela copolímeros em multi-bloco biodegradável que têm blocos em ordem seqüencial de polilactide e/ou poliglicolídeo produzidos por polimerização de abertura de anel do lactide e/ou glicolídeo em um diol oligomérico ou um resíduo de diamina seguido por extensão de cadeia com um
25 composto di-funcional, como, um diisocianato, diacilcloreto ou diclorossilano.

Regiões bio-reabsorvíveis de revestimentos úteis na presente invenção podem ser designadas para serem hidroliticamente e/ou enzimaticamente cliváveis. Para
30 objetivos da presente invenção, "hidroliticamente clivável"

refere-se à suscetibilidade do copolímero, especialmente a região bio-reabsorvível, à hidrólise em água ou um ambiente que contém água. De modo similar, "enzimaticamente clivável" como aqui usado refere-se à susceptibilidade do
5 copolímero, especialmente a região bio-reabsorvível, à clivagem por enzimas endógena ou exógena.

Quando colocada no corpo, a região hidrofílica pode ser processada em fragmentos excretáveis e/ou metabolizáveis. Portanto, a região hidrofílica pode
10 incluir, por exemplo, poliéteres, polialquileno óxidos, polióis, poli(vinil pirrolidina), álcool poli(vinílico), poli(alquil oxazolinás), polissacarídeos, carboidratos, peptídeos, proteínas e copolímeros e misturas desses. Além disso, a região hidrofílica também pode ser, por exemplo, a
15 óxido de poli(alquilenos). Tais óxidos de poli(alquilenos) podem incluir, por exemplo, óxido de poli(etileno), óxido de poli(propileno) e misturas e copolímeros desses.

Polímeros que são componentes de hidrogéis são também úteis na presente invenção. Hidrogéis são materiais
20 poliméricos que são capazes de absorver quantidades relativamente grandes de água. Exemplos de compostos que formam hidrogel incluem, sem limitação, ácidos poliacrílicos, sódio carboximetilcelulose, álcool polivinílico, polivinil pirrolidina, gelatina, carragenana
25 e outros polissacarídeos, ácido hidroxietilenometacrílico (HEMA), bem como derivados desses, e outros. Podem ser produzidos hidrogéis que são estáveis, biodegradáveis e bio-reabsorvíveis. Além disso, composições de hidrogel podem incluir subunidades que exibem uma ou mais dessas
30 propriedades.

Composições bio-compatíveis de hidrogel cujas integridades podem ser controladas através de entrecruzamento são conhecidas e são atualmente preferidas para uso nos métodos da invenção. Por exemplo, Hubbell e cols., Patente U.S. Nos. 5.410.016, emitida em 25 de abril de 1995 e 5.529.914, emitida em 25 de junho de 1996, revelam sistemas hidrossolúveis, que são copolímeros em bloco entrecruzados que têm um segmento em bloco central hidrossolúvel entre duas extensões hidroliticamente instáveis. Tais copolímeros são também *end-capped* com funcionalidades de acrilato fotopolimerizável. Quando entrecruzados, esses sistemas tornam-se hidrogéis. O bloco central hidrossolúvel de tais copolímeros pode incluir poli(etileno glicol); enquanto as extensões hidroliticamente instáveis podem ser um ácido poli(α -hidroxi), como ácido poliglicólico ou ácido polilático. Veja, Sawhney e cols., *Macromolecules* 26: 581-587 (1993).

Em outra modalidade preferida, o gel é um gel termo-reversível. Géis termo-reversíveis que incluem componentes como plurônicos, colágeno, gelatina, ácido hialurônico, polissacarídeos, poliuretano hidrogel, poliuretano-uréia hidrogel e combinações desses são atualmente preferidos.

Ainda em outros exemplos de modalidade, o conjugado da invenção inclui um componente de um lipossomo. Lipossomos podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica, por exemplo, como descrito em Eppstein e cols., Patente U.S. No. 4.522.811. Por exemplo, formulações em lipossomo podem ser preparadas por dissolução de lipídeos adequados (como estearoil fosfatidil etanolamina, estearoil fosfatidil colina, aracadoil

fosfatidil colina, e colesterol) em um solvente inorgânico que é então evaporado, deixando para trás uma fina película de lipídeo seco na superfície do recipiente. Uma solução aquosa do composto ativo ou seu sal farmaceuticamente
5 aceitável é então introduzida no recipiente. O recipiente é então agitado à mão para liberar material lipídico das laterais do recipiente e para to dispersar agregados lipídicos, assim formando a suspensão lipossômica.

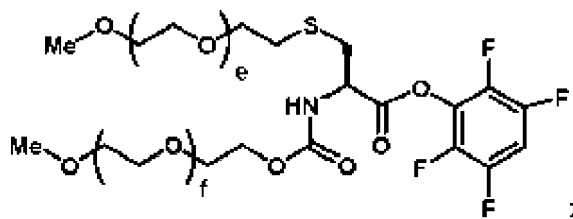
As micropartículas acima citadas e métodos de
10 preparação das micropartículas são oferecidos por via de exemplo e eles não devem definir o escopo das micropartículas de uso na presente invenção. Será aparente para aqueles habilitados na técnica que um arranjo de micropartículas, fabricadas por diferentes métodos, é de
15 uso na presente invenção.

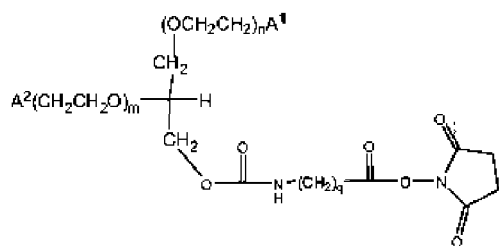
Os formatos estruturais acima discutidos no contexto dos polímeros hidrossolúveis, de cadeia linear e ramificada são geralmente aplicáveis com relação a polímeros insolúveis em água também. Portanto, por exemplo, os
20 núcleos de ramificação de cisteína, serina, dilisina, e trilisina podem ser funcionalizados com duas porções de polímero insolúvel em água. Os métodos usados para produzir essas espécies são geralmente intimamente análogos àqueles usados para produzir os polímeros hidrossolúveis.

25 **II. D. v. Métodos de produção de grupos de modificação poliméricos**

Os grupos de modificação poliméricos podem ser ativados por reação com uma porção glicosil ou sacaril ou uma porção de aminoácido. Exemplos de estruturas de
30 espécies ativadas (por exemplo, carbonatos e ésteres

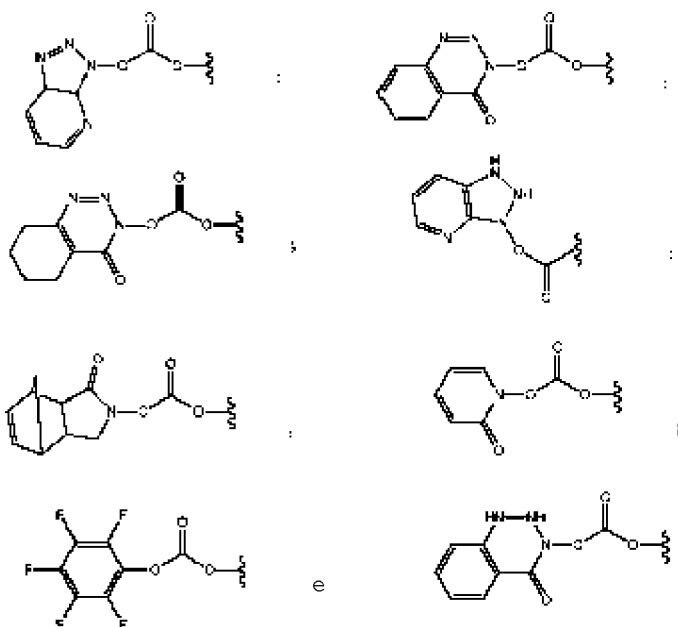
5

COC(=O)c1ccc(cc1)C(C)(COCCO)nCOCCOC[illegible]
$$\begin{array}{c}
 \text{(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{A}^1 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{A}^2\text{(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{---C---H} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{L}^a\text{---O---(CH}_2\text{)}_q\text{---C(=O)---O---N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}
 \end{array}$$
$$\begin{array}{c}
 \text{(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{A}^1 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{A}^2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{---C---H} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{O---(CH}_2\text{)}_q\text{---C(=O)O---N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}
 \end{array}$$



5

Na figura acima, q é um membro selecionado de 1-40. outros grupos de ativação, ou de partida, adequados para ativação de PEGs lineares e ramificados de uso na preparação dos compostos aqui apresentados incluem, sem
10 limitação as espécies:



15

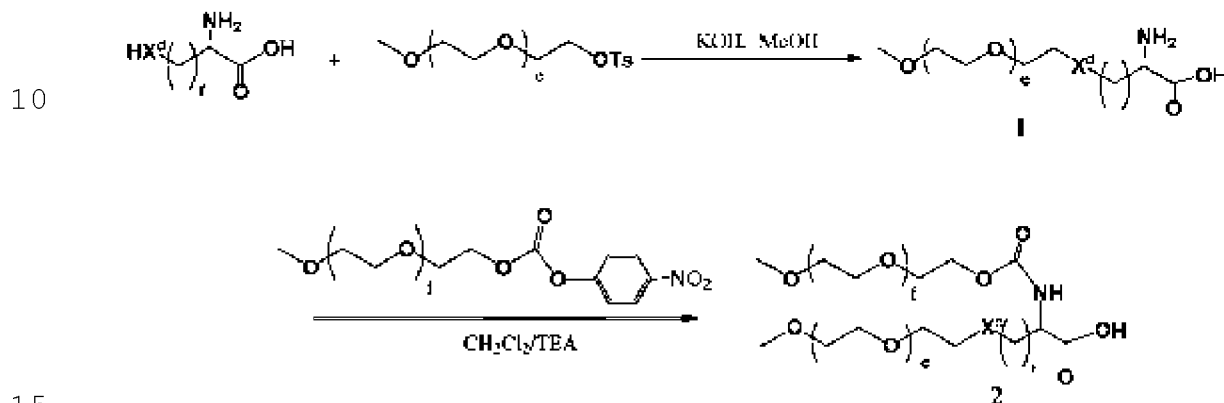
20

moléculas de PEG que são ativadas com essas e outras espécies e métodos de fazer os PEGs ativados são apresentadas em WO 04/083259.

25 Aqueles habilitados na técnica perceberão que um ou mais dos braços de m-PEG do polímero ramificados acima mostrado podem ser substituídos por uma porção PEG com um terminal diferente, por exemplo, OH, COOH, NH₂, C₂-C₁₀-alquil etc. Além disso, as estruturas acima são prontamente
30 modificadas por inserção de ligantes de alquil (ou remoção

de átomos de carbono) entre o átomo de α -carbono e o grupo funcional da cadeia lateral do aminoácido. Assim, derivados "homo" e homólogos superiores, bem como homólogos inferiores estão dentro do escopo de núcleos para PEGs ramificados de uso na presente invenção.

As espécies de PEG ramificado aqui apresentadas são facilmente preparadas por métodos como aquele apresentado no esquema abaixo:



em que X^d é O ou S e r é um número inteiro de 1 a 5. Os índices e e f são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500. Em uma modalidade de exemplo, um ou ambos desses índices são selecionados de modo que o polímero tem cerca de 5 kD, 10 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 35 kD, ou 40 kD de peso molecular. PEG de um maior peso molecular também pode ser usado na presente invenção, incluindo até cerca de 200 kD, como pelo menos cerca de 180 kD, cerca de 160 kD, cerca de 140 kD, cerca de 120 kD, cerca de 100 kD, cerca de 90 kD, cerca de 80 kD, e cerca de 70 kD. Em certas modalidades o peso molecular de PEG é cerca de 80 kD. Em outras modalidades, o peso molecular de PEG é pelo menos cerca de 200 kD, pelo menos cerca de 180 kD, pelo menos cerca de 160 kD, ou pelo menos cerca de 140 kD.

30

Portanto, de acordo com esse esquema, um aminoácido natural ou não natural faz contato com um derivado ativado de m-PEG, no caso do tosilato, formando **1** por alquilação do heteroátomo de cadeia lateral X^d. O aminoácido m-PEG mono-

5 funcionalizado é submetido a condições de N-acilação com um derivado reativo de m-PEG, assim montando um m-PEG ramificado **2**. Como uma pessoa habilitada perceberá, o grupo de partida de tosilato pode ser substituído com qualquer grupo de partida adequado, por exemplo, halogênio,

10 mesilato, triflato etc. De modo similar, o carbonato reativo utilizados para acilar a amina pode ser substituído com um éster ativo, por exemplo, N-hidroxissuccinimida etc., ou o ácido pode ser ativado *in situ* com o uso de um agente de desidratação como diciclohexilcarbodiimida,

15 carbonildiimidazol etc.

Em outros exemplos de modalidades, a porção de uréia é substituída por um grupo como amida.

II. E. Composições de matéria de conjugado de peptídeo homodisperso

20 Além de fornecer conjugados de peptídeo que são formados através de um grupo de ligação de glicosil quimicamente ou enzimaticamente adicionado, a presente invenção fornece composições de matéria que compreendem conjugados de peptídeo que são altamente homogenos em seus

25 padrões de substituição. Com o uso dos métodos da invenção, é possível formar conjugados de peptídeo em que uma proporção substancial dos grupos de ligação de glicosil e porções glicosil por uma população de conjugados de peptídeo é anexada a um aminoácido estruturalmente idêntico

30 ou resíduo de glicosil. Portanto, em um segundo aspecto, a

invenção fornece um conjugado de peptídeo que tem uma população de porções de polímero hidrossolúvel, que são covalentemente ligadas ao peptídeo através de um grupo de ligação de glicosil, por exemplo, um grupo de ligação de glicosil intacto. Em um exemplo de conjugado de peptídeo da invenção, essencialmente cada membro da população de polímero hidrossolúvel é ligado por meio do grupo de ligação de glicosil a um resíduo de glicosil do peptídeo, e cada resíduo de glicosil do peptídeo ao qual o grupo de ligação de glicosil é anexado tem a mesma estrutura.

A presente invenção também fornece conjugados análogos àqueles descritos acima em que o peptídeo é conjugado a um grupo de modificação, por exemplo, porção terapêutica, porção diagnóstica, porção de direcionamento, porção de toxina ou outras por meio de um grupo de ligação de glicosil. Cada um dos grupos de modificação acima citados pode ser uma molécula pequena, polímero natural (por exemplo, polipeptídeo) ou polímero sintético. Quando o grupo de modificação é anexado a um ácido siálico, é geralmente preferível que o grupo de modificação seja substancialmente não fluorescente.

Em uma modalidade de exemplo, o peptídeo da invenção inclui pelo menos um sítio de glicosilação ligado em O ou ligado em N, que é glicosilado com um açúcar modificado que inclui um grupo de modificação polimérico, por exemplo, uma porção PEG. Em uma modalidade de exemplo, o PEG é covalentemente ligado ao peptídeo por meio de um grupo de ligação de glicosil intacto, ou por meio de um ligante não glicosil, por exemplo, alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído. O

grupo de ligação de glicosil é covalentemente ligado a um resíduo de aminoácido ou um resíduo de glicosil do peptídeo. Alternativamente, o grupo de ligação de glicosil é anexado a uma ou mais unidades de glicosil de um glicopeptídeo. A invenção também fornece conjugados em que um grupo de ligação de glicosil é anexado a um resíduo de aminoácido e a um resíduo de glicosil.

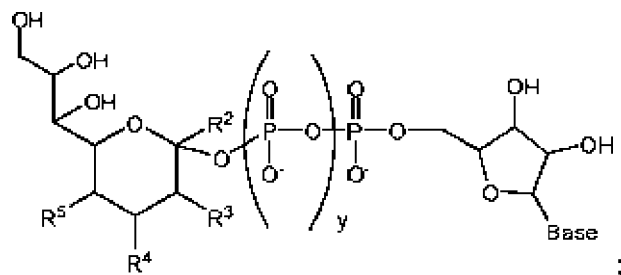
Os glicanos nos peptídeos da invenção geralmente correspondem àqueles encontrados em um peptídeo que é produzido por células de mamífero (BHK, CHO) ou células de inseto (por exemplo, Sf-9), após remodelagem de acordo com os métodos aqui apresentados. Por exemplo, peptídeo derivado de inseto que é expresso com um núcleo de tri-manosil faz contato subsequente com um doador de GlcNAc e uma GlcNAc transferase e um doador de Gal e uma Gal transferase. A anexação de GlcNAc e Gal ao núcleo de tri-manosil é realizada em duas etapas ou em etapa única. Um ácido siálico modificado é adicionado a pelo menos um ramo de uma porção de glicosil como aqui discutido. Aquelas porções Gal que não são funcionalizadas com o ácido siálico modificado são opcionalmente "*capped*" por reação com um doador de ácido siálico na presença de uma sialil transferase.

Em uma modalidade de exemplo, pelo menos 60% das porções Gal terminais em uma população de peptídeos são *capped* com ácido siálico, preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente, pelo menos 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90% e ainda mais preferivelmente pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% são *capped* com ácido siálico.

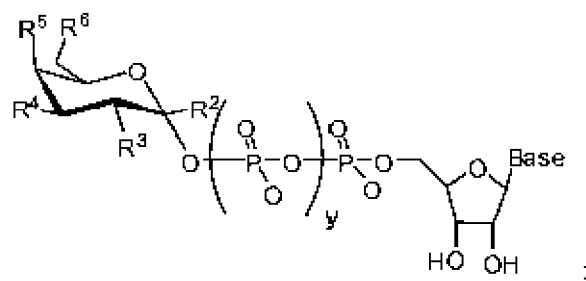
II. F. Açúcares de nucleotídeo

Em outro aspecto da invenção, a invenção também fornece nucleotídeos de açúcar. Exemplos de espécies de acordo com essa modalidade incluem:

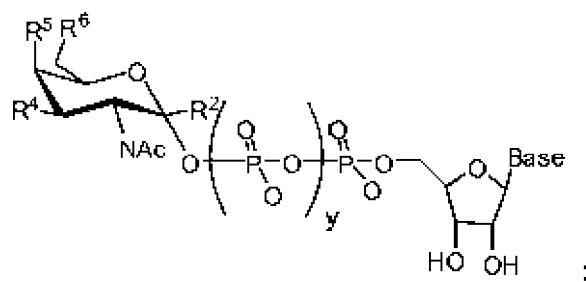
5



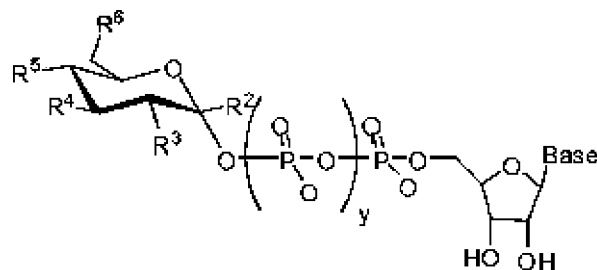
10



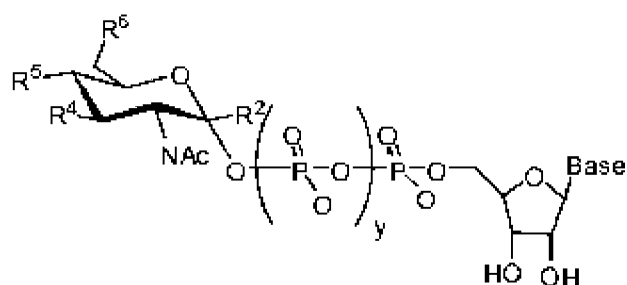
15



20

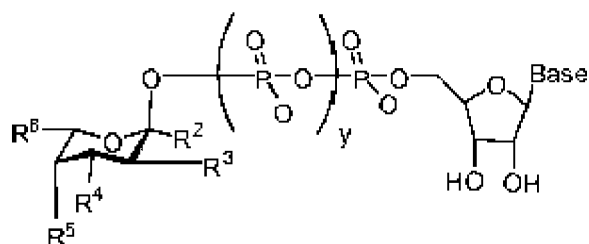
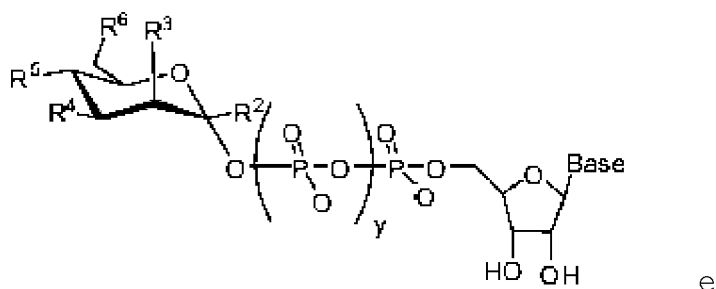


25

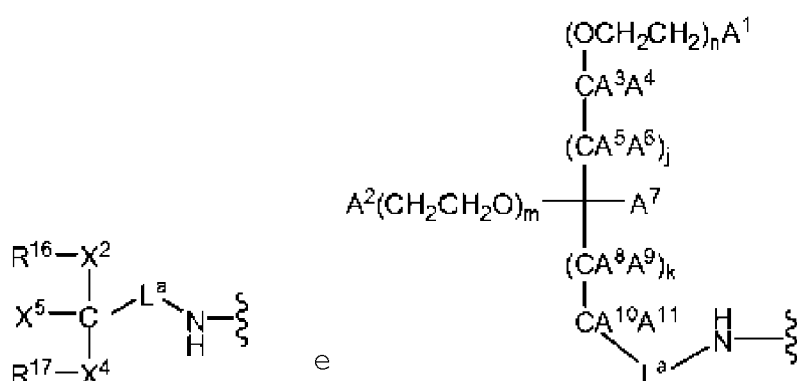


30

157/239

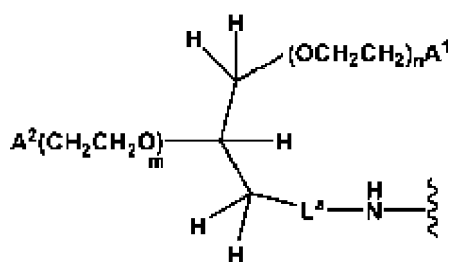


em que y é um número inteiro selecionado de 0 a 2 e pelo menos um de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 ou R^6 tem uma estrutura que é um membro selecionado de



em que as variáveis são como acima descrito.

Em uma modalidade de exemplo, pelo menos um de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 ou R^6 tem uma estrutura de acordo com a seguinte fórmula:



Em uma modalidade de exemplo, A^1 e A^2 são selecionados de $-OH$ e $-OCH_3$.

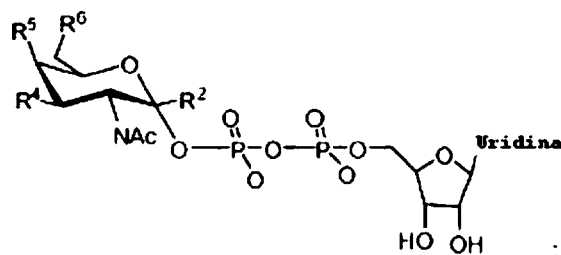
30

5



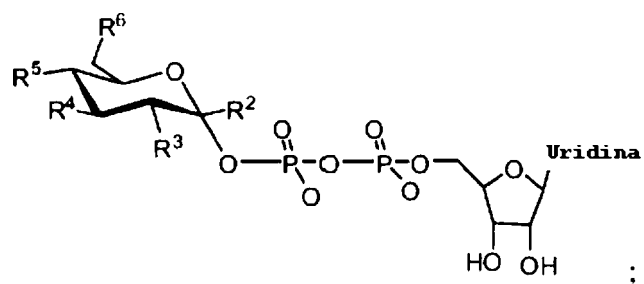
15

20

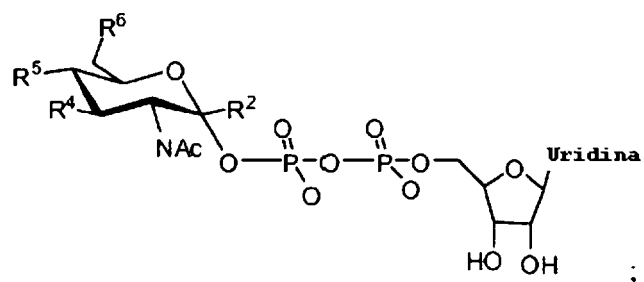


159/239

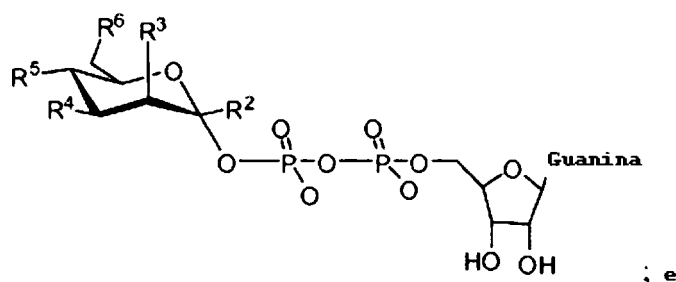
5



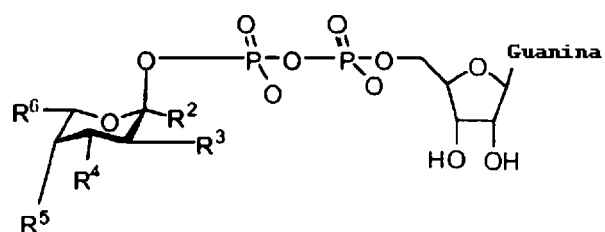
10



15



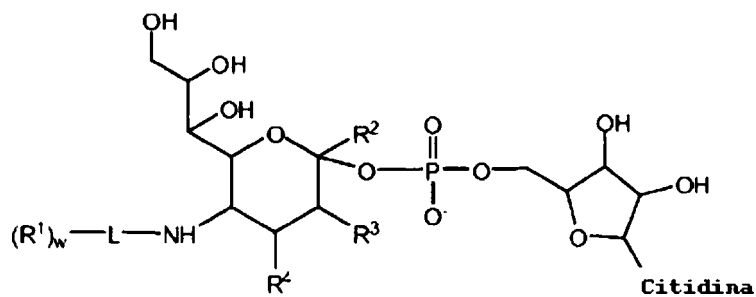
20



em que as variáveis são como acima descrito.

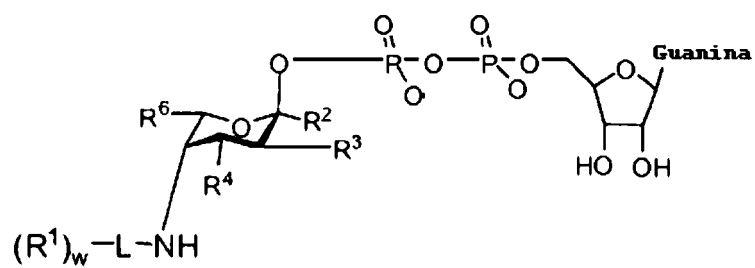
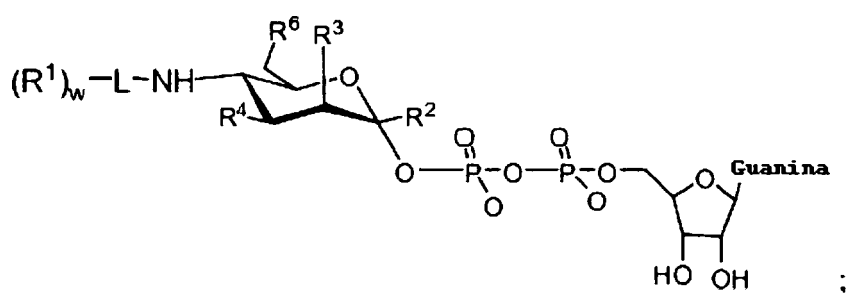
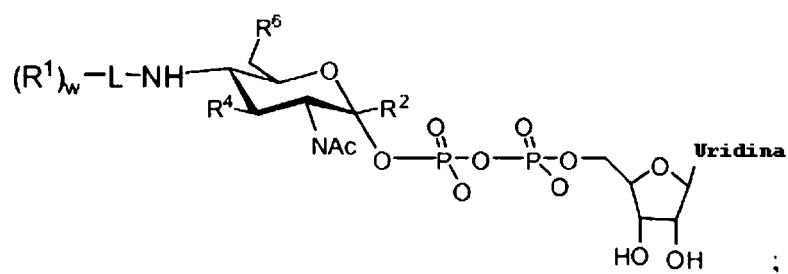
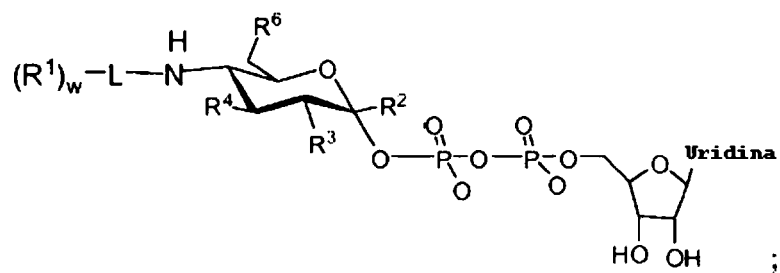
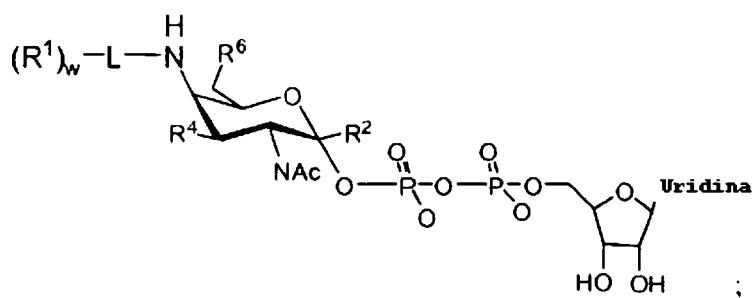
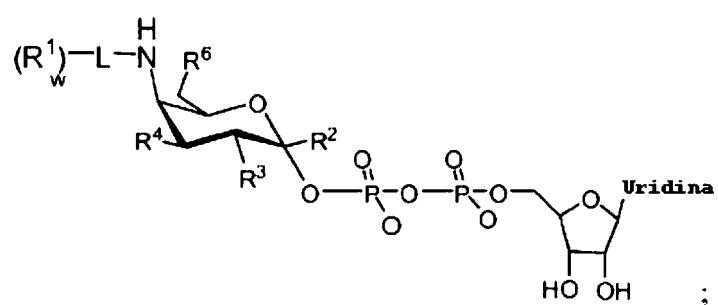
Em outra modalidade de exemplo, espécies de acordo com essa modalidade incluem:

25



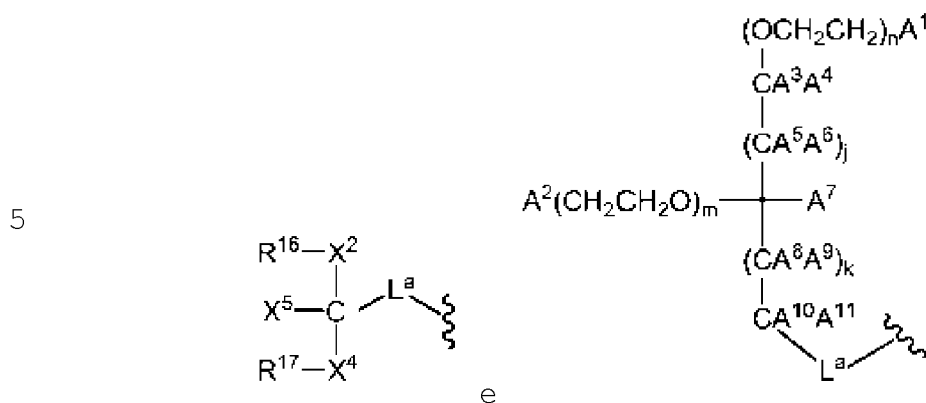
30

160/239



161/239

em que $L-(R^1)_w$ é um membro selecionado de



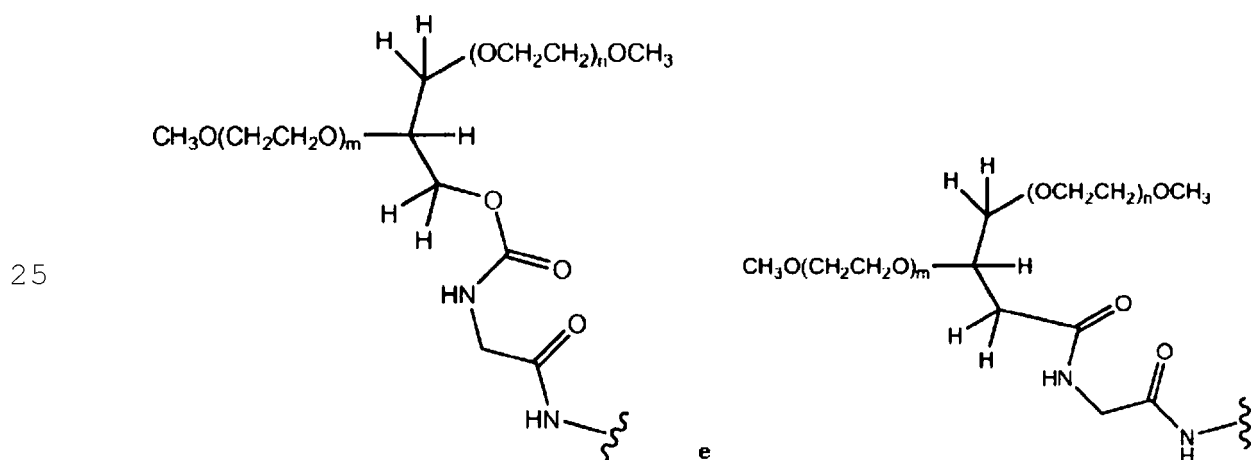
em que as variáveis são como acima descrito.

10 Em uma modalidade de exemplo, $L-(R^1)_w$ tem uma estrutura de acordo com a seguinte formula:



Em uma modalidade de exemplo, A^1 e A^2 são selecionados de $-OH$ e $-OCH_3$.

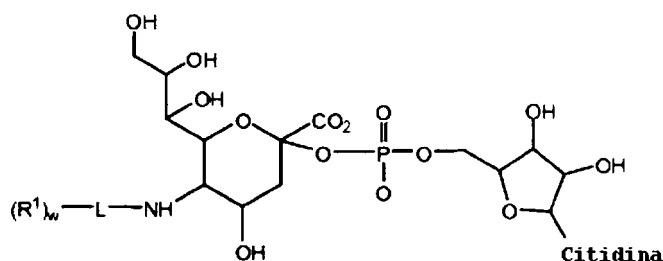
20 Exemplos de grupos de modificação poliméricos de acordo com essa modalidade incluem a porção:



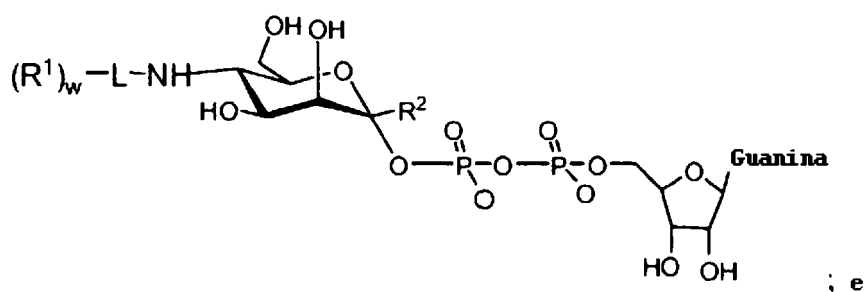
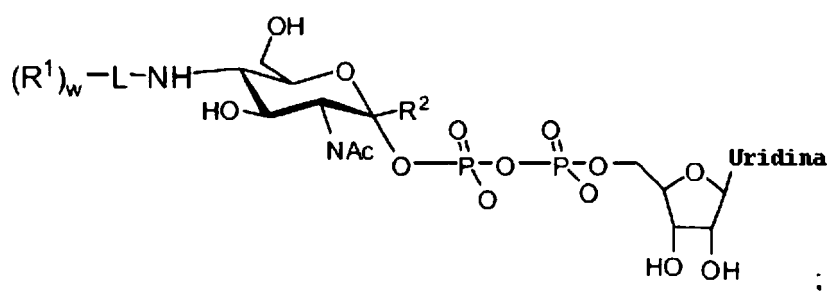
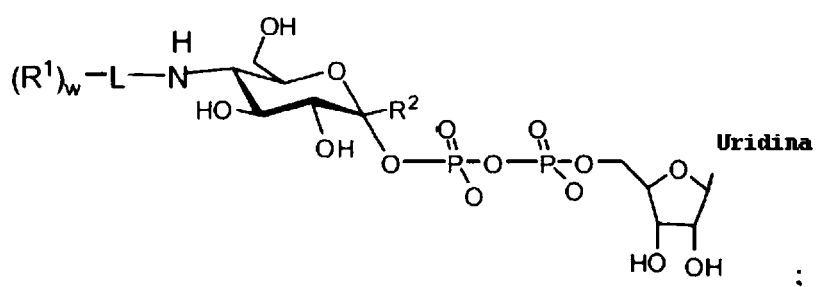
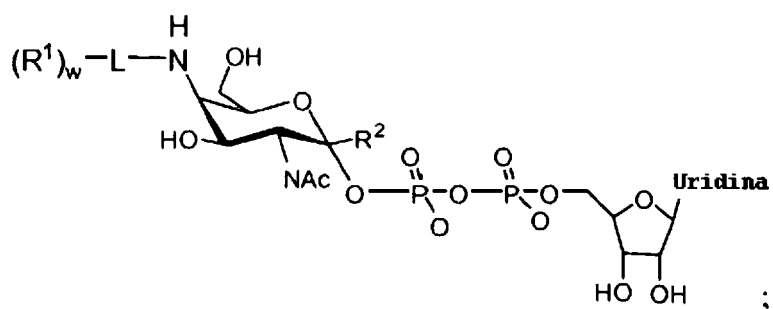
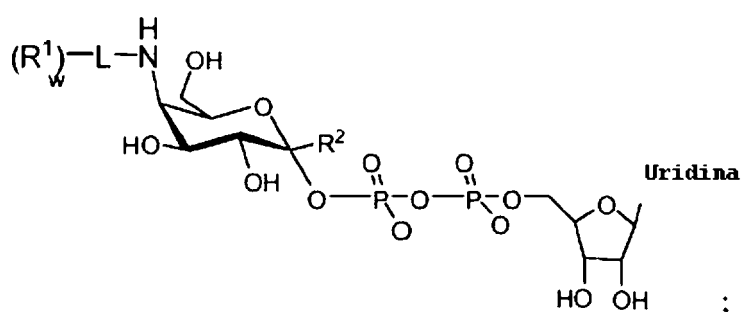
30 Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros independentemente selecionados de cerca de 1 a

cerca de 1.000. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros independentemente selecionados de cerca de 1 a cerca de 500. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros independentemente selecionados de cerca de 1 a cerca de 70, cerca de 70 a cerca de 150, cerca de 150 a cerca de 250, cerca de 250 a cerca de 375 e cerca de 375 a cerca de 500. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros independentemente selecionados de cerca de 10 a cerca de 35, cerca de 45 a cerca de 65, cerca de 95 a cerca de 130, cerca de 210 a cerca de 240, cerca de 310 a cerca de 370 e cerca de 420 a cerca de 480. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 15 a cerca de 30. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 50 a cerca de 65. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 100 a cerca de 130. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 210 a cerca de 240. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 310 a cerca de 370. Em uma modalidade de exemplo, m e n são números inteiros selecionados de cerca de 430 a cerca de 470.

Em outra modalidade de exemplo, espécies de acordo com essa modalidade incluem:



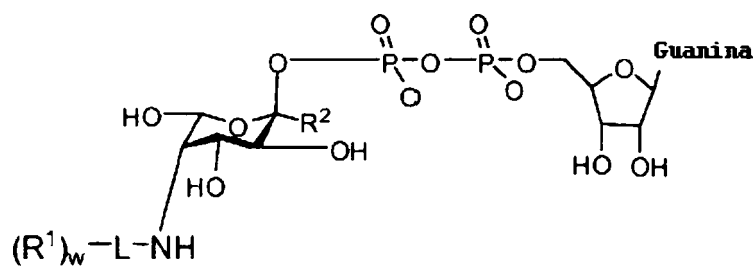
163/239



30

164/239

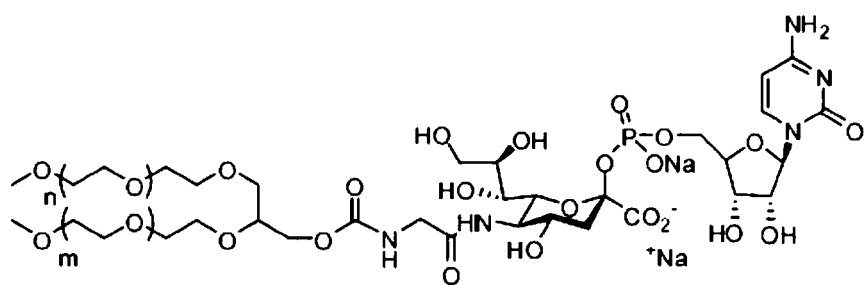
5



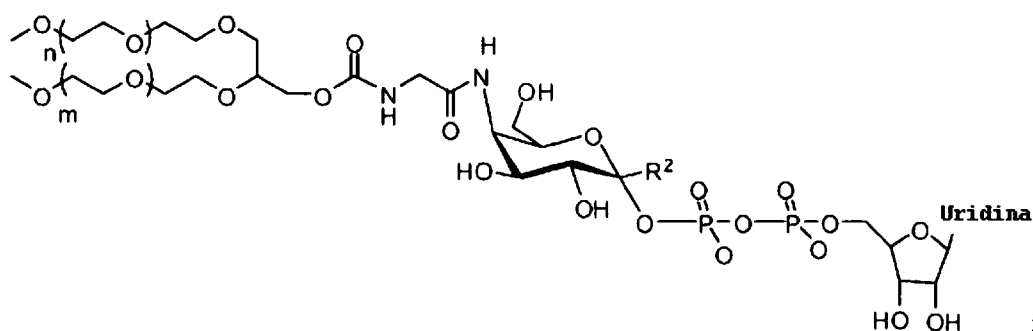
em que as variáveis são como acima descrito.

Em outra modalidade de exemplo, espécies de acordo com essa modalidade incluem:

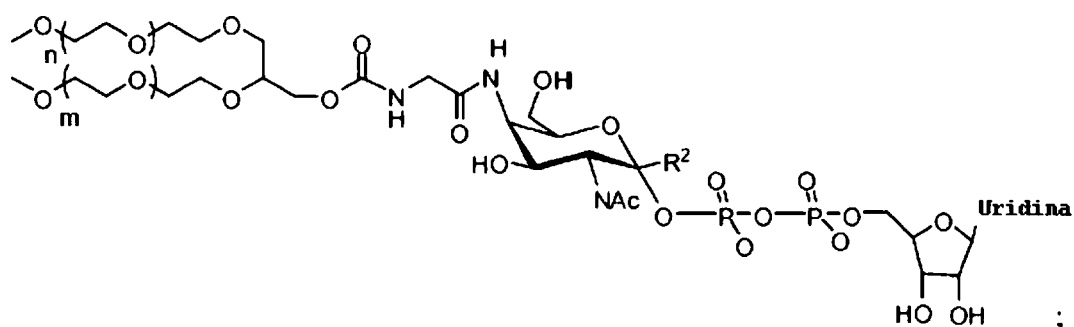
10



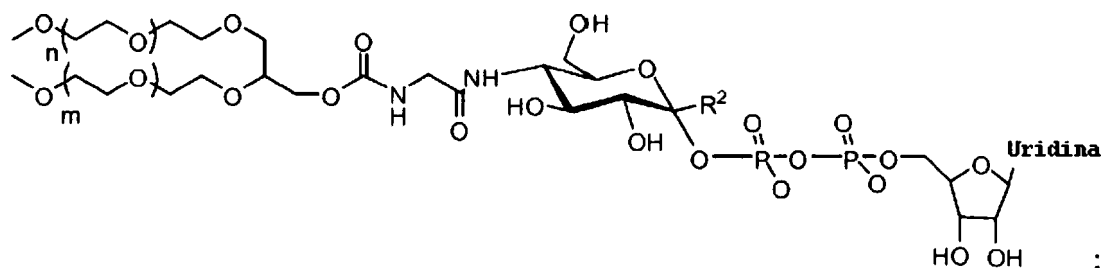
15



20

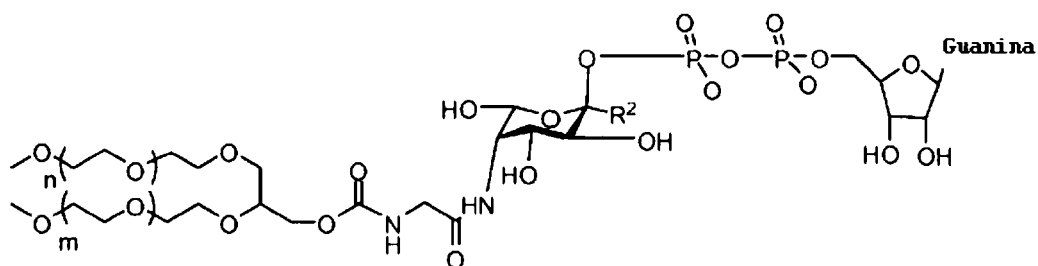
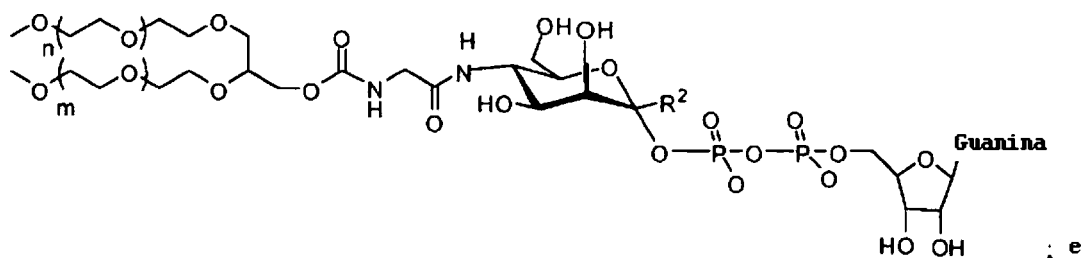
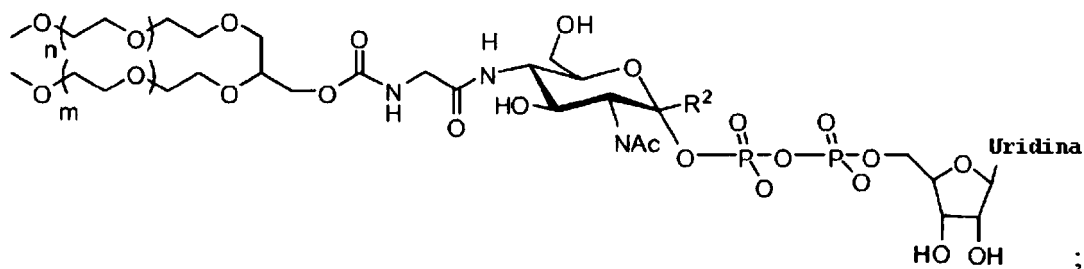


25



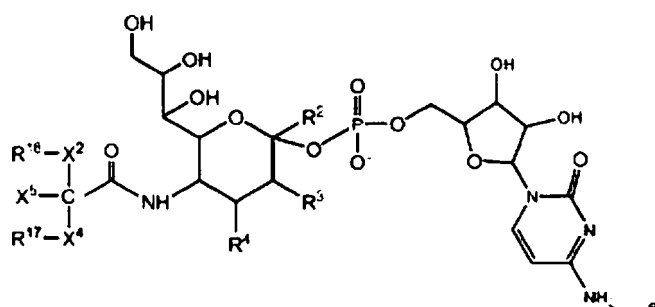
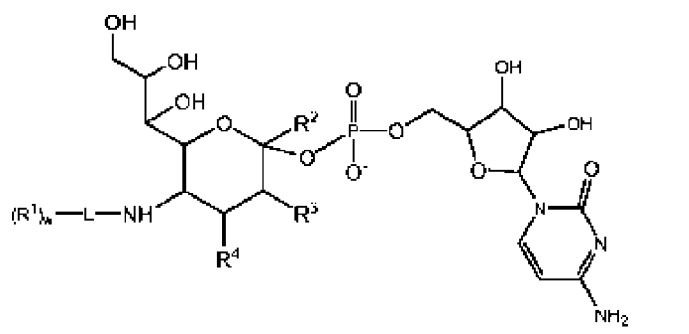
30

165/239



em que as variáveis são como acima descrito.

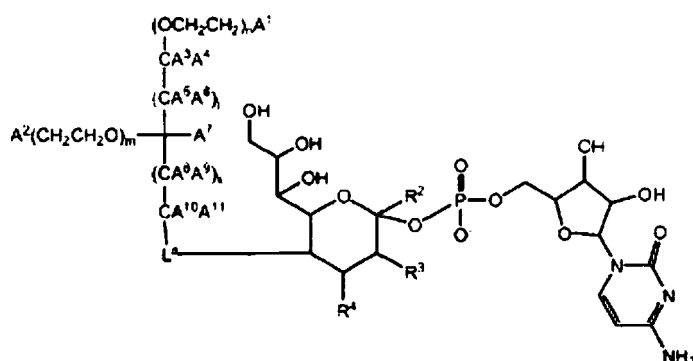
Em outra modalidade de exemplo, os açúcares de nucleotídeo têm a fórmula que é um membro selecionado de:



30

166/239

5

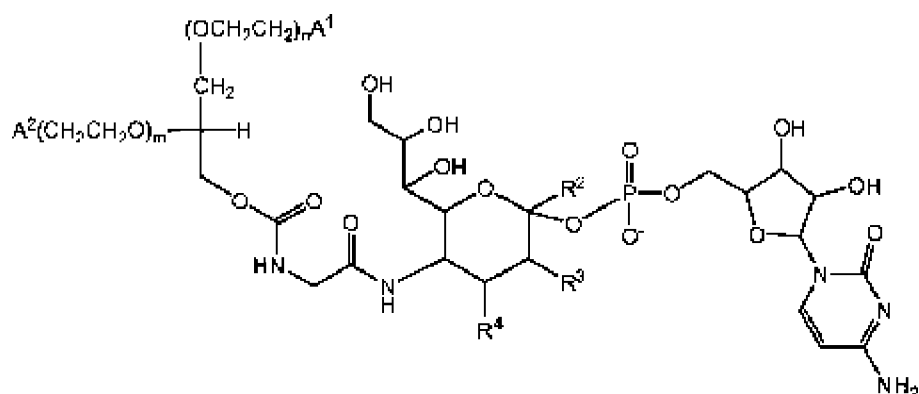


em que as variáveis são como acima descrito.

10

Um exemplo de açúcar de nucleotídeo de acordo com essa modalidade tem a estrutura:

15

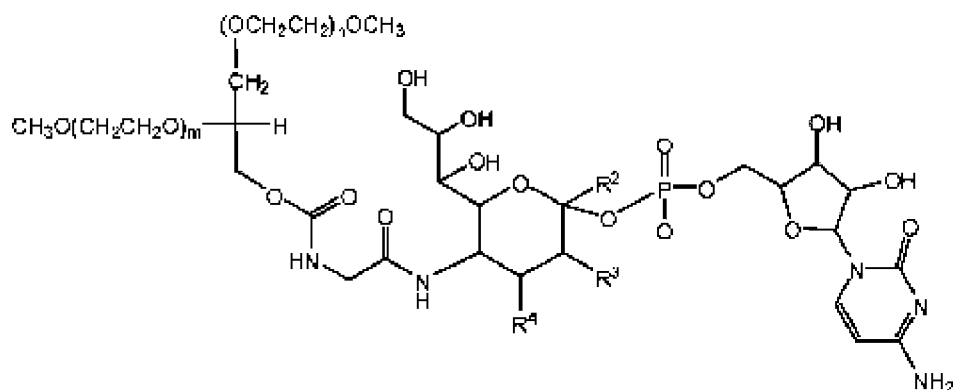


em que as variáveis são como acima descrito.

20

Um exemplo de açúcar de nucleotídeo de acordo com essa modalidade tem a estrutura:

25



em que as variáveis são como acima descrito.

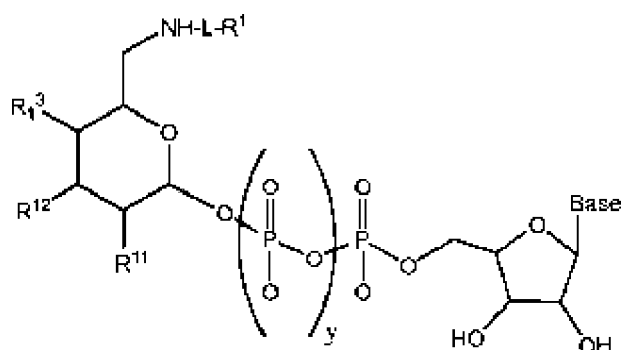
30

Em outra modalidade de exemplo, o açúcar de

167/239

nucleotídeo é baseado na seguinte fórmula:

5

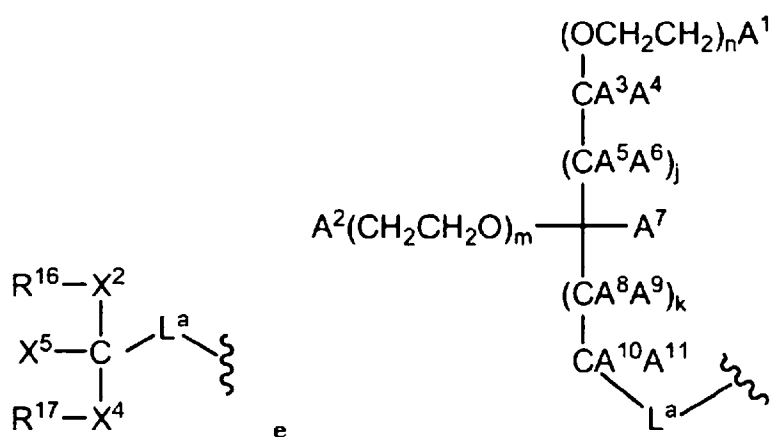


em que os grupos R, e L, representam porções como
 10 acima discutido. O índice "y" é 0, 1 ou 2. Em uma
 modalidade de exemplo, L é uma ligação entre NH e R¹. A
 base é uma base de ácido nucleico.

Em uma modalidade de exemplo, L-R¹ é um membro
 selecionado de

15

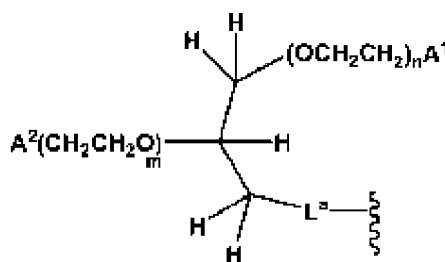
20



em que as variáveis são como acima descrito.

Em uma modalidade de exemplo, L-R¹ tem uma estrutura
 25 de acordo com a seguinte fórmula:

30



Em uma modalidade de exemplo, A¹ e A² são selecionados de -OH e -OCH₃.

III. Os métodos

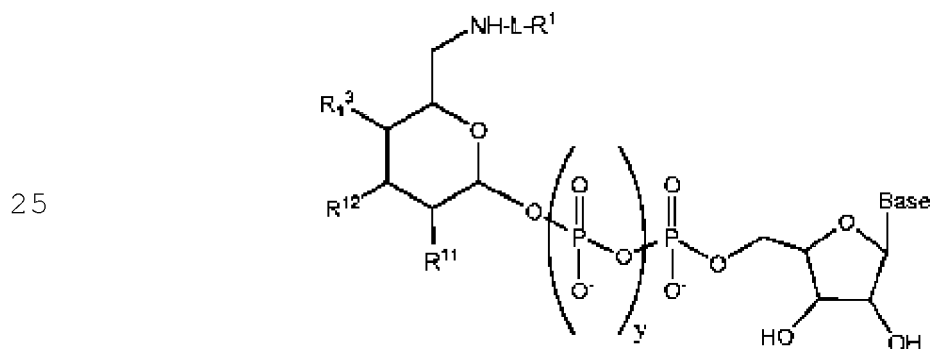
Além dos conjugados acima discutidos, a presente
5 invenção fornece métodos para a preparação desses e de outros conjugados. Além disso, a invenção fornece métodos de prevenção, cura ou melhoria de um estado de doença por administração de um conjugado da invenção a um indivíduo em
10 risco de desenvolver a doença ou um indivíduo que tem a doença.

Em modalidades de exemplo, o conjugado é formado entre uma porção de modificação polimérica e um peptídeo glicosilado ou não glicosilado. O polímero é conjugado ao peptídeo por meio de um grupo de ligação de glicosil, que é
15 interposto, e covalentemente ligado ao peptídeo (ou resíduo de glicosil) e ao grupo de modificação (por exemplo, polímero hidrossolúvel). O método inclui o contato do peptídeo com uma mistura que contém um açúcar modificado e uma enzima, por exemplo, uma glicosiltransferase que
20 conjuga o açúcar modificado ao substrato. A reação é conduzida sob condições adequadas para formar uma ligação covalente entre o açúcar modificado e o peptídeo. A porção de açúcar do açúcar modificado é preferivelmente selecionada de açúcares de nucleotídeo. O método de síntese
25 de um conjugado de peptídeo, que compreende a combinação de a) sialidase; b) uma enzima capaz de catalisar a transferência de um grupo de ligação de glicosil como uma glicosiltransferase, exoglicosidase ou endoglicosidase; c) açúcar modificado; d) peptídeo, assim sintetizando o
30 conjugado de peptídeo. A reação é conduzida sob condições

adequadas para formar uma ligação covalente entre o açúcar modificado e o peptídeo. A porção de açúcar do açúcar modificado é preferivelmente selecionada de açúcares de nucleotídeo.

5 Em uma modalidade de exemplo, o açúcar modificado, como aqueles acima apresentados, é ativado como os açúcares de nucleotídeo correspondentes. Exemplos de nucleotídeos de açúcar que são usados na presente invenção em sua forma modificada incluem mono, di ou trifosfatos de nucleotídeo
10 ou análogos desses. Em uma modalidade preferida, o nucleotídeo de açúcar modificado é selecionado de UDP-glicosídeo, CMP-glicosídeo, ou GDP-glicosídeo. Ainda mais preferivelmente, a porção de nucleotídeo de açúcar do nucleotídeo de açúcar modificado é selecionada de UDP-
15 galactose, UDP-galactosamina, UDP-glicose, UDP-glicosamina, GDP-manose, GDP-fucose, CMP-ácido siálico, ou CMP-NeuAc. Em uma modalidade de exemplo, o fosfato de nucleotídeo é anexado a C-1.

A invenção também fornece o uso de nucleotídeos de
20 açúcar modificados com $L-R^1$ na posição de carbono 6. Exemplos de espécies de acordo com essa modalidade incluem:

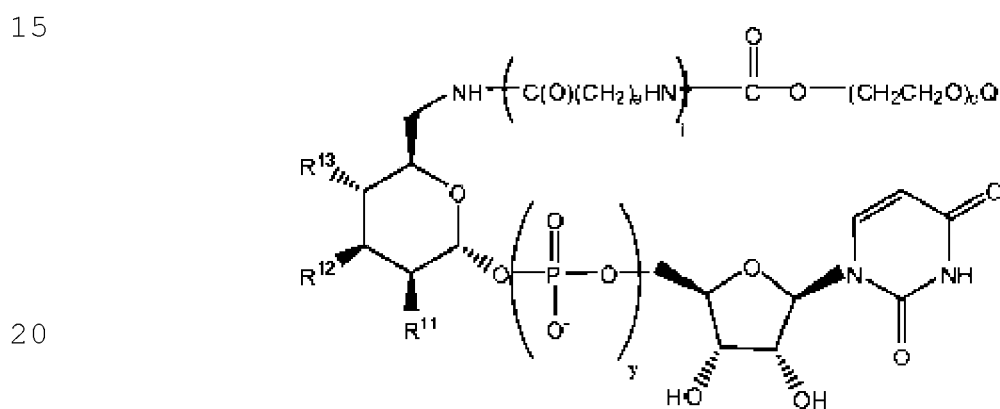
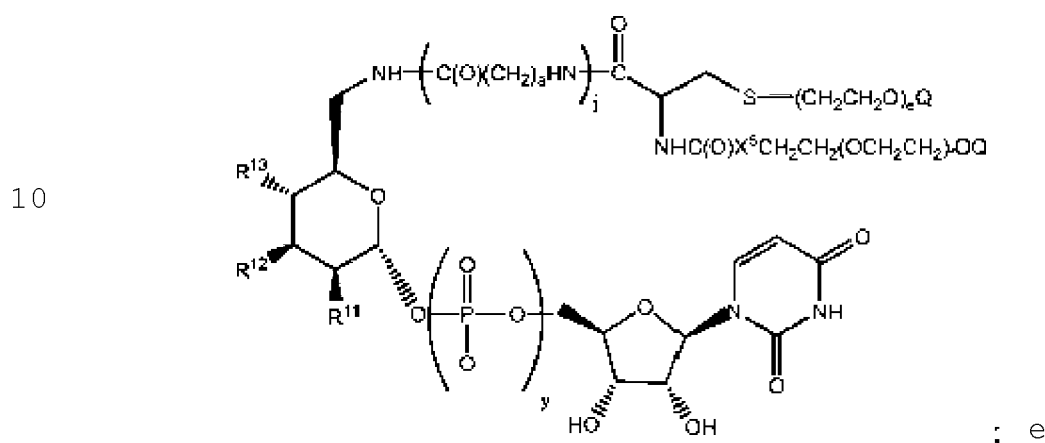


em que os grupos R, e L, representam as porções como acima discutido. O índice "y" é 0, 1 ou 2. Em uma
30 modalidade de exemplo, L é uma ligação entre NH e R^1 . a

170/239

base é uma base de ácido nucleico.

Exemplos de açúcares de nucleotídeo de uso na invenção são descritos nessa. Em outra modalidade de exemplo, açúcares de nucleotídeo de uso na invenção são aqueles em que o carbono na posição 6 é modificado incluindo espécies
5 que têm a estereoquímica de GDP manose, por exemplo:

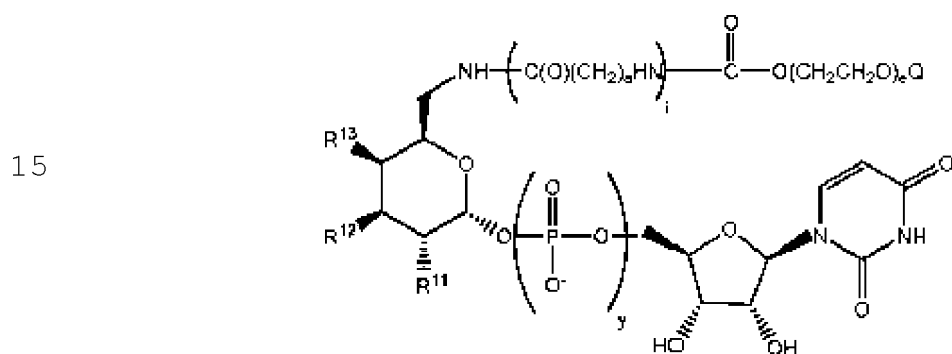
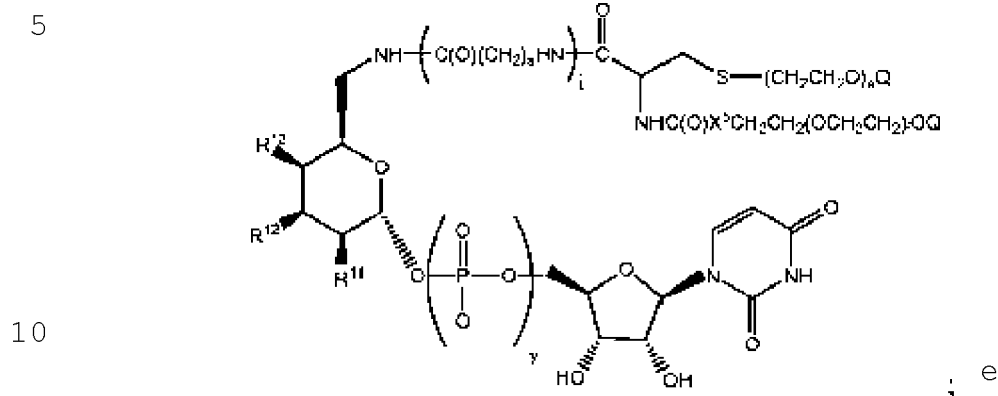


em que X^5 é uma ligação ou O e as variáveis restantes são como acima descrito. O índice i representa 0 ou 1. O índice a representa um número inteiro de 1 a 20. Os índices
25 e e f representam independentemente números inteiros de 1 a 2.500. Q, como acima discutido, é H ou C_1-C_6 alquil substituído ou não substituído. Como aqueles habilitados perceberão, o derivado de serina, em que S é substituído com O também está dentro desse motivo geral.

30 Ainda em uma outra modalidade de exemplo, a invenção

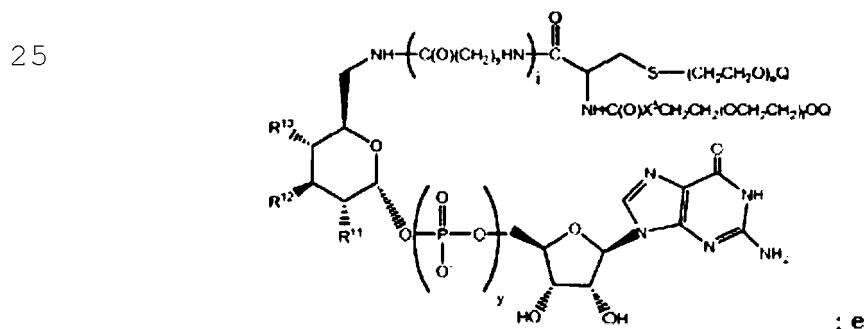
171/239

fornece um conjugado em que o açúcar modificado é baseado na estereoquímica de UDP galactose. Um exemplo de açúcar de nucleotídeo de uso nessa invenção tem a estrutura:

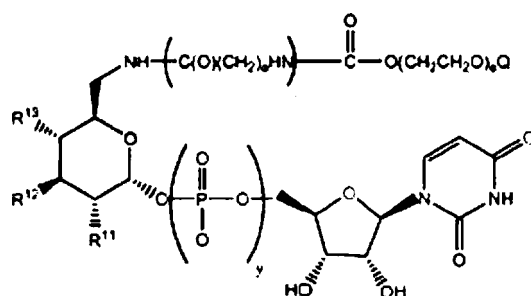


em que as variáveis são como acima descrito.

20 Em outra modalidade de exemplo, o açúcar de nucleotídeo é baseado na estereoquímica de glicose. Exemplos de espécies de acordo com essa modalidade têm as fórmulas:



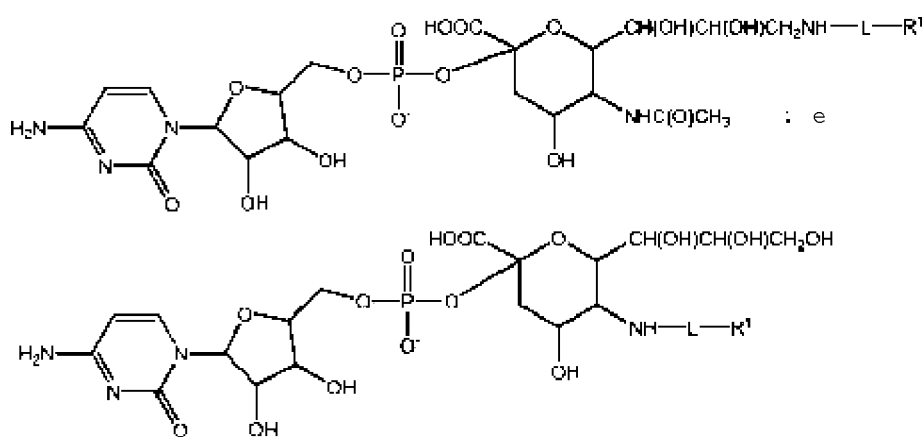
5



em que as variáveis são como acima descrito.

Portanto, em uma modalidade ilustrativa em que a porção de glicosil é ácido siálico, o método da invenção
10 utiliza compostos que têm as fórmulas:

15



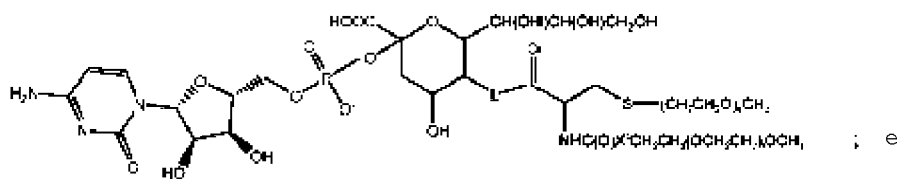
20

em que $L-R^1$ é como acima discutido, e L^1-R^1 representa um ligante ligado ao grupo de modificação. Como com L , exemplos de espécies de ligante de acordo com L^1 incluem uma ligação, porções alquil ou heteroalquil.

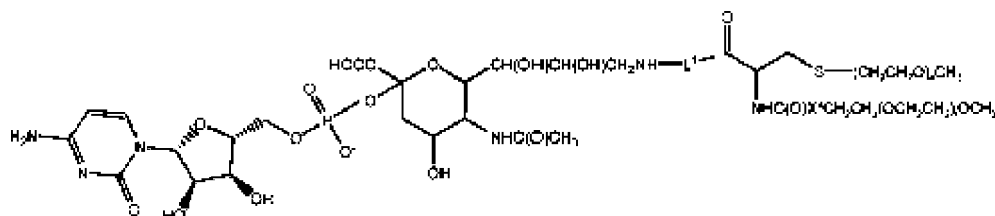
25

Além disso, como acima discutido, a presente invenção fornece o uso de açúcares de nucleotídeo que são modificados com um polímero hidrossolúvel, que é de cadeia linear ou ramificada. Por exemplo, compostos que têm a fórmula mostrada abaixo são de uso para preparar conjugados
30 dentro do escopo da presente invenção:

173/239



5



10 em que X⁴ é O ou uma ligação.

Em geral, a porção de açúcar ou cassete porção de açúcar-ligante ou o PEG ou os grupos de cassete PEG-ligante são ligados através do uso de grupos reativos, que são tipicamente transformados pelo processo de ligação em um novo grupo funcional orgânico ou espécies não reativas.

15 O grupo funcional reativo do açúcar, é localizado em qualquer posição na porção de açúcar. Grupos reativos e classes de reações úteis na prática da presente invenção são geralmente aqueles que são bem conhecidos na técnica de química de bioconjugado. Classes de reações atualmente

20 favorecidas disponíveis com porções reativas de açúcar são aquelas que prosseguem sob condições relativamente brandas. Essas incluem, sem limitação, substituições nucleofílicas (por exemplo, reações de aminas e alcoóis com acil haletos, ésteres ativos), substituições eletrofílicas (por exemplo,

25 reações de enamina) e adições a ligações múltiplas carbono-carbono e carbono-heteroátomo (por exemplo, reação de Michael, adição de Diels-Alder). Essa e outras reações úteis são discutidas, por exemplo, em March, ADVANCED

30 ORGANIC CHEMISTRY, 3^a Ed., John Wiley & Sons, New York,

1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; e Feeney e cols., MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

5 Grupos funcionais reativos úteis pendentes de um núcleo de açúcar ou grupo de modificação incluem, sem limitação:

 (a) grupos carboxil e vários derivados desses que incluem, sem limitação, ésteres de N-hidroxissuccinimida,
10 ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haletos de ácido, acilimidazol, tioésteres, ésteres de p-nitrofenil, alquil, alcenil, alcinil e ésteres aromáticos;

 (b) grupos hidroxil, que podem ser convertidos, por exemplo, a ésteres, éteres, aldeídos etc.

15 (c) grupos haloalquil, em que o haleto pode ser posteriormente deslocado com um grupo nucleofílico como, por exemplo, uma amina, um ânion de carboxilato, ânion de tiol, carbênion, ou um íon de alcóxido, assim resultando na anexação covalente de um novo grupo no grupo funcional do
20 átomo de halogênio;

 (d) grupos dienofilo, que são capazes de participar em reações de Diels-Alder como, por exemplo, grupos maleimido;

 (e) grupos aldeído ou cetona, de modo que subsequente derivatização é possível por meio de formação de derivados
25 de carbonil como, por exemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas ou oximas, ou por meio de tais mecanismos como adição de Grignard ou adição de alquilítio;

 (f) grupos sulfonil haleto para subsequente reação com aminas, por exemplo, para formar sulfonamidas;

30 (g) grupos tiol, que podem ser, por exemplo,

convertidos a dissulfetos ou reagir com acil haletos;

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

(i) alcenos, que podem, por exemplo, passar por
5 cicloadições, acilação, adição de Michael etc; e

(j) epóxidos, que podem reagir com, por exemplo, aminas e compostos hidroxil.

Os grupos funcionais reativos podem ser escolhidos de modo que eles não participem, ou interfiram com as reações
10 necessárias para montar o núcleo de açúcar reativo ou grupo de modificação. Alternativamente, um grupo funcional reativo pode ser protegido de participar na reação pela presença de um grupo de proteção. Aqueles habilitados na técnica compreendem como proteger um grupo funcional
15 particular de modo que ele não interfira com um conjunto escolhido de condições de reação. Para exemplos de grupos de proteção úteis, veja, por exemplo, Greene e cols., PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, New York, 1991.

20 Na discussão que se segue, inúmeros exemplos específicos de açúcares modificados que são úteis na prática da presente invenção são apresentados. Nos exemplos de modalidades, um derivado de ácido siálico é utilizado como o núcleo de açúcar ao qual o grupo de modificação é
25 anexado. O foco da discussão sobre derivados de ácido siálico é para clareza de ilustração apenas e não deve limitar o escopo da invenção. Aqueles habilitados na técnica perceberão que várias outras porções de açúcar podem ser ativadas e derivatizadas em uma maneira análoga
30 àquela apresentada com o uso de ácido siálico como um

exemplo. Por exemplo, numerosos métodos são disponíveis para modificação de galactose, glicose, N-acetilgalactosamina e fucose para nomear alguns substratos de açúcar, que são prontamente modificados por métodos reconhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Elhalabi e cols., *Curr. Med. Chem.* 6: 93 (1999); e Schafer e cols., *J. Org. Chem.* 65: 24 (2000)).

Em uma modalidade de exemplo, o açúcar modificado é baseado em 6-amino-N-acetil-porção de glicosil.

10 No esquema acima, o índice n representa um número inteiro de 1 a 2.500. Em uma modalidade de exemplo, esse índice é selecionado de modo que o polímero tem cerca de 10 kD, 15 kD ou 20 kD de peso molecular. O símbolo "A" representa um grupo de ativação, por exemplo, um halo, um
15 componente de um éster ativado (por exemplo, um éster de N-hidroxissuccinimida), um componente de um carbonato (por exemplo, p-nitrofenil carbonato) e outros. Aqueles habilitados na técnica perceberão que outros açúcares de nucleotídeo de PEG-amida são facilmente preparados por
20 esses e métodos análogos.

O peptídeo é tipicamente sintetizado de novo, ou recombinantemente expresso em uma célula procariótica (por exemplo, célula bacteriana, como *E. coli*) ou em uma célula eucariótica como uma célula de mamífero, levedura, inseto,
25 de fungo ou planta. O peptídeo pode ser uma proteína de comprimento total ou um fragmento. Além disso, o peptídeo pode ser um peptídeo de tipo selvagem ou mutado. Em uma modalidade de exemplo, o peptídeo inclui uma mutação que adiciona um ou mais sítios de glicosilação ligados em O ou
30 N à seqüenciado peptídeo.

O método da invenção também fornece modificação de peptídeos incompletamente glicosilados que são produzidos recombinantemente. Várias glicoproteínas produzidas recombinantemente são incompletamente glicosiladas, expondo
5 resíduos de carboidrato que podem ter propriedades indesejadas, por exemplo, imunogenicidade, reconhecimento pelo RES. O emprego de um açúcar modificado em um método da invenção, o peptídeo pode ser simultaneamente glicosilado e derivatizado, por exemplo, com um polímero hidrossolúvel,
10 agente terapêutico ou outros. A porção de açúcar do açúcar modificado pode ser o resíduo que pode ser conjugado adequadamente ao aceitador em um peptídeo totalmente glicosilado, ou uma outra porção de açúcar com propriedades desejáveis.

15 Aqueles habilitados perceberão que a invenção pode ser praticada com o uso de substancialmente qualquer peptídeo ou glicopeptídeo de qualquer fonte. Exemplos de peptídeos com os quais a invenção pode ser praticada são apresentados em WO 03/031464, e nas referências aqui apresentadas.

20 Peptídeos modificados pelos métodos da invenção podem ser sintéticos ou peptídeos de tipo selvagem ou eles podem ser peptídeos mutados, produzidos por métodos conhecidos na técnica, como mutagênese direcionada a sítio. Glicosilação de peptídeos é tipicamente ligada em N ou ligada em O. Um
25 exemplo de ligação em N é a anexação do açúcar modificado à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As seqüências de tripeptídeo asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as seqüências de reconhecimento para anexação enzimática de
30 uma porção de carboidrato à cadeia lateral de asparagina.

Portanto, a presença de uma dessas seqüências de tripeptídeo em um polipeptídeo cria um sítio de glicosilação potencial. Glicosilação ligada em O refere-se à anexação de um açúcar (por exemplo, N-
5 acetilgalactosamina, galactose, manose, GlcNAc, glicose, fucose ou xilose) à cadeia lateral hidroxil de um hidroxiaminoácido, preferivelmente serina ou treonina, embora aminoácidos não usuais ou não naturais, por exemplo, 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina também possam ser
10 usados.

Além disso, em adição a peptídeos, os métodos da presente invenção podem ser praticados com outras estruturas biológicas (por exemplo, glicolipídeos, lipídeos, esfingóides, ceramidas, células inteiras, e
15 outros, contendo um sítio de glicosilação).

A adição de sítios de glicosilação a um peptídeo ou outra estrutura é convenientemente realizada por alteração da seqüência de aminoácidos de forma que ela contenha um ou mais sítios de glicosilação. A adição também pode ser feita
20 pela incorporação de uma ou mais espécies que apresentam um grupo -OH, preferivelmente resíduos de serina ou treonina, dentro da seqüência de peptídeos (para sítios de glicosilação ligados em O). A adição pode ser feita por mutação ou por síntese química completa do peptídeo. A
25 seqüência de aminoácidos do peptídeo é preferivelmente alterada através de mudanças no nível de DNA, particularmente por mutação do DNA que codifica o peptídeo em bases pré-selecionadas de forma que são gerados códons que se traduzirão nos aminoácidos desejados. A mutação(s)
30 de DNA é preferivelmente feita com o uso de métodos

conhecidos na técnica.

Em uma modalidade exemplar, o sítio de glicosilação é adicionado por embaralhamento de polinucleotídeos. Polinucleotídeos que codificam um peptídeo candidato podem
5 ser modulados com protocolos de embaralhamento de DNA. Embaralhamento de DNA é um processo de recombinação recursiva e mutação, realizado por fragmentação aleatória de um conjunto de genes relacionados, seguido por remontagem dos fragmentos por um processo semelhante à
10 reação de cadeia de polimerase. Veja, por exemplo, Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751 (1994); Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994); e Patente U.S. Nos. 5.605.793, 5.837.458, 5.830.721 e 5.811.238.

Peptídeos de exemplo com os quais a invenção pode ser
15 praticada, métodos de adição ou remoção de sítios de glicosilação, e adição ou remoção de estruturas ou subestruturas de glicosil são descritos em detalhes em WO03/031464 e relatados em pedidos U.S. e PCT.

A presente invenção também toma vantagem da adição (ou
20 remoção) de um ou mais resíduos glicosil selecionados ao peptídeo, após o que, um açúcar modificado é conjugado a pelo menos um dos resíduos de glicosil selecionados do peptídeo. A presente modalidade é útil, por exemplo, quando é desejado conjugar o açúcar modificado a um resíduo de
25 glicosil selecionado que tanto não está presente em um peptídeo ou não está presente em uma quantidade desejada. Assim, antes do acoplamento de um açúcar modificado a um peptídeo, o resíduo de glicosil selecionado é conjugado em relação ao peptídeo por acoplamento enzimático ou químico.
30 Em outra modalidade, o padrão de glicosilação de um

peptídeo é alterado antes da conjugação do açúcar modificado por remoção de um resíduo de carboidrato do peptídeo. Vide, por exemplo, WO 98/31826.

5 A adição ou remoção de quaisquer porções de carboidrato presentes no glicopeptídeo é realizada tanto química quanto enzimaticamente. Um exemplo de desglicosilação química é preferivelmente alcançado por exposição da variante do peptídeo ao composto de ácido trifluormetanossulfônico ou um composto equivalente. Esse
10 tratamento resulta na clivagem da maior parte ou todos os açúcares, exceto o açúcar de ligação (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina), embora deixando o peptídeo intacto. A desglicosilação química é descrita por Hakimuddin e outros, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 e
15 por Edge e outros, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. A clivagem enzimática das porções de carboidrato nas variantes dos peptídeos pode ser obtida por uso de várias endo e exoglicosidases conforme descrito por Thotakura e outros, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987).

20 Em uma modalidade de exemplo, o peptídeo é essencialmente completamente dessialilado com neuraminidase antes da realização de etapas de glicoconjugação ou remodelagem no peptídeo. Após a glicoconjugação ou remodelagem, o peptídeo é opcionalmente re-sialilado com o
25 uso de uma sialiltransferase. Em uma modalidade de exemplo, a re-sialilação ocorre essencialmente em cada (por exemplo, >80%, preferivelmente maior que 85%, maior que 90%, preferivelmente maior que 95% e mais preferivelmente maior que 96%, 97%, 98% ou 99%) aceitador de sacaril terminal em
30 uma população de aceitadores de sialil. Em uma modalidade

preferida, o sacarídeo tem um padrão de sialilação substancialmente uniforme (ou seja, padrão de glicosilação substancialmente uniforme).

A adição química de porções de glicosil é realizada por qualquer processo reconhecido na técnica. A adição enzimática de porções de açúcar é preferivelmente obtida usando uma modificação dos métodos estabelecidos aqui, substituindo unidades de glicosil nativas para os açúcares modificados usados na invenção. Outros métodos de adição de porções de açúcar são revelados na Patente U.S. número 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554 e 5.922.577.

Pontos de anexação exemplares para resíduo de glicosil selecionado incluem, porém não estão limitados a: (a) sítios de consenso para glicosilação em N e sítios para glicosilação ligada em O; (b) porções de glicosil terminal que são aceitadoras para uma glicosiltransferase; (c) arginina, asparagina e histidina; (d) grupos carboxila livre; (e) grupos sulfidril livre, tais como aqueles de cisteína; (f) grupos hidroxila livres tais como aqueles de serina, treonina ou hidroxiprolina; (g) resíduos aromáticos tais como aqueles de fenilalanina, tirosina ou triptofano; ou (h) o grupo amida de glutamina. Métodos exemplares de uso na presente invenção são descritos no WO 87/05330 publicado em 11 de setembro de 1987 e em Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259-306 (1981).

Em uma modalidade, a invenção fornece um método para ligação de dois ou mais peptídeos através de um grupo de ligação. O grupo de ligação é de qualquer estrutura útil e pode ser selecionado de cadeia linear e estruturas de cadeia ramificada. Preferivelmente, cada término do

ligante, que é anexado a um peptídeo, inclui um açúcar modificado (isto é, um grupo de ligação de glicosil intacto nascente).

Em um método exemplar da invenção, dois peptídeos são ligados em conjunto através de uma porção ligante que inclui uma polimérica (por exemplo, um ligante PEG). A construção conforma-se na estrutura geral estabelecida no quadro acima. Conforme descrito aqui, a construção da invenção inclui dois grupos de ligação glicosil intactos (isto é, $s + t = 1$). O foco em um ligante PEG que inclui dois grupos glicosil é para fins de clareza e não deve ser interpretado como limitando a identidade dos braços de ligante de uso nesta modalidade da invenção.

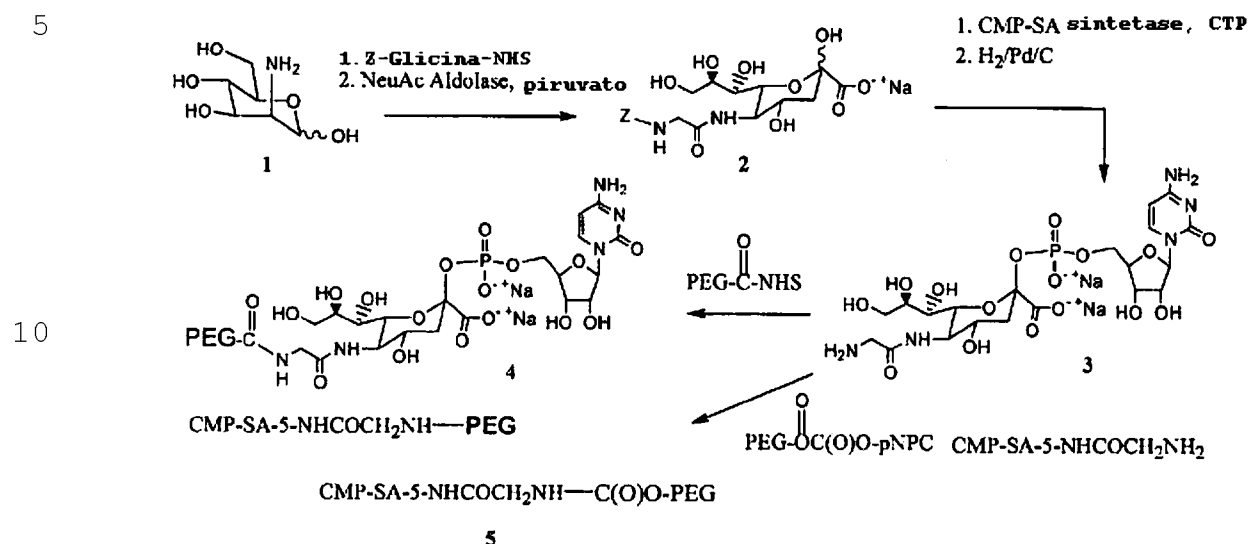
Assim, uma porção PEG é funcionalizada em um primeiro término com uma primeira unidade glicosil e em um segundo término, com uma segunda unidade glicosil. As primeira e segunda unidades glicosil são preferivelmente substratos para transferases diferentes, permitindo anexação ortogonal dos primeiro e segundo peptídeos às primeira e segunda unidades glicosil, respectivamente. Na prática, o ligante $(\text{glicosil})^1\text{-PEG-(glicosil)}^2$ faz contato com o primeiro peptídeo e uma primeira transferase para a qual a primeira unidade glicosil é um substrato, desta forma constituindo o $(\text{peptídeo})^1\text{-(glicosil)}^1\text{-PEG-(glicosil)}^2$. A primeira transferase e/ou peptídeo não reagido é então opcionalmente removida da mistura de reação. O segundo peptídeo e a segunda transferase para a qual a segunda unidade de glicosil é um substrato são adicionados ao conjugado de $(\text{peptídeo})^1\text{-(glicosil)}^1\text{-PEG-(glicosil)}^2$ constituindo $(\text{peptídeo})^1\text{-(glicosil)}^1\text{-PEG-(glicosil)}^2\text{-(peptídeo)}^2$. Os

habilitados na técnica apreciarão que o processo ressaltado acima é também aplicável para formação de conjugados entre mais do que dois peptídeos, por exemplo, o uso de um PEG ramificado, dendrímero, poli(aminoácido), polissacarídeo ou
5 semelhante.

Em uma modalidade de exemplo, o peptídeo que é modificado por um método da invenção é um glicopeptídeo que é produzido em células de mamífero (por exemplo, células CHO) ou em um animal transgênico e portanto, contêm cadeias
10 de oligossacarídeo ligadas em N e/ou ligadas em O, que são incompletamente sialiladas. As cadeias do oligossacarídeo do glicopeptídeo desprovido de um ácido siálico e que contêm um resíduo de galactose terminal podem ser PEGuiladas, PPGuiladas ou modificadas com um ácido siálico
15 modificado.

No Esquema 1, o amino glicosídeo 1 é tratado com o éster ativo de um derivado de aminoácido protegido (por exemplo, glicina), convertendo o resíduo de amina açúcar no aduto de amida de aminoácido protegido correspondente. O
20 aduto é tratado com uma aldolase para formar α -hidroxi carboxilato 2. O composto 2 é convertido no derivado CMP correspondente por ação de sintetase CMP-SA, seguido por hidrogenação catalítica do derivado de CMP para produzir o composto 3. A amina introduzida através da formação do
25 aduto de glicina é utilizada como um local de anexação PEG por reação do composto 3 com um PEG ativado ou o derivado de PPG (por exemplo, PEG-C(O)NHS, PEG-OC(O)O-p-nitrofenil), produzindo espécies como 4 ou 5, respectivamente

Esquema 1



Em uma modalidade de exemplo, um açúcar modificado pode ser ligado a um sítio de ligação de O-glicano em um peptídeo. As glicosiltransferases que podem ser usadas para produzir esse conjugado de peptídeo incluem: para Ser56 (-Glc-(Xyl)n-Gal-SA-PEG – uma galactosiltransferase e sialiltransferase; para Ser56 -Glc-(Xyl)n-Xyl-PEG – uma xilosiltransferase; e para Ser60-Fuc-GlcNAc-(Gal)n-(SA)m-PEG – uma GlcNAc transferase.

III. A. Conjugação de Açúcares Modificados em Peptídeos

Os açúcares modificados com PEG são conjugados a um peptídeo glicosilado ou não glicosilado usando uma enzima adequada para mediar a conjugação. Preferivelmente, as concentrações de açúcar(es) doador(es) modificado(s), enzima(s) e peptídeo(s) aceitador(es) são selecionadas, de modo que, a glicosilação prossegue até o aceitador ser consumido. As considerações discutidas abaixo, embora

apresentadas no contexto de uma sialiltransferase são geralmente aplicáveis a outras reações de glicosiltransferase. Uma lista de sialiltransferases preferidas para uso na invenção é fornecida na FIG. 6.

5 Vários métodos de uso de glicosiltransferases para sintetizar estruturas de oligossacarídeo desejadas são conhecidos e são geralmente aplicáveis à presente invenção. Métodos de exemplo são descritos, por exemplo, no WO 96/32491, Ito e outros, *Pure Appl. Chem.* 65: 753 (1993), e
10 Patente U.S. números 5.352.670, 5.374,541 e 5.545.553, Pat. U.S. de domínio público Nos. 6.399.336, e 6.440.703, e Pedidos PCT publicados de domínio público, WO 03/031464, WO 04/033651, WO 04/099231, que são aqui incorporados por referência.

15 A presente invenção é praticada usando uma glicosiltransferase simples ou uma combinação de glicosiltransferases. Por exemplo, pode-se usar uma combinação de sialiltransferase e uma galactosiltransferase. Naquelas modalidades que usam mais
20 de uma enzima, as enzimas e substratos são preferivelmente combinados em uma mistura de reação inicial ou as enzimas e reagentes para a segunda reação enzimática são adicionados ao meio de reação, uma vez que a primeira reação enzimática está completa ou quase completa. Por
25 condução de duas reações enzimáticas em seqüência em um recipiente simples, os rendimentos totais são aperfeiçoados em relação aos procedimentos nos quais uma espécie intermediária é isolada. Além disto, a limpeza e descarte de solventes extras e subprodutos é reduzida.

30 Em uma modalidade preferida, cada uma das primeira e

segunda enzimas é uma glicosiltransferase. Em outra modalidade preferida, uma enzima é uma endoglicosidase. Em uma modalidade preferida adicional, mais de duas enzimas são usadas para montar a glicoproteína modificada da invenção. As enzimas são usadas para alterar uma estrutura de sacarídeo no peptídeo em qualquer ponto antes ou após a adição do açúcar modificado ao peptídeo.

Em uma outra modalidade, o método faz uso de uma ou mais exo ou endoglicosidase. A glicosidase é tipicamente um mutante, que é transformado por engenharia para formar ligações de glicosil ao invés de romper as mesmas. A glicanase mutante inclui, tipicamente, uma substituição de um resíduo de aminoácido para um resíduo de aminoácido ácido de sítio ativo. Por exemplo, quando a endoglicanase é endo-H, os resíduos de sítio ativo substituídos tipicamente serão Asp na posição 130, Glu na posição 132 ou uma combinação desses. Os aminoácidos são geralmente substituídos por serina, alanina, asparagina ou glutamina.

A enzima mutante catalisa a reação, geralmente por uma etapa de síntese que é análoga à reação inversa da etapa de hidrólise de endoglicanase. Nestas modalidades, a molécula doadora de glicosil (por exemplo uma estrutura oligo ou monossacarídea desejada) contém um grupo de partida e a reação se processa com a adição da molécula doadora a um resíduo de GlcNAc na proteína. Por exemplo, o grupo de partida pode ser um halogênio, tal como flúor. Em outras modalidades, o grupo de partida é uma porção Asn ou Asn-peptídeo. Ainda em modalidades adicionais, o resíduo de GlcNAc na molécula doadora de glicosil é modificado. Por exemplo, o resíduo de GlcNAc pode compreender uma porção

1,2-oxazolina.

Em uma modalidade preferida, cada uma das enzimas utilizada para produzir um conjugado da invenção está presente em uma quantidade catalítica. A quantidade
5 catalítica de uma enzima específica varia de acordo com a concentração daquele substrato da enzima, bem como as condições de reação tais como, temperatura, tempo e valor de pH. Meios para determinar a quantidade catalítica para uma dada enzima sob concentrações de substrato pré-
10 selecionadas e condições de reação são bem conhecidas dos habilitados na técnica.

A temperatura na qual um processo descrito acima é realizado pode variar de imediatamente acima do congelamento à temperatura na qual a maior parte da enzima
15 sensível desnatura. As faixas de temperatura preferidas são de cerca de 0°C a cerca de 55°C e, mais preferivelmente, cerca de 20°C a cerca de 37°C. Em outra modalidade exemplar, um ou mais componentes do presente método são conduzidos em uma temperatura elevada usando uma enzima
20 termofílica.

A mistura de reação é mantida por um período de tempo suficiente para que o aceitador seja glicosilado, dessa forma formando o conjugado desejado. Algum conjugado pode freqüentemente ser detectado após algumas horas, com
25 quantidades recuperáveis geralmente sendo obtidas dentro de 24 horas ou menos. Os habilitados na técnica entenderão que a taxa de reação é dependente de vários fatores variáveis (por exemplo, concentração de enzima, concentração de doador, concentração de aceitador, temperatura, volume do
30 solvente) que são otimizados para um sistema selecionado

A presente invenção também provê a produção em escala industrial de peptídeos modificados. Como aqui usado, uma escala industrial geralmente produz pelo menos 1 grama de conjugado finalizado, purificado.

5 Na discussão que se segue a invenção é exemplificada pela conjugação de porções de ácido siálico modificadas a um peptídeo glicosilado. O ácido siálico modificado de exemplo é rotulado com PEG. O foco da discussão que se segue no uso do ácido siálico modificado por PEG e
10 peptídeos glicosilados é quanto a clareza de ilustração e não se destina a implicar no fato de que a invenção esteja limitada à conjugação desses dois parceiros. Uma pessoa habilitada entenderá que a discussão é geralmente aplicável às adições de porções de glicosil modificadas que não ácido
15 siálico. Além disso, a discussão é igualmente aplicável à modificação de uma unidade de glicosil com agentes que não PEG incluindo outras porções de PEG, porções terapêuticas e biomoléculas.

Uma abordagem enzimática pode ser usada para a
20 introdução seletiva de carboidratos Peguilados ou PPGuilados em um peptídeo ou glicopeptídeo. O método utiliza açúcares modificados contendo PEG, PPG ou um grupo funcional reativo mascarado e é combinado com a glicosiltransferase ou glicosintase apropriada.
25 Selecionando-se a glicosiltransferase que tornará a ligação carboidrato desejada e com a utilização do açúcar modificado como o substrato doador, PEG ou PPG podem ser introduzidos diretamente no esqueleto do peptídeo, nos resíduos de açúcar existentes de um glicopeptídeo ou em
30 resíduos de açúcar que foram adicionados a um peptídeo.

Em uma modalidade de exemplo, um aceitador para a sialiltransferase está presente no peptídeo a ser modificado tanto como uma estrutura de ocorrência naturalmente quanto uma colocada lá recombinante, 5 enzimática ou quimicamente. Aceitadores apropriados incluem, por exemplo, aceitadores de galactosil 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 10 habilitados na técnica (vide, por exemplo, Paulson e outros, *J. Biol. Chem.* 253:5617-5624 (1978)). Exemplos de sialiltransferases são aqui apresentados.

Em uma modalidade, um aceitador para a sialiltransferase está presente no glicopeptídeo a ser 15 modificado por síntese *in vivo* do glicopeptídeo. Tais glicopeptídeos podem ser sialilados usando os métodos reivindicados sem posterior modificação do padrão de glicosilação do glicopeptídeo. Alternativamente, os métodos da invenção podem ser usados para sialilar um peptídeo que 20 não inclui um aceitador adequado; um primeiro modifica o peptídeo para incluir um aceitador por métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Em uma modalidade de exemplo, um resíduo GalNAc é adicionado pela ação de uma GalNAc transferase.

25 Em uma modalidade exemplar, o aceitador de galactosil é montado por anexação de um resíduo de galactose a um aceitador apropriado ligado ao peptídeo, por exemplo um GlcNAc. O método inclui incubação do peptídeo a ser modificado com uma mistura de reação que contém uma 30 quantidade apropriada de uma galactosiltransferase (por

exemplo, gal β 1,3 ou gal β 1,4) e um doador de galactosil adequado (por exemplo, UDP-galactose). A reação é deixada para processar substancialmente até terminar ou alternativamente, a reação é terminada quando uma
5 quantidade pré-selecionada do resíduo de galactose é adicionada. Outros processos de montagem de um aceitador de sacarídeo selecionado ficarão aparentes aos habilitados na técnica.

Ainda em outra modalidade, os oligossacarídeos ligados
10 ao glicopeptídeo são primeiro "aparados", tanto no total quanto em parte, para expor tanto um aceitador para a sialiltransferase quanto uma porção à qual um ou mais resíduos adequados podem ser adicionados para obter um aceitador adequado. Enzimas, tais como,
15 glicosiltransferases e endoglicosidades (vide, por exemplo, Patente U.S. número 5.716.812) são úteis para reações de anexação e aparamento. Em uma outra modalidade desse método, as porções de ácido siálico do peptídeo são essencialmente completamente removidas (por exemplo, pelo
20 menos 90, pelo menos 95 ou pelo menos 99%), expondo um aceitador para um ácido siálico modificado.

Na discussão que se segue, o método da invenção é exemplificado pelo uso de açúcares modificados possuindo uma porção de PEG anexada aos mesmos. O foco da discussão é
25 para clareza da ilustração. Os habilitados na técnica apreciarão que a discussão é igualmente relevante para aquelas modalidades nas quais o açúcar modificado porta uma porção terapêutica, biomolécula ou outras.

Em uma modalidade exemplar da invenção em que um
30 resíduo de carboidrato é "aparado" antes da adição do

açúcar modificado, alta manose é retro-aparada para a estrutura biantenária de primeira geração. Um açúcar modificado que sustenta PEG é conjugado a um ou mais dos resíduos de açúcar expostos pelo "retro-aparamento". Em um
5 exemplo, uma porção de PEG é adicionada via uma porção de GlcNAc conjugada à porção de PEG. A GlcNAc modificada é anexada a um ou ambos dos resíduos de manose terminais da estrutura biantenária. Alternativamente, uma glcNAc não modificada pode ser adicionada a um ou ambos terminar das
10 espécies ramificadas.

Em outra modalidade exemplar, um uma porção de PEG é adicionada a um ou ambos dos resíduos de manose terminal da estrutura biantenária através de um açúcar modificado possuindo um resíduo de galactose, que é conjugado ao
15 resíduo de GlcNAc adicionado aos resíduos de manose terminal. Alternativamente, uma Gal não modificada pode ser adicionada a um ou ambos resíduos de GlcNAc terminal.

Ainda em outro exemplo, uma porção de PEG é adicionada ao resíduo de Gal usando um ácido siálico modificado como
20 aquele acima discutido.

Em outra modalidade exemplar, uma estrutura de manose superior é "retroaparada" à manose da qual a estrutura biantenária se ramifica. Em um exemplo, uma porção de PEG é adicionada via uma GlcNAc modificada com o polímero.
25 Alternativamente, uma GlcNAc não modificada é adicionada à manose, seguida por a Gal com uma porção de PEG anexada. Ainda em outra modalidade, resíduos Gal e GlcNAc não modificados são adicionados seqüencialmente à manose, seguido por uma porção de ácido siálico modificada com uma
30 porção de PEG.

Uma estrutura de manose superior também pode ser retro-aparada ao núcleo de tri-manosil elementar.

Em uma modalidade de exemplo adicional, manose é "retro-aparada" à GlcNAc à qual a primeira manose é anexada. A GlcNAc é conjugada a um resíduo de Gal que sustenta uma porção de PEG. Alternativamente, uma Gal não modificada é adicionada à GlcNAc, seguida pela adição de um ácido siálico modificado com um açúcar hidrossolúvel. Ainda em um exemplo adicional, a GlcNAc terminal é conjugada com Gal e a GlcNAc é subsequente fucosilada com uma fucose modificada que sustenta uma porção de PEG.

Manose superior também pode ser retro-aparada à primeira GlcNAc anexada à Asn do peptídeo. Em um exemplo, a GlcNAc do resíduo GlcNAc-(Fuc)_a é conjugada com a GlcNAc que sustenta um polímero hidrossolúvel. Em um outro exemplo, a GlcNAc do resíduo GlcNAc-(Fuc)_a é modificada com Gal, que sustenta um polímero hidrossolúvel. Ainda em uma modalidade adicional, a GlcNAc é modificada com Gal, seguida pela conjugação à Gal d um ácido siálico modificado com uma porção de PEG.

Outras modalidades de exemplo são apresentadas nas Publicações de Pedidos de Patente U.S. de domínio público: 20040132640; 20040063911; 20040137557; Pedidos de Patente U.S. Nos: 10/369.979; 10/410.913; 10/360.770; 10/410.945 e PCT/US02/32263 cada um desses é aqui incorporado por referência.

Os exemplo acima discutidos fornecem ma ilustração do poder dos métodos aqui apresentados. Com o uso dos métodos aqui descritos, é possível "retro-aparar" e construir um resíduo de carboidrato de substancialmente qualquer

estrutura desejada. O açúcar modificado pode ser adicionado ao terminal da porção de carboidrato como apresentado acima, ou ele pode ser intermediário entre o núcleo do peptídeo e o terminal do carboidrato.

5 Em uma modalidade de exemplo, um ácido siálico existente é removido de um glicopeptídeo com o uso de um sialidase, dessa forma desmascarando todos ou a maior parte dos resíduos de galactosil subjacentes. Alternativamente, um peptídeo ou glicopeptídeo é rotulado com resíduos de galactose, ou um resíduo de oligossacarídeo que termina em
10 uma unidade de galactose. Após a exposição ou adição dos resíduos de galactose, uma sialiltransferase adequada é usada para adicionar um ácido siálico modificado.

 Em uma outra modalidade de exemplo, uma enzima que
15 transfere ácido siálico em ácido siálico é utilizada. Esse método pode ser praticado sem tratamento de um glicano sialilado com uma sialidase para expor resíduos de glicano debaixo do ácido siálico. Um exemplo de polímero-ácido siálico modificado é um ácido siálico modificado com
20 poli(etileno glicol). Outras enzimas de exemplo que adicionam ácido siálico e porções de ácido siálico modificado em glicanos que incluem um resíduo de ácido siálico ou trocam um resíduo de ácido siálico existente em um glicano para essas espécies incluem ST3Gal3, CST-II,
25 ST8Sia-II, ST8Sia-III e ST8Sia-IV.

 Em uma abordagem adicional, uma funcionalidade reativa mascarada está presente no ácido siálico. O grupo reativo mascarado é preferivelmente não afetado pelas condições usadas para anexar o ácido siálico modificado ao peptídeo
30 de Fator VII/Fator VIIa. Depois da anexação covalente do

ácido siálico modificado ao peptídeo, a máscara é removida e o peptídeo é conjugado com um agente como PEG. O agente é conjugado ao peptídeo em uma maneira específica por sua reação como o grupo reativo não mascarado no resíduo de açúcar modificado.

Qualquer açúcar modificado pode ser usado com sua glicosiltransferase apropriada, dependendo dos açúcares terminais das cadeias laterais de oligossacarídeo do glicopeptídeo. Conforme discutido acima, o açúcar terminal do glicopeptídeo necessário para a introdução da estrutura PEGuilada pode ser introduzido naturalmente durante a expressão ou pode ser produzido após expressão usando a(s) glicosidase(s), glicosiltransferase(s) apropriadas ou mistura de glicosidase(s) e glicosiltransferase(s).

Em uma modalidade de exemplo adicional, UDP-galactose-PEG reage com β 1,4-galactosiltransferase, desse modo transferindo a galactose modificada para a estrutura terminal de N-acetilglicosamina adequada. Os resíduos de GlcNAc terminal no glicopeptídeo podem ser produzidos durante expressão, como pode ocorrer em tais sistemas de expressão como mamífero, inseto, planta ou fungos, mas também podem ser produzidos por tratamento do glicopeptídeo com uma sialidase e/ou glicosidase e/ou glicosiltransferase, como necessário.

Em uma outra modalidade de exemplo, uma GlcNAc transferase, como GNT1-5, é utilizada para transferir PEGuilada-GlcNAc a um resíduo de manose terminal em um glicopeptídeo. Ainda em uma outra modalidade de exemplo, estruturas de glicano ligadas em N e/ou ligada em O são enzimaticamente removidas de um glicopeptídeo para expor um

aminoácido ou um resíduo de glicosil terminal que é subseqüentemente conjugado com o açúcar modificado. Por exemplo, uma endoglicanase é usada para remover as estruturas ligadas em N de um glicopeptídeo para expor uma
5 GlcNAc terminal como uma GlcNAc-ligada-Asn no glicopeptídeo. UDP-Gal-PEG e a galactosiltransferase adequada são usados para introduzir a funcionalidade de PEG-galactose na GlcNAc exposta.

Em uma modalidade alternativa, o açúcar modificado é
10 adicionado diretamente ao esqueleto do peptídeo usando uma glicosiltransferase conhecida por transferir resíduos de açúcar para o esqueleto do peptídeo. Glicosiltransferases exemplares úteis na prática da presente invenção incluem, porém não estão limitadas a, GalNAc transferases (GalNAc
15 T1-14), GlcNAc transferases, fucosiltransferases, glicosiltransferases, xilosiltransferases, manosiltransferases e semelhantes. O uso desta abordagem permite a adição direta de açúcares modificados nos peptídeos que não possuem qualquer carboidrato ou,
20 alternativamente nos glicopeptídeos existentes. Em ambos os casos, a adição de açúcar modificado ocorre em posições específicas no esqueleto de peptídeo, conforme definido pela especificidade do substrato da glicosiltransferase e não em uma maneira aleatória como ocorre durante a
25 modificação de um esqueleto de peptídeo de proteína usando métodos químicos. Um conjunto de agentes pode ser introduzido nas proteínas ou glicopeptídeos que não possuem seqüência de peptídeo de substrato de glicosiltransferase por transformação por engenharia da seqüência de aminoácido
30 adequada na cadeia de polipeptídeo.

Em cada uma das modalidades exemplares estabelecidas acima, uma ou mais etapas de modificação química ou enzimática adicionais podem ser utilizadas seguindo-se a conjugação do açúcar modificado ao peptídeo. Em uma
5 modalidade exemplar, uma enzima (por exemplo, fucosiltransferase) é usada para anexar uma unidade de glicosil (por exemplo, fucose) ao açúcar modificado terminal anexado ao peptídeo. Em outro exemplo, uma reação enzimática é utilizada para "capear" sítios aos quais o
10 açúcar modificado falhou em conjugar. Alternativamente, uma reação química é utilizada para alterar a estrutura do açúcar modificado conjugado. Por exemplo, o açúcar modificado conjugado reage com agentes que estabilizam ou desestabilizam sua ligação com o componente de peptídeo ao
15 qual o açúcar modificado é anexado. Em outro exemplo, um componente do açúcar modificado é desprotegido, seguindo-se sua conjugação ao peptídeo. Uma pessoa habilitada perceberá que existe um conjunto de procedimentos enzimáticos e químicos que são úteis nos métodos da invenção em um
20 estágio após o açúcar modificado ser conjugado no peptídeo. Elaboração adicional do conjugado de açúcar-peptídeo modificado encontra-se dentro do escopo da invenção.

Enzimas e condições de reação para a preparação de conjugados da presente invenção são discutidos em detalhes
25 na parente do atual pedido bem como nos pedidos de patente PCT publicados de co-propriedade WO 03/031464, WO 04/033651, WO 04/099231.

Em uma modalidade selecionada, um peptídeo, expresso em células de inseto, é remodelado de modo que glicanos no
30 glicopeptídeo remodelado incluam um resíduo de glicosil

GlcNAc-Gal. A adição de GlcNAc e Gal pode ocorrer como reações separadas ou como uma reação única em um frasco único. Nesse exemplo, GlcNAc-transferase I e Gal-transferase I são usadas. A porção sialil modificada é
5 adicionada com o uso de ST3Gal-III.

Em uma outra modalidade, a adição de GlcNAc, Gal e Sia modificadas também pode ocorrer em um frasco de reação único, usando as enzimas apresentadas acima. Cada uma das etapas de remodelagem enzimática e glicoPEGuilação são
10 realizadas individualmente.

Quando o peptídeo é expresso em células de mamífero, diferentes métodos são de uso. Em uma modalidade, o peptídeo é conjugado sem necessidade de remodelagem antes da conjugação por contato do peptídeo com uma
15 sialiltransferase que transfere o ácido siálico modificado diretamente a um ácido siálico no peptídeo formando Sia-Sia-L-R¹, ou troca um ácido siálico no peptídeo pelo ácido siálico modificado, formando Sia-L-R¹. Uma enzima de exemplo de uso nesse método é CST-II. Outras enzimas que
20 adicionam ácido siálico a ácido siálico são conhecidas por aqueles habilitados na técnica e exemplos de tais enzimas são apresentados nas Figuras anexadas.

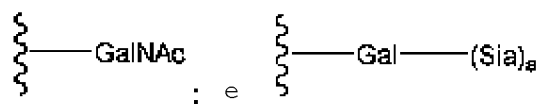
Ainda em um outro método de preparação de conjugados da invenção, o peptídeo expresso em um sistema de mamífero
25 é dessialilado com o uso de uma sialidase. O resíduo de Gal exposto é sialilado com um ácido siálico modificado com o uso de uma sialiltransferase específica para glicanos ligados em O, gerando um peptídeo com glicano ligado em O modificado. O peptídeo dessialilado, modificado é
30 opcionalmente parcialmente ou totalmente ressialilado pelo

198/239

uso de uma sialiltransferase como ST3GalIII.

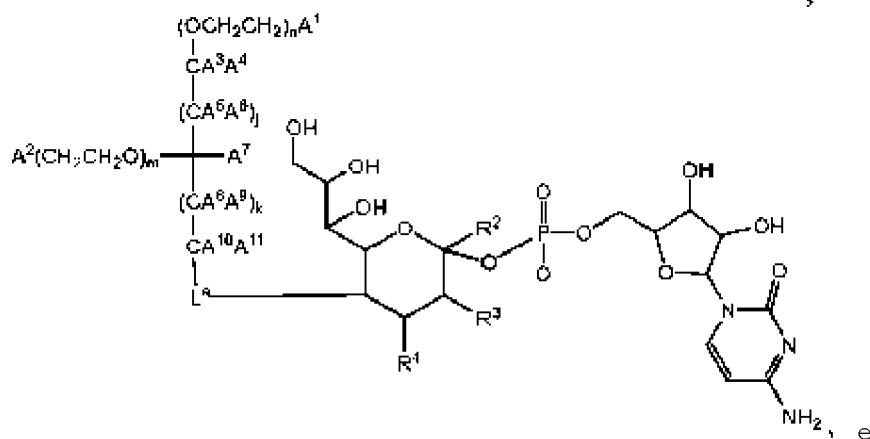
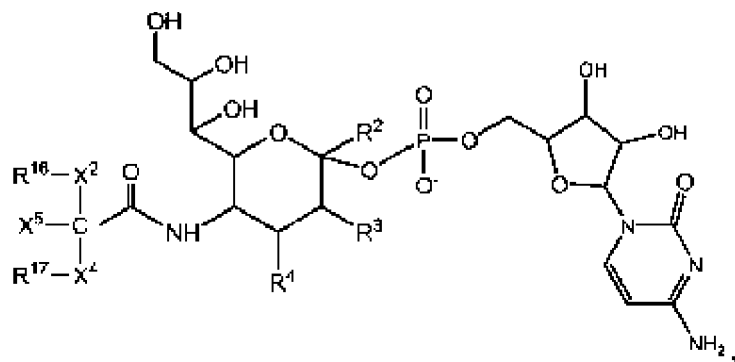
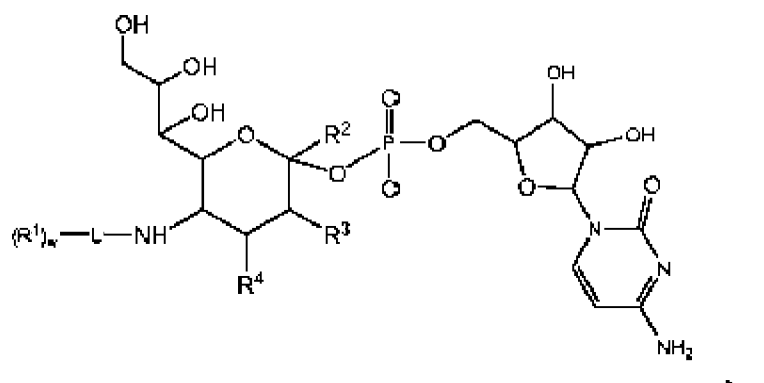
Em um outro aspecto, A invenção fornece um método de fazer um conjugado de peptídeo PEGuilado da invenção. O método inclui: (a) o contato de um peptídeo que compreende

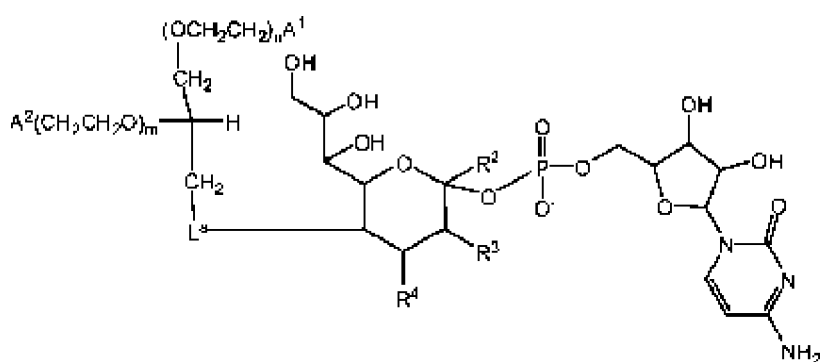
5 um grupo glicosil selecionado de:



Com um doador de PEG-ácido siálico que tem a fórmula que é

10 um membro selecionado de





5

em que as variáveis são como acima descrito, e uma enzima que transfere PEG-ácido siálico do referido doador para um membro selecionado de GalNAc, Gal e Sia do referido grupo glicosil, sob condições adequadas para a referida transferência. Um doador de ácido siálico modificado de exemplo é CMP-ácido siálico modificado, através de uma porção ligante, com um polímero, por exemplo, uma porção de poli(etileno glicol) de cadeia linear ou ramificada. Como aqui discutido, o peptídeo é opcionalmente glicosilado com GalNAc e/ou Gal e/ou Sia ("Remodelado") antes da anexação ao açúcar modificado. As etapas de remodelagem podem ocorrer em seqüência no mesmo frasco sem purificação do peptídeo glicosilado entre as etapas. Alternativamente, após uma ou mais etapas de remodelagem, o peptídeo glicosilado pode ser purificado antes de submetê-lo à próxima etapa de glicosilação ou glicoPEGuilação. Em uma modalidade de exemplo, o método também compreende a expressão do peptídeo em um hospedeiro. Em uma modalidade de exemplo, o hospedeiro é uma célula de mamífero ou uma célula de inseto. Em uma outra modalidade de exemplo, a célula de mamífero é um membro selecionado de uma célula BHK e células CHO e a célula de inseto é uma célula de *Spodoptera frugiperda*.

30

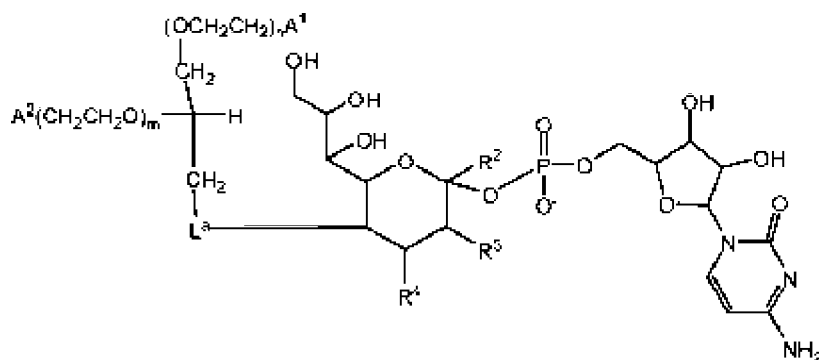
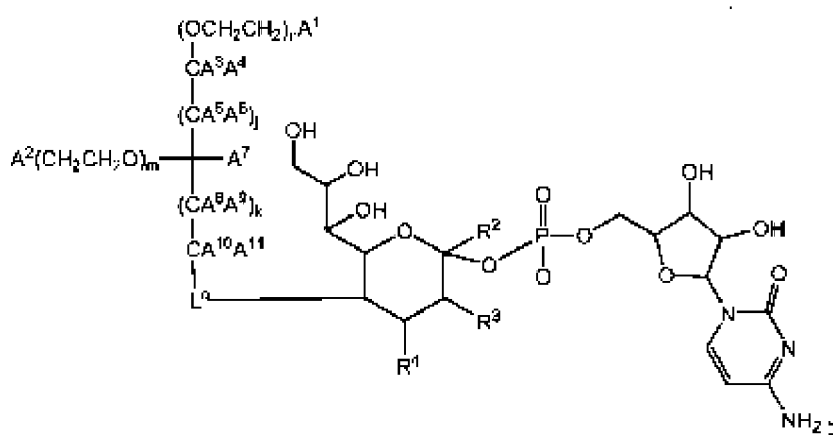
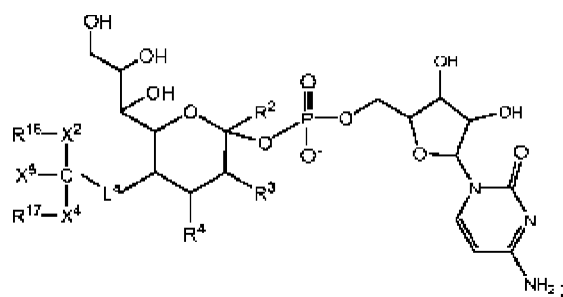
200/239

Como ilustrado nos exemplos e discutido adicionalmente abaixo, a colocação de uma porção aceitadora para o PEG-açúcar é realizada em qualquer número de etapas desejado. Por exemplo, em uma modalidade, a adição de GalNAC ao

5 peptídeo pode ser seguida por uma segunda etapa em que o PEG-açúcar é conjugado à GalNAC no mesmo frasco de reação. Alternativamente, essas duas etapas podem ser realizadas em um frasco único aproximadamente simultaneamente.

Em uma modalidade de exemplo, o doador de PEG-ácido

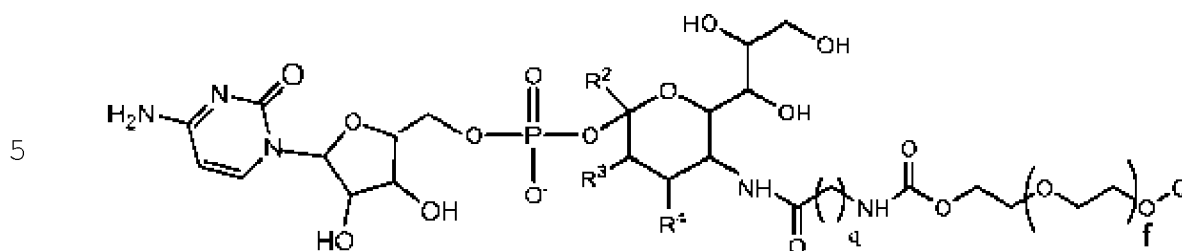
10 siálico tem a fórmula:



em que as variáveis são como acima descrito.

201/239

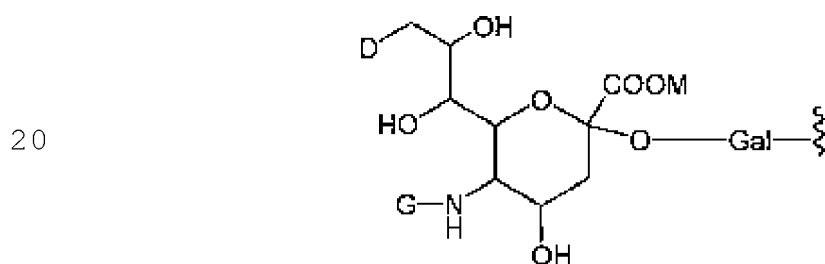
Em outra modalidade de exemplo, o doador de PEG-ácido siálico tem a fórmula:



em que as variáveis são como acima descrito.

Em uma modalidade de exemplo adicional, o peptídeo é
 10 expresso em um sistema de expressão adequado antes de ser
 glicoPEGuilado ou remodelado. Exemplos de sistemas de
 expressão incluem células Sf-9/baculovírus e de Ovário de
 Hamster da China (CHO).

Em uma modalidade de exemplo, a invenção fornece um
 15 método de fazer um conjugado de peptídeo que compreende um
 ligante de glicosil que compreende um resíduo de sialil
 modificado que tem a fórmula:



em que D é um membro selecionado de -OH e R^1 -L-HN-; G
 é um membro selecionado de R^1 -L e $-C(O)(C_1-C_6)alquil-R^1$; R^1
 25 é uma porção que compreende um membro selecionado de um
 resíduo de poli(etileno glicol) de cadeia linear e resíduo
 de poli(etileno glicol) ramificado; M é um membro
 selecionado de H, um metal e uma carga negativa única; L é
 um ligante que é um membro selecionado de uma ligação,
 30 alquil substituído ou não substituído e heteroalquil

202/239

substituído ou não substituído, de modo que quando D é OH, G é R¹-L-, e quando G é -C(O)(C₁-C₆)alquil, D é R¹-L-NH

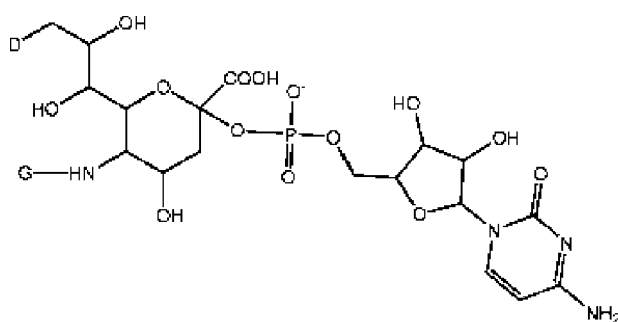
o referido método compreendendo: (a) o contato de um peptídeo que compreende a porção glicosil:

5



com uma porção doadora de PEG-ácido siálico que tem a fórmula:

10

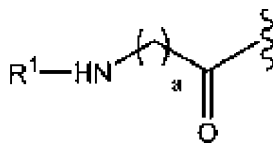


15

em que as variáveis são como acima descrito, e uma enzima que transfere o referido PEG-ácido siálico na Gal da referida porção glicosil, sob condições adequadas para a referida transferência.

Em uma modalidade de exemplo, L-R¹ tem a fórmula:

20

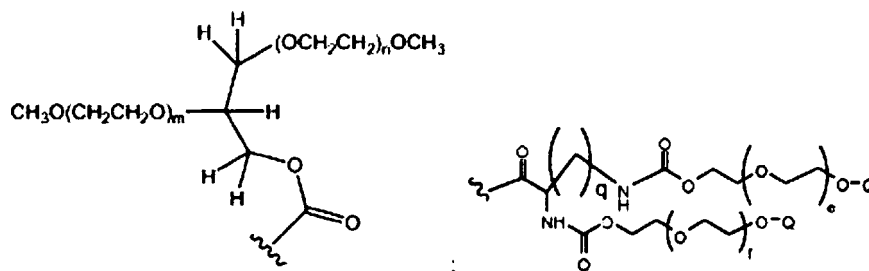


em que a é um número inteiro selecionado de 0 a 20.

Em uma outra modalidade de exemplo, R¹ tem uma

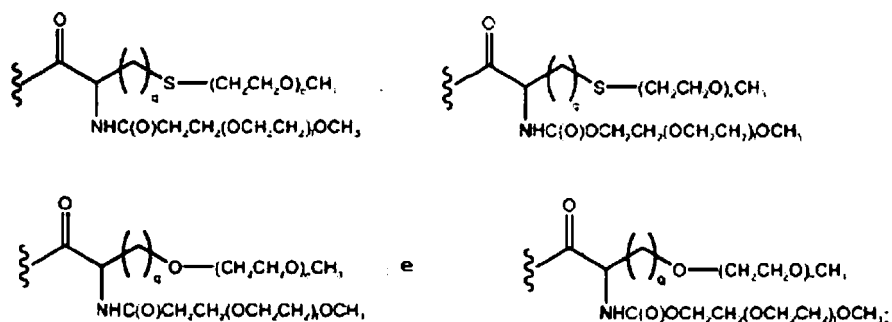
25 estrutura que é um membro selecionado de:

30



:

5



em que e, f, m e n são números inteiros independentemente selecionados de 1 a 2.500; e q é um
 10 número inteiro selecionado de 0 a 20.

Quantidades de grande escala ou de pequena escala de conjugado de peptídeo podem ser produzidas pelos métodos aqui descritos. Em uma modalidade de exemplo, a quantidade de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,5 mg a
 15 cerca de 100 kg. Em uma modalidade de exemplo, a quantidade de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,1 kg a cerca de 1 kg. Em uma modalidade de exemplo, a quantidade de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,5 kg a cerca de 10 kg. Em uma modalidade de exemplo, a quantidade
 20 de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,5 kg a cerca de 3 kg. Em uma modalidade de exemplo, a quantidade de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,1 kg a cerca de 5 kg. Em uma modalidade de exemplo, a quantidade de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,08 kg a
 25 cerca de 0,2 kg. Em uma modalidade de exemplo, a quantidade de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,05 kg a cerca de 0,4 kg. Em uma modalidade de exemplo, a quantidade de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,1 kg a cerca de 0,7kg. Em uma modalidade de exemplo, a quantidade
 30 de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,3 kg a

cerca de 1,75 kg. Em uma modalidade de exemplo, a quantidade de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 25 kg a cerca de 65 kg.

A concentração de peptídeo utilizada nas reações aqui
5 descritas é um membro selecionado de cerca de 0,5 a cerca de 10 mg de peptídeo/mL de mistura de reação. Em uma modalidade de exemplo, a concentração do peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,5 a cerca de 1 mg de peptídeo/mL de mistura de reação. Em uma modalidade de
10 exemplo, a concentração de peptídeo é um membro selecionado de cerca de 0,8 a cerca de 3 mg de peptídeo/mL de mistura de reação. Em uma modalidade de exemplo, a concentração do peptídeo é um membro selecionado de cerca de 2 a cerca de 6 mg de peptídeo/mL de mistura de reação. Em uma modalidade
15 de exemplo, a concentração do peptídeo é um membro selecionado de cerca de 4 a cerca de 9 mg peptídeo/mL de mistura de reação. Em uma modalidade de exemplo, a concentração do peptídeo é um membro selecionado de cerca de 1,2 a cerca de 7,8 mg de peptídeo/mL de mistura de
20 reação. Em uma modalidade de exemplo, a concentração do peptídeo é um membro selecionado de cerca de 6 a cerca de 9,5 mg de peptídeo/mL de mistura de reação.

A concentração de açúcar de nucleotídeo PEGuilado que pode ser utilizada nas reações aqui descritas é um
25 membro selecionado de cerca de 0,1 a cerca de 1,0 mM. Fatores que podem aumentar ou diminuir a concentração incluem o tamanho do PEG, tempo de incubação, temperatura, componentes do tampão, bem como o tipo, e concentração, de glicosiltransferase usada. Em uma modalidade de exemplo, a
30 concentração de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um membro

selecionado de cerca de 0,1 a cerca de 1,0 mM. Em uma modalidade de exemplo, a concentração de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um membro selecionado de cerca de 0,1 a cerca de 0,5 mM. Em uma modalidade de exemplo, a

5 concentração de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um membro selecionado de cerca de 0,1 a cerca de 0,3 mM. Em uma modalidade de exemplo, a concentração de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um membro selecionado de cerca de 0,2 a cerca de 0,7 mM. Em uma modalidade de exemplo, a

10 concentração de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um membro selecionado de cerca de 0,3 a cerca de 0,5 mM. Em uma modalidade de exemplo, a concentração de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um membro selecionado de cerca de 0,4 a cerca de 1,0 mM. Em uma modalidade de exemplo, a

15 concentração de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um membro selecionado de cerca de 0,5 a cerca de 0,7 mM. Em uma modalidade de exemplo, a concentração de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um membro selecionado de cerca de 0,8 a cerca de 0,95 mM. Em uma modalidade de exemplo, a

20 concentração de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um membro selecionado de cerca de 0,55 a cerca de 1,0 mM.

Os equivalentes molares de de açúcar de nucleotídeo PEGuilado que podem ser utilizados nas reações aqui descritas são baseados no número teórico de açúcares

25 PEGuilados que podem ser adicionados à proteína. O número teórico de açúcares PEGuilados é baseado no número teórico de sítios de sialilação na proteína bem como no peso molecular da proteína quando comparado ao peso molecular e dessa forma moles de açúcar de nucleotídeo PEGuilado. Em

30 uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de

açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 1 a 20. Em uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 1 a 20. Em uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 2 a 6. Em uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 3 a 17. Em uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 4 a 11. Em uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 5 a 20. Em uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 1 a 10. Em uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 12 a 20. Em uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 14 a 17. Em uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 7 a 15. Em uma modalidade de exemplo, os equivalentes molares de açúcar de nucleotídeo PEGuilado é um número inteiro selecionado de 8 a 16.

III. B. Dessialilação e GlicoPEGuilação simultânea

A presente invenção fornece um método "one-pot" de glicopeguilação. O método de *one-pot* é distinto de outros processos de exemplo para fazer um conjugado de peptídeo, que emprega uma de-sialilação seqüencial com sialidase,

subseqüente purificação do asialo-peptídeo em uma coluna de troca de ânion, então glicoPEGuilação com o uso de CMP-ácido siálico-PEG e uma glicosiltransferase (como ST3Gal3), exoglicosidase ou uma endoglicosidase. O conjugado de
5 peptídeo é então purificado via troca de ânion seguida por cromatografia de exclusão por tamanho para produzir o conjugado de peptídeo purificado.

O método de *one-pot* é um método aperfeiçoado para produzir um conjugado de peptídeo. Nesse método, as reações
10 de de-sialilação e glicoPEGuilação são combinadas em uma reação de *one-pot* que evita a primeira etapa de cromatografia de troca de ânion usada no processo anteriormente descritos para purificar o assialo peptídeo. Essa redução nas etapas do processo produz várias
15 vantagens. Primeiro, o número de etapas de processo necessárias para produzir o conjugado de peptídeo é reduzido, o que também reduz a complexidade de operação do processo. segundo, o tempo do processo para a produção dos conjugados de peptídeo é reduzido, por exemplo, de 4 a 2
20 dias. Isso reduz as necessidades de material bruto e custos de controle de qualidade associados com controles em-processo. Terceiro, a invenção utiliza menos sialidase, por exemplo, até 20 vezes menos sialidase, por exemplo, 500 mU/L são necessários para produzir o conjugado de peptídeo
25 em relação ao processo. Essa redução no uso de sialidase reduz significativamente a quantidade de contaminantes, como sialidase, na mistura de reação.

Em uma modalidade de exemplo, um conjugado de peptídeo é preparado pelo seguinte método. Em uma primeira etapa, um
30 peptídeo é combinado com a sialidase, um açúcar modificado

da invenção, e uma enzima capaz de catalisar a transferência do grupo de ligação de glicosil do açúcar modificado ao peptídeo, portanto preparando o conjugado de peptídeo. Qualquer sialidase pode ser usada nesse método.

5 Exemplos de sialidasas de uso na invenção podem ser encontrados no banco de dados CAZY (veja, <http://afinb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html> e www.cazy.org/CAZY). Sialidasas de exemplo podem ser adquiridas de qualquer número de fontes (QA-Bio, Calbiochem, Marukin, Prozyme

10 etc.). Em uma modalidade de exemplo, a sialidase é um membro selecionado de sialidasas citoplasmáticas, sialidasas lisossômicas, α -sialidasas, e endosialidasas. Em uma outra modalidade de exemplo, a sialidase usada é produzida a partir de bactérias como

15 *Clostridium perfringens* ou *Streptococcus pneumoniae*, ou de um vírus como um adenovírus. Em uma modalidade de exemplo, a enzima capaz de catalisar a transferência do grupo de ligação de glicosil do açúcar modificado ao peptídeo é um membro selecionado de uma glicosiltransferase, como

20 sialiltransferases e fucosiltransferases, bem como exoglicosidasas e endoglicosidasas. Em uma modalidade de exemplo, a enzima é uma glicosiltransferase, que é ST3Gal3. Em uma outra modalidade de exemplo, a enzima usada é produzida a partir de bactérias como *Escherichia Coli* ou um

25 fungo como *Aspergillus niger*. Em uma outra modalidade de exemplo, a sialidase é adicionada ao peptídeo antes da glicosiltransferase por um tempo especificado, permitindo que a reação de sialidase prossiga antes do início da reação de glicoPEGuilação com adição do reagente de PEG-

30 ácido siálico e a glicosiltransferase. Vários desses

exemplos são aqui discutidos. Finalmente, qualquer açúcar modificado aqui descrito pode ser utilizado nessa reação.

Em uma outra modalidade de exemplo, o método também compreende uma etapa de "capping". Nessa etapa, ácido
5 siálico não PEGuilado adicional é adicionado à mistura de reação. Em uma modalidade de exemplo, esse ácido siálico é adicionado ao peptídeo ou conjugado de peptídeo portanto evitando adição adicional de PEG-ácido siálico. Em uma
10 outra modalidade de exemplo, esse ácido siálico impede a função da glicosiltransferase na mistura de reação, interrompendo eficazmente a adição de grupos de ligação de glicosil ao peptídeo ou conjugados de peptídeo. Mais
importantemente, o ácido siálico que é adicionado à mistura de reação cobre os glicanos não glicoPEGuilados assim
15 fornecendo um conjugado de peptídeo que tem melhor farmacocinética. Em adição, essa sialidase pode ser adicionada diretamente à mistura de reação de glicoPEGuilação quando a extensão da PEGuilação a certas
quantidades é desejada sem purificação prévia.

20 Em uma modalidade de exemplo, depois da etapa de cobertura ("capping"), menos que cerca de 50% dos sítios de sialilação no peptídeo ou conjugado de peptídeo não compreendem uma porção sialil. Em uma modalidade de
exemplo, depois da etapa de cobertura ("capping"), menos
25 que cerca de 40% dos sítios de sialilação no peptídeo ou conjugado de peptídeo não compreendem uma porção sialil. Em uma modalidade de exemplo, depois da etapa de cobertura
("capping"), menos que cerca de 30% dos sítios de
sialilação no peptídeo ou conjugado de peptídeo não
30 compreendem uma porção sialil. Em uma modalidade de

exemplo, depois da etapa de cobertura ("capping"), menos que cerca de 20% dos sítios de sialilação no peptídeo ou conjugado de peptídeo não compreendem uma porção sialil. Em uma modalidade de exemplo, depois da etapa de cobertura

5 ("capping"), menos que cerca de 10% dos sítios de sialilação no peptídeo ou conjugado de peptídeo não compreendem uma porção sialil. Em uma modalidade de exemplo, entre cerca de 20% e cerca de 5% dos sítios de sialilação no peptídeo ou conjugado de peptídeo não

10 compreendem uma porção sialil. Em uma modalidade de exemplo, entre cerca de 25% e cerca de 10% dos sítios de sialilação no peptídeo ou conjugado de peptídeo não compreendem uma porção sialil. Em uma modalidade de exemplo, depois da etapa de cobertura ("capping"),

15 essencialmente todos os sítios de sialilação no peptídeo ou conjugado de peptídeo compreendem uma porção sialil.

III. C. Dessialilação e modificação seletiva de peptídeos

Em uma outra modalidade de exemplo, a presente invenção fornece um método para dessialilação de um

20 peptídeo. O método preferivelmente fornece um peptídeo que é pelo menos cerca de 40%, preferivelmente 45%, preferivelmente cerca de 50%, preferivelmente cerca de 55%, preferivelmente cerca de 60%, preferivelmente cerca de 65%, preferivelmente cerca de 70%, preferivelmente cerca de 75%,

25 preferivelmente cerca de 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente, pelo menos 92%, preferivelmente pelo menos 94%, ainda mais preferivelmente pelo menos 96%, ainda mais preferivelmente pelo menos 98%, e ainda mais

30 preferivelmente 100% dissialilados.

O método inclui o contato do peptídeo com uma sialidase, preferivelmente por um período de tempo. O período de tempo pré-selecionado é suficiente para dessialilar o peptídeo ao grau desejado. Em uma modalidade preferida, o peptídeo dessialilado é separado da sialidase quando o grau desejado de dessialilação é atingido. Uma reação de dessialilação e ciclo de purificação de exemplo é aqui apresentada.

Aqueles habilitados são capazes de determinar um período de tempo pré-selecionado adequado pelo qual conduzir a reação de dessialilação. Em uma modalidade de exemplo, o período é de menos que 24 horas, preferivelmente menos que 8 horas, mais preferivelmente menos que 6 horas, mais preferivelmente menos que 4 horas, mais preferivelmente menos que 2 horas e ainda mais preferivelmente menos que 1 hora.

Em uma outra modalidade de exemplo, na preparação de conjugado de peptídeo ao final da reação de dessialilação, pelo menos 10% dos membros da população de peptídeos tem apenas um único ácido siálico anexado a ele, preferivelmente pelo menos 20%, mais preferivelmente pelo menos 30%, ainda mais preferivelmente pelo menos 40%, ainda mais preferivelmente pelo menos 50% e mais preferivelmente pelo menos 60%, e ainda mais preferivelmente completamente dessialilado.

Ainda em uma modalidade de exemplo adicional, na preparação ao final da reação de dessialilação, pelo menos 10% dos membros da população dos peptídeos são totalmente dessialilados, preferivelmente pelo menos 20%, mais preferivelmente pelo menos 30%, mais preferivelmente pelo

menos 40%, ainda mais preferivelmente pelo menos 50% e ainda mesmo mais preferivelmente pelo menos 60%.

Ainda em uma outra modalidade de exemplo, na preparação de conjugado de peptídeo ao final da reação de
5 dessialilação, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50% ou 60% dos membros da população de peptídeo tem apenas um único ácido siálico, e pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50% ou 60% do peptídeo é totalmente dessialilado.

Em uma modalidade preferida, na preparação ao final da
10 reação de dessialilação, pelo menos 50% da população de peptídeos é totalmente dessialilada e pelo menos 40% dos membros da população de peptídeo sustenta apenas uma única porção de ácido siálico.

Após a dessialilação, o peptídeo é opcionalmente
15 conjugado com um açúcar modificado. Um exemplo de açúcar modificado inclui uma porção sacaril ligada a uma porção de poli(etileno glicol) ramificado ou linear. A conjugação é catalisada por uma enzima que transfere o açúcar modificado de um doador de açúcar modificado para um aminoácido ou
20 resíduo de glicosil do peptídeo. Um doador de açúcar modificado de exemplo é um CMP-ácido siálico que sustenta uma porção de poli(etileno glicol) ramificado ou linear. Um exemplo de porção de poli(etileno glicol) tem um peso molecular de pelo menos cerca de 2 KDa, mais
25 preferivelmente pelo menos cerca de 5 KDa, mais preferivelmente pelo menos cerca de 10 KDa, preferivelmente pelo menos cerca de 20 KDa, mais preferivelmente pelo menos cerca de 30 KDa, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 40 KDa.

30 Em uma modalidade de exemplo, a enzima utilizada para

transferir a porção do açúcar modificado do doador de açúcar modificado é uma glicosiltransferase, por exemplo, sialiltransferase. Uma sialiltransferase de exemplo de uso nos métodos da invenção é ST3Gal3.

5 Um método de exemplo da invenção resulta em um peptídeo modificado que sustenta pelo menos um, preferivelmente pelo menos dois, preferivelmente pelo menos três grupos de modificação. Em uma modalidade, o peptídeo produzido sustenta um único grupo de modificação na cadeia
10 leve do peptídeo. Em uma outra modalidade, o método fornece um peptídeo modificado que sustenta um único grupo de modificação na cadeia pesada. Ainda em uma outra modalidade, o método fornece um peptídeo modificado com um único grupo de modificação na cadeia leve e um único grupo
15 de modificação na cadeia pesada.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de preparação de um peptídeo modificado. O método inclui o contato do peptídeo com um doador de açúcar modificado que sustenta um grupo de modificação e uma enzima capaz de
20 transferir a porção de açúcar modificado do doador de açúcar modificado para um aminoácido ou resíduo de glicosil do peptídeo.

Em uma modalidade de exemplo, o método fornece uma população de peptídeos modificados em que pelo menos 40%,
25 preferivelmente pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70% e ainda mais preferivelmente pelo menos 80% dos membros da população são mono-conjugados na cadeia leve do peptídeo.

Em uma modalidade de exemplo, o método fornece uma
30 população de peptídeos modificados em que pelo menos 40%,

preferivelmente pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70% e ainda mais preferivelmente pelo menos 80% dos membros da população são di-conjugados na cadeia leve do peptídeo.

5 Em uma modalidade de exemplo desse aspecto, o método fornece uma população de peptídeos modificados em que não mais que 50%, preferivelmente não mais que 30%, preferivelmente não mais que 20%, mais preferivelmente não mais que 10% dos membros da população são mono-conjugados
10 na cadeia pesada do peptídeo.

 Em uma modalidade de exemplo desse aspecto, o método fornece uma população de peptídeos modificados em que não mais que 50%, preferivelmente não mais que 30%, preferivelmente não mais que 20%, mais preferivelmente não
15 mais que 10% dos membros da população são di-conjugados na cadeia pesada do peptídeo.

 O peptídeo pode ser submetido à ação de uma sialidase antes da etapa de contato, ou o peptídeo pode ser usado sem dessialilação prévia. Quando o peptídeo faz contato com uma
20 sialidase ele pode ser completamente dessialilado ou apenas parcialmente dessialilado. Em uma modalidade preferida, o peptídeo é pelo menos parcialmente dessialilado antes da etapa de contato. O peptídeo pode ser essencialmente completamente dessialilado (essencialmente assialo) ou
25 apenas parcialmente dessialilado. Em uma modalidade preferida, o peptídeo dessialilado é uma das modalidades dessialiladas acima descritas.

III. D. Alíquotas adicionais de reagentes adicionados na síntese de conjugados de peptídeo

30 Em uma modalidade de exemplo da síntese dos conjugados

de peptídeo aqui descritos, uma ou mais alíquotas adicionais de um componente/reagente da reação são adicionadas à mistura de reação depois de um período de tempo selecionado. Em uma modalidade de exemplo, o conjugado de peptídeo é um conjugado de peptídeo. Em uma outra modalidade de exemplo, um componente/reagente da reação adicionado é um nucleotídeo de açúcar modificado. A introdução de um nucleotídeo de açúcar modificado em uma reação aumentará probabilidade de levar a reação de glicoPEGuilação à finalização. Em uma modalidade de exemplo, o açúcar de nucleotídeo é um CMP-SA-PEG aqui descrito. Em uma modalidade de exemplo, um componente/reagente da reação adicionado é uma sialidase. Em uma modalidade de exemplo, um componente/reagente da reação adicionado é uma glicosiltransferase. Em uma modalidade de exemplo, um componente/reagente da reação adicionado é magnésio. Em uma modalidade de exemplo, a alíquota adicional adicionada representa cerca de 10%, ou 20%, ou 30%, ou 40%, ou 50%, ou 60%, ou 70%, ou 80% ou 90% da quantidade original adicionada no início da reação. Em uma modalidade de exemplo, um componente/reagente da reação é adicionado à reação cerca de 3 horas, ou 6 horas, ou 8 horas, ou 10 horas, ou 12 horas, ou 18 horas, ou 24 horas, ou 30 horas, ou 36 horas depois de seu início.

III. E. Purificação de conjugado de peptídeos

Os produtos produzidos pelos processos acima podem ser usados sem purificação. No entanto, é usualmente preferível recuperar o produto e um ou mais dos intermediários, por exemplo, açúcares de nucleotídeo, espécies de PEG ramificado e linear, açúcares modificados e açúcares de

nucleotídeo modificados. Técnicas padrão bem conhecidas para recuperação de peptídeo glicosilado como cromatografia de camada fina ou espessa, cromatografia em coluna, cromatografia de troca iônica, ou filtração de membrana
5 podem ser usadas. É preferível usar filtração de membrana, mais preferivelmente utilizando uma membrana osmótica reversa, ou uma ou mais técnicas cromatográficas em coluna para a recuperação como é discutido posteriormente nessa e na literatura aqui citada. Por exemplo, filtração de
10 membrana em que as membranas têm valor de corte de peso molecular de cerca de 3.000 a cerca de 10.000 pode ser usada para remover proteínas como glicosil transferases. Em certos casos, as diferenças de valor de corte de peso molecular entre a impureza e o produto serão utilizadas
15 para assegurar a purificação do produto. Por exemplo, para purificar o produto peptídeo-SA-PEG-40 kD de CMP-SAPEG-40KD que não reagiu, deve ser escolhido um filtro que permitirá, por exemplo, que peptídeo -SA-PEG40KD permaneça na retenção enquanto permite que CMP-SA-PEG-40KD flua no filtrado.
20 Nanofiltração ou osmose reversa podem ser então usadas para remover sais e/ou purificar os sacarídeos do produto (veja, por exemplo, WO 98/15581). Membranas de nanofiltro são uma classe de membranas de osmose reversa que passam sais monovalentes mas retêm sais polivalentes e solutos não
25 carregados maiores que cerca de 100 a cerca de 2.000 Daltons, dependendo da membrana usada. Portanto, em uma aplicação típica, sacarídeos preparados pelos métodos da presente invenção serão retidos na membrana e sais de contaminação passarão através dela.
30 Se o peptídeo for produzido intracelularmente, como

uma primeira etapa, os resíduos em partículas, quer de células hospedeiras quer fragmentos de lise, são removidos. Após a glicoPEGuilação, o peptídeo PEGuilado é purificado por métodos reconhecidos na técnica, por exemplo, por 5 centrifugação ou ultrafiltração; opcionalmente, a proteína pode ser concentrada com um filtro de concentração de proteínas disponível no comércio, seguindo-se da separação da variante de peptídeo de outras impurezas por uma ou mais etapas selecionadas dentre cromatografia por 10 imunoafinidade, fracionamento de coluna de troca de íons (por exemplo, em dietilamino-etila (DEAE) ou em matrizes contendo grupos carboxi-metil ou sulfo-propil), cromatografia sobre Azul-Sefarose, CM Azul-Sefarose, MONO-Q, MONO-S, lentilha-lectina-Sefarose, WGA Sefarose, Con A- 15 Sefarose, Éter Toyopearl, Butil Toyopearl, Fenil Toyopearl, ou proteína A Sefarose, cromatografia SDS-PAGE, cromatografia sobre sílica, cromato-focalização, HPLC de fase reversa (por exemplo, sílica gel com um grupo alifático anexado), filtração por gel, empregando-se, por 20 exemplo, peneiras moleculares de Sephadex ou cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia em colunas que se ligam seletivamente ao polipeptídeo, e etanol, ou precipitação de sulfato de amônio. A purificação pode ser usada para separar uma cadeia do conjugado de peptídeo de 25 Fator VII/Fator VIIa da outra, como também descrito posteriormente nessa seção.

Os glicopeptídeos modificados produzidos em cultura são geralmente isolados por extração inicial de células, enzimas etc., seguindo-se uma ou mais etapas de 30 concentração, extração de sal, troca de íons aquosos, ou de

cromatografia de exclusão por tamanho. Além disso, a glicoproteína modificada pode ser purificada por cromatografia de afinidade. Em seguida pode-se empregar HPLC para as etapas finais de purificação.

5 Um inibidor de protease pode ser incluído em qualquer uma das etapas acima para inibir a proteólise e podem ser incluídos antibióticos ou conservantes para impedir o crescimento de contaminantes adventícios. Os inibidores de protease usados nas etapas anteriores podem ser inibidores
10 de baixo peso molecular, incluindo antidor, alfa-1-antitripsina, anti-trombina, leupeptina, amastatina, quimostatina, banzamidin, bem como outros inibidores de serina de protease (ou seja serpinas). Geralmente, inibidores de serina protease devem ser usados em
15 concentrações que variam de 0,5 – 100 μM , embora quimostatina em cultura de células possa ser usada em concentrações de até 200 μM . Outros serina inibidores de protease incluirão inibidores específicos para a quimiotripsina-like, subtilisina-like, alfa/beta hidrolase,
20 ou os clãs de peptidase de sinal de serina proteases. Além de serina proteases, outros tipos de inibidores de protease também podem ser usados, incluindo inibidores de cisteína protease (1 – 10 μM) e inibidores de aspártico protease (1 – 5 μM), bem como inibidores de protease não específicos
25 como pepstatina (0,1 – 5 μM). Inibidores de protease usados nessa invenção também podem incluir inibidores de protease naturais, como o inibidor de hirustasina isolado de sanguessuga. Em algumas modalidades, inibidores de protease compreenderão peptídeos sintéticos ou anticorpos que são
30 capazes de se ligar com especificidade ao sítio catalítico

de protease para estabilizar Fator VII/Fator VIIa sem interferir com a reação de glicosilação.

Em uma outra modalidade, sobrenadantes de sistemas que produzem o glicopeptídeo modificado da invenção são primeiro concentrados empregando-se um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Depois da etapa de concentração, o concentrado pode ser aplicado a uma matriz adequada de purificação.

Por exemplo, uma matriz de afinidade adequada pode compreender, um ligante para o peptídeo, uma molécula de lecitina ou de anticorpo ligada a um suporte adequado. Alternativamente, pode ser empregada uma resina de troca de ânions, por exemplo, uma matriz ou substrato que tenha grupamentos DEAE pendentos. As matrizes adequadas incluem acrilamida, agarose, dextrano, celulose ou outros tipos habitualmente empregados na purificação de proteínas. Alternativamente, pode ser empregada uma etapa de troca de cátions. Os trocadores de cátions adequados incluem diversas matrizes insolúveis que compreendem grupos sulfopropil ou carboximetil. Os grupos sulfopropil são especialmente preferidos.

Outros métodos de uso na purificação incluem cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), cromatografia de hidroxapatita, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia em azul Sefarose. Esses e outros métodos úteis são ilustrados na Patente Provisória U.S. de co-autoria No. (Proceso No. 40853-01-5168-P1, depositada em 6 de maio de 2005).

Uma ou mais etapas de RP-HPLC que empregam meios de

RP-HPLC hidrófobos, por exemplo, gel de sílica tendo grupos metil pendentos ou outros grupos alifáticos, podem ser empregados para purificar ainda mais a composição de conjugado de polipeptídeos. Algumas ou todas as etapas de purificação acima ou todas elas, em diversas combinações, podem também ser empregadas para produzir uma glicoproteína modificada essencialmente homogênea.

O glicopeptídeo modificado da invenção que resulta de uma fermentação em grande escala pode ser purificado por métodos análogos aos descritos por Urdal e cols., *J. Chromatog.* **296**: 171 (1984). Essa referência descreve duas etapas de RP-HPLC em sequência para a purificação de IL-2 humana recombinante sobre uma coluna de HPLC preparatório. Alternativamente, podem ser utilizadas técnicas tais como cromatografia de afinidade, para a purificação da glicoproteína modificada.

Em uma modalidade de exemplo, a purificação é realizada pelos métodos apresentados na Patente Provisória U.S. de domínio público, No. 60/665.588, depositada em 24 de março de 2005.

De acordo com a presente invenção, peptídeos PEGuilados ou conjugados de peptídeo produzidos via dessialilação sequencial ou sialilação simultânea podem ser purificados ou resolvidos pelo uso de um gradiente de cloreto de magnésio.

IV. Composições farmacêuticas

Em um outro aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica. A composição farmacêutica inclui um diluente farmaceuticamente aceitável e um conjugado covalente entre uma porção de PEG de ocorrência não natural, porção

terapêutica ou biomolécula e um peptídeo glicosilado ou não glicosilado. O polímero, porção terapêutica ou biomolécula é conjugado ao peptídeo via um grupo de ligação de glicosil intacto interposto e ligado de forma covalente ao peptídeo e ao polímero, porção terapêutica ou biomolécula

Composições farmacêuticas da invenção são adequadas para uso em uma variedade de sistemas de liberação de medicamento. Formulações adequadas para uso na presente invenção são encontradas em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17^a ed. (1985). Para uma breve revisão dos métodos para liberação de medicamento, veja, Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Em uma modalidade de exemplo, a formulação farmacêutica compreende um peptídeo conjugado e um diluente farmaceuticamente aceitável que é um membro selecionado de cloreto de sódio, dihidrato de cloreto de cálcio, glicilglicina, polissorbato 80, e manitol. Em uma outra modalidade de exemplo, o diluente farmaceuticamente aceitável é cloreto de sódio e glicilglicina. Em uma outra modalidade de exemplo, o diluente farmaceuticamente aceitável é dihidrato de cloreto de cálcio e polissorbato 80. Em uma outra modalidade de exemplo, o diluente farmaceuticamente aceitável é manitol.

As composições farmacêuticas podem ser formuladas para qualquer modo adequado de administração, incluindo, por exemplo, a administração tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraniana, intraperitonial, subcutânea ou intramuscular. Para a administração parenteral, tal como por injeção subcutânea, o veículo compreende de

preferência, água, solução salina, álcool, uma gordura, uma
cera ou um tampão. Para a administração oral, qualquer um
dos veículos acima ou um veículo sólido, tal como manitol,
lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica,
5 talco, celulose, glicose, sacarose carbonato de magnésio
pode ser empregado. Micro-esferas biodegradáveis (tal como
de polilactato poliglicolato) podem também ser empregadas
como veículos para as composições farmacêuticas dessa
invenção. As micro-esferas biodegradáveis adequadas são
10 reveladas, por exemplo, na Patente U.S. 4.897.268 e
5.075.109.

Habitualmente, as composições farmacêuticas são
administradas por via parenteral, por exemplo, por via
intravenosa. Assim, a invenção propõe composições para a
15 administração parenteral que compreendem o composto
dissolvido ou suspenso em um veículo aceitável, de
preferência um veículo aquoso, por exemplo, água, água
tamponada, solução salina, PBS e outros. As composições
podem conter substâncias auxiliares farmaceuticamente
20 aceitáveis como necessário para se aproximar de condições
fisiológicas, como ajuste de pH e agentes de tamponamento,
agentes de ajuste de tonicidade, agentes umectantes,
detergentes e outros.

Essas composições podem ser esterilizadas por técnicas
25 de esterilização convencionais ou podem se esterilizadas
por filtração. As soluções aquosas resultantes podem ser
acondicionadas para uso conforme estão, ou liofilizadas,
sendo o preparado liofilizado combinado com um veículo
aquoso estéril antes da administração. O pH dos preparados
30 se encontrará tipicamente entre 3 e 11, sendo mais

preferível entre 5 e 9, e o mais preferível de 7 a 8.

Em algumas modalidades, os glicopeptídeos da invenção podem ser incorporados a lipossomos formados de lipídios padrão formadores de vesículas. Vários métodos são
5 disponíveis para a preparação de lipossomos, conforme descrito em Szoka e outros, Ann Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980); Patentes U.S. 4.235.871, 4.501.728 e 4.837.0128. O direcionamento de lipossomos empregando-se uma variedade de agentes de direcionamento (por exemplo,
10 sialil galactosídeos da invenção) é bem conhecido na técnica (veja, por exemplo, Patente U.S. 4.957.773 e 4.603.044).

Métodos padrão para o acoplamento de agentes de direcionamento a lipossomos podem ser usados. Estes métodos
15 geralmente abrangem a incorporação a lipossomos de componentes lipídios, tais como fosfatidiletanolamina, que podem ser ativados para fixação dos agentes de direcionamento ou compostos lipofílicos derivados tais como glicopeptídeos derivados de lipídeos da invenção.

20 Os mecanismos de direcionamento geralmente exigem que os agentes de direcionamento estejam posicionados na superfície do lipossomo de um modo tal, que as porções alvo estejam disponíveis para a interação com o alvo, por exemplo, um receptor de superfície celular. Os carboidratos
25 da invenção podem ser ligados a uma molécula de lipídios antes do lipossomo se formar empregando-se métodos conhecidos daqueles habilitados na técnica (por exemplo, alquilação ou acilação do grupo hidroxil presente no carboidrato com um haleto de alquila de cadeia longa ou com
30 um ácido graxo, respectivamente). Alternativamente, o

lipossomo pode ser projetado de tal modo que uma porção conectora é primeiro incorporada à membrana no momento da formação da membrana. A porção conectora deve ter uma porção lipofílica, que é firmemente engastada e ancorada na membrana. Ela também deve ter uma porção reativa, que seja disponível quimicamente na superfície aquosa do lipossomo. A porção reativa é selecionada de modo tal, que ela será adequada quimicamente para formar uma ligação química estável com o agente de direcionamento ou carboidrato, que é acrescentado mais tarde. Em alguns casos é possível se ligar diretamente o agente de direcionamento à molécula conectora, mas na maioria dos casos é mais adequado se empregar uma terceira molécula para agir como uma ponte química, ligando desse modo a molécula conectora que se encontra dentro da membrana com o agente de direcionamento ou carboidrato que é estendido, nas três dimensões para fora da superfície da vesícula.

Os compostos preparados por métodos da invenção podem também ter uso como reagentes de diagnóstico. Por exemplo, compostos rotulados, por exemplo, podem ser usados para localizar áreas de inflamação ou metástase tumoral em um paciente sob suspeita de ter uma inflamação. Para tal fim, os compostos podem ser rotulados com ^{125}I , ^{14}C ou trítio.

Métodos preparatórios para espécies de uso na preparação de composições da invenção são geralmente apresentados em várias publicações de patente, por exemplo, US 20040137557; WO 04/083258; e WO 04/033651. Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar os conjugados, e métodos da presente invenção, mas não devem limitar a invenção reivindicada.

EXEMPLOS**EXEMPLO 1****Dessialilação de Fator VIIa.**

Fator VIIa que foi expresso em meio livre de soro,
5 Fator VIIa que foi produzido em meio contendo soro, mais
três mutantes de Fator VIIa N145Q, N322Q, e análogo DVQ
(V158D/E296V/M298Q).

Na preparação para dessialilação enzimática, Fator
VIIa foi dialisado em MES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 50mM
10 MES, pH 6 de um dia para o outro a 4°C em tubo de diálise
Snakeskin com um MWCO de 10 KDa. Dessialilação de Fator
VIIa (1 mg/mL) foi realizada com 10 U/L sialidase solúvel
de *Arthrobacter ureafaciens* (Calbiochem) a 32°C por 18
horas no tampão trocado.

15 EXEMPLO 2**Sialil-PEGuilação de Fator VIIa.**

Sialil-PEGuilação ("GlicoPEGuilação") foi realizada em
assialo-Fator VIIa (1 mg/mL) com 100 U/L ST3Gal-III e 200
µM CMP-ácido siálico-PEG (40 KDa, 20 KDa, 10 KDa, 5 KDa, e
20 2 KDa) a 32°C no tampão de dessialilação por 2-6 horas.
Depois do tempo de reação adequado ter expirado, a amostra
PEGuilada foi imediatamente purificada para minimizar
GlicoPEGuilação adicional.

Para cobrir Fator VII/Fator VIIa GlicoPEGuilado com
25 amostras cobertas com ácido siálico, a sialidase foi
primeiro removida de assialo-Fator VIIa por cromatografia
de troca aniônica como indicado abaixo. Excesso de CMP-
ácido siálico (5 mM) foi adicionado e incubado a 32°C por 2
horas, cobrindo Fator VIIa glicoPEGuilado com ácido
30 siálico. As formas de sialil-PEGuilado de Fator VIIa foram

analisadas por SDS-PAGE não redutor (géis de Tris-glicina e/ou géis de NuPAGE) e um kit de coloração de azul coloidal, como descrito por Invitrogen.

EXEMPLO 3

5 Purificação de Fator VIIa PEGuilado.

Amostras glicoPEGuiladas de Fator VIIa foram purificadas com um método de troca aniônica modificado. Amostras foram manuseadas a 5°C. Imediatamente antes da carga na coluna, 1 g Chelex 100 (BioRad) por 10 mL de
10 solução de Fator VIIa foi adicionado à amostra remodelada. Depois de agitação por 10 min, a suspensão foi filtrada em uma membrana de acetato de celulose (0,2 µm) com um sistema de vácuo. A resina quelante retida no filtro foi lavada uma vez com 1-2 mL água por 10 mL. A condutividade do filtrado
15 foi ajustada a 10 mS/cm a 5°C, e ajustada a pH 8,6, se necessário.

Troca aniônica foi realizada a 8-10°C. Uma coluna contendo Q Sepharose FF foi preparada antes da carga por lavagem com 1 M NaOH (10 volumes de coluna), água (5
20 volumes de coluna), 2 M NaCl, 50 mM HOAc, pH 3 (10 volumes de coluna), e equilibrando com 175 mM NaCl, 10 mM glicilglicina, pH 8,6 (10 volumes de coluna). Para cada reação de PEGuilação, 15-20 mg Fator VIIa foi carregado a uma coluna XK16 (Amersham Biosciences) com 10 mL Q
25 Sepharose FF (não mais que 2 mg proteína por mL de resina) em uma taxa de fluxo de 100 cm/h. para o PEG de 2 KDa linear, 20 mg de Fator VIIa foi carregado em um coluna XK26 (Amersham Biosciences) com 40 mL Q Sepharose FF (0,5 mg proteína ppr mg de resina) em uma taxa de fluxo de 100
30 cm/h.

Após a carga, a coluna foi lavada com 175 mM NaCl, 10 mM glicilglicina, pH 8,6 (10 volumes de coluna) e 50 mM NaCl, 10 mM glicilglicina, pH 8,6 (2 volumes de coluna). Eluição foi realizada com um gradiente de etapa de 15 mM CaCl₂ pelo uso de 50 mM NaCl, 10 mM glicilglicina, 15 mM CaCl₂, pH 8,6 (5 volumes de coluna). A coluna foi então lavada com 1 M NaCl, 10 mM glicilglicina, pH 8,6 (5 volumes de coluna). O efluente foi monitorado por absorvência a 280 nm. Frações (5 mL) foram coletadas durante o fluxo-através e as duas lavagens; frações de 2,5 mL foram coletadas durante as eluições de CaCl₂ e 1M de sal. Frações contendo Fator VIIa foram analisadas por SDS-PAGE não redutor (géis de Tris-glicina e/ou géis de NUPAGE) e um kit de coloração de azul coloidal. As frações adequadas com Fator VIIa foram reunidas, e o pH foi ajustado a 7,2 com 4 M HCl.

Fator VIIa-SA-PEG-10KDa foi purificado como descritos acima, exceto pelas seguintes mudanças. EDTA (10 mM) foi adicionada à solução de Fator VIIa PEGuilado, o pH foi ajustado a pH 6, e a condutividade foi ajustada a 5mS/cm, a 5°C. Cerca de 20 mg de Fator VIIa-SA-PEG-10KDa foi carregado a uma coluna XK16 (Amersham Biosciences) com 10 mL Poros de 50 Micron resina HQ (não mais que 2 mg de proteína por mL, resina) em uma taxa de fluxo de 100 cm/h. Após a carga, a coluna foi lavada com 175 mM NaCl, 10 mM histidina pH 6 (10 volumes de coluna) e 50 mM NaCl, 10 mM histidina, pH 6 (2 volumes de coluna). Eluição foi realizada com um gradiente de etapa de 20 mM CaCl₂ em 50 mM NaCl, 10 mM histidina, pH 6 (5 volumes de coluna). A coluna foi então lavada com 1 M NaCl, 10 mM histidina, pH 6 (5 volumes de coluna).

O eluato da troca aniônica contendo Fator VIIa-SA-PEG-10KDa (25 mL) foi concentrado a 5-7 mL pelo uso de um dispositivo de filtro de centrífuga Amicon Ultra-15 10K, de acordo com as instruções do fabricante (Millipore). Após a
5 concentração, cromatografia de exclusão por tamanho foi realizada. A amostra (5-7 mL) foi carregada na coluna contendo Superdex 200 (HiLoad 16/60, grau prep; Amersham Biosciences) equilibrada em 50 mM NaCl, 10 mM glicilglicina, 15 mM CaCl_2 , pH 7,2 para a maioria das
10 variantes PEGuiladas. Fator VIIa-SA-PEG-10KDa foi separado do assialo-Fator VIIa não modificado, em uma taxa de fluxo de 1 mL/min, e a absorvência foi monitorada a 280 nm. Frações (1 mL) contendo Fator VIIa foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE não redutor (géis de Tris-glicina
15 e/ou géis de NuPAGE) e um kit de coloração de azul coloidal. Frações contendo a isoforma PEGuilada visada e desprovidas do assialoFator VIIa não modificado foram reunidas e concentradas a 1 mg/mL usando um dispositivo de filtro de centrífuga Amicon Ultra-15 10K. A concentração da
20 proteína foi determinada a partir de leituras de absorvência a 280 nm usando um coeficiente de extinção de $1,37 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

EXEMPLO 4

**Determinação de isoformas PEGuiladas por análise de HPLC de
25 fase reversa.**

Fator VIIa PEGuilado foi analisado por HPLC em uma coluna de fase reversa (Zorbax 300SB-C3, tamanho de partícula 5 μm , 2,1 x 150 mm). Os eluentes foram A) 0,1 TFA em água e B) 0,09 % TFA em acetonitrila. Detecção foi a 214
30 nm. O gradiente, taxa de fluxo, e temperatura da coluna

5 dependeram do comprimento de PEG (40 KDa, 20 KDa, e 10 KDa PEG: 35-65 %B em 30 min, 0,5 mL/min, 45°C; 10 KDa PEG: 35-60 %B em 30 min, 0,5 mL/min, 45°C; 5 KDa: 40-50 %B em 40 min, 0,5 mL/min, 45°C; 2 KDa: 38-43 %B em 67 min, 0,6 mL/min, 55°C). A identidade de cada pico foi determinada baseado em duas ou mais de quatro diferentes peças de evidência: o tempo de retenção conhecido de Fator VIIa nativo, a migração de SDS-PAGE do pico isolado, o espectro de massa MALDI-TOF do pico isolado, e a progresso em ordem do tempo de retenção de cada pico com número crescente de PEG anexado.

EXEMPLO 5

Determinação de sítio de anexação de PEG por HPLC de fase reversa.

15 Variantes de Fator VIIa e Fator VIIa PEGuilado foram reduzidas por mistura de amostra (10 µL em uma concentração de 1 mg/mL) com tampão de redução (40 µL, 50 mM NaCl, 10 mM glicilglicina, 15 mM EDTA, 8 M uréia, 20 mM DTT, pH 8,6) por 15 min em temperatura ambiente. Água (50 gL) foi
20 adicionada e a amostra resfriada a 4°C até ser injetada no HPLC (< 12 hrs). A coluna de HPLC, eluentes, e detecção foram como descrito acima para amostras não reduzidas. A taxa de fluxo foi 0,5 mL/min e o gradiente foi 30-55 %B em 90 min, seguido por um breve ciclo de lavagem até 90 %B. A
25 identidade de cada pico foi determinada como descrito no Exemplo 4.

EXEMPLO 6

Ensaio de coagulação de Fator VIIa.

Amostras PEGuiladas e padrões foram testados em
30 duplicata, e foram diluídos em 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂.

0,1% BSA (peso/vol), 50 mM Tris, pH 7,4. o padrão e amostras foram analisados por uma faixa de 0,1 a 10 ng/mL. Volumes iguais de padrões diluídos e amostras foram misturados com plasma deficiente de Fator VIIa (Diagnostica Stago), e estocados em gelo por não mais que 4 horas antes de serem analisados.

Os tempos de coagulação foram medidos com um coagulômetro SStart4 (Diagnostica Stago). O coagulômetro mediu o tempo decorrido até que um coágulo *in vitro* fosse formado, como indicado pela interrupção do leve movimento adiante e para trás de uma bola magnética em uma cuveta de amostra.

Em cada cuveta, uma bola magnética foi depositada, mais 100 µL Fator VIIa amostra/ plasma deficiente e 100 µL de uma solução de cefalina de cérebro de rato diluída (estocada em gelo por não mais que 4 horas). Cada reagente foi adicionado com 5 segundos entre cada cavidade, e a mistura final foi incubada por 300 segundos a 37°C. A solução de cefalina de cérebro de rato diluída (RBC) foi feita de 2 mL de solução de estoque RBC (1 frasco de estoque RBC, de Haemachem, mais 10 mL 150mM NaCl) e 4 mL 100mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0,1% BSA (peso/vol), 50mM Tris, pH 7,4.

Em 300 segundos, o ensaio foi iniciado pela adição de 100 µL, de uma solução pré-aquecida (37°C) de Fator tecidual solúvel (2µg/mL; aminoácidos 1-209) em 100mM NaCl. 12,5 mM CaCl₂, 0,1% BSA (peso/vol), 50mM Tris, pH 7,4. novamente, essa próxima solução foi adicionada com um intervalo de 5 segundos entre amostras.

Os tempos de coagulação dos padrões diluídos foram

usados para gerar uma curva padrão (log de tempo de coagulação versus log de concentração de Fator VIIa). A regressão linear resultante da curva foi usada para determinar as atividades relativas de coagulação de variantes PEGuiladas. Variantes PEGuiladas de Fator VIIa foram comparadas contra um estoque em alíquotas de Fator VIIa.

EXEMPLO 7

10 GlicoPEGuilação de Fator VIIa recombinante produzido em células BHK

Esse exemplo apresenta a PEGuilação de Fator VIIa recombinante feito em células BHK.

Preparação de Assialo-Fator VIIa. Fator VIIa recombinante foi produzido em células BHK (células renais de rim de filhote de hamster). Fator VIIa (14,2 mg) foi dissolvido a 1 mg/mL em solução tampão (pH 7,4, 0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,001 M CaCl₂, 0,05% NaN₃) e foi incubado com 300 mU/mL sialidase (*Vibrio cholera*)-agarose conjugado por 3 dias a 32 °C. Para monitorar a reação uma pequena alíquota da reação foi diluída com o tampão adequado e um gel IEF realizado de acordo com procedimentos de Invitrogen (Figura 157). A mistura foi centrifugada a 3.500 rpm e o sobrenadante foi coletado. A resina foi lavada três vezes (3 x2 mL) com a solução tampão acima (pH 7,4, , 0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,05% NaN₃) e as lavagens combinadas foram concentradas em um Centricon-Plus-20. A solução restante teve o tampão trocado com 0,05 M Tris (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 0,05% NaN₃ a um volume final de 14,4 mL.

Preparação de Fator VIIa-SA-PEG-1KDa e Fator VIIa-SA-PEG-10KDa. A dessialilação de solução de Fator VIIa foi

dividida em duas amostras iguais de 7,2 mL. A cada amostra foi adicionado CMP-SA-PEG-1KDa (7,4 mg) ou CMP-SA-PEG-10KDa (7,4 mg). ST3Gal3 (1,58U) foi adicionada a ambos os tubos e as misturas de reação foram incubadas a 32°C por 96 horas.

5 A reação foi monitorada por SDS-PAGE gel usando reagentes e condições descritos por Invitrogen. Quando a reação foi completada, a mistura de reação foi purificada usando uma coluna preparatória Toso Haas TSK-Gel-3000 usando tampão PBS (pH 7,1) e coletando frações baseado em absorção de UV.

10 As frações combinadas contendo o produto foram concentradas a 4°C em filtros de centrífuga Centricon-Plus-20 (Millipore, Bedford, MA) e a solução concentrada reformulada para render 1,97 mg (ensaio de proteína de ácido bicinconinico, ensaio de BCA, Sigma-Aldrich, St.

15 Louis MO) de Fator VIIa-SA-PEG. O produto da reação foi analisado com o uso de SDS-PAGE e análise IEF de acordo com os procedimentos e reagentes supridos por Invitrogen. As amostras foram dialisadas contra água e analisadas por MALDI-TOF.

20

EXEMPLO 8

Fator VIIa-SA-PEG-10KDa: Método de "one pot"

Fator VIIa (5 mg diluídos no tampão de formulação do produto a uma concentração final de 1 mg/mL), CMP-SA-PEG-10KDa (10 mM, 60 µL) e enzima de *A. niger* ST3Gal3 (33 U/L)

25 e 10 mM histidina, 50 mM NaCl, 20 mM CaCl₂ foram combinados em um frasco de reação junto com 10 U/L, 1 U/L, 0,5 U/L ou 0,1 U/L de sialidase (CalBiochem). Os ingredientes foram misturados e incubados a 32°C. O progresso da reação foi medido por análise de alíquotas em intervalos de 30 minutos

30 para as primeiras quatro horas. Uma alíquota foi então

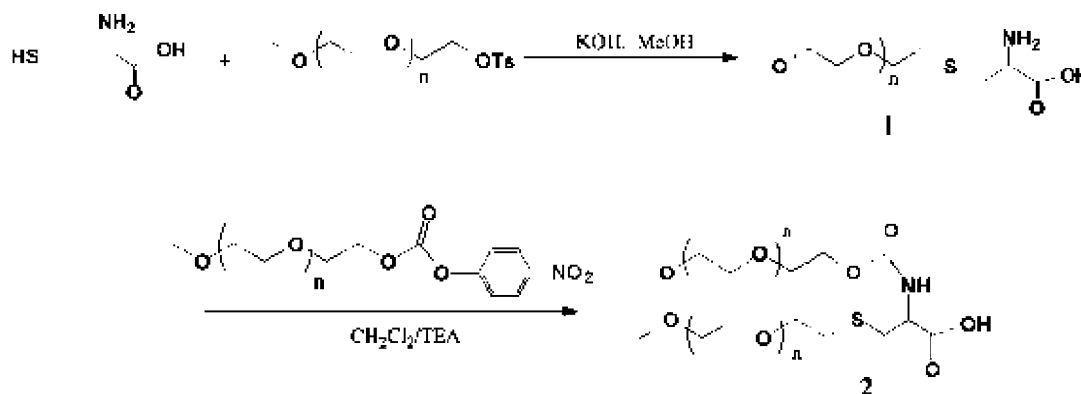
removida no ponto de tempo de 20 hora e submetida a SDS-PAGE. A extensão da PEGuilação foi determinada por remoção de 1 mL a 1,5, 2,5 e 3,5 horas e purificação da amostra em uma coluna Poros 50HQ.

5 Para as condições reação contendo 10 U/L de sialidase, nenhuma quantidade apreciável de produto Fator VIIa-SA-PEG foi formada. Para as condições reação contendo 1 U/L de sialidase, cerca de 17,6 % do Fator VIIa na mistura de reação foi mono ou diPEGuilado depois de 1,5 hora. Esse
10 aumentou para 29% depois de 2,5 horas, e 40,3% depois de 3,5 horas. Para as condições reação contendo 0,5 U/L de sialidase, cerca de 44,5% do Fator VIIa na mistura de reação foi mono ou diPEGuilado depois de 3 horas, e 0,8% foi triPEGuilado ou mais. Depois de 20 horas, 69,4% foi
15 mono ou diPEGuilado, e 18,3% foi triPEGuilado ou mais.

Para as condições reação contendo 0,1 U/L de sialidase, cerca de 29,6% do Fator VIIa na mistura de reação foi mono ou diPEGuilado depois de 3 horas. Depois de 20 horas, 71,3% foi mono ou diPEGuilado, e 15,1% foi
20 triPEGuilado ou mais.

EXEMPLO 9

Preparação de Cisteína-PEG₂ (2)



a. Síntese de Composto 1

Hidróxido de potássio (84,2 mg, 1,5 mmol, como um pó) foi adicionado a uma solução de L-cisteína (93,7mg, 0,75 mmol) em metanol anidro (20 L) sob argônio. A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 30 min, e então mPEG-O-

5 tosilato de massa molecular 20 kilodalton (Ts; 1,0 g, 0,05 mmol) foi adicionado em várias porções por 2 horas. A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 5 dias, e concentrada por evaporação rotatória. O resíduo foi diluído com água (30 mL), e agitado em temperatura ambiente por 2

10 horas para destruir qualquer excesso de 20 kilodalton mPEG-O-tosilato. A solução foi então neutralizada com ácido acético, o pH ajustado ao pH 5,0 e carregada em uma coluna de cromatografia de fase reversa (C-18 sílica). A coluna foi eluída com um gradiente de metanol/água (o produto elui

15 em cerca de 70% metanol), eluição do produto monitorada por dispersão de luz evaporativa, e as frações adequadas coletadas e diluídas com água (500 mL). Essa solução foi cromatografada (troca iônica, XK 50 Q, BIG Beads, 300 mL, forma de hidróxido; gradiente de água para água/ácido

20 acético -0,75N) e o pH das frações adequadas diminuído para 6,0 com ácido acético. Essa solução foi então capturada em uma coluna de fase reversa (C-18 sílica) e eluída com um gradiente de metanol/água como descrito acima. As frações do produto foram reunidas, concentradas, redissolvidas em

25 água e liofilizadas para gerar 453 mg (44%) de um sólido branco (1).

Dados estruturais para o composto foram como se segue:

^1H -RMN (500 MHz; D_2O) δ 2,83 (t, 2H, O-C- $\underline{\text{CH}_2}$ -S), 3,05 (q, 1H, S- $\underline{\text{CHH}}$ -CHN), 3,18 (q, 1H, (q, 1H, S- $\underline{\text{CHH}}$ -CHN), 3,38 (s, 30 3H, $\underline{\text{CH}_3}$ O), 3,7 (t, $\text{OCS}_2\underline{\text{CH}_2}\text{O}$), 3,95 (q, 1H, $\underline{\text{CHN}}$). A pureza do

produto foi confirmada por SDS PAGE.

b. Síntese de Cisteína-PEG2 (2)

Trietilamina (~0, mL) foi adicionada em gotas a uma solução de composto 1 (440 mg, 22 μ mol) dissolvido em 5 CH_2Cl_2 anidro (30 mL) até a solução esta básica. Uma solução de 20 kilodalton mPEG-O-p-nitrofenil carbonato (660 mg, 33 μ mol) e N-hidroxisuccinimida (3,6 mg, 30,8 μ mol em CH_2Cl_2 (20 mL) foi adicionada em várias porções por 1 hora em temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada em 10 temperatura ambiente por 24 horas. O solvente foi então removido por evaporação rotatória, o resíduo foi dissolvido em água (100 mL), e o pH ajustado a 9,5 com 1,0 N NaOH. A solução básica foi agitada em temperatura ambiente por 2 horas e foi então neutralizada com ácido acético \ um pH 15 7,0. A solução foi então carregada em uma coluna de cromatografia de fase reversa (C-18 sílica). A coluna foi eluída com um gradiente de metanol/água (o produto elui em cerca de 70% metanol), eluição do produto monitorada por dispersão de luz evaporativa, e as frações adequadas 20 coletadas e diluídas com água (500 mL). Essa solução foi cromatografada (troca iônica, XK 50 Q, BIG Beads, 300 mL, forma de hidróxido; gradiente de água para água/ácido acético -0,75N) e o pH das frações adequadas diminuído para 6,0 com ácido acético. Essa solução foi então capturada em 25 uma coluna de fase reversa (C-18 sílica) e eluída com um gradiente de metanol/água como descrito acima. As frações do produto foram reunidas, concentradas, redissolvidas em água e liofilizadas para gerar 575 mg (70%) de um sólido branco (2).

30 Dados estruturais para o composto foram como se segue:

^1H -RMN (500 MHz; D_2O) δ 2,83 (t, 2H, $\text{O}-\text{C}-\underline{\text{CH}_2}-\text{S}$), 2,95 (t, 2H, $\text{O}-\text{C}-\underline{\text{CH}_2}-\text{S}$), 3,12 (q, 1H, $\text{S}-\underline{\text{CHH}}-\text{CHN}$), 3,39 (s, 3H CH_3O), 3,71 (t, $\text{OCH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{O}$). A pureza do produto foi confirmada por SDS PAGE.

5

EXEMPLO 10**Fator VIIa-SA-PEG-40KDa****GlicoPEGuilação de Fator VIIa (*One Pot* com cobertura).**

GlicoPEGuilação de Fator VIIa foi realizada em uma reação *one-pot* em que a dessialation e PEGuilação ocorrem
10 simultaneamente, seguida por cobertura com ácido siálico. A reação foi realizada em um frasco de vidro revestido controlado a 32°C por um banho de água recirculante. Primeiro, o Fator VIIa concentrado 0,2 μm -filtrado foi introduzido no frasco e aquecido a 32°C por mistura com uma
15 barra de agitação por 20 minutos. A solução de sialidase foi feita a partir de pó seco em 10 mM histidina/50 mM NaCl/20 mM CaCl_2 , pH 6,0 em uma concentração de 4.000 U/L. Uma vez que o Fator VIIa atinge 32°C, a sialidase foi adicionada ao Fator VIIa, e a reação foi misturada por
20 aproximadamente 5 minutos para assegurar uma solução uniforme, depois de um tempo a mistura foi interrompida. A dessialação prosseguiu por 1,0 h a 32°C. Durante a reação de dessialação, CMP-SA-PEG-40KDa foi dissolvido em 10mM histidina/50mM NaCl/20mM CaCl_2 , tampão em pH 6,0, e a
25 concentração foi determinada por absorvência de UV a 271nm. Depois de CMP-SA-PEG-40KDa ter sido dissolvido, CMP-SA-PEG-40KDa foi adicionado à reação, bem como ST3Gal3, e a reação foi misturada por aproximadamente 15 minutos com uma barra de agitação para assegurar uma solução uniforme. Um volume
30 adicional de 85 mL de tampão foi adicionado para fazer 1,0

L de reação. A reação prosseguiu sem agitação por 24 horas antes de CMP-SA ser adicionado a uma concentração de 4,3 mM para extinguir a reação e cobrir os resíduos de galactose terminal restantes com ácido siálico. A extinção prosseguiu com mistura por 30 minutos a 32°C. O volume total da reação foi 1,0 L antes da extinção. Amostras (1 mL) foram feitas em 0, 4,5, 7,5, e 24 horas, extintas com CMP-SA, e analisadas por RP-HPLC e SDS-PAGE.

Purificação de Fator VIIa-SA-PEG-40KDa. Depois da cobertura, a solução foi diluída com 2,0 L de 10mM histidina, pH 6,0 que foi estocada de um dia para o outro a 4°C e a amostra foi filtrada através de um filtro de 0,2 µm Millipak 60. O volume de carga resultante foi 3,1 L. A cromatografia AEX2 foi realizada a 20-25°C (temperatura ambiente) em um sistema Akta Pilot. Após a carga, uma lavagem com 10 volumes de coluna com tampão de equilíbrio foi realizada, e o produto foi eluído da coluna usando um gradiente de volume de coluna 10 de MgCl₂ que resultou na resolução de espécies de Fator VIIa PEGuilado de Fator VIIa não PEGuilado. A carga para essa coluna foi intencionalmente mantida baixa, visando < 2 mg Fator VIIa/mL resina. Géis de SDS-PAGE foram adicionados além de análise de RP-HPLC de frações selecionadas e conjuntos de frações para fazer o conjunto de produto. As frações reunidas tiveram o pH ajustado a 6,0 com 1M NaOH e estocadas na sala fria a 2-8°C de um dia para o outro.

Concentração Final /Diafiltração, filtração asséptica e alíquotas. As frações reunidas foram filtradas através de um filtro Millipak 20 0,2 µm e estocadas de um dia para o outro a 2-8°C. Para realizar a concentração/diafiltração,

uma membrana de celulose regenerada Millipore 0,1 m² 30 KDa foi usada em um sistema ajustado com uma bomba peristáltica e tubos de silicone. O sistema foi montado e aspergido com água, então limpo com 0,1M NaOH por pelo menos 1 hora, e

5 então estocado em 0,1M NaOH até equilíbrio com 10 mM histidina/ 5 mM CaCl₂/100 mM NaCl pH 6,0 tampão de diafiltração imediatamente antes do uso. O produto foi concentrado a aproximadamente 400 mL e então diafiltrado em volume constante com aproximadamente 5 diavolumes de

10 tampão. O produto foi então concentrado a aproximadamente 300 mL e recuperado depois de uma baixa recirculação de pressão por 5 minutos, e as membranas foram enxaguadas com 200 mL de tampão d diafiltração por uma recirculação por 5 minutos. O lavado foi recuperado com produto, e mais 50mL

15 de tampão foi recirculado por mais 5 minutos para um lavado final. O volume resultante foi de aproximadamente 510 mL, e aquele foi filtrado através de um filtro a vácuo de 1L ajustado com uma com membrana de 0,2 µm PES (Millipore). O volume assepticamente filtrado foi então dividido em

20 alíquotas de 25 mL em tubos falcon estéreis de 50mL e congelados a -80°C.

Análise da reação de PEGuilação por HPLC (Exemplo 10)

	Tempo de reação de conjugação				Purificação
	0 hrs	4,5 hrs	7,5 hrs	24 hrs	Depois de Cromatografia
% não PEGuilado	94,7	76,1	66,6	51,0	0,6
% Mono PEGuilado	0,9	17,9	26,1	39,1	85,6

% DiPEGuilado	0,1	0,9	1,9	5,1	5,1
% TriPEGuilado	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2

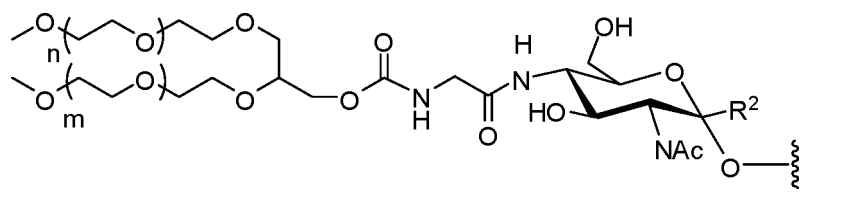
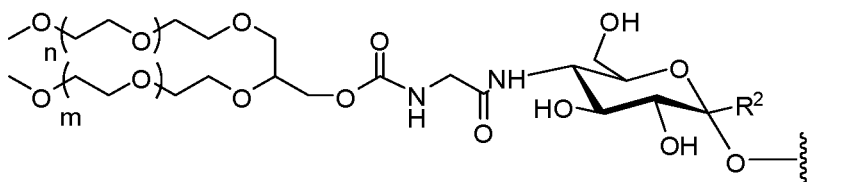
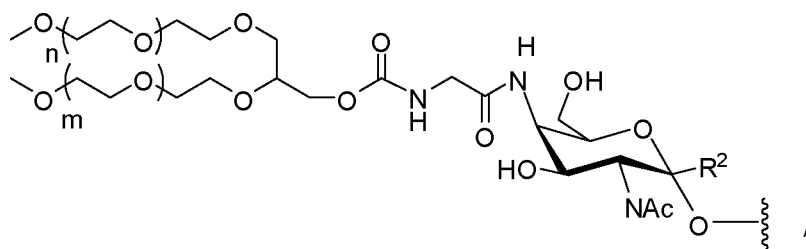
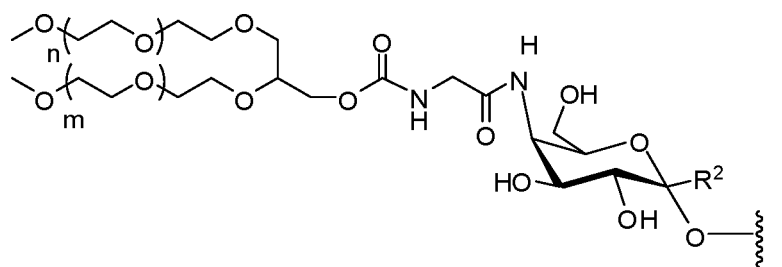
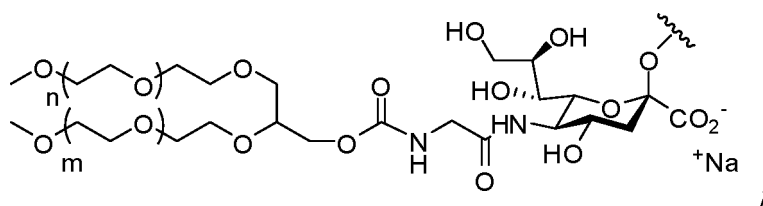
Depois de 24 horas, a distribuição de volume de estado de produto PEG foi: 0,7% não PEGuilado, 85,3% mono-PEGuilado, 11,5% di-PEGuilado, e 0,3% tri-PEGuilado. Cromatografia em coluna é a etapa principal no processo que
5 gera a distribuição de produto, amplamente através de remoção de material não PEGuilado de espécies mono- e di-PEGuiladas.

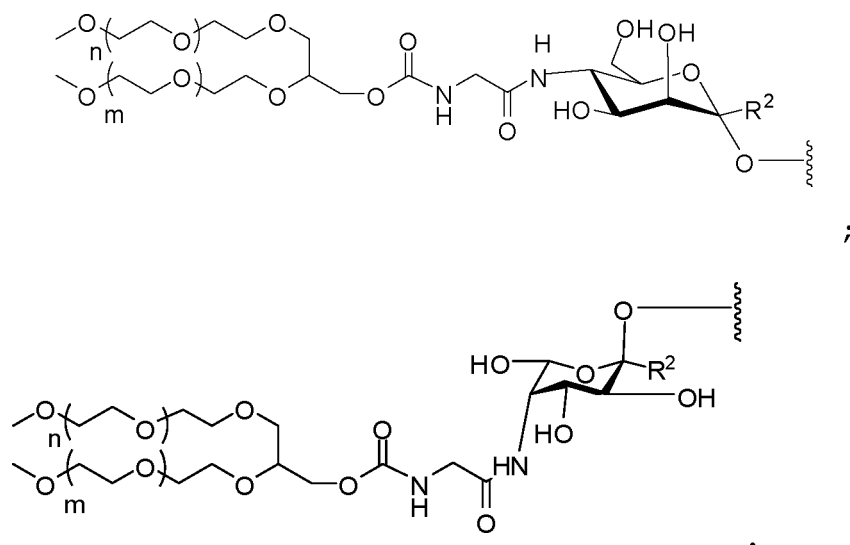
Entende-se que os exemplos e modalidades aqui descritos são para objetivos ilustrativos apenas e que
10 várias modificações ou mudanças serão sugeridas em vista desses para pessoas habilitadas na técnica e devem estar incluídas no espírito e alcance desse pedido e escopo das reivindicações em apêndice. Todas publicações, patentes e pedidos de patentes aqui citados são incorporados em suas
15 totalidade por referência para todos os objetivos.

REIVINDICAÇÕES

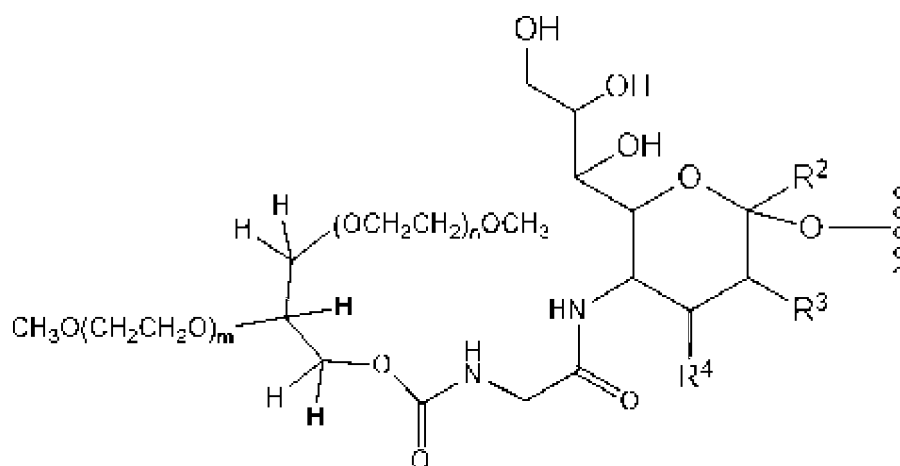
1. Conjugado de peptídeo caracterizado por compreender:

a) um peptídeo que é Fator IX e que é covalentemente ligado a uma porção que é um membro selecionado de:





em que os índices m e n são números inteiros independentemente selecionados de 100 a 4000; em que R^2 é um membro selecionado de H , CH_2OR^7 , $COOR^7$ e OR^7 ; em que R^7 é um membro selecionado de H , alquil substituído ou não substituído e heteroalquil substituído ou não substituído; ou em que referida porção é



em que os índices m , n e R^2 são conforme definidos acima; e em que R^3 e R^4 são membros independentemente selecionados de H , alquil substituído ou não substituído, OR^8 e $NHC(O)R^9$; em que R^8 e R^9 são independentemente selecionados de H , alquil substituído ou não substituído, heteroalquil substituído ou não substituído, ácido siálico

e ácido polissilícico.

2. Formulação farmacêutica, caracterizada por compreender um conjugado de peptídeo, conforme definido na reivindicação 1 e um diluente farmacêuticamente aceitável.

Preparação de CMP-SA-Glicerol-PEG-40 kDa

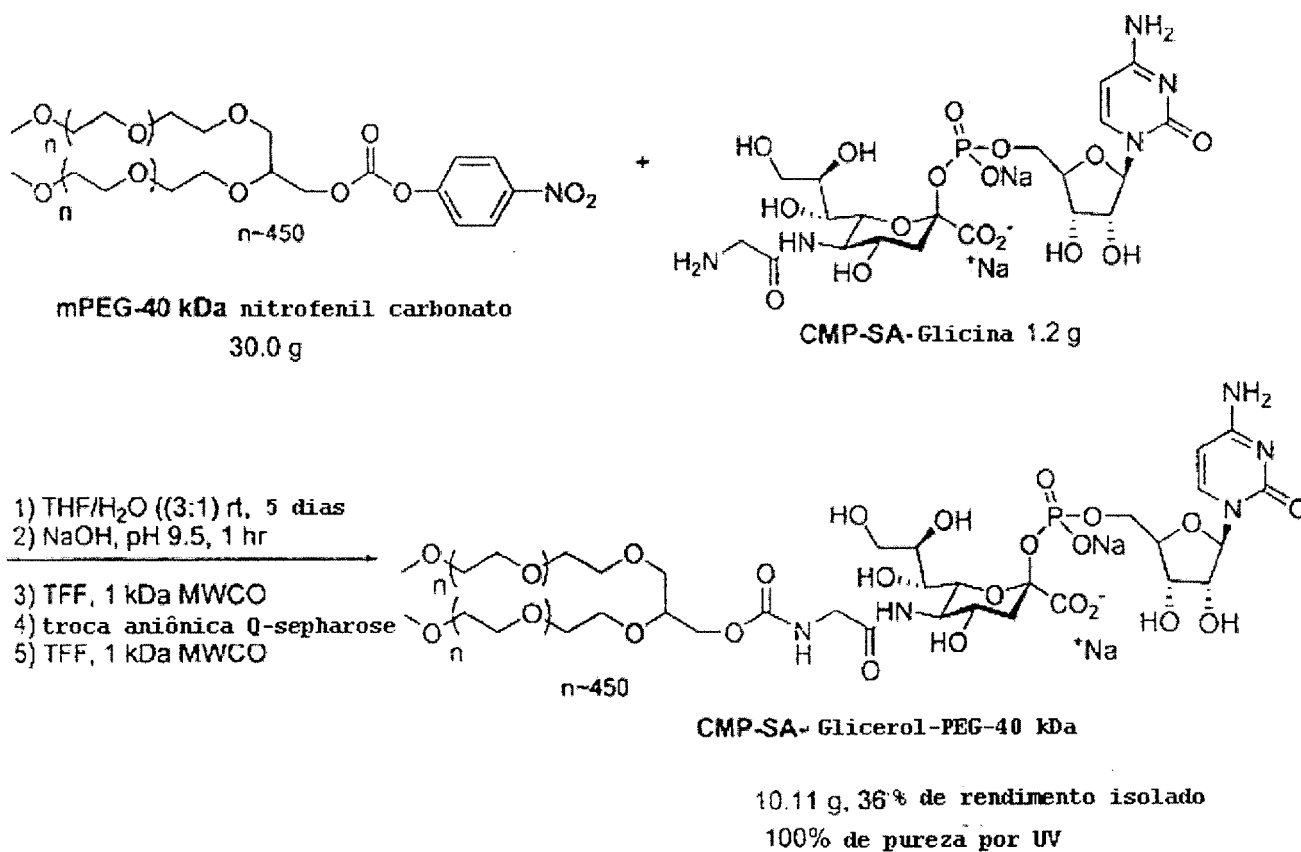


FIGURA 1

Condições de REação de CMP-SA-Glicerol-PEG-40 kDa

Parâmetros de Reação	
CMP-SA-Gly (Forma de Sal)	2.3 mol. eq. (1.2 g) Sal de Sódio
mPEG-40kDa- nitrofenil carbonato (NOF)	1 mol. eq. (30 g)
Solventes	THF:H ₂ O (3:1)
pH	7.5 - 8
Temperatura	20 °C
Tempo de Reação	5 dias
Rendimento Purificado	36% 10.11 g
Pureza (UV 274 nm vs. CMP-SA-Glicina)	100%

FIGURA 2

Processo de Purificação de CMP-SA-Glicerol-PEG-40 kDa

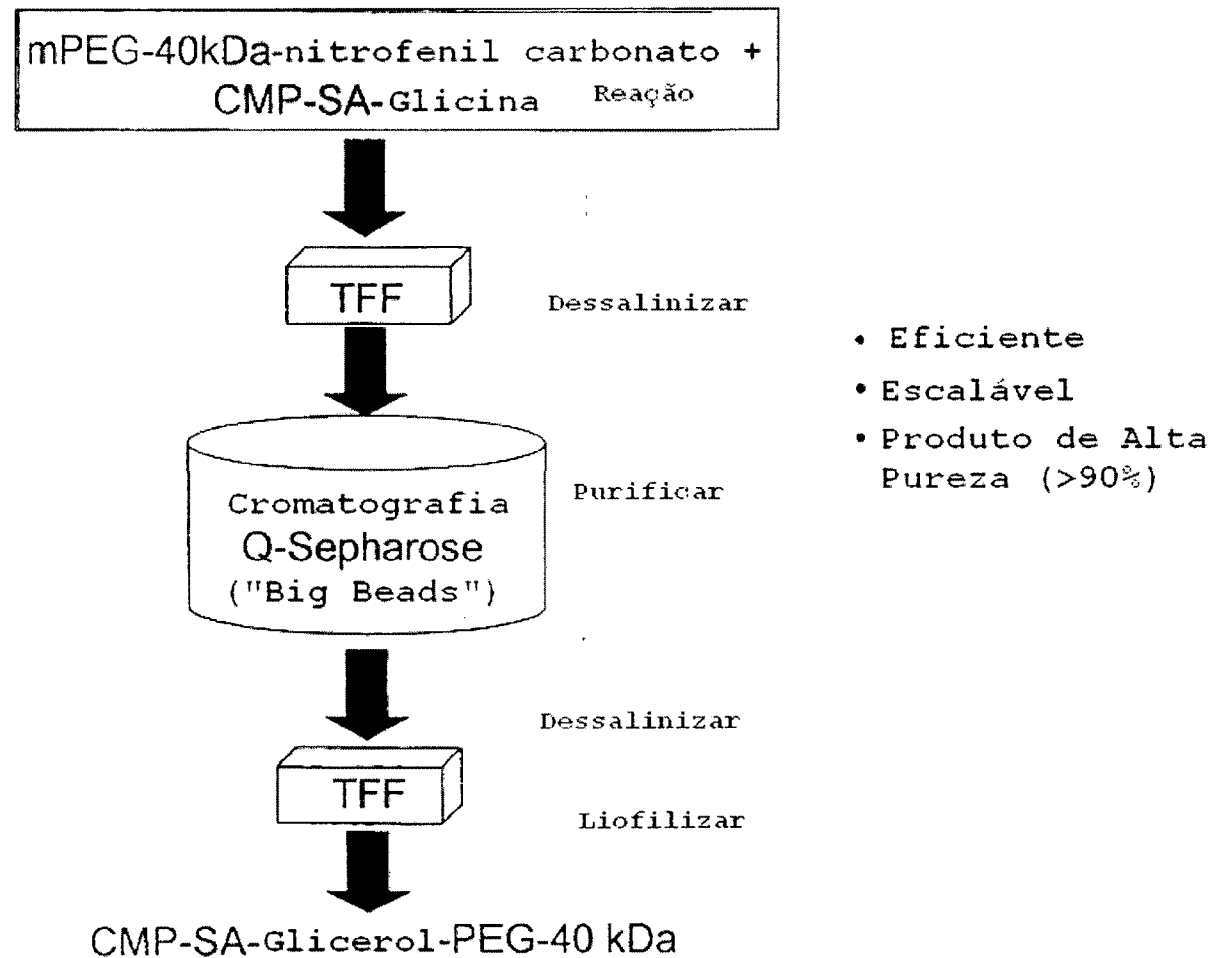


FIGURA 3

Purificação por Q-Sepharose de **CMP-SA- Glicerol -PEG-40 kDa**

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

Forma de Bicarbonato da Resina

Fase Móvel A: Água

Fase B Móvel: 1.0 N NaCl

UV: 274 nm

Carga: Aproximadamente 15 g de Reação de CMP-SA- Glicerol -PEG-40 kDa

Mistura(30 g) após TFF (Condutividade: 0.53 mS)

Taxa de Carga: 60 mL/min

Eluição:

1.67 CV Fase A Móvel

2 CV gradiente de 10% a 80% Fase B Móvel a 125 mL/min.

"Pool" de Eluição foi dessalgado por TFF

Millipore 1 kDa Pellicon 2 " MINI"

(2 x PLAC 1 kDa celulose Regenerada

Membrana: Tipo Screen V; 0.1m²).

Produto dessalgado foi liofilizado

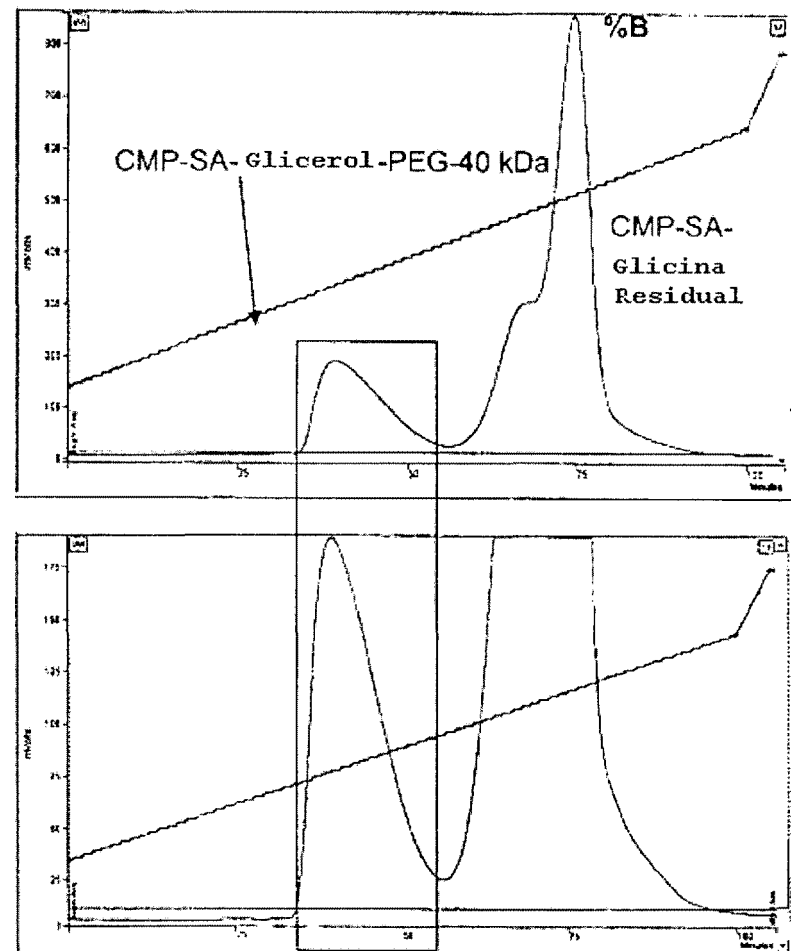
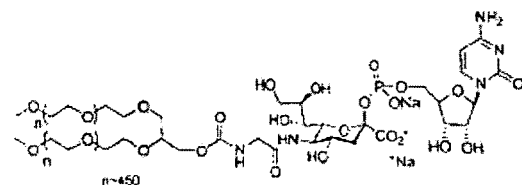


FIGURA 4

¹H-NMR de CMP-SA-Glicerol-PEG-40kDa

500 MHz ¹H NMR



10.11 g, 100% de Pureza por UV

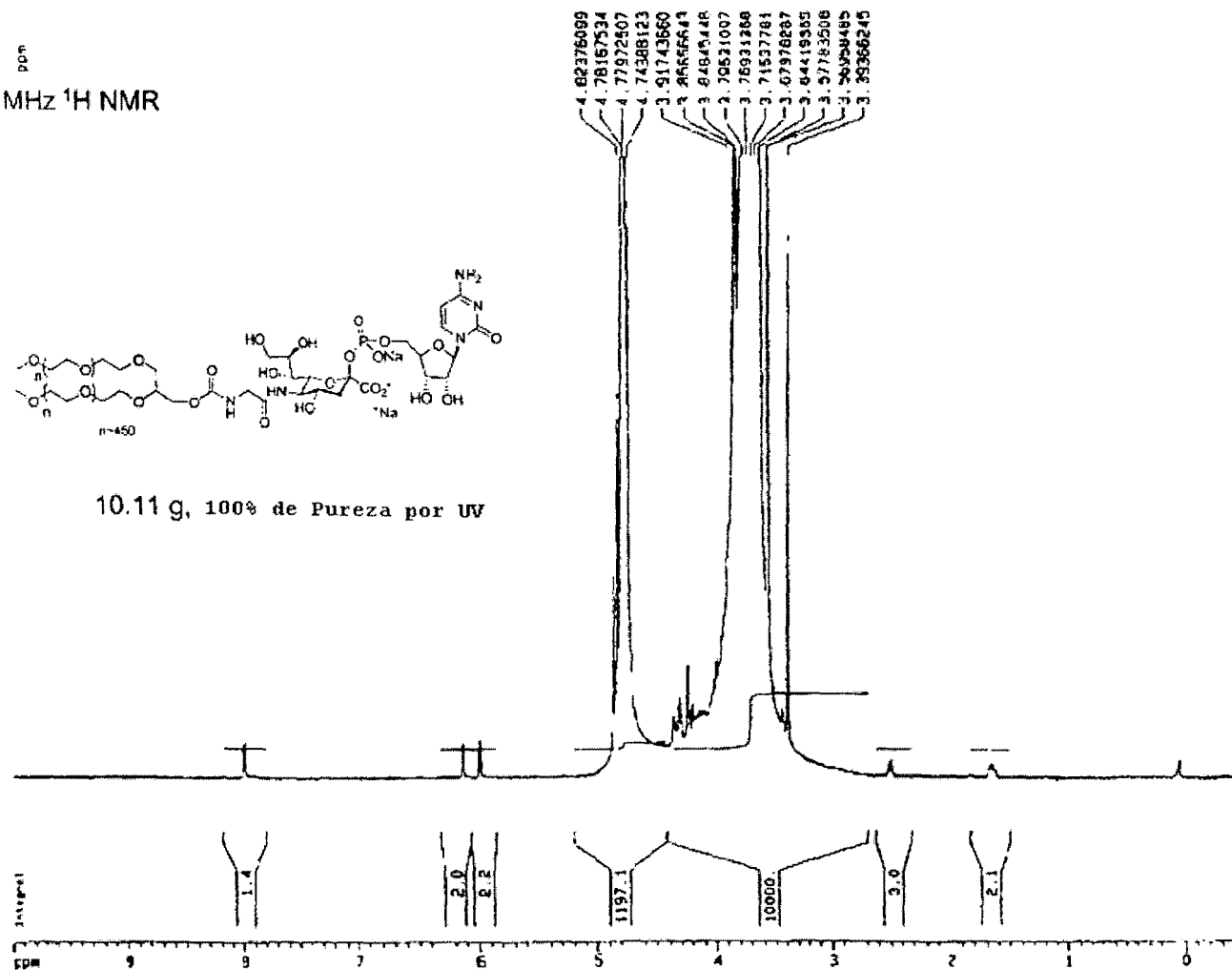


FIGURA 5

FIGURA 6A

Proteína	Organismo	EC#	Gen Bank / GenPept	SwissProt	PDB / 3D
At1g08280	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC011438 BT004583 NC_003070	AAF18241.1 AA042829.1 NP_172305.1	Q84W00 Q9SGD2
At1g08660/F22013.14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AC003981 AY064135 AY124807 NC_003070 NM_180609	AAF99778.1 AAL36042.1 AAM70516.1 NP_172342.1 NP_850940.1	Q8VZJ0 Q9FRR9
At3g48820/T21J18_90	<i>Arabidopsis thaliana</i>	n.d.	AY080589 AY133816 AL132963 NM_114741	AAL85966.1 AAM91750.1 CAB87910.1 NP_190451.1	Q8RY00 Q9M301
α -2,3-sialiltransferase (ST3Gal-IV)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ534673	CAE48298.1	
α -2,3-sialiltransferase (ST3Gal-V)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ585768	CAE51392.1	
α -2,6-sialiltransferase (Siat7b)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ620651	CAF05850.1	
α -2,8-sialiltransferase (SIAT8A)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.8	AJ699418	CAG27880.1	
α -2,8-sialiltransferase (Siat8D)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ699421	CAG27883.1	
α -2,8-sialiltransferase ST8Sioc-III (Sial8C)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ704563	CAG28696.1	
CMP α -2,6-sialiltransferase (STSGal I)	<i>Bos taurus</i>	2.4.99.1	Y15111 NM_177517	CAA75385.1 NP_803483.1	018974
sialiltransferase 8 (fragmento)	<i>Bos taunts</i>	n.d.	AF450088	AAL47018.1	QBWN13
sialiltransferase ST3Gal-II (Siat4B)	<i>Bos taunts</i>	n.d.	AJ748841	CAG44450.1	
sialiltransferase ST3Gal-III (Siat6)	<i>Bos taurus</i>	n.d.	AJ748842	CAG44451.1	
sialiltransferase ST3Gal-VI (Siat10)	<i>Dos taurus</i>	n.d.	AJ748843	CAG44452.1	
ST3Gal I	<i>Bos taunts</i>	n.d.	AJ305086	CAC24698.1	Q9BEG4
St6GalNAc-VI	<i>Bos taunts</i>	n.d.	AJ620949	CAF06586.1	
CDS4	<i>Branchiostoma flotidae</i>	n.d.	AF391289	AAM18873.1	081771
polisialiltransferase (PST) (fragmento) ST8Sia IV	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210729	AAF17105.1	09T109
polisialiltransferase (STX) (fragmento) ST8Sia II	<i>Cercopithecus aethiops</i>	2.4.99.-	AF210318	AAF17104.1	Q9TT10
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona intestinalis</i>	n.d.	AJ626815	CAF25173.1	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Ciona savignyi</i>	n.d.	AJ626814	CAF25172.1	
α -2,8-polisialiltransferase ST8Sia IV	<i>Cricetulus griseus</i>	2.4.99.-	- Z46801	AAE28634 CAA86822.1	Q64690
Gal β 1,3/4-GlcNAc α -2,3-sialiltransferase St3Gal I	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY266675	AAP22942.1	Q8OWL0
Gal β 1,3/4-GlcNAc α -2,3-sialiltransferase St3Gal II (fragmento)	<i>Cricetulus griseus</i>	n.d.	AY266676	AAP22943.1	Q80WK9
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal I Siat4	<i>Dario rerio</i>	n.d.	AJ783740	CAH04017.1	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal II Siat5	<i>Dania rerio</i>	n.d.		CAH04018.1	

FIGURA 6B

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept		SwissProt	PDB / 3D
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal III (Siat6)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ626821	CAF25179.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ744809	CAG32845.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal V-r (Siat5-related)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ783742	CAH04019.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6Gal I (Siat1)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ744801	CAG32837.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GalINac II (Siat7B)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ634459	CAG25680.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GalINac V (Siat7E) (fragmento)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ646874	CAG26703.1		
α -2,6-sialiltransferase ST5GalINac VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ646883	CAG26712.1		
α -2,8-sialiltransferase STBSia I (Siat 8A) (fragmento)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ715535	CAG29374.1		
α -2,8-sialiltransferase STBSia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ715543	CAG29382.1		
α -2,8-sialiltransferase STBSia IV (Siat 80) (fragmento)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ715545	CAG29384.1		
α -2,8-sialiltransferase STBSia V (Siat 8E) (fragmento)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ715546	CAG29385.1		
α -2,8-sialiltransferase STBSia VI (Siat 8F) (fragmento)	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ715551	CAG29390.1		
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferase II (ST6Gal II)	<i>Danio rerio</i>	n.d.	AJ627627	CAF29495.1		
N-glicano α -2,8-sialiltransferase	<i>Danio redo</i>	n.d.	5C050483 AY055462 NM_153662	AAHSO483.1 AAL17875.1 NP_705948.1	Q7ZU51 Q8QH33	
ST3Gal III-relacionado (siat6r)	<i>Danio redo</i>	n.d.	BCO53179 AJ626820 NM_200355	AAH53179.1 CAF25178.1 NP_956649.1	Q7T3B9	
St3Gal-V	<i>Danio redo</i>	n.d.	AJ619960	CAF04061.1		
st6GalINac-VI	<i>Dania redo</i>	n.d.	BC080932 AJ620947	AAH60932.1 CAF06584.1		
α -2,6-sialiltransferase (C04671) ST6Gal I	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.4.99.1	AE003465 AF218237 AF397532 AE003465 NM_079129 NM_166684	AAF47256.1 AAG13185.1 AAK92126.1 AAM70791.1 NP_523853.1 NP_725474.1	Q9GU23 Q9W121	
α -2,3-sialiltransferase (ST3Gal-V1)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585767 AJ627204	CAE51391.1 CAF25503.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.4	X80503 NM_205217	CAA56666.1 NP_990548.1	Q11200	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal IV (fragmento)	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF035250	AAC14163.1	Q73724	
α -2,3-sialiltransferase (ST3GAL-11)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ585761	CAE51385.2		
α -2,6-sialiltransferase (Siat7b)	<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ620653	CAF05852.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6Gal I	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.1	X75553 NM_205241	CAA53235.1 NP_990572.1	Q92182	
α -2,6-sialiltransferase	<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.3	-	AAE68028.1	Q92183	

FIGURA 6C

Proteína	Organismo		EC#	GenBank / GenPept		SwissProt	PDB / 3D
ST6GaINAc I				X74946 NM 205240	AAE68029.1 CAA52902.1 NP 990571.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc II		<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	X77775 NM J05233	AAE68030.1 CAA54813.1 NP 990564.1	Q92184	
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc III (SIAT7C) (fragmento)		<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ634455	CAG25677.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc V (SIAT7E) (fragmento)		<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ646877	CAG26706.1		
α -2,8-sialiltransferase (GD3 Sintase) ST8Sia I		<i>Gallus gabs</i>	2.4.99.-	U73176	AAC28888.1	P79783	
α -2,8-sialiltransferase (SIATB8)		<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699419	CAG27881.1		
α -2,8-sialiltransferase (SIAT8C)		<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699420	CAG27882.1		
α -2,8-sialiltransferase (SIAT8F)		<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ699424	CAG27886.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia-V (SIAT8C)		<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ704564	CAG28697.1		
β -galactosamida α -2,6- sialiltransferase II (ST6Gal II)		<i>Gallus gallus</i>	n.d.	AJ827629	CAF29497.1		
GM3 sintase (SIAT9)		<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.9	AY515255	AAS83519.1		
polisialiltransferase ST8Sia IV		<i>Gallus gallus</i>	2.4.99.-	AF008194	AAB95120.1	O42399	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal I		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	L29555 AF059321 L13972 AF155238 AF186191 B0018357 NM 003033 NM173344	AAA36612.1 AAC 17874.1 AAC37574.1 AAD39238.1 AAG29876.1 AAH18357.1 NP_003024.1 NP_775479.1	Q11201 O60677 O9UN51	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal II		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	U63090 L3038777 X96667 NM 006927	AAB40389.1 AAH36777.1 CAA65447.1 NP_008858.1	Q16842 O00654	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal III (SiaT6)		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.6	L23768 BCO50380 AF425B51 AF425652 AF425853 AF425854 AF425855 AF425856 AF425857 AF425858 AF425859 AF425860 AF425861 AF425862 AF425863 AF425864 AF425865 AF425865 AF425867 AY167992 AY167993 AY167994	AAA35778.1 AAHSO380.1 AAO13859.1 AAO13860.1 AAO13861.1 AAO13862.1 AAO13863.1 AAO13864.1 AAO13865.1 AAO13866.1 AAO13867.1 AAO13868.1 AAO13869.1 AAO13870.1 AAO13871.1 AAO13872.1 AAO13873.1 AAO13874.1 AAO13875.1 AAO38806.1 AAO38807.1 AAO38808.1	Q11203 Q86UR6 Q86UR7 QB6UR8 QB6UR9 Q86US0 Q86US1 Q86US2 Q81X43 Q81X44 Q81X45 Q81X46 Q81X47 Q81X48 Q81X49 Q81X50 Q81X51 Q81X52 Q81X53 Q81X54 Q81X55 Q81X56	

FIGURA 6D

Proteína	Organismo		EC#	GenBank	GenPept	SwissProt	PDB / 3D
				AY167995 AY167996 AY167997 AY167998 NM_006279 NM_174984 NM_174965 NM_174906 NM_174987 NM_174969 NM_174970 NM_174972	AA038809.1 AA038810.1 AA038811.1 AA038812.1 NP_006270.1 NP_777624.1 NP_777625.1 NP_777626.1 NP_777627.1 NP_777629.1 NP_777630.1 NP_777632.1	Q81X57 Q81X58	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal IV		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L23767 AF035249 BC010645 AY040826 AF516602 AF516603 AF516604 AF525084 X74570 CR456858 NM_003278	AAA16460.1 AAC14162.1 AAH10645.1 AAK93790.1 AAM66431.1 AAM66432.1 AAM66433.1 AAM81378.1 CAA52662.1 CAG33139.1 NP_006269.1	Q11206 O60497 Q96QQ9 Q8N6A6 Q8N6A7 Q8NFD3 Q8NFG7	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal VI		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.4	AF119391 BC023312 AB022918 AX877828 AX886023 NM_008100	AAD39131.1 AAH23312.1 BAA77609.1 CAE89895.1 CAF00161.1 NP_006091.1	Q9Y274	
α -2,6-sialiltransferase (ST6Gal II ; KIAA1877)		<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC008680 AB058780 AB059555 AJ512141 AX795193 AX795193 NM_032528	AAH08680.1 BAB47506.1 BAC24793.1 CAD54408.1 CAE48260.1 CAE48261.1 NP_115917.1	Q86Y44 Q8IUG7 O961-1E4 Q96JF0	
α -2,6-sialiltransferase (ST6GALNAC III)		<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC059363 AY358540 AK091215 AJ507291 NM_152996	AAH59363.1 AAQ88904.1 BACO3611.1 CAD45371.1 NP_694541.1	Q8N259 Q8NDV1	
α -2,6-sialiltransferase (ST6GalNAc V)		<i>Homo sapiens</i>	n.d.	BC001201 AK056241 AL0354D9 AJ507292 NM_030965	AAH01201.1 BAB71127.1 CAB72344.1 CAD45372.1 NP_112227.1	Q9BVH7	
α -2,8-sialiltransferase (SThM) ST6GalNAc II		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U14550 BC04C455 AJ251053 NM_006456	AAA52228.1 AAH40455.1 CAB61434.1 NP_006447.1	Q9UJ37 Q12971	
α -2,6-sialiltransferase ST6Gal I		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.1	BC031476 BC040009 A17362 A23699 X17247 X54363 X62822 NM_003032 NM_173216	AAH31476.1 AAH40009.1 CAA01327.1 CAA01686.1 CAA35111.1 CAA38246.1 CAA44634.1 NP_003023.1 NP_775323.1	P15907	
α -2,6-sialiltransferase ST6GalNAc I		<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.3	BC022462 AY096001 AY358918 AK00D113 Y11339	AAH22462.1 AAM22800.1 AAQ89277.1 BAA90953.1 CAA72179.2	O8TBJ5 Q9NSC7 Q9NXQ7	

FIGURA 6E

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept	SwissProt	PDS / 3D
			NM 018414	NP 060884.1	
α -2,8-polisialiltransferase ST8Sia IV	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L41680 BCO27866 BCO53657 NM 005663	AAC41775.1 AAH27866.1 AAH53657.1 NP 005659.1	Q8N1F4 Q92187 Q92693
α -2,8-sialiltransferase (GD3 sintase) ST8Sia I	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.E	L32867 L43494 BC046158 AY569975 Q26360 X77922 NM 003034	AAA62366.1 AAC37586.1 AAH46158.1 AAQ53140.1 AAS75783.1 BAA05391.1 CAA54891.1 NP 003025.1	Q86X71 Q92185 Q93084
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia II	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	L29556 U82762 U33551 BC069584 NM_006011	AAA36613.1 AAB51242.1 AAC24458.1 AAH69584.1 NP_006002.1	Q92186 Q92470 Q92746
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia III	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF004668 AF003092 NM_015879	AAB87642.1 AAC15901.2 NP_056963.1	Q43173 Q9NS41
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia V	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	U91641 CR457037 NM_013305	AAC51727.1 CAG33318.1 NP_037437.1	Q15466
ENSP00000020221 (fragmento)		n.d.	ACO23295	-	
lactosilceramida α -2,3-sialiltransferase (ST3Gal V)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.9	AF105026 AF119415 BC065936 AY152815 AAP65066 AY359105 AB018356 AX876536 NM_003896	AAD14634.1 AAF66146.1 AAH65936.1 AA016868.1 AAP65066.1 AAQ89463.1 BAA33950.1 CAE89320.1 NP_003887.2	Q9UNP4 Q94902
<i>N</i> -acetilgalactosaminida α -2,6-sialiltransferase (ST6GaINAc VI)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	BC005564 BC007802 BC016299 AY358672 AB035173 AK023900 AJ507293 AX880950 CR457318 NM_013443	AAH06564.1 AAH07802.1 AAH16299.1 AAQ89035.1 BAA87035.1 BAB14715.1 CAD45373.1 CAE91145.1 CAG33599.1 NP_038471.2	Q969X2 Q9H8A2 Q9ULB8
<i>N</i> -acetilgalactosaminida α -2,6-sialiltransferase IV (ST6GaINAc IV)	<i>Homo sapiens</i>	2.4.99.-	AF127142 BC036705 - AB035172 AKOODBOD Y17461 AJ271734 AX061620 AX068265 AX969252 NM_014403 NM_175039	AAF00102.1 AAH36705.1 AAP63349.1 BAA87034.1 BAA91281.1 CAB44354.1 CAC07404.1 CAC24981.1 CAC27250.1 CAF14360.1 N1 ^a _055218.3 NP_778204.1	Q9H4F1 Q9NWU6 Q9UKU1 Q9ULB9 Q9Y3G3 Q9Y3G4
ST8S1A-VI (fragmento)	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AJ621583 XM_291725	CAF21722.1 XP_291725.2	
produto proteico sem nome	<i>Homo sapiens</i>	n.d.	AK021929 AX1381696	BAB13940.1 CAE91353.1	Q9HAA9
Gal β -1,3/4-GlcNAc et.	<i>Mesocricetus</i>	2.4.99.6	AJ245699	CAB53394.1	Q9QXF6

FIGURA 6F

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept		SwissProt	PDB I 13D
2,3-sialiltransferase (ST3Gal III)	<i>auratus</i>					
Gal P-1,3/4-GlcNAc α -2,3-sialiltransferase (ST3Gal IV)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.6	AJ245700	CAB53395.1	Q9QXF5	
GD3 sintase (fragmento) ST8Sia	<i>Mesocricetus auratus</i>	n.d.	AF141657	AAD33879.1	Q91.1/UL1	
polisialiltransferase (ST8Sia M)	<i>Mesocricetus auratus</i>	2.4.99.-	AJ245701	CAI363396.1	Q9QXF4	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal I	<i>St3gal1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF214028 AK031344 AK078469 X73523 NM_009177	AAF60973.1 BAC27356.1 BAC37290.1 CAA51919.1 NP_033203.1	P54751 Q11202 Q9J1.20	
α -2,3-sialiltransferase - ST3Gal II	<i>St3gal2</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC015264 BC066064 AK034554 AK034663 AK053827 X76989 NM_009179 NM_178048	AAH15264.1 AAH66064.1 BAC28752.1 BAC28859.1 BAC35543.1 CAA54294.1 NP_033205.1 NP_835149.1	Q11204 Q8BPLO Q8BSA0 Q8BSE9 Q91WH6	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal III	<i>St3gan</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC006710 AK005053 AK013016 X84234 NM_000176	AAH06710.1 BAB23779.1 BAB28598.1 CAA59013.1 NP_033202.2	P97325 Q922X5 Q9CZ48 Q9DBB6	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal IV	<i>St3gal4</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	BC011121 8CO50773 D28941 AK008543 A13061335 X95809 NM_009178	AAH11121.1 AAHSO773.1 BAA06068.1 BAB25732.1 BAB47508.1 CAA65076.1 NP_033204.2	P97354 Q61325 Q91Y74 Q921 R5 Q9CVE8	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal VI	<i>St3ga1e</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.4	AF119390 BC052338 AB063326 AK033562 AK041173 NM_018784	AAD39130.1 AAH52338.1 BAB79494.1 BAC28360.1 BAC30851.1 NP_061254	Q8OUR7 Q8BLV1 Q8VIB3 Q9WVG2	
α -2,6-sialiltransferase ST6GalINac II	<i>St6galnac2</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	NM_009180 BC010208 AB027198 AK004613 X93999 X94000 NM_009180	6677963 AAH10208.1 BAB00637.1 8AB23410.1 CAA83821.1 CAA63822.1 NP_033206.2	P70277 Q9DC24 Q9JJM5	
α -2,6-sialiltransferase ST6Gal I	<i>St6gal1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.1	- BC027833 D16106 AK034768 AK084124 NM_145933	AAE68031.1 AAH27833.1 BAA03680.1 BAC28828.1 BAC39120.1 NP_666045.1	Q64685 Q8BM62 Q8K1 L1	
α -2,6-sialiltransferase ST6Gal II	<i>Stegal2</i> <i>Mus musculus</i>	n.d.	AK082566 AB095093 AK129462 NM_172829	BAC38534.1 BAC87752.1 BAC98272.1 NP_766417.1	Q8BUU4	
α -2,6-sialiltransferase ST6GalINac I	<i>Stegalnac1</i> <i>Mus musculus</i>	2.4.99.3	Y11274 NM_011371	CAA72137.1 NP_035501.1	Q9QZ39 Q9JJP5	
α -2,6-sialiltransferase ST6GalINac III	<i>St6galnac3</i> <i>Mus musculus</i>	n.d.	BC058387 AK034804 Y11342 Y11343	AAH58387.1 BAC28836.1 CAA72181.2 CAB95031.1	Q9WUV2 Q9JHP5	

FIGURA 6G

Proteína	Organismo		EC#	GenBank / GenPept		SwissProt	POB 1 3D
				NM 011372	NP_035502		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc IV	<i>St6galnac4</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.7	BCO56451 AK085730 AJ007310 Y15779 Y15780 Y19055 Y19057 NM 011373	AAH56451.1 BAC39523.1 CAA07446.1 CAB43507.1 CAB43514.1 CAB93946.1 CAB93948.1 NP_035503.1	Q8C3J2 Q9JHP2 Q9R2B6 088725 Q9JHP0 Q9QUP9 Q9R2B5	
α -2,8-sialiltransferase (GD3 sintase) ST8Sia I	<i>St8sial</i>	<i>Mus musculus</i>	2,4.99.8	L38677 BCO24821 AK046188 AK052444 X84235 AJ401102 NM 011374	AAA91869.1 AAH24821.1 BAC32625.1 BAC34994.1 CAA59014.1 CAC20706.1 NP_035504.1	Q64468 Q64687 Q8BL76 Q8BW10 Q8K1C1 Q9EPKO	
α -2,8-sialiltransferase (ST8Sia VI)	<i>St8sia6</i>	<i>Mus musculus</i>	n.d.	A8060564 AK085105 NM 145838	BAC01265.1 BAC39367.1 NP_665837.1	Q8B143 Q8K4T1	
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia II	<i>St8sia2</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	X83562 X99646 X99647 X99648 X99849 X99650 X99651 NM 009181	CAA58548.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 CAA67965.1 NP_033207.1	035696	
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia IV	<i>St8sia4</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.8	BC060112 AK00369D AK041723 AJ223956 X86000 Y09484 NM 009183	AAH60112.1 BAB22941.1 BAC31044.1 CAA11685.1 CAA59992.1 CAA70692.1 NP_033209.1	Q64692 Q813Y70	
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia V	<i>St8sfa5</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BCO34855 AK078670 X98014 X98014 X98014 NM_013666 NM_153124 NM 177416	AAI-134855.1 BAC37354.1 CAA66642.1 CAA66643.1 CAA66644.1 NP_038694.1 NP_694764.1 NP_803135.1	P70126 P70127 P70128 Q8BJWO Q8JZQ3	
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia III	<i>St8sia3</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BC075645 AK015874 X80502 NM 009182	AAH75645.1 BA830012.1 CAA56665.1 NP_033208.1	Q64689 Q9CUJ6	
GD1 sintase (ST6GaINAc V)	<i>St6gainac5</i>	<i>Mus musculus</i>	n.d.	BCO55737 AB030836 A8028840 AK034387 AK038434 AK042683 NM 012028	AAH55737.1 BAA85747.1 BAA89292.1 BAC28693.1 BAC29997.1 BAC31331.1 NP_036158.2	Q8CAM7 Q8CBX1 Q9QYJ1 Q9ROK6	
GM3 sintase (α -2,3- sialiltransferase) ST3Ga1 V	<i>St3ga15</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.9	AF119416 - A13018048 A8013202 AK012961 Y15003 NM_011375	AAF66147.1 AAP65063.1 BAA33491.1 BAA76467.1 BAB28571.1 CAA75235.1 NP_035505.1	088829 QOCZ66 Q9QVVF9	
N- acetilgalactosaminida α -2,6-sialiltransferase (ST6GaINAc VI)	<i>St6galnac6</i>	<i>Mus musculus</i>	2.4.99.-	BCO36985 AB035174 A0035123 AK030846	AAH36985.1 BAA87036.1 BAA95940.1 BAC27064.1	Q8CDC3 Q8JZW3 09JM95 Q9ROG9	

FIGURA 6H

Proteína	Organismo	EC#	GenBank I	GenPept	SwissProt	PDB 13D
M138L	<i>Myxoma virus</i>	n.d.	NM 016973 U46578 AF170726 NC_001132	NP 058669.1 AAD00069.1 AAE61323.1 AAE61326.1 AAF15026.1 NP 051852.1		
α -2,3-sialiltransferase (St3Gal I-1)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ565760	CAE51384.1		
α -2,6-sialiltransferase (Sia11)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AJ620649	CAF05848.1		
α -2,8-polisialiltransferase IV (ST6Sia IV)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	A6094402	BAC77411.1	Q7T2X5	
GalNAc α -2,6-sialiltransferase (RtST6GalNAc)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.d.	AB097943	BAC77520.1	Q7T2X4	
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal IV	<i>Oryzobolus cuniculus</i>	2.4.99.-	AF121967	AAF28871.1	Q9N257	
0J1217_F02.7	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AP004084	BAD07616.1		
OSJNBa0043L24.2 or OSJNB60002J11.9	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AL731626 AL662969	CAD41185.1 CAE04714.1		
P0683102.18 or P04891303.1	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	n.d.	AP003289 AP003794	BAB63715.1 BAB90552.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GalNAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Oryzias latipes</i>	n.d.	AJ646876	CAG26705.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744833	CAG32839.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal II (Siat5)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744834	CAG32840.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal III (Siat6)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626819	CAF25177.1		
α -2,3-sialyltransferase ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ626824	CAF25182.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal VI (Siat10)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744808	CAG32844.1		
α -2,6-sialiltransferase (Sia7A)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748740	CAG38615.1		
α -2,6-sialiltransferase (Sia7B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ748741	CAG38616.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GalNAc III (Siat7C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ634454	CAG25676.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GalNAc IV (Siat7D) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646870	CAG26699.1		
α -2,6-sialyltransferase ST6GalNAc V (Siat7E)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646875	CAG26704.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GalNAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ646882	CAG26711.1		
α -2,8-sialyltransferase BA (Siat8A)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.8	AJ697658	CAG26896.1		
α -2,8-sialiltransferase aB (Siat8B)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697659	CAG26897.1		
α -2,8-sialiltransferase 8C (Siat8C)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697660	CAG26898.1		
α -2,8-sialyltransferase 8D (Siat8D)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697661	CAG26899.1		
α -2.8.sialiltransferase	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697662	CAG26900.1		

FIGURA 6I

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept		Swiss	PDB / 3D
8E (Siat8E)						
α -2,8-sialiltransferase 8F (Siat8F)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ697663	CAG26901.1		
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferase I (ST6Gal I; Siat1)	<i>Pan troglodytes</i>	2.4.99.1	AJ627624	CAF29492.1		
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferase II (ST6Gal II)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ627625	CAF29493.1		
GM3 sintase ST3Gal V (Siat9)	<i>Pan troglodytes</i>	n.d.	AJ744807	CAG32843.1		
S138L	<i>Rabbit fibroma virus Kasza</i>	n.d.	NC 001266	NP_052025		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.6	M97754 NM_031697	AAA42146.1 NP_113885.1		Q02734
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal IV (Siat4c)	<i>Pettus norvegicus</i>	n.d.	AJ626825	CAF25183.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal VI	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ626743	CAF25053.1		
α -2,6-sialiltransferase ST3Gal II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	X76988 NM031695	CAA54293.1 NP_113883.1		Q11205
α -2,6-sialiltransferase ST6Gal I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.1	M18769 M83143	AAA41196.1 AAB07233.1		P13721
α -2,5-sialiltransferase ST6GaINAc I (Siat7A)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634458	CAG25684.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc II (Siat7B)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ634457	CAG25679.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L29554 BC072501 NM_019123	AAC42086.1 AAH72501.1 NP_061996.1		Q64686
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc IV (Siat7D) (fragmento)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646871	CAG26700.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc Vi (Siat7E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646872	CAG26701.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ646881	CAG26710.1		
α -2,8-sialiltransferase (GD3 sintase) ST8Sia I	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U53883 D45255	AAC27541.1 BAA08213.1		P70554 P97713
α -2,8-sialiltransferase (SIAT8E)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ690422	CAG27884.1		
α -2,8-sialiltransferase (SIATBF)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ699423	CAG27885.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia II	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	L13445 NM_057156	AAA42147.1 NP 476497.1		Q07977 Q64688
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia III	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U55938 NM013029	AAB50061.1 NP_037161.1		P97877
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia IV	<i>Rattus norvegicus</i>	2.4.99.-	U90215	AAB49989.1		008563
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferase II (ST6Gal II)	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AJ627626	CAF29494.1		
GM3 sintase ST3Gal V	<i>Rattus norvegicus</i>	n.d.	AB018049 NM031337	BAA33492.1 NP112627.1		088830

FIGURA 6J

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GonPept		SwissProt	PDB /3D
sialiltransferase ST3Gal-1 (Siat4A)	<i>Rattus nonlegicus</i>	n.d.	AJ746840	CAG44449.1		
α -2,3-sialiltransferase (ST3Gal-11)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	AJ585763	CAE51387.1		
α -2,6-sialiltransferase (Siat7b)	<i>Silurana tropicalis</i>	n.d.	A.1820650	CAF05849.1		
α -2,6-sialiltransferase (ST6Galnac)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	n.d.	AJ699425	CAG27887.1		
α -2,3-sialiltransferase (ST3GAL-111)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ5B5765	CAE51389.1		
α -2,3-sialiltransferase (ST3GAL-IV)	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ5B4674	CAE48299.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal I	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.4	M97753	AAA31125.1	Q02745	
α -2,6-sialiltransferase - (fragmento) ST6Gal 1	<i>Sus scrofa</i>	2.4.99.1	AF136748	AAD33059.1	Q9XSG8	
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferase (ST6GaINAc-V)	<i>Sus sacra</i>	n.d.	AJ620948	CAF06585.2		
sialiltransferase (fragmento) ST6Gal	<i>sus scrofa</i>	n.d.	AF041031	AAC15633.1	062717	
ST6GALNAC-V	<i>Sus scrofa</i>	n.d.	AJ620948	CAF06585.1		
α -2,3-sialiltransferase (Siat5-r)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ7448D5	CAG32841.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal I (Siat4)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626816	CAF25174.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal II (Siat5) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626617	CAF25175.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal III (Siat6)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ626818	CAF25176.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6Gal I (Siat1)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ741800	CAG32836.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc II (Siat7B)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634460	CAG25681.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc 11B (Siat7B-related)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634461	CAG25682.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc III (Siat7C) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ634456	CAG25678.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc IV (sial7D) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	2.4.99.3	Y17466 AJ646869	CAB44338.1 CAG26698.1	Q9W6U6	
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc V (Siat7E) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646873	CAG26702.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GaINAc VI (Siat7F) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ646880	CAG26709.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia I (Siat 8A) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715534	CAG29373.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia II (Siat 8B) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715538	CAG29377.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia III (Siat 8C) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715541	CAG29380.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia IIir (Siat 8Cr)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715542	CAG29381.1		
α -2,8-sialiltransferase STEISia V (Siat 8E)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715547	CAG29386.1		

FIGURA 6K

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPapt		SwissProt	PDB / 3D
(fragmento)						
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia VI (Slat 8F) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715549	CAG29388.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia Vlr (Slat 8Fr) (fragmento)	<i>Takifugu rubripes</i>	n.d.	AJ715550	CAG29389.1		
α -2,3-sialiltransferase (Slat5-r)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744806	CAG32842.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal I (Slat4)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ744802	CAG32838.1		
α -2,3-sialiltransferase ST3Gal III (Slat6)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ626822	CAF25180.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GalNAc II (Slat7B)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ634462	CAG25683.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GalNAc V (Slat7E) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ646879	CAG26706.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia I (Slat 8A) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715536	CAG29375.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia II (Slat 8B) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715537	CAG29376.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia III (Slat 8C) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715539	CAG29378.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia IIk (Slat 8Cr) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715540	CAG29379.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia V (Slat 8E) (fragmento)	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	n.d.	AJ715548	CAG29387.1		
α -2,3-sialiltransferase (St3Gal-11)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585762	CAE51386.1		
α -2,3-sialiltransferase (MGM-VI)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585766	CAE51390.1		
α -2,3-sialiltransferase St3Gal-III (Slat6)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AJ585764	CAE51388.1		
α -2,8-polisialiltransferase	<i>Xenopus laevis</i>	2.4.99.-	AB007468	BAA32617.1	O93234	
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia-I (Slat8A;GD3 sintase)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	AY272056 AY272057 AJ704562	AAQ16162.1 AAQ16163.1 CAG28695.1		
Desconhecido (Proteína para MGC:81265)	<i>Xenopus laevis</i>	n.d.	BC068760	AAH68760.1		
α -2,3-sialiltransferase (3Gal-V1)	<i>Xenopus hopioafis</i>	n.d.	AJ626744	CAF25054.1		
α -2,3-sialiltransferase (Slat4c)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ622908	CAF22058.1		
α -2,6-sialiltransferase ST6GalNAc V (Slat7E) (fragmento)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ6461378	CAG26707.1		
α -2,8-sialiltransferase ST8Sia III (Slat 8C) (fragmento)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ715544	CAG29383.1		
β -galactosamida α -2,6-sialiltransferase II (ST6Gal II)	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AJ627628	CAF29496.1		
sialiltransferase St8Sial	<i>Xenopus tropicalis</i>	n.d.	AY652775	AAT67042		
poli- α -2,8-sialosil sialiltransferase (NeuS)	<i>Escherichia coli K1</i>	2.4.-.-	M76370 X60598	AAA24213.1 CAA43053.1	Q57269	
polisialiltransferase	<i>Escherichia coli K92</i>	2.4.-.-	M88479	AAA24215.1	Q47404	

FIGURA 6L

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept		SwissP rot'	PDB 13D
α -2,8 polisialiltransferase SiaD	<i>Neisseria meningitidis</i> 61940	2.4.-.-	M95053 X78068	AAA20478.1 CAA54985.1	Q51281 Q51145	
SynE	<i>Neisseria meningitidis</i> FAM18	n.d.	U75650	AAB53842.1	006435	
polisialiltransferase (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M1019	n.d.	AY234192	AA085290.1		
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M209	n.d.	AY281045	AAP34769.1		
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3045	n.d.	AVM 044	AAP34767.1		
polisialiltransferase (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3315	n.d.	AY234191	AA085289.1		
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M3515	n.d.	AY281047	AAP34770.1		
polisialiltransferase (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M4211	n.d.	AY234190	AA085288.1		
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M4642	n.d.	AY281048	AAP34771.1		
polisialiltransferase (SiaD)(fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M5177	n.d.	AY234193	AA085291.1		
SiaD	<i>Neisseria meningitidis</i> M5178	n.d.	AY231043	AAP34766.1		
SiaD (fragmento)	<i>Neisseria meningitidis</i> M980	n.d.	AY281045	AAP34768.1		
NMB0067	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	n.d.	NC_003112	NP_273131		
Lst	<i>Aeromonas punctata</i> Sch3	n.d.	AF126255	AAS66624.1		
ORF2	<i>Haemophilus influenzae</i> A2	n.d.	M94855	AAA24979.1		
H11699	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	n.d.	U32842 NC_000907	AAC23345.1 NP_439841.1	Q48211	
α -2,3-sialiltransferase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> F62	2.4.99.4	U60664	AAC44539.1 AAE67205.1	P72074	
α -2,3-sialiltransferase	<i>Neisseria meningitidis</i> 126E, NRCC 4010	2.4.99.4	U60662	AAC44544.2		
α -2,3-sialiltransferase	<i>Neisseria meningitidis</i> 406Y, NRCC 4030	2.4.99.4	U60661	AAC44543.1		
α -2,3-sialiltransferase (NMB0922)	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	2.4.99.4	U60660 AE002443 NC_003112	AAC44541.1 AAF41330.1 NP_273962.1	P72097	
NMA1118	<i>Neisseria meningitidis</i> 22491	n.d.	AL162755 NC_003116	CAB84380.1 NP_283887.1	Q9JUV5	
PM0508	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d.	AE006086 NC_002683	AAK02592.1 NP_245445.1	Q9CNC4	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB25	n.d.	AF519787	AAM82550.1	Q8KS93	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB3	n.d.	AF519788	AAM82551.1	Q8KS92	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB39	n.d.	AF519789	AAM82552.1		
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB53	n.d.	AF519790	AAM82553.1		
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB57	n.d.	AF519791	AAM82554.1	Q8KS91	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i> SARB71	n.d.	AF519793	AAM82556.1	Q8KS89	
WaaH	<i>Salmonella enterica</i>	n.d.	AF519792	AAM82555.1	Q8KS90	

FIGURA 6M

Proteína	Organismo	ECU	Gen Bank / GenPept		SwissProt	PDD / 3D
	<i>SARB8</i>					
WaaH	<i>Salmonella enterica SARC10V</i>	n.d.	AF519779	AAM88840.1	Q8KS99	
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica SARC12</i>	n.d.	AF519781	AAM88842.1		
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica SARC131</i>	n.d.	AF519782	AAM88843.1	Q3KS98	
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica SARC141</i>	n.d.	AF519783	AAM88844.1	Q8KS97	
WaaH	<i>Salmonella enterica SARC151/</i>	n.d.	AF519784	AAM88845.1	Q8KS96	
WaaH	<i>Salmonella enterica SARC1611</i>	n.d.	AF519785	AAM88846.1	QBKS95	
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica SARC31</i>	n.d.	AF519772	AAM88834.1	Q8KSA4	
WaaH (fragmento)	<i>Salmonella enterica SARC41</i>	n.d.	AF519773	AAM88835.1	Q8KSA3	
WaaH	<i>Salmonella enterica SARC511a</i>	n.d.	AF519774	AAM88836.1		
WaaH	<i>Salmonella enterica SARC6113</i>	n.d.	AF519775	AAM88837.1	Q8KSA2	
WaaH	<i>Salmonella enterica SARC8</i>	n.d.	AF519777	AAM88838.1	Q8KSA1	
WaaH	<i>Salmonella enterica SARC9V</i>	n.d.	AF519778	AAM88839.1	Q8KSA0	
UDP-glicose : α -1,2-glicosiltransferase (WaaH)	<i>Salmonella enterica subsp. arizonae SARC 5</i>	2.4.1.-	AF511116	AAM48166.1		
bifuncional α -2,3/-2,8-sialiltransferase (Cst-11)	<i>Campylobacter jejuni ATCC 43449</i>	n.d.	AF401529	AAL06004.1	Q93CZ5	
Cst	<i>Campylobacter *ejuni 81-176</i>	n.d.	AF305571	AAL09368.1		
α -2,3-sialiltransferase (Cst-III)	<i>Campylobacter jejuni ATCC 43429</i>	2.4.99.-	AY044156	AAK73183.1		
α -2,3-sialiltransferase (Cst-III)	<i>Campylobacter jejuni ATCC 43430</i>	2.4.99.-	AF400047	AAK85419.1		
α -2,3-sialiltransferase (Cst-II)	<i>Campylobacter ejuni ATCC 43432</i>	2.4.99.-	AF215659	AAG43979.1	Q9FCM9	
α -2,3/8-sialiltransferase (CstII)	<i>Campylobacter jejuni ATCC 43438</i>	n.d.	AF400048	AAK91725.1	Q93N1Q0	
α -2,3-sialiltransferase cst-I	<i>Campylobacter jejuni ATCC 43446</i>	2.4.99.-	AF167344	AAF34137.1		
α -2,3-sialiltransferase (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni ATCC 43456</i>	2.4.99.-	AF401528	AAL05990.1	Q93D05	
α -2,3*/ α -2,8-sialiltransferase (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni ATCC 43460</i>	2.4.99.-	AY044668	AAK96001.1	Q938K6	
α -2,3/8-sial (transferase Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni ATCC 700297</i>	n.d.	AF216647	AAL36462.1		
ORF	<i>Campylobacter jejuni GB11</i>	n.d.	AY422197	AAR82875.1		
α -2,3-sialiltransferase cst-III	<i>Campylobacter jejuni MSC57360</i>	2.4.99.-	AF195055	AAG29922.1		
α -2,3-sialiltransferase cst-III Ci1140	<i>Campylobacter jejuni NCTN 11168</i>	2.4.99.-	AL139077 NC 002163	CAB73395.1 NP 282288.1	Q9PNF4	
α -2,3/ α -2,8-sialiltransferase II (cstII)	<i>Campylobacter jejuni O:10</i>	n.d.	AX934427	AA096669.1 CAF04167.1		
α -2,3/ α -2,8-sialiltransferase II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni O:19</i>	n.d.	AX934431	CAF04169.1		
α -2,3/ α -2,8-sialiltransferase II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni O:36</i>	n.d.	AX934436	CAF04171.1		
α -2 3/ α -2,8-	<i>Campylobacte</i>	n.d.	AX934434	CAF04170.1		

FIGURA 6N

Proteína	Organismo	EC#	GenBank / GenPept		Swiss Prot	PDB /3D
sialiltransferase II (CstII)	<i>jejuni</i> O:4					
m-2,3/a-2,8-sialiltransferase II (CstII)	<i>Campylobacter jejuni</i> O:41	n.d.	- AX934429	AA096670.1 AAT17967.1 CAF04168.1		
cc-2,3-sialiltransferase cst-I	<i>Campylobacter jejuni</i> O H 43 84	2.4.99.-	AF130466 -	AAF13495.1 AAS36261.1	- AX934429	
bifuncional oc.-2,31-2,8-sialiltransferase (Cst-II)	<i>Campylobacter jejuni</i> OH4384	2.4.99.-	AF130984 AX934425	AAF31771.1 CAF04166.1	AF130466 -	
HI0352 (fragmento)	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	n.d.	U32720 X57315 NC 000907	AAC22013.1 CAA40567.1 NP 438516.1	AF130984 AX934425	
PM1174	<i>Pasteurella multocida</i> PM70	n.d.	AE006157 NC 002663	AAK03258.1 NP_246111.1	U32720 X57315 NC 000907	
Seqüência 10 de patente US 6503744	Desconhecido.	n.d.		AA096672.1		
Seqüência 10 de patente US 6699705	Desconhecido.	n.d.		AAT17969.1		
Seqüência 12 de patente US 6699705	Desconhecido.	n.d.		AAT17970.1		
Seqüência 2 de patente US 6709834	Desconhecido..	n.d.		AAT23232.1		
Seqüência 3 de patente US 6503744	Desconhecido.	n.d.		AA096668.1		
Seqüência 3 de patente US 6699705	Desconhecido.	n.d.		AAT17965.1		
Seqüência 34 de patente US 6503744	Desconhecido.	n.d.		AA096684.1		
Seqüência 35 de patente US 6503744 (fragmento)	Desconhecido.	n.d.		AA096685.1 AAS36262.1		
Seqüência 48 de patente US 6699705	Desconhecido.	n.d.		AAT17988.1		
Seqüência 5 de patente US 6699705	Desconhecido.	n.d.		AAT17966.1		
Seqüência 9 de patente US 6503744	Desconhecido.	n.d.		AA096671.1		

FIGURA 7A

12AP1/E5 Viventia Biotech	Vacina de AIDS- ANRS, CIBG, Hesed
1964 -- Aventis	Biomed, Hollis-Eden, Rome, United
20K hormônio do cresc. -- AMU R	Biomedical, American Home Products,
28P6/E6 Viventia Biotech	Maxygen
3-Hidroxiftaloil-beta-lacto globulin	Ligante de receptor de vias aéreas -
4-IBB ligand gene therapy	IC Innovations
64-Cu MAb conjugadoTETA-1 A3	AJvW 2 -- Ajinomoto
Mallinckrodt Institute of	AK 30 NGF Alkermes
Radiology	Albuferon Human Genome Sciences
64-Cu MAb conjugadoTETA-cT84.66	albumin a- Biogen, DSM Anti-
64-Cu Trastuzumab TETA conjugado-	Infectives,
Genentech	Genzyme Transgenics, PPL
A 200 Amgen	Therapeutics, TranXenoGen, Welfide
A10255 -- Eli Lilly	Corp.
Al PDX -- Nedra! Therapeutic s	aldesleucina -- Chiron
A6 Angstrom	alefacept Biogen
aaAT-III-- Genzyme	Alemtuzumab
Abciximab -- Centocor	Allergy therapy ALK-Abello/Maxygen,
ABI.001 -- Atlantic BioPharmaceuticals	ALK-Abello/RP Scherer
ABT-828 -- Abbott	Vacinas para alergia- Allergy
Accutin	Therapeutics
Actinohivin	Alnidofibatide Aventis Pasteur
activin -- Biotech Australia, Human	Alnorina SRC VB VECTOR
Therapeutics, Curls	ALP 242 -- Gruenenthal
AD 439 -- Tanox	Alfa antitripsina Arriva/Hyland
AD 519 -- Tanox	Immuno/ProMetic/Protease Sciences
Adalimumab -- Cambridge Anticorpo	Alfa-1 antitripsina -- Cutter, Bayer,
Tech.	PPL
Vacina de Adenocarcinoma- Biomira --	Therapeutics, Profile,
NIS	ZymoGenetics,
Adenosina deanimase Enzond	Arriva
Adenosina A2B receptor antagonists	Alfa-1 protease inibidor -- Genzyme
Adenosina Therapeutics	Transgenics, Welfide Corp.
ADP-001 -- Axis Genetics	proteína de fusão de alfa-
AF 13948 --Affymax	galactose-
Afelimomab -- Knoll	Immunomedics
AFP-SCAN -- Immunomedics	Alfa-galactosidase A -- Research
AG 2195 -- Corixa	Corporation Technologies, Genzyme
agalsidase alfa Transkaryot	Alfa-glicosidase -- Genzyme,
Therapies	Novazyme
agalsidase beta -- Genzyme	Alfa-lactalbumina
AGENT- Antisoma	Alfa-L-iduronidase Transkaryotic
Al 300 -- AutoImmune	Therapies, BioMarin
Al-101 -- Teva	alteplase -- Genentech
AI-102 -- Teva	alvircept sudotox NIH
AI-201 -- AutoImmune	ALX1-11 -sNPS Pharmaceuticals
AI-301 -- AutoImmune	Alzheimer's disease gene therapy
	AM-133 AMRAD
	Amb a 1 immunostim conj. -- Dynavax
	AMD 3100 - AnorMED-- NIS
	AMD 3465 - AnorMED-- NIS

FIGURA 7B

AMD 3465 - AnorMED-- NIS	Anti-B7-2 MAb GL-1
AMD Fab -- Genentech	imunotoxina Anti-B7-2-gelonin -
Amediplase - Menarini, Novartis	Antibacterianos/antifúngicos-
AM-F9	Diversa/IntraBiotics
Vacina para Amebíase	anticorpos monoclonais Anti-beta-
Amfiregulin Octagene	amilóide-
anakinra -- Amgen	Cambridge Antibdy Tech., Wyeth
analgésico -- Nobex	Ayerst
ancestim -- Amgen	Anti-BLyS anticorpos -- Cambridge
AnergiX.RA - Corixa, Organon	Anticorpo Tech. /Human Genome
Angiocidin InKine	Sciences
angiogenesis inibidors -- ILEX	Conjugados Anticorpo-medimento -
AngioMab - Antisoma	Seattle Genetics/Eos
Angiopietinas Regeneron/Procter &	Anti-05 MAB BB5-1 Alexion
Gamble	Anti-05 MAB N19-8 --Alexion
angiostatina EntreMed	Anti-C8 MAB
terapia genética de	Cicocinas anticâncer BioPulse
angiostatina/endostatina	Matriz anticâncer - Telios Integra
Genetix Pharmaceuticals	anticorpos monoclonais Anticâncer-
angiotensina-II, tópica -- Maret	ARIUS, Immunex
Antrax -- EluSys Therapeutics/US	Peptídeos anticâncer - Maxygen,
Army	Micrologix
Medical Research nstitute	Pró-fármaco Anticâncer Tech. --
Antrax vaccine	Alexion
Anti- Fator D de cresc. derivado de	Anticorpo Technologies
plaquetas	Anticâncer Troy-Bodies -- Affite
anticorpos monoclonais humanos -	Affitech
CuraGen	Vacina anticâncer -- NIH
Anti-17-1A MAB 3622W94 -	Anticanceres Epimmune
GlaxoSmithKline	Anti-CCR5/CXCR4 MAB de carn.-- KS
Anti-2C4 MAB -- Genentech	Biomedix Holdings
anti-4-1BB anticorpos monoclonais -	Anti-CD11 a MAB KBA -
Bristol-Myers Squibb	Anti-CD11a MAB M17
Anti-Adhesion Platform Tech. --	Anti-CD11a MAB TA-3 -
Cytovax	Anti-CD11a MAB WT.1 -
Anti-adipócitoMAB -- Cambridge	Anti-CD11b MAB -Pharmacia
Antibocorpo Tech./ObeSys	Anti-CD11b MAB IM2
antialérgico Maxygen	Anti-CD154 MAB -Biogen
vacina antialergia - Acambis	Anti-CD16-anti-CD30 MAB-Biotest
Anti-Alfa-4-integrina	Anti-CD18 MAB - Pharmacia
Anti-Alfa β 3 integrina MAB - Applied	Anti-CD19 MAB B43-
Molecular Evolution	Anti-CD19 MAB-conjugado de
anticorpos monoclonais Anti-	butirato de sódio lipossômico
angiogênese-KS Biomedix/Schering	Anti-CD147
AG	Anti-CD19 MAB-conjugado de
Anti-B4 MAB-DC1 conjugado-	saporina
ImmunoGen	Anti-CD19-dsFv-PE38-imunotoxina
anticorpo Anti-B7 PRIMATIZED IDEC	Anti-CD2 MAB 12-15
Anti-B7-1 MAB 16-10A1	Anti-CD2 MAB B-E2-Diaclone
Anti-B7-1 MAB 1G10	Anti-CD2 MAB OX34-

FIGURA 7C

Anti-CD2 MAb OX54 –	Anti-CD4 MAb YTS 177-9
Anti-CD2 MAb OX55 –	Anti-CD40 ligante MAb 5c8 -- Biogen
Anti-CD2 MAb RM2-1	Anti-CD40 MAb
Anti-CD2 MAb RM2-2	Anti-CD40 MAb 5D12 – Tanox
Anti-CD2 MAb RM2-4	Anti-CD44 MAb A3D8
Anti-CD20 MAb BCA B20	Anti-CD44 MAb GKWA3
Anti-CD20-anti-Fc alfa RI MAb biespecífica	Anti-CD44 MAb IM7
Medarex, Tenovus	Anti-CD44 MAb KM81
Anti-CD22 MAb-saporin-6 complexo –	Anticorpos monoclonais variantes
Anti-CD3 imunotoxina –	Anti-CD44 Corixa/Hebrew University
Anti-CD3 MAb 145-2C11 -- Pharming	Anti-CD45 MAb BC8-I-131
Anti-CD3 MAb CD4IgG conjugado --	Anti-CD45RB MAb
Genentech	Anti-CD48 MAb HuLy-m3
Anti-CD3 MAb humanizado I – Protein Design,	Anti-CD48 MAb WM-63
RW Johnson	Anti-CD5 MAb – Becton Dickinson
Anti-CD3 MAb WT32	Anti-CD5 MAb OX19
Anti-CD3 MAb- ricina-cadeia-A conjugado	Anti-CD6 MAb
Anti-CD3 MAb- xantina-oxidase conjugado	Anti-CD7 MAb-PAP conjugate
–	Anti-CD7 MAb-ricina-cadeia-A conjugado
Anti-CD30 MAb BerH2 -- Medac	Anti-CD8 MAb – Amerimmune, Cytodyn,
Anti-CD30 MAb-saporin conjugado	Becton Dickinson
Anti-CD30-scFv-ETA imunotoxina I	Anti-CD8 MAb 2-43
Anti-CD38 MAb AT13/5	Anti-CD8 MAb OX8
Anti-CD38 MAb-saporin conjugado	Anti-CD80 MAb P16C10 -- IDEC
Anti-CD3-anti-CD19 MAb biespecífica	Anti-CD80 MAb P7C10 -- ID Vaccine
Anti-CD3-anti-EGFR MAb	Anti-CD8-idarrubicina conjugado
Anti-CD3-anti-interleukin-2-receptor MAb	Anti-CEA MAb CE-25
Anti-CD3-anti-MOV18 MAb -- Centocor	Anti-CEA MAb MN 14 – Immunomedics
Anti-CD3-anti-SCLC MAb biespecífica	Anti-CEA MAb MN14-PE40 conjugado –
Anti-CD4 vacina de idiótipo	Immunomedics
Anti-CD4 MAb – Centocor, IDEC	Anti-CEA MAb T84.66- interleucina-2
Pharmaceuticals, Xenova Group	conjugado
Anti-CD4 MAb 16H5	Anti-CEA sheep MAb -- KS Biomedix
Anti-CD4 MAb 4162W94 -- GlaxoSmithKline	Holdings
Anti-CD4 MAb B-F5 -- Diaclone	Anticorpos monoclonais anti-superfície cel.
Anti-CD4 MAb GK1-5	Cambridge Antibody Tech. /Pharmacia
Anti-CD4 MAb KT6	Anti-c-erbB2-anti-CD3 MAb bifuncional --
Anti-CD4 MAb OX38	Otsuka
Anti-CD4 MAb PAP conjugado -- Bristol-	Anti-CMV MAb -- Scotgen
Myers Squibb	Anti-complemento
Anti-CD4 MAb RIB 5-2	Anti-CTLA-4 MAb
Anti-CD4 MAb W3/25	Anti-EGFR anticorpo catalítico Hesus
Anti-CD4 MAb YTA 3.1.2	Biomed

FIGURA 7D

anti-EGFR imunotoxina -- IVAX	Anti-ICAM-1 MAb HA58
Anti-EGFR MAb -- Abgenix	Anti-ICAM-1 MAb YN1/1.7.4
Anti-EGFR MAb 528	Anti-ICAM-3 MAb ICM3 - ICOS
Anti-EGFR MAb KSB 107 -- KS	vacina de câncer de mama
Biomedix Anti-EGFR MAb-DM1	Anti-idiotipo 11D10
conjugado-- ImmunoGen	vacina de câncer de mama
Anti-EGFR MAb-LA1 --	Anti-idiotipo ACA14C5 --
Anti-EGFR de carneiro MAb -	vacina de câncer Anti-idiotipo
- KS Biomedix Anti-FAP MAb	-- ImClone Systems/ Merck KGaA
F19-I-131	ImClone, Viventia Biotech
Anti-Fas IgM MAb CH11	vacina de câncer Anti-idiotipo
Anti-Fas MAb Jo2	1A7 -- Titan
Anti-Fas MAb RK-8	vacina de câncer Anti-idiotipo
Anti-Flt-1 anticorpos	3H1 -- Titan
monoclonais -- ImClone Anti-	vacina de câncer Anti-idiotipo
fungal peptides -- State	TriAb -- Titan
University of New York	vacina Anti-idiotipo de
antifungal tripeptides -- BTG	Chlamydia trachomatis
Anti-ganglioside GD2 anticorpo-	vacina de câncer colorretal
interleukin-2 fusion protein --	Anti-idiotipo -- Novartis
Lexigen	vacina de câncer colorretal
Anti-GM2 MAb -- Kyowa	Anti-idiotipo -- Onyvax
Anti-GM-CSF receptor anticorpos	vacina de melanoma Anti-idiotipo
monoclonais -- AMRAD	IDEC Pharmaceuticals
Anti-gp130 MAb -- Tosoh	vacina de câncer ovariano
Anti-HCA anticorpos monoclonais	Anti-idiotipo ACA 125
- AltaRex/Epigen	vacina de câncer ovariano Anti-
Anticorpos Anti-hCG --	idiotipo AR54 - - AltaRex
Abgenix/AVI BioPharma	vacina de câncer ovariano
Anticorpos monoclonais anti-	Anti-idiotipo CA125 -- AltaRex,
heparanase humana - Oxford	Biomira
Glycosciences/Medarex	Anti-IgE anticorpo catalítico --
anticorpos monoclonais Anti-	Hesed Biomed Anti-IgE MAb E26 --
vírus da hepatite C human a--	Genentech
XTL Biopharmaceuticals Anti-	Anti-IGF-1 MAb
HER-2 terapai gênica	Antiinflamatório -- GeneMax
anticorpo Anti-herpes	Peptídeo antiinflamatório --
anticorpo -- Epicyte	BTG
Anti-HIV anticorpo -- Epicyte	Peptídeos anti-integrina --
anti-HIV anticorpo catalítico--	Burnha
Hesed Biomed anti-HIV proteína	Anti-interferon-alfa-receptor MAb
de fusão-- Idun	64G12 --Pharma Pacific Management
proteínas anti-HIV -- Cangene	Anti-interferon-gama MAb -
Anti-HM1-24 MAb -- Chugai	Protein Design Labs
Anti-hR3 MAb Anti-Human-	Anti-interferon-gama anticorpo
Carcinoma-Antígeno MAb --	policlonal- - Advanced
Epicyte	Biotherapy
Anti-ICAM-1 MAb -- Boehringer	Anti-interleucina-10 MAb --
Ingelheim	Anti-interleucina-12 MAb --
Anti-ICAM-1 MAb 1A-29 --	Anti-interleucina-1-beta
Pharmacia	anticorpo policlonal- R&D
	Systems
	Anti-interleucina-2 receptor MAb
	2A3

FIGURA 7E

Anti-interleucina-2 receptor MAb 33B3-1 -Immunotech	Anticiorpos monoclonais anti-properdina
Anti-interleucina-2 receptor MAb ART-18	Abgenix/Gliatech
Anti-interleucina-2 receptor MAb LO-Tact-1	Anti-PSMA (antígeno de membrana espec. de próstata)
Anti-interleucina-2 receptor MAb Mikbetal	Anti-PSMA MAb J591 -- BZL Biologics
Anti-interleucina-2 receptor MAb NDS61	Anti-Rev MAb gene therapy --
Anti-interleucina-4 MAb 11B11	Anti-RSV anticorpos -- Epicyte, Intracell
Anti-interleucina-5 MAb -- Wallace Laboratories	Anticiorpos monoclonais Anti-RSV-Medarex/MedImmune, Applied Molecular Evolution/MedImmune
Anti-interleucina-6 MAb-Centocor, Diaclone, Pharmadigm	Anti-RSV MAb, inhalation -- Alkermes/Medimmune
Anti-interleucina-8 MAb Abgenix	Anti-RT gene therapy
Anti-interleucina-8 MAb -- Xenotech	Antisense K-ras RNA terapia de gene
Anti-JL1 MAb	Anti-SF-25 MAb
Anti-Klebsiella sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	anticorpo Anti-esperm -- Epicyte
Anti-Laminin receptor MAb-lipossomal	Anti-Tac (Fv) -PE38 conjugado
doxorubicina conjugado	Anti-TAPA/CD81 MAb AMP1
Anti-LCG MAb Cytoclonal	Terapia genin ca Anti-tat
anticorpos monoclonais Anti-L-seletin -Protein Design Labs, Abgenix, Stanford University	Anti-TCR-Alfabeta MAb H57-597
anticorpos monoclonais Anti-MBL -Alexion/Brigham and Women's Hospital	Anti-TCR-Alfabeta MAb R73
anticorpos monoclonais Anti-MHC	Anti-tenascin MAb BC-4-I-131
Anti-MIF anticorpo humanizado- IDEC, Cytokine PharmaSciences	Anti-TGF-beta human monoclonal anticorpos -- Cambridge Antibody Tech Genzyme
Anti-MRSANRSA sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	Anti-TGF-beta MAb 2G7 -- Genentech
Anti-mu MAb Novartis	Antitrombina III Genzyme
Anti-MUC-1 MAb	Transgenics, Aventis, Bayer, Behringwerke, CSL, Myriad
Anti-MUC 18	Anti-Thy1 MAb
Anti-Nogo-A MAb IN1	Anti-Thy1.1 MAb
Anti-nuclear autoanticorpos-- Procyon	Anti-fator tecidual/factor VIIA sheep MAb -KS Biomedix
anticorpos monoclonais Anti-câncer	Anti-TNF anticorpos monoclonais - Centocor, Chiron, Peptech, Pharmacia, Serono
de ovário-- Dompe	Anti-TNF sheep MAb -- KS Biomedix Holdings
anticorpos monoclonais Anti-p185	Anti-TNFA Alfa MAb Genzyme
Anti-p43 MAb	Anti-TNFA Alfa MAb B-C7
Vacinas Antiparasíticas	Diaclone
Anti-PDGF/bFGF sheep MAb KS Biomedix	Anti-tooth decay MAb -- Planet BioTech.
	Anti-TRAIL receptor-1 MAb Takeda
	Antitumor RNases NIH

FIGURA 7F

Anti-VCAM MAb 2A2 Alexion	ácido aurintricarboxílico-alto peso molecular
Anti-VCAM MAb 3F4 Alexion	Distúrbios Autoimunes - GPC
Anti-VCAM-1 MAb	Biotech/MorphoSys
Anti-VEC MAb ImClone	Distúrbios Autoimunes e rejeição a transplante -- Bristol-Myers
Anti-VEGF MAb - Genentech	Squibb/Genzyme Tra
Anti-VEGF MAb 2C3	Distúrbios Autoimunes /câncer -
Anti-VEGF sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	Abgenix/Chiron, CuraGen
Anti-VLA-4 MAb HP1/2 - Biogen	Autotaxin
Anti-VLA-4 MAb PS/2	Avicidin NeoRx
Anti-VLA-4 MAb R1-2	axogênese factor-1-- Boston Life Sciences
Anti-VLA-4 MAb TA-2	Axokine Regeneron
Anti-VAP-1 humana MAb	vacina de linfoma de cél. B - Biomira
Anti-VRE sheep MAb -- KS Biomedix Holdings	B7-1 gene therapy -
ANUP TranXenoGen	BABS proteínas - Chiron
ANUP-1 Pharis	BAM-002 Novelos Therapeutics
AOP-RANTES Senetek	Basiliximab (anti CD25 MAb)-
Apan-CH Praecis Pharmaceuticals	Novartis
APC-8024-Demegen	Bay-16-9996 -- Bayer
ApoA-1 -- Milano, Pharmacia	Bay-39-9437 -- Bayer
Apogen -Alexion	Bay-50-4798 -- Bayer
Apolipoproteína E -Bio Tech General	BB-10153--British Biotech
Applaggin -Biogen	BBT-001-- Bolder BioTech.
Aprotinina -ProdiGene	BBT-002-- Bolder BioTech.
APT-070C-AdPro Tech	BBT-003-- Bolder BioTech.
AR 177 -Aronex Pharmaceuticals,	BBT-004-- Bolder BioTech,
Antigenics	BBT-005-- Bolder BioTech,
AR545C	BBT-006-- Bolder BioTech.
ARGENT gene delivery systems -	BBT-007-- Bolder BioTech.
ARIAD	BCH-2763 -- Shire
ART-123 Kasei	BCSF Millenium Biologix
Arilsulfatase B-BioMarin	BDNF Regeneron -Amgen
Arilsulfatase B, Recombinante humana -BioMarin	Becaplermin -- Johnson & Johnson,
AS 1051 -Ajinomoto	Chiron
ASI-BCL -Intracell	Bectumomab - Immunomedic s
Asparaginase -Merck	Beriplast Aventis
ATL-101 -Alizyme	Terapia de gene de receptor Beta-
Peptídeo atraial natriurético -	adrenérgico
Pharis	University of Arkansas
	bFGF Scios
	BI 51013 - Behringwerke AG
	BIBH 1 - Boehringer Ingelhei m
	BIM-23190 - Beaufour-Ipsen
	birch pollen immunotherapy - Pharmacia
	proteínas de fusão biespecíficas
	--NIH

FIGURA 7G

biespecífico MAb 2B1 - Chiron	calcitonina -- oral - Nobex,
Bitistatin	Emisphere,
BIWA 4 -- Boehringer Ingelheim	Pharmaceutical Discovery
Substituto sanguíneo - Northfield,	gene de Calcitonina -related
Baxter Intl.	peptídeo Asahi
BLP-25 Biomira	Kasei Unigene
BLS-0597-Boston Life Sciences	calcitonina, humana -- Suntory
BLyS -- Human Genome Sciences	calcitonina, nasal - Novartis,
BLyS radiolabelled - Human Genome	Unigene
Sciences	calcitonina, Panoderm -- Elan
BM 06021Boehringer Mannheim	calcitonina, Peptitol -- Shire
BM-202 -- BioMarin	calcitonina, salmão -Therapicon
BM-301 -- BioMarin	calin Biopharm
BM-301 -- BioMarin	Calfobindin I
BM-302 BioMarin	caifobindin I -- Kowa
BMP 2 - Genetics Institute/Medtronic	calreticulina NYU
Sofamor Danek, Genetics	Campath-1 M
Institute/Collagenesis,	Terapia de câncer -- Cangene
Genetics Institute/Yamanouchi	vacina de câncer - Aixlie, Aventis
BMP 2 gene therapy	Pasteur, Center of Molecular
BMP 52 -- Aventis Pasteur, Biopharm	Immunology, YM
BMP-2 -- Genetics Institute	BioSciences, Cytos, Genzyme,
BMS 182248- Bristol-Myers Squibb	Transgenics, GlobeImmune, Igeneon,
BMS 202448- Bristol-Myers Squibb	ImClone, Virogenetics, InterCell,
Fatores de crescimento ósseo --	Iomai, Jenner Biotherapies,
IsoTis	Memorial Sloan-
BPC-15 -- Pfizer	Kettering Cancer Center, Sydney
peptídeo natriurético cerebral-	Kimmel Cancer Center, Novavax,
câncer de mama Oxford	Proteína Sciences, Argonex, SIGA
GlycoSciences/Medarex	Vacina de câncer ALVAC-CEA B7.1
Vacina de câncer de mama -- Therion	- Aventis Pasteur/Therion Biologics
Biologics, Oregon	Vacina de câncer CEA-TRICOM
BSSL -- PPL Therapeutics	Aventis Pasteur/Therion Biologics
BST-2001 -- BioStratum	Vacina de câncer terapia de gene--
BST-3002 -- BioStratum	Cantab Pharmaceuticals
BTI 322 --	Vacina de câncer HER-2/neu Corixa
butirilcolinesterase -- Shire	Vacina de câncer THERATOPE
C 6822 -- COR Therapeutics	Biomira
inibidor Clesterase- Pharming	vacina de câncer, PoIyMASC
C3d adjuvante -- AdProTech	Valentis
CAB-2.1 -- Millennium	vacina de Candida - Corixa,
calcitonin a- Inhale Therapeutics	Inhibitex
Systems,	Canstatin -- ILEX
Aventis, Genetronics,	CAP-18 -- Panorama
TranXenoGen,	terapia de gene Cardiovascular --
Unigene, Rhone Poulenc Rohrer	Collateral Therapeutics
	carperitide -- Suntory
	Casocidin-1 Pharis
	CAT 152 -- Cambridge Antibody Tech.
	CAT 192 -- Cambridge Antibody Tech

FIGURA 7H

CAT 213 -- Cambridge Anticorpo Tech.	vacina de Chlamydia pneumoniae --
Catalase-- Enzon	Antex Biologics
Cat-PAD -- Circassia	vacina de Chlamydia trachomatis --
CB 0006 -- Celltech	Antex Biologics
CCK(27-32)-- Akzo Nobel	vacina de Chlamydia -
CCR2-64I NIH	GlaxoSmithKline
CD, Procept Paligent	vacina de Cholera CVD 103-HgR --
CD154 gene therapy	Swiss Serum and Veccine Institute
CD39 Immunex	Berne
CD39-L2 Hyseq	vacina de Cholera CVD 112 Swiss
CD39-L4 Hyseq	Serum and Vaccine Institute Berne
CD4 fusion toxin - Senetek	vacina de Cholera inativada oral -
CD4 IgG - Genentech	SBL
CD4 receptor antagonists	Vacina de Cl-782 -Hitachi Kase
-Pharmacopeia/Progenics	Fator neutrófico ciliar -- Fidia,Roche
CD4 soluble -- Progenics	Projeto CIM -- Active Biotech
CD4, soluble -- Genzyme Transgenics	CL 329753 -- Wyeth-Ayerst
CD40 ligand Immunex	CL22, Cobra -- ML Laboratories
CD4-ricin chain A -- Genentech	Clenoliximab IDEC
CD59 terapia de gene-- Alexion	anticorpos de Clostridium difficile
CD8 TIL cell therapy -- Aventis	--Epicyte
Pasteur	fatores da coagulação- Octagene
CD8, solúvel -- Avidex	CMB 401 -- Celltech
CD95 ligante-- Roche	CNTF -- Sigma-Tau
CDP 571 Celltech	vacina de dependência de cocaína--
CDP 850 -- Celltech	Cantab, ImmuLogic, Scripps
CDP-860 (PEG-PDGF MAb) Celltech	vacina de coccidiomycosis -- Arizo
CDP 870 -- Celltech	colágeno -- Type I Pharming
CDS-1 -- Ernest Orlando	inibidores da formação de colágeno -
Cedelizumab Ortho-McNeil	- FibroGen
Cetermin I nsmed	Colágeno/Hidroxiapatita/fator
CETP vacina de -- Avant	de cresc. Ósseo -- Aventis
Cetrorelix	Pasteur, Biopharm, Orquest
Cetuximab	collagenase BioSpecifics
CGH 400 Novartis	vacina de câncer colorretal Wistar
CGP 42934 - Novartis	Institute
CGP 51901 -- Tanox	Componente B, Recombinante-Serono
CGRP Unigene	Inibidores de fator de cresc. de tecido
CGS 27913 Novartis	conjuntivo FibroGen/Taisho
CGS 32359 -- Novartis	Contortrostatin
vacina de doença de Chagas--	contraceptiva vacina -Zonagen
Corixa	Contraceptiva vacina hCG
resposta imune de quimiocinas	Contraceptiva vacina masc reversível-
CHH 380 Novartis	IMMUCON
quitinase -- Genzyme, ICOS	vacina contraceptiva zona pelúcida -
	Zonagen
	Cobre-64 rotuladoMAB TETA-1A3 --NCI
	Coralyne

FIGURA 7I

Corsevin M	Daclizumab (anti-IL2R MAb) -- Proteína
Análogos de peptídeo C-- Schwarz	Design Labs
CPI-1500 -- Consensus	DAMP" Incyte Genomics
CRF Neurobiological Tech.	Daniplestim -- Pharmacia
cRGDFV pentapeptídeo --	darbepoetin alfa -- Amgen
CRL 1095 -- CytRx	DBI-3019 Diabetogen
CRL 1336 -- CytRx	DCC Genzyme
CRL 1605 -- CytRx	DDF -- Hyseq
CS-560 Sankyo	decorin -- Integra, Telios
CSF ZymoGenetics	defensinas Large Scale Biology
CSF-G -- Hangzhou, Dong-A, Hanmi	DEGR-VIIa
CSF-GM -- Cangene, Hunan, LG Chem	Anticorpo desimmunizado B6/22 AGEN
CSF-M Zarix	Anticorpos anticâncer desimmunizados
CT 1579 -- Merck Frosst	Biovation/Viragen
CT 1786 -- Merck Frosst	Dendroamide A
CT-112A BTG	Vacina de dengue Bavarian Nordic, Merck
CTB-134L Xenova	denileukin difitox -- Ligand
CTC-111 Kaketsuken	DES-1101 -- Desmos
CTGF FibroGen	desirudin -- Novartis
CTLA4-Ig -- Bristol-Myers Squibb	desmopressina -- Unigene
CTLA4-Ig terapia de gene	Desmoteplase -- Merck, Schering AG
CTP-37 AVI BioPharma	Destabilase
C-type natriuretic peptídeo --	terapia gên Diabetes - DeveloGen, Pfizer
Suntory	Diabetes terapia- Crucell
CVS 995 -- Corvas Intl.	Diabetes type 1 vaccine -- Diamyd
CX 397 -- Nikko Kyodo	Therapeutics Vacina tipo 1
CY 1747 -- Epimmune	DiaCIM -- YM BioSciences
CY 1748 -- Epimmune	oligopeptídeos dialíticos Research C
Cianovirin-N	Diamyd -- Diamyd Therapeutics
Terapia de fibrose cística--	DiaPep227-- Pepgen
CBR/IVAX	DiavaX -- Corixa
CYT 351	Digoxina MAb -- Glaxo
citocina Traps -- Regeneron	Diphtheria tetanus pertussis-hepatitis B
citocinas -- Enzon, Cytoclonal	vacina -- GlaxoSmithKline
vacina de glicoproteína de	DIR terapia - Solis Therapeutics --
Citomegalovírus	DNase -- Genentech
Chiron, Aquila Biopharmaceuticals,	Dornase alfa -- Genentech
Aventis Pasteur, Virogenetics	Dornase alfa, inhalation -- Genentech
Cytomegalovirus vacina de live -	Doxorubicin-anti-CEA MAb conjugado -
Aventis	Immunomedics
Pasteur	DP-107 -- Trimeris
terapia de gene de citosina	drotrecogin alfa -- Eli Lilly
desaminase	DTctGMCSF
GlaxoSmithKline	
DA-3003 Dong-A	
DAB389interleucina-6 Senetek	
DAB389interleucina-7	

FIGURA 7J

DTP-vacina de pólio -Aventis Pasteur	Terapia de retirada de nutriente de anticorpo ligado à enzima-KS Biomediz Holdings
DU 257-KM231 conjugado de anticorpo -Kyowa	Agente neutralizante derivado de eosinófilos
Matriz de enxerto dural -Integra	EP-51216-Asta Medica
Dutepilase - Baxter Intl.	EP-51389 Asta Medics
DWP-401 -- Daewoong	EPH family ligands Regeneron
DWP-404 -- Daewoong	Epidermal growth Factor -- Hitachi
DWP-408 -- Daewoong	Kasei, Johnson & Johnson
Dx 88 (Epi-KAL2) -- Dyax	Toxina de fusão de fator de cresc.
Dx 890 (elastin inibidores) -- Dyax	Epidérmico Senetek
E coli 0157 vacina de -- NIH	fator de cresc. Epidérmico -genistein
E21-R -- BresaGen	EPI-HNE-4 Dyax
vacina de vírus da encefalite equina do leste	EPI-I<AL2 Dyax
Equicetin --	Epoetina-alfa -- Amgen, Dragon
Equinhibin 1 --	Pharmaceuticals, Nanjing Huaxin
Equistatin -- Merck	Epratuzumab -- Immunomedics
Equitamina --	vacina de vírus de Epstein-Barr
Ecromeximab -- Kyowa Hakko	Aviron/SmithKlineBeecham,
EC-SOD -- PPL Therapeutics	Bioresearch
Eculizumab (5G1.1) -- Alexion	Eptacog alfa -- Novo Nordisk
EDF -- Ajinomoto	Eptifibatide COR Therapeutics
EDN derivado -- NIH	erb-38 --
EDNA -- NIH	Erlizumab -- Genentech
Edobacomab -- XOMA	eritropoietina Alkermes, ProLease,
Edrecolomab -- Centocor	Dong-A, Elanex, Genetics
EF 5077	Institute, LG
Efalizumab -- Genentech	Chem, Protein Sciences, Serono, Snow
toxina de fusão EGF- Seragen, Ligand	Brand, SRC VB VECTOR, Transkaryotic
EGF-P64k vacina de -- Center of Molecular Immunology	Therapies
EL 246 -- LigoCyte	eritropoietina Beta --Hoffman La Roche
inibidor de elastase -- Synergen	eritropoietina/Epoetina alfa
elcatonin -- Therapicon	Chugai
EMD 72000 -- Merck KGaA	vacina de Escherichia coli -North
Emdogain -- BIORA	American Vaccine, SBL Vaccin, Swiss
emfilermin -- AMRAD	Serum and Vaccine Institute Berne
Enoctakin -- Novartis	etanercept Immunex
enamel matriz proteína -- BIORA	examorelin -- Mediolanum
Endo III -- NYU	Exendin 4 -- Amylin
endostatin a- EntreMed, Pharis	exonuclease VII
Enhancinas -- Micrologix	F 105 -- Centocor
Enlimomab -- Isis Pharm.	F-992 -- Fornix
Enoxaparin sodium -- Pharmuka	Fator IX - Alfa Therapeutics, Welfide Corp., CSL, enetics
	Institute/AHP,
	Pharmacia, PPL Therapeutics
	Fator IX terapia de gene- Cell
	Genesys

FIGURA 7K

Fator VII -- Novo Nordisk, Bayer, Baxter Intl.	follitropin alfa -- Alkermes, ProLease, Follitropin Beta -- Bayer, Organon
Fator VIIa-PPL Therapeutics, ZymoGenetics	FP 59
Fator VIII -- Bayer Genentech, Beaufour Ipsen, CLB, Inex, Octagen, Pharmacia, Pharming	FSH Ferring
Fator VIII -- PEGuilado -- Bayer	FSH + LH -- Ferring
fragmentos de Fator VIII -- Pharmacia	F-spondin CeNeS
terapia de gene de Fator VIII -- Targeted Genetics	Sistema de liberação de proteína de fusão -- UAB Research Foundation
Formulação de sacarose de Fator VIII-- Bayer, Genentech	Toxinas de fusão -- Boston Life Sciences
Fator VIII-2 -- Bayer	G 5598 -- Genentech
Fator VIII-3 -- Bayer	GA-II Transkaryotic Therapies
inibidores de Fator Xa-- Merck, Novo Nordisk, Mochida	Análogos de Gama-interferon -- SRC
Fator XIII -- ZymoGenetics	VB VECTOR
Factors VIII e IX terapia de gene -Genetics Institute/Targeted Genetics	Ganirelix -- Roche
Famoxin Genset	lipase gástrica -- Meristem
Fas (delta) TM proteína -- LXR BloTech.	Gavilimomab --
Fas TR -- Human Genome Sciences	G-CSF -- Amgen, SRC VB VECTOR
Felvizumab Scotgen	GDF-1 CeNeS
FFR-Vila -- Novo Nordisk	GDF-5 Biopharm
FG-001 -- F-Gene	GDNF (glial derived neurotrophic factor) Amgen
FG-002 -- F-Gene	gelsolina Biogen
FG-004 -- F-Gene	Gemtuzumab ozogamicin Celltech
FG-005 -- F-Gene	Epoetina ativada por Gene-ativado -alfa Aventis
FGF + fibrin -- Repair	Pharma Transkaryotic Therapies
Fibrimage Bio-Tech. General	Terapia de gene de Glanzmann
peptídeos de ligação de fibrina-- ISIS Innovation	trombastenia
fibrinogênio -- PPL Therapeutics, Pharming	Glatiramer acetato -- Yeda
Fator de crescimento de fibroblasto-- Chiron, NYU,	Fator de cresc. glial 2 - CeNeS
Ramot, ZymoGenetics	GLP-1 -- Amylin, Suntory, TheraTech, Watson
Conjugado de fibrolase -- Schering AG	GLP-1 peptídeo analogues -- Zealand Pharmaceuticals
Filgrastim -- Amgen	GLP-2 -- Novo Nordisk, Ontario, Inc., Suntory Limited
filgrastim PDA modified-Xencor	glucagon Eli Lilly, ZymoGenetics
FLT-3 ligand Immunex	peptídeo semelhante a Glucagon-1
FN18 CRM9 --	7-36 amida -Suntory
follistatin -- Biotech Australia, Human Therapeutics	peptídeo semelhante a Glicogênio- -- Amylin
	Glicocerebrosidase Genzyme
	glutamato decarboxilase Genzyme
	Transgenics
	Glicoproteína S3 -- KurehaGM-CSF Immunex
	vacina de tumour GM-CSF -- PowderJect

FIGURA 7L

GnRH immunotherapeutic Protherics	Hemolink Hemosol hepapoietin --
Goserelina (LhRH antagonist)	Snow Brand heparanase InSight
- AstraZeneca	heparinase I -- Ibex heparinase
gp75 antigen -- ImClone	III -- Ibex
gp96 Antigenics	vacina de Hepatitis A -- American
GPI 0100 -- Galenica	Biogenetic Sciences Hepatitis A
GR 4991W93 -- GlaxoSmithKline	vacina de inactivated
Fator estimulante de colônia de	Hepatitis A vacina de Nothav --
Granulócitos- Dong-A	Chiron Hepatitis A-hepatitis B
Conjugado de Fator estimulante de	vacina de - GlaxoSmithKline
colônia de Granulócitos-	Terapia de hepatite B -- Tripep
Terapia de alergia de grama --	vacina de Hepatitis B - Amgen, Chiron
Dynavax	SpA, Meiji Milk, NIS, Prodeva,
GRF1-44 ICN	PowderJect, Rhein Biotech
Fator de crescimento- Chiron,	vacina de Hepatite B recombinant e--
Atrigel, Atrix, Innogenetics,	Evans Vacina des, Epitec
ZymoGenetics, Novo	Combiotech, Genentech, Medimmune,
peptídeos de Fator de crescimento	Merck Sharp & Dohme, Rhein
- Biotherapeutics	Biotech, Shantha Biotechnics,
hormônio do cresc. -- LG Chem	Vector, Yeda
hormônio do cresc., Recombinante	vacina de Hepatite B recombinant e
humano Serono	TGP 943 Takeda
GT 4086 -- Gliatech	vacina de Hepatite C -- Bavarian
GW 353430 -- GlaxoSmithKline	Nordic, Chiron, Innogenetics
GW-278884 GlaxoSmithKline	Acambis,
H 11 -- Viventia Biotech	vacina de Hepatite D -- Chiron Vacina
vacina de vírus H5N1 influenza A -	des vacina de Hepatite E
Protein Sciences	recombinante -
hemoglobina -- Biopure	-Genelabs/GlaxoSmithKline,
hemoglobina 3011, Recombinant -	Novavax Fator de cresc. de
Baxter Healthcare	hepatócito- Panorama, Sosei
hemoglobina crosfumaril - Baxter	Fator de cresc. de hepatócito kringle
Intl.	fragmentos -- EntreMed Her-2/Neu
hemoglobina estabilizada--	peptídeos -- Corixa
Ajinomoto	vacina de DNA glicoproteína de Herpes
hemoglobina, recombinante -Apex	simples de - Merck, Wyeth-Lederle
HAF-Immune Response	Vaccine Malvern, Genentech,
vacina de Hantavirus	GlaxoSmithKline, Chiron, Takeda
HB 19	vacina de Herpes simples vivo--
HBNF Regeneron	ImClone SystemsWyeth-Lederle,
HCC-1 Pharis	Aventis Pasteur
hCG Milkhaus	HGF derivatives -- Dompe
hCG vacina de -- Zonagen	hIAPP vacina de -- Crucell
HE-317 -- Hollis-Eden	
Pharmaceuticals	
vacinas de câncer de proteína Heat	
shock e influenza -- StressGen	
vacina de Helicobacter pylori --	
Acambis, AstraZeneca/CSL, Chiron,	
Provalis	
Helistat-G GalaGen	

FIGURA 7M

Hib-hepatitis B vacina de -- Aventis	vacina de hospedeiro-vetor --
Pasteur HIC 1	Henogen
HIP-- Altachem	HPM 1 -- Chugai
Hirudins Biopharma, Cangene,	HPV vacina de -- MediGene
Dongkook, Japan Energy Corporation,	HSA -- Meristem
Pharmacia Corporation, SIR	NSF -- StressGen
International, Sanofi-Synthelabo,	HSP veículos --Weizmann, Veda,
Sotragene, Rhein Biotech	Peptor HSPPC-70 -- Antigenics
HIV edible vacina de -- ProdiGene	HSPPC-96, derivado de patógeno --
vacina de HIV gp120 - Chiron,	Antigenics
Ajinomoto, GlaxoSmithKline, ID	HSV 863 -- Novartis
Vacina de, Progenics, VaxGen	vacina de HTLV-I DNA
vacina de HIV gpl 20 terapia de	vacina de HTLV-I
gene-	vacina de HTLV-I -- Access
vacina de HIV gp160 DNA - PowderJect,	HU 901 -- Tanox
Aventis Pasteur, Oncogen, Hyland	Hu23F2G -- ICOS Hu HMFGL
Immuno, Proteína Sciences	HumaLYM -- Intracell
vacina de HIV gp41 -- Panacos	Human krebs statika -- Yamanouchi
vacina de HIV HGP-30W -- CEL-SCI	Anticorpos monoclonais humanos
globulina imune de HIV - Abbott,	-- AbgenixIBlogen, Abgenix/
Chiron	Corixa, Abgenix/Immunex,
peptídeos de HIV American Home Products	Abgenix/Lexicon, Abgenix/ Pfizer,
vacina de HIV -- Applied bioTech.,	Athersys/Medarex,
Axis Genetics, Biogen, Bristol-Myers	Biogen/MorphoSys, CAT/Searle,
Squibb, Genentech, Korea Green	Centocor/Medarex, Corixa/Kirin
Cross, NIS, Oncogen, Proteína	Brewery, Corixa/Medarex, Eos
Sciences Corporation, Terumo, Tonen	BioTech./Medarex, Eos/Xenerex,
Corporation, WyethAyerst, Wyeth-	Exelixis/Proteína Design Labs,
Lederle Vacina des- Malvern,	ImmunoGen! Raven, Medarex/
Advanced BioScience	B.Twelve, MorphoSys/ImmunoGen, XTL
Laboratories, Bavarian Nordic,	Biopharmaceuticals/Dyax,
Bavarian Nordic/Statens Serum	Anticorpos monoclonais humanos --
Institute, GeneCure, Immune	Medarex/Northwest Biotherapeutics,
Response, Progenics, Therion	Medarex/Seattle Genetics
Biologics, United Biomedical,	netrin-1 humano -- Exelixis
Chiron	human anticorpos papilomavírus --
vacina de HIV vCP1433 Aventis	Epicyte
Pasteur	vacina de papilomavírus Humano --
vacina de HIV vCP1452 Aventis	Biotech Australia, IDEC, StressGen
Pasteur	vacina de papilomavírus Humano MEDI
vacina de HIV vCP205 -- Aventis	501
Pasteur HL-9 -- American BioScience	-- MedImmune/GlaxoSmithKline
HM-9239 -- Cytran HML-103 --	vacina de papilomavírus Humano MEDI
Hemoso HML-104 -- Hemoso HML-105 -	503/MEDI 504 --
- Hemoso HML-109 -- Hemoso HML-110	MedImmune/GlaxoSmithKline
-- Hemoso HML-121 -- Hemoso hNLP	vacina de papilomavírus Humano TA-
-- Pharis	CIN --Cantab Pharmaceuticals
Hookworm vacina de	

FIGURA 7N

vacina de papilomavírus Humano	IL-7-Dap 389 toxina de fusão -
TA-HPV --Cantab Pharmaceuticals	Ligand
vacina de papilomavírus	IL-21 - Novo Nordisk, ZymoGenetics
Humano TH-GW -	IM-862 Cytran
Cantab/GlaxoSmithKline	IMC-1 C11 ImClone
anticorpos policlonais humanos	imiglucerase Genzyme
--	globulina imune intravenosa (human)
Biosite/Eos BioTech./ Medarex	- Hoffman La Roche
anticorpos monoclonais humanos	immune privilege Fator --
tipo II anti Fator VIII --	Proneuron Immunocal Immunotec
ThromboGenics anticorpos	Imunoterapia de gene-- Briana Bio-
monoclonais humanizados de	Tech
murideo anti glioproteína lb-	Imunolipossomal 5-
ThromboGenics	fluordesoxiuridinadipalmitato -
HumaRAD -- intracell	vacina imunossupressora-- Aixlie
HuMax EGFR -- Genmab HuMax-CD4 -	imunotoxina - Antisoma, NIH
- Medarex HuMax-IL15 -- Genmab	ImmuRAIT-Re-188 Immunomedics
HYB 190 -- Hybridon	imreg-1 Imreg
HYB 676 -- Hybridon	infertilidade -- Johnson &
I-125 MAb A33 -- Celltech	Johnson, E- TRANS
Ibritumomab tiuxetan -- IDEC	Infliximab -- Centocor
IBT-9401 -- Ibex	vacina de Influenza vírus--
IBT-9402 -- Ibex	Aventis Pasteur, ProteinSciences
IC 14 -- ICOS	inhibin -- Biotech Australia,
Idarubicin anti-Ly-2.1 -- IDEC	Human Therapeutics
114 -- IDEC	terapia de gene proteína
IDEC 131 -- IDEC	inibidora G
IDEC 152 -- IDEC	INKP-2001 InKine
IDM 1 -IDM	Inolimomab Diaclone
IDPS -- Hollis-Eden	insulina-- AutoImmune, Altea,
Pharmaceuticals	Biobras, BioSante, Bio-Tech.
iduronate-2-sulfatase	General, Chong Kun Dang,
Transkaryotic Therapies	Emisphere, Flame', Provalis,
IGF/IBP-2-13 Pharis	Rhein Biotech, TranXenoGen
IGN-101 Igeneon	insulina (bovina) -- Novartis
IK HIRO2 Iketon	análogo de insulina- Eli
IL-11 -- Genetics Institute/AHP	Lilly
IL-13-PE38 NeoPharm	Insulina Aspart -- Novo Nordisk
IL-17 receptor -- Immunex	insulin detemir -- Novo Nordisk
IL-18BP Yeda	insulina glargine -- Aventis
IL-1Hy1 Hyseq	insulina inalada - Inhale
IL-111 Celltech	Therapeutics Systems, Alkermes
IL-111 adjuvant -- Celltech	insulina oral -- Inovax
IL-2 -- Chiron	insulina, AeroDose AeroGen
IL-2 + IL-12 -- Hoffman La-Roche	insulin, AERx Aradigm
L-6/sIL-6R fusion -- Hadasit	insulina, BEODAS -- Elan
IL-6R derivative -- Tosoh	insulina, Biphasix -- Helix
	insulin, bucal -- Generex
	insulina, I2R Flemington
	insulina, intranasal -- Bentley

FIGURA 70

insulina, oral - Nobex, Unigene	Interferon Gamma -- Boehringer
insulina, Orasome Endorex	Ingelheim, Sheffield, Rentschler,
insulina, ProMaxx -- Epic	Hayashibara
insulina, Quadrant -- Elan	interferon receptor , Tipo I --
insulina, recombinant e-- Aventis	Serono interferon (GammalB) --
insulina, Spiros -- Elan	Genentech Interferon-Alfa-2b +
insulina, Transfersome IDEA	ribavirin - Biogen, ICN
insulina, Zymo, recombinant e-- Novo	Interferon-Alfa-2b terapia de gene--
Nordisk	Schering-Plough
insulinotropina Scios Insulysin	Interferon-coni terapia de gene-
terapia de gene antagonistas de -	interleucina-1 antagonistas --
integrina -- Merck	Dompe
interferon (Alfa2) -- SRC VB VECTOR,	Interleucina-1 antagonista de
Viragen, Dong-A, Hoffman La-Roche,	receptor -- Abbott Bioresearch,
Genentech	Pharmacia
interferon - BioMedicines, Human	Interleucina-1 receptor tipo I --
Genome Sciences	Immunex
interferon (Alfa-n3)-Interferon	interleucina-1 receptor Tipo II --
Sciences Intl.	Immunex Interleucina-1 trap --
interferon (Alfa), Biphasix -- Helix	Regeneron
interferon (Alfa)-Amgen, BioNative,	Interleucina-1-Alfa Immunex/Roche
Novartis, Genzyme Transgenics,	interleucina-2 -- SRC VB VECTOR,
Hayashibara, Inhale Therapeutics	Ajinomoto, Biomira, Chiron
Systems, Medusa, Flamel, Dong-A,	IL-21 toxin a de difteria-- Ligand
GeneTrol, Nastech, Shantha,	Interleucina-3 Cangene
Wassermann, LG Chem, Sumitomo,	Interleucina-4 -- Immunology
Aventis, Behring EGIS, Pepgen,	Ventures,
Servier, Rhein Biotech,	Sanofi Winthrop, Schering-Plough,
interferon (Alfa2A)	Immunex/ Sanofi Winthrop, Bayer, Ono
interferon (Alfa2B) - Enzon, Schering-	interleucina-4 + TNF-Alfa NIH
Plough, Biogen, IDEA	interleucina-4 agonista-- Bayer
interferon (Alfa-N1) GlaxoSmithKline	interleucina-4 toxina de fusão -
interferon (beta) - Rentschler,	- Ligand
GeneTrol, Meristem, Rhein Biotech,	Interleucina-4 receptor - Immunex,
Toray, Yeda, Daiichi, Mochida	Immun
interferon (Beta1A) - Serono, Biogen	Interleucina-6 - Ajinomoto, Cangene,
interferon (beta1A), inhale Biogen	Yeda, Genetics Institute, Novartis
interferon (β1 b)-- Chiron	interleucina-6 proteína de fusão
interferon (tau)-- Pepgen	interleucina-6 toxina de fusão -
Interferon alfacon-1 -- Amgen	Ligand, Serono
Interferon Alfa-2a vacina de	interleucina-7 -- IC Innovations
Interferon Beta 1 b Schering/Chiron,	interleucina-7 receptor -
InterMune	Immunex interleucina-8 antagonistas
	-- Kyowa
	Hakko/Millennium/Pfizer
	interleucina-9 antagonistas --
	Genaera
	Interleucina-10 - DNAX, Schering-
	Plough Interleucina-10 terapia de
	gene- interleucina-12 -- Genetics
	Institute,
	Hoffman La-Roche
	interleucina-13 Sanofi
	interleucina-13 antagonists -- AMRAD
	Interleucina-13-PE38QQR

FIGURA 7P

interleucina-15 Immunex	laronidase BioMarin
interleucina-16 -- Research Corp	vacina de febre Lassa
interleucina-18	LCAT NIH
GlaxoSmithKline Interleucina-	LDP 01 -- Millennium
18 binding proteína -- Serono	LDP 02 -- Millennium
lor-P3 -- Center of Molecular	Superóxido dismutase Lecitinizada
Immunology IP-10 - NIH	Seikagaku
IPF Metabolex	LeIF adjuvant -- Corixa
IR-501 -- Immune Response	vacina de leishmaniaose-- Corixa
ISIS 9125 -- Isis	lenercept -- Hoffman La-Roche
Pharmaceuticals	lenograstim -- Aventis, Chugai
(SURF No, 1554 -- Millennium	lepirudin Aventis
ISURF No. 1866 - Iowa State	leptina -- Amgen, IC Innovations
Univer. ITF-1697 Italfarmaco	terapia de gene de Leptina --
IxC 162 -- Ixion	Chiron Corporation l
J 695 -- Cambridge Anticorpo Tech.,	leptina, 2ª-geração-- Amgen
Genetics Inst., Knoll	Leridistim -Pharmacia
Jagged + FGF - Repair	leuprolide, ProMaxx -- Epic
JKC 362- Phoenix Pharmaceuticals	leuprorelin, oral -- Unigene
JTP-2942 -- Japan Tobacce Juman	LeuTech Papatin
anticorpos monoclonais --	LEX 032 -- SuperGen
Medarex/Raven	LiDEPT Novartis
K02 Axys Pharmaceuticals	Lintuzumab (anti-CD33 MAb) --
Keliximab IDEC	Proteína Design Labs
Keyhole limpet haemocyanin KGF --	lipase -- Altus Biologics
Amgen	vacina de lipíd eoA -- EntreMed
KM 871 -- Kyowa	Tec. de âncora de lipídeo A . -
KPI 135 Scios	ICRT, ID Biomedical
KPI-022 Scios	lipossomo-CD4 Tech. -- Sheffield
Kringle 5	vacina de Listeria monocytogenes
KSB 304	LMB 1
KSB-201 -- KS Biomedix	LMB 7
L 696418 -- Merck	LMB 9 -- Battelle Memorial
L 703801 -- Merck	Institute, NIH LM-CD45 Cantab
L1 Acorda	Pharmaceuticals lovastatin --
L-761191 -- Merck	Merck
lactoferrin Meristem, Pharming,	LSA-3
Agennix lactoferrin cardio	LT-II receptor -- Biogen
Pharming	vacina de câncer de pulmão--
LAG-3 Serono	Corixa
LA1T GEMMA	lusupultide Scios
LAK cell cytotoxin -- Arizona	L-Vax AVAX
lamellarins PharmaMar/University	LY 355455 -- Eli Lilly
of Malaga	LY 366405 -- Eli Lilly
laminin A peptídeos -- NIH	LY-355101 -- Eli Lilly
lanotepase -- Genetics Institute	

FIGURA 7Q

vacina de DNA de doença de Lyme	MDX 240 -- Medarex MDX 33
-- Vical/Aventis Pasteur	MDX 44 Medarex MDX 447 -7
vacina de de doença de Lyme-	Medarex MDX H210 Medarex
Aquila Biopharmaceuticals,	MDX RA -- Houston BioTech.,
Aventis, Pasteur, Symbicom,	Medarex ME-104 Pharmexa
GlaxoSmithKline, Hyland Immuno,	vacina de sarampo
MedImmune	Mecasemin Cephalon/Chiron,
vacina de vírus de	Chiron MEDI 488 -- MedImmune
coriomeningite linfocítica	MEDI 500
vacina de linfoma- Biomira,	MEDI 507 - BioTransplant
Genitope LYP18	Hormônio de concentração de
lys plasminogênio, recombinante	melanina -- Neurocrine
terapia de gene de doença de	Biosciences
estocagem lisossomal -Avigen	melanocortinas OMRP
lisostafin -- Nutrition 21	anticorpos monoclonais de Melanoma
M 23 -- Gruenenthal	-- Viragen
M1 anticorpos monoclonais --	vacina de melanoma --
Acorda Therapeutics	GlaxoSmithKline, Akzo Nobel,
MA 16N7C2 - Corvas Intl.	Avant, Aventis Pasteur,
vacina de malária --	Bavarian Nordic, Biovector,
GlaxoSmithKline, AdProTech,	CancerVax, Genzyme Molecular
Antigenics, Apovia, Aventis	Oncology, Humbolt, ImClone
Pasteur, Axis Genetics,	Systems, Memorial, NYU, Oxxon
Behringwerke,	vacina de Melanoma Magevac
CDCP, Chiron Vacina des,	Therion intensificadores de
Genzyme Transgenics, Hawaii,	memória -- Scios
MedImmune, NIH,	vacina meningocócica B --
NYU, Oxxon, Roche/Saramane,	Chiron vacina meningocócica -
Biotech Australia, Rx Tech	- CAMR vacina meningocócica
vacina de malária	grupo B conjugado
CDC/NIIMALVAC-1 vacina de	-- North American Vacina de
malária, multicomponente	vacina meningocócica grupoB
mamaglobin Corixa	recombinante -- BioChem
mamastatina Biotherapeutics	Vaccines,
lecitina de ligação a manana	Microscience
NatImmu	vacina meningocócica grupo Y
manana-MUC1 Psiron	conjugado
MAP 30	-- North American Vacina
Marinovir Phytera MARstem	de vacina meningocócica
Maret MB-015 -- Mochida MBP	grupos A B and C cnjugado--
ImmuLogic MCI-028 --	North American Vaccine
Mitsubishi-Tokyo	Mepolizumab GlaxoSmithKline
MCIF -- Human Genome Sciences	Metastatin - EntreMed, Takeda
MDC -- Advanced BioScience Akzo	Met-CkB7 -- Human Genome
Nobel, ICOS	Sciences met-enkephalin TNI
MDX 11 Medarex MDX 210 --	METH-1 - Human Genome Sciences
Medarex MDX 22 -Medarex	metioninase anticâncer
MDX 22	terapia de gene de Metionina
	liase -AntiCancer

FIGURA 7R

Met-RANTES – Genexa Biomedical,	MAB 323A3 -- Centocor
Serono	MAB 3C5 MAB 3F12 MAB 3F8 MAB
Metreleptin	42/6 MAB 425 -- Merck KGaA
inibidor de MicrotúbuloMAB	MAB 447-52D -- Merck Sharp &
Immunogen/Abgenix	Dhome
MGDF -- Kirin	MAB 45-2D9- -- hematoporfirina
MGV Progenics	conjugado
micrin -- Endocrine	MAB 4B4
microplasminaThromboGenics	MAB 4E3-CPA conjugado-- BCM
MIF – Genetics Institute	Oncology
Fator inibidor de migração-- NIH	MAB 4E3-daunorubicin conjugado
Mim CD4.1 – Xyte Therapies	MAB 50-6
mirostipen -- Human Genome	MAB 50-61A – Institut Pasteur
Sciences Mitumomab (BEC-2) –	MAB 5A8 -- Biogen
ImClone Systems, Merck KGaA	MAB 791 T/36-methotrexate
MK 852 -- Merck	conjugadoMAB 7c11.e8
MLN 1202 (Anti-CCR2 monoclonal	MAB 7E11 C5-selenocistamina
anticorpo) – Millenium	conjugadoMAB 93KA9 -- Novartis
Pharmaceuticals Mobenakin -- NIS	MAB A5B7- conjugado de
molgramostim -- Genetics	cisplatina -Biodynamics
Institute,	Research, Pharmacia MAB A5B7-I-
Novartis	131
anticorpos monoclonais --	MAB A7
Abgenix/Celltech, Immusol/	MAB A717 -- Exocell
Medarex, Viragen/ Roslin	MAB A7-zinostatina conjugado
Institute, Cambridge Anticorpo	MAB ABX-RB2 -- Abgenix
Tech./Elan	MAB ACA 11
MAB108 MAB10D5	MAB AFP-I-131 – Immunomedics
MAB 14.18-interleucina-2	MAB AP1 MAB AZ1 MAB B3-LysPE40
Immunocitocina Lexigen	conjugado
MAB 14G2a –	MAB B4 – United Biomedical
MAB 15A10 –	MAB B43 Genisteina-conjugado
MAB 170 -- Biomira	MAB B43.13-Tc-99m -- Biomira
MAB 177Lu CC49 --	MAB B43-PAP conjugado
MAB 17F9 MAB 1D7 MAB 1 F7 --	MAB B4G7-gelonina conjugado
Immune Network	MAB BCM 43-daunorrubicin
MAB 1 H10-doxorrubicina conjugado	aconjugado– BCM Oncologia
MAB 26-2F	MAB BIS-1
MAB 2A11	MAB BMS 181170 -- Bristol-Myers
MAB 2E1 RW Johnson	Squibb MAB BR55-2
MAB 2F5	MAB BW494
MAB 31.1 -- International BiolImmune	MAB C 242-DM1 conjugado--
Systems	ImmunoGen
MAB 32 -- Cambridge Anticorpo	
Tech., Peptech	

FIGURA 7S

MAb C242-PE conjugado	MAB KS 1-4-metotrexate conjugado
MAB c30-6	MAB L6 -- Bristol-Myers Squibb,
MAB CA208-citorrodin-S conjugado-	Oncogen
Hoechst Japan	MAB LiC0 16-88
MAB CC49 - Enzon	MAB LL2-I-131 -- Immunomedics
MAB ch14.18 --	MAB LL2-Y-90
MAB CH14.18-GM-CSF proteína de	MAB LS2D617 -- Hybritech
fusão -- Lexigen	MAB LYM-1-gelonina conjugado
MAB chCE7	MAB LYM-1-I-131 MAB LYM-1-Y-90
MAB CI-137 AMRAD	MAB LYM-2 -- Peregrine
MAB cisplatin conjugado	MAB M195
MAB CLB-CD19	MAB M195-bismuth 213 conjugado-
MAB CLB-CD19v	Proteína Design Labs
MAB CLL-1 -- Peregrine	MAB M195-gelonina conjugado
MAB CLL-1-GM-CSF conjugado	MAB M195-I-131 MAB M195-Y-90 MAB
MAB CLL-1-IL-2 conjugado--	MA 33H1 -- Sanofi
Peregrine	MAB MAD11
MAB CLN IgG -- doxorubicina	MAB MGB2
conjugados	MAB MINTS
MAB conjugados Tanox	MAB MK2-23
MAB D612	MAB MOC31 ETA(252-613)
MAB Dal B02	conjugadoMAB MOC-31-In-111
MAB DC101 ImClone	MAB MOC-31-PE conjugado
MAB EA1	MAB MR6 --
MAB EC708 -- Biovation	MAB MRK-16 -- Aventis Pasteur
MAB EP-5C7 -- Protein Design	MAB MS11G6
Labs	MAB MX-DTPA BrE-3 MAB MY9
MAB ERIC-1 -- ICRT MAB F105 gene	MAB Nd2 -- Tosoh MAB NG-1 --
therapy	Hygeia
MAB FC 2.15	MAB NM01 -- Nissin Food
MAB G250 -- Centocor	MAB OC 125
MAB GA6	MAB OC 125-CMA conjugado
MAB GA733	MAB OKI-1 -- Ortho-McNeil
MAB Gliomab-H -- Viventia	MAB OX52 -- Bioproducts for
Biotech	Science MAB PMA5
MAB HB2-saporin conjugadoMAB HD	MAB PRI
37	MAB prost 30
MAB HD37-ricin chain-A conjugado	MAB R-24
MAB HNK20 -- Acambis	MAB R-24 a Humana GD3 --
MAB huN901-DMI conjugado--	Celitech
ImmunoGen	MAB RFB4- conjugado de cadeia A
MAB 1-131 CC49 -- Corixa MAB	de ricina
ICO25	MAB RFT5- conjugado de cadeia A
MAB ICR12-CPG2 conjugado	de ricina
MAB ICR62	
MAB IRac-ricin A conjugado	
MAB K1	

FIGURA 7T

Mab SC 1	tolerância mucosa -- Aberdeen
Mab SM-3 - ICRT	subst inibidora de mul.
MAB SMART ID10 Protein Design Labs	muplestim -- Genetics Institute, Novartis, DSM Anti-Infectives
Mab SMART ABL 364 - Novartis	Mab de murídeo-- KS Biomedix
Mab SN6f	somatropin a Mutante- JCR
Mab SN6f- conjugado de cadeia A de ricina desglicosilada	Pharmaceutical MV 833 --
Mab SN6j	Toagosei
Mab SN7- conjugado de cadeia A de ricina	vacina de Mycoplasma pulmonis
Mab T101-Y-90 conjugado--	Mycoprex XOMA
Hybritech Mab T-88 -- Chiron	mieloperoxidase Henogen
Mab TB94 -- Cancer ImmunoBiology	miostatina -- Genetics
Mab TEC 11	Institute Nacolomab tafenatox --
Mab TES-23 -- Chugai	Pharmacia Nagrecor -- Scios
Mab TM31 -- Avant	nagrestipen -- British Biotech
Mab TNT-1 -- Cambridge Antibody Tech., Peregrine	NAP-5 -- Corvas Intl.
Mab TNT-3	NAPc2 -- Corvas Intl.
Mab TNT-3 -- IL2 proteína de fusão -- Mab TP3-At-211	nartograstim Kyowa
Mab TP3-PAP conjugado--	Natalizumab -- Protein Design
Mab UJ13A ICRT	Labs Nateplase -- NIH, Nihon
Mab UN3	Schering nateplase Schering AG
Mab ZME-018-gelonina conjugado	NBI-3001 Neurocrine Biosci.
Mab-BC2 GlaxoSmithKline	NBI-5788 Neurocrine Biosci.
Mab-DM1 conjugado-- ImmunoGen	NBI-6024 Neurocrine Biosci.
Mab- conjugado de cadeia A de ricina	Inibidores Nef -- BRI
-- XOMA	vacina de Neisseria gonorrhoea --
Mab-temoporquina conjugados	Antex Biologics
Monopharm C Viventia Biotech	conjugado Neomicina B-arginina
monteplase Eisai	Nerelimomab -- Chiron
Hidrato de montirelina --	Fator de cresc. de nervo Amgen --
Gruenthal moroctocog alfa --	Chiron, Genentech
Genetics Institute Moroctocog-alfa -- Pharmacia	terapia de gene de Fator de cresc. de nervo
MP 4	citrato de nesiritide -- Scios
MP-121 -- Biopharm	neuregulina-2 CeNeS
MP-52 -- Biopharm	neurocan NYU
MRA Chugai	sistema de liberação neuronal--
MS 28168 -- Mitsui Chemicals, Nihon Schering	CAMR
MSH toxina de fusão -- Ligand	Fator inibidor Neurofílico --
MSI-99 Genaera	Corvas vacina Neuroprotetora --
MT 201 -- Micromet	University of Auckland
vacina de Muc-1 -- Corixa	Quimeras neurotróficas --
	Regeneron Fator neurotrófico--
	NsGene, CereMedix NeuroVax Immune
	Response
	neurturin -- Genentech
	endopeptidase neutra-- Genentech

FIGURA 7U

Intesificadores de NGF -	vacina de onicomiose--
NeuroSearch	Boehringer Ingelheim
vacina de NHL -- Large Scale	opebecan -- XOMA
Biology	opióides - Arizona
N IP45 -- Boston Life Sciences	Oprelvekin -- Genetics Institute
NKI-B20	Oregovomab AltaRex
NM 01 - Nissin Food	Org-33408 b-- Akzo Nobel
NMI-139 -- NitroMed	Orolip DP -- EpiCept
NMMP -- Genetics Institute NN-	oryzacystatin
2211 - Novo Nordisk Noggin --	peptídeos OSA - GenSci
Regeneron	Regeneration osteoblasto-
Nonacog alfa	caderina GF Pharis
Norelin Biostar	terapia de gene de
vacina de vírus Norwalk	osteocalcina-timidina quinase
NRLU 10 - NeoRx	proteína osteogênica Curis
NRLU 10 PE -- NeoRx NT-3 --	osteopontina OraPharma
Regeneron	peptídeos de osteoporose --
NT-4/5 -- Genentech	Integra, Telios
NU 3056	osteoprotegerin - Amgen,
NU 3076	SnowBrand vacina de otite meíia
NX 1838 -- Gilead Sciences	-- Antex Biologics cancer
NY ESO-1/CAG-3 antigen -- NIH	ovariano- University of Alabama
NYVAC-7 Aventis Pasteur NZ-	proteína de fusão OX40-IgG -
1002 Novazyme	Cantab,
obesity therapy Nobex OC 10426	Xenova
-- Ontogen	P 246 -- Diatide
OC 144093 Ontogen OCIF	P 30 -- Alfacell
Sankyo	p1025 -- Active Biotech
Oct-43 - Otsuka	P-113^ -- Demegen
Odulinomab Immunotech OK PSA -	peptídeo P-16 -- Transition
liposomal	Therapeutics p43 Ramot
OKT3-gamma-1-ala-ala	peptídeo P-50 -- Transition
OM 991	Therapeutics
OM 992	p53 + RAS vacina de - NIH,
Omalizumab Genentech	NCI PACAP(1-27) analogue
oncoimmunin-L NIH	vacinas pediátricas-- Chiron
Oncolisina B ImmunoGen	Pafase ICOS
Oncolisina CD6 ImmunoGen	PAGE-4 plasmid DNA - IDEC
Oncolisina M ImmunoGen	PAI-2 -- Biotech Australia,
Oncolisina S ImmunoGen	Human Therapeutics
Oncofago -Antigenics	Palifermin (keratinocyte growth
Oncostatina M Bristol-Myers	factor) -Amgen
Squibb OncoVax-CL Jenner	Palivizumab -- Medimmune
Biotherapies OncoVax-P Jenner	PAM 4 - Merck
Biothera	pamiteplase Yamanouchi
Onercept -Yeda	pancreatina, Minitabs- Eurand
	Pangen - Fournier
	Pantarin - Selective Genetics
	vacina de Parainfluenza vírus -
	Pharmacia, Pierre Fabre

FIGURA 7V

paraoxanase Esperion	vacina de peptídeo -- NIH ,NCI
homônio da paratireóide- Abiogen, Korea	Pexelizumab
Green Cross	Acetato de pexiganan -- Genaera
homônio da paratireóide (1-34) --	Pharmaprojects No. 3179 -- NYU
Chugai/Suntory	Pharmaprojects No. 3390 - Ernest
terapia de gene de doença de	Orlando
Parkinson' -- Cell Genesys/	Pharmaprojects No. 3417-Sumitomo
Ceregene	Pharmaprojects No. 3777 -Acambis
vacina de Parvovírus-- MedImmune	Pharmaprojects No. 4209 -XOMA
PCP-Scan -- Immunomedics	Pharmaprojects No. 4349 -- Baxter
PDGF -- Chiron	Intl.
PDGF coquetel -- Theratechnologies	Pharmaprojects No. 4651
terapia de alergia de amendoim --	Pharmaprojects No. 4915 -Avanir
Dynavax	Pharmaprojects No. 5156 Rhizogenics
PEG anti-ICAM MAb Boehringer	Pharmaprojects No. 5200 --
Ingelheim	Pfizer
PEG asparaginase Enzon	Pharmaprojects No. 5215 --
PEG glicocerebrosidase	Origene
PEG hirudin -- Knoll	Pharmaprojects No. 5216 --
PEG interferon-Alfa-2a -- Roche	Origene
PEG interferon-Alfa-2b + ribavirin --	Pharmaprojects No. 5218 --
Biogen, Enzon, ICN Pharmaceuticals,	Origene
Schering-Plough	Pharmaprojects No. 5267 -- ML
PEG MAb A5B7 --	Laboratories
Pegacaristim -- Amgen -- Kirin Brewery -	Pharmaprojects No. 5373-MorphoSys
- ZymoGenetics	Pharmaprojects No. 5493 --
Pegaldesleucina -- Research Corp	Metabolex
pegaspargase Enzon	Pharmaprojects No. 5707-Genentech
pegfilgrastim -- Amgen	Pharmaprojects No. 5728-Autogen
PEG-interferon Alfa -- Viragen	Pharmaprojects No. 5733 -- BioMarin
PEG-interferon Alfa 2A -- Hoffman La-	Pharmaprojects No. 5757 - NIH
Roche	Pharmaprojects No. 5765-Gryphon
PEG-interferon Alfa 2B -- Schering'	Pharmaprojects No. 5830 --
Plough	AntiCancer
PEG-r-hirudin -- Abbott	Pharmaprojects No. 5839-Dyax
PEG-rHuMGDF -- Amgen	Pharmaprojects No. 5849-Johnson &
PEG-uricase -- Mountain View	Johnson
Pegvisomant -- Genentech	Pharmaprojects No. 5860 -- Mitsubishi-
Proteínas PEGuiladas, PoIyMASC	Tokyo
Valentis	Pharmaprojects No. 5869 -- Oxford
leptin a PEGuilada recombinante	GlycoSciences
nativa humana -- RochePemtumomab	Pharmaprojects No. 5883 -- Asahi
Penetratin Cyclacel	Pharmaprojects No. 5947 -- StressGen
Pepscan -- Antisoma	Pharmaprojects No. 5961 --
peptídeo G -- Peptech, ICRT	Theratechnologies
	Pharmaprojects No. 5962 -- NIH
	Pharmaprojects No. 5966 -- NIH
	Pharmaprojects No. 5994 -- Pharming
	Pharmaprojects No. 5995 -- Pharming
	Pharmaprojects No. 6023 -- IMMUCON
	Pharmaprojects No. 6063 -- Cytoclonal

FIGURA 7W

Pharmaprojects No. 6073 - SIDDCO	vacina pneumocócica -- Antex
Pharmaprojects No. 6115 -Genzyme	Biologics, Aventis Pasteur
Pharmaprojects No. 6227 - NIH	vacina pneumocócica intranasal --
Pharmaprojects No. 6230 - NIH	BioChem Vacina des/Biovector
Pharmaprojects No. 6236 - NIH	PR1A3
Pharmaprojects No. 6243 - NIH	PR-39
Pharmaprojects No. 6244 - NIH	pralmorelin -- Kaken Pretarget-
Pharmaprojects No. 6281 -Senetek	Lymphoma NeoRx
Pharmaprojects No. 6365 - NIH	Priliximab -- Centocor PRO 140 --
Pharmaprojects No. 6368 - NIH	Progenics PRO 2000 -- Precept PRO
Pharmaprojects No. 6373 - NIH	367 -- Progenics PRO 542 --
Pharmaprojects No. 6408 -- Pan	Progenics pro-Apo A-I Esperion
Pacific	prolactin Genzyme
Pharmaprojects No. 6410 -	Prosaptide TX14 (A) Bio-Tech.
Athersys :	General anticorpos de câncer de
Pharmaprojects No. 6421 -- Oxford	próstata- Immunex, UroCor
GlycoSciences	Terapia de anticorpos de câncer de
Pharmaprojects No. 6522 -Maxygen	próstata- Genentech/UroGenesys,
Pharmaprojects No. 6523-Pharis	Genotherapeutics
Pharmaprojects No. 6538- Maxygen	Imunoterapêutica de câncer de
Pharmaprojects No. 6554 - APALEXO	próstata -- The PSMA Development
Pharmaprojects No. 6560 - Ardana	Company vacina de câncer de
Pharmaprojects No. 6562 -Bayer	próstata -- Aventis Pasteur,
Pharmaprojects No. 6569 - Eos	Zonagen, Corixa, Dendreon,
Fenoxazina	Jenner Biotherapies, therion
Fenilase Ibex	BiologicsAntígeno específico de
Fator derivado de epitélio	próstata -- EntreMed proteína A
pigmentar--	-- RepliGen
Inibidor ativador de	proteína adesivas -- Enzon
plasminogênio -1, recombinante	proteína C -- Baxter Intl., PPL
-- DuPont Pharmaceuticals	Therapeutics, ZymoGenetics
ativadores de plasminogênio -	ativador de proteína C- Gilead
- Abbott Laboratories, American	Sciences proteína quinase R
Home Products, Boehringer	antags NIH
Mannheim, Chiron Corporation,	protirelin Takeda
DuPont Pharmaceuticals, Eli	protocaderina 2 -- Caprion
Lilly, Shionogi, Genentech,	Pro-uroquinase Abbott,
Genetics Institute,	Bristol-Myers
GlaxoSmithKline, Hemispherx	Squibb, Dainippon, Tosoh
Biopharma, Merck & Co, Novartis,	Welfide P-selectin
Pharmacia Corporation, Wakamoto,	glycoproteína ligand-1 --
Yeda	Genetics Institute
peptídeos relacionados a	Infecções por pseudomonas --
plasminogênio -- Bio-Tech.	InterMune vacina de Pseudomonas
General/MGH	-- Cytovax PSGL-Ig -- American
Fator 4 de plaquetas-- RepliGen	Home Products PSP-94 -- Procyon
Fator de cresc. derivado de	
plaquetas -Amgen -- ZymoGenetics	
plusonermin-- Hayashibara	
PMD-2850 Protherics	

FIGURA 7X

PTH 1-34 Nobex	vacina de vírus sincicial
Quilimmune-M Antigenics	Respiratório
R 744 -- Roche	inativada
R 101933	vacina de vírus sincicial
R 125224 -- Sankyo	Respiratório - vacina de vírus
RA therapy -- Cardion	parainfluenza -- Aventis
vacina de raiva recombinante --	Pasteur, Pharmacia
Aventis Pasteur, BioChem Vacina	Reteplase Boehringer Mannheim,
des,	Hoffman La-Roche
Kaketsuken Pharmaceuticals	Retropep Retroscreen
RadioTheraCIM YM BioSciences	RFB4 (dsFv) PE38
Ramot project No. 1315 -- Ramot	RFI 641 -- American Home Products
Ramot project No. K-734A Ramot	RFTS UAB Research Foundation
Ramot project No. K-734B Ramot	RG 12986 -- Aventis Pasteur
Ranibizumab (Anti-VEGF fragment)	RG 83852 -- Aventis Pasteur
--	RG-1059 -- RepliGen
Genentech	rGCR NIH
RANK -- Immunex	rGLP-1 Restoragen
ranpirnase Alfacell	rGRF Restoragen
ranpirnase-anti-CD22 MAb	rh Insulin -- Eli Lilly
Alfacell inibidor RANTES --	RHAMM targeting peptídeos --
Milan	Cangene rHb1.1 -- Baxter Intl.
sistemas de liberação de	rhCC10 Claragen
medicamento RAPID -- ARIAD	rhCG -- Serono
rasburicase Sanofi	terapia de gene de artrite
rBPI-21, topical -- XOMA	reumática
RC 529 -- Corixa	vacina de artrite reumatóid e--
rCFTR Genzyme Transgenics,	Veterans
RD 62198	Affairs Medical Center
rDnase -- Genentech	rhLH Serono
RDP-58 SangStat	terapia de gene de Ribozima
ReceptTox-Fce Keryx	Genset
ReceptTox-GnRH -- Keryx, MTR	vacina de Rickettsia recombinante
Technologies	RIGScan CR -- Neoprobe
ReceptTox-MBP -- Keryx, MTR	RIP-3 -- Rigel
Technologies	Rituximab -- Genentech
recFSH Akzo Nobel, Organon	RK-0202 RxKinetix
REGA 3G12 Regavirumab Teijin	RLT peptídeo -- Esperion
relaxin Connetics Corp	rM/NEI IVAX
Renal vacina de câncer --	rmCRP Immt6ch
Macropharm repifermin -- Human	RN-1001 Renovo
Genome Sciences Respiratory	RN-3 -- Renovo
syncytial virus PFP-2 vacina de	RNase conjugado-- Immunomedics
Wyeth-Lederle	RO 631908 -- Roche
vacina de vírus sincicial	vacina de Rotavírus -- Merck
Respiratório-- GlaxoSmithKline,	RP 431 -- DuPont Pharmaceuticals
Pharmacia, Pierre Fabre	RP-128 -- Resolução
	terapia de gene RPE65

FIGURA 7Y

RPR 110173 -- Aventis Pasteur	SERP-1 Viron
RPR 115135 Aventis Pasteur	sertenef Dainippon
RPR 116258A Aventis Pasteur	serum albumina, Recombinant human --
rPSGL-Ig -- American Home Products	Aventis Behring
tensoativo r-SPC- Byk Gulden	Fator derivado de soro -- Hadasit
RSV anticorpo -- Medimmune	Sevirumab Novartis
Ruplizumab Biogen	SGN 14 -- Seattle Genetics
rV-HER-2/neu Therion Biologics	SGN 15 -- Seattle Genetics
SA 1042 -- Sankyo	SGN 17/19 -- Seattle Genetics
sacrosidase -- Orphan Medical	SGN 30 -- Seattle Genetics
Sant 7	SGN-10 Seattle Genetics
Sargramostim Immunex	SGN-11 Seattle Genetics
saruplase Gruenenthal	SH 306 -- DuPont Pharmaceuticals
Satumomab Cytogen	Shanvac-B Shantha
SB 1-- COR Therapeutics	vacina de Shigella flexneri -- Avant,
SB 207448 GlaxoSmithKline	Acambis, Novavax
SB 208651 -- GlaxoSmithKline	vacina de Shigella sonnei --
SB 240683 -- GlaxoSmithKline	sICAM-1 Boehringer Ingelheim
SB 249415 -- GlaxoSmithKline	Silteplase Genzyme
SB 249417 -- GlaxoSmithKline	vacina de SIV, Endocon, Institut
SB 6 -- COR Therapeutics	Pasteur
SB RA 31012	SK896 Sanwa Kagaku Kenkyousho
SC 56929 Pharmacia	SK-827 -- Sanwa Kagaku Kenkyusho
SCA binding proteínas -- Curis, Enzon	Skeletex -- CellFactors
scFv(14E1)-ETA Berlex Laboratories,	SKF 106160 -- GlaxoSmithKline S-
Schering AG	nitroso-AR545C --
ScFv(FRP5)-ETA --	SNTP Ativo Biotech somatomedina-1
ScFv6C6-PE40 --	-- GroPep, Mitsubishi-
SCH 55700 -- Ceiltech	Tokyo, NIH
vacina de Esquistossomose-- Glaxo	somatomedina-1 proteína carreadora--
Wellcome/Medeva, Brazil	lnsmed
SCPF -- Advanced Tissue Sciences	somatostatina Ferring
scuPA-suPAR complex -- Hadasit	Somatotropina/
SD-9427 -- Pharmacia	Hormônio do cresc. Humano -- Bio-
SDF-1 -- Ono	Tech.
SDZ 215918 -- Novartis	General, Eli Lilly
SDZ 280125 -- Novartis	somatropina Bio-Tech. General,
SDZ 89104 -- Novartis	Alkermes, ProLease, Aventis Behring,
'SDZ ABL 364 -- Novartis	Biovector, Cangene, Dong-A, Eli
SDZ MMA 383 -- Novartis	Lilly, Enisphere, Enact, Genentech,
Secretin a- Ferring, Repligen	Genzyme Transgenics, Grandis/InfiMed,
serina protease inhihs Pharis	CSL, InfiMed, MacroMed, Novartis,
sermorelina acetato -- Serono	Novo Nordisk, Pharmacia Serono,
	TranXenoGen
	Derivado de somatropin a-- Schering
	AG somatropina, AIR -- Eli Lilly
	Somatropina inalada-- Eli
	Lilly/Alkermes

FIGURA 7Z

somatropina, Kabi -- Pharmacia	vacina de peptídeos de receptor de célula T
somatropina, Orasome -- Novo Nordisk	lipossomos T4N5 AGI Dermatics
Sonermin Dainippon Pharmaceutical	TAC1, solúvel -- ZymoGenetics
SP(V5.2)C Supertek	apoptose direcionada - Antisoma
SPf66	tasonermin Boehringer Ingelheim
esfingomielinase Genzyme	TASP
SR 29001 -- Sanofi	TASP-V
SR 41476 -- Sanofi	Análogos de peptídeo Tat -- NIH TBP
SR-29001 -- Sanofi	I Yeda
SSI (dsFV)-PE38 NeoPharm	TBP II
β 2 microglobulina Avidex	TBV25H NIH
β 2-microglobulina proteínas de fusão --	Tc 99m ior ceal -- Center of Molecular
NIH peptídeos β -amilóides -- CeNeS	Immunology
β -defensin Pharis	Tc 99m P 748 -- Diatide
infecções por Staphylococcus	Tc 99m votumumab Intracell
aureus- Inhibitex/ZLB	Tc 99m rh Annexin V -Theseus
vacina conjugada de Staphylococcus aureus Nabi	Imaging
terapia Staphylococcus - Tripep	Tecleucina- Biogen
Staflloquinase -- Biovation, Prothera, Thrombogenetics	tenecteplase -- Genentech
vacina de Streptococcus A -- M6 Pharmaceuticals, North American Vaccine	Teriparatide -- Armour Pharmaceuticals,
vacina de de Streptococcus B-- Microscience	Asahi Kasei, Eli Lilly
vacina de de StreptococcusB recombinante -- Biochem	terlipressina Ferring
Vacina des Streptococcus pyogenes STRL-33 NIH	testisin AMRAD
Subalin -- SRC VB VECTOR SUIS -- United Biomedical	Tetrafibricin Roche
SUIS-LHRH -- United Biomedical	TFPI -- Entremed
SUN-E3001 -- Suntory	tgD-IL-2 Takeda
anticorpos monoclonais de super alta afiidade- - YM BioSciences	TGF-Alfa ZymoGenetics
Superóxido dismutase -- Chiron, Enzon, Ube Industries, Bio-Tech, Yeda	TGF-11 Kolon
Superóxido dismutase-2 -- OXIS	TGF-112 Insmad
supressina UAB Research Foundation	TGF-113 OSI
SY-161-P5 ThromboGenics	terapia de gene de Talassaemia --
SY-162 -- ThromboGenics	Crucell TeraCIM-h-R3 -- Center of Molecular
vacina de lupus eritematoso sistêmico - MedCloneNivoRx	Immunology, YM BioSciences
peptídeos de receptor de célula T-- Xoma T	Teradigm-HBV Epimmune
	Teradigm-HPV Epimmune
	Teradigm-malaria Epimmune
	Teradigm-melanoma Epimmune TeraFab -- Antisoma
	ThGRF 1-29 -- Theratechnologies
	ThGRF 1-44 -- Theratechnologies
	peptídeo de ativação de receptor de trombina-Abbott
	trambomodulin a- Iowa, Novocastra

FIGURA 7AA

Trombopoietina -- Dragon	fator de cresc. transformante -
Pharmaceuticals, Genentech	beta-1 -Genentech
trombopoietina, Pliva Receptron	proteína de transporte -- Genesis
Trombospondina 2 -	Trastuzumab Genetech
trombostatina Thromgen	TRH -- Ferring
timalfasin SciClone	Triabin Schering AG
timocartin - Gedeon Richter	Triconal
timosina Alfa1 NIH	Triflavin
hormônio estimulante da tireóide	troponin I -- Boston Life Sciences
-- Genzyme tICAM-1 -- Bayer	TRP-2^ NIH
peptídeo anticoagulante Tick --	inibidor de tripsina Mochida
Merck TIF Xoma	TSP-1 terapia de gene-
Tifacogin - Chiron, NIS, Pharmacia	TT-232
Tissue Fator -- Genentech	TTS-CD2 - active Biotech
inibidor de via de Fator	vacina de Tuberculose-- Aventis
tecidualTJN-135 Tsumura	Pasteur, Genesis
TM 27 Avant	Superantígenos direcionando a
TM 29 - Avant	tumor - Active Biotech --
TMC-151 - Tanabe Seiyaku	Pharmacia
Fator de necrose tumoral deTNF --	vacina tumoral-- PhotoCure
Asahi Kasei	conjugados de anticorpo de pró-
TNF Alfa CytImmune	fármaco ativados por tumor--
TNF anticorpo - Johnson & Johnson	Millennium/ImmunoGen
TNF proteína de ligação-- Amgen	tumstatin -- ILEX
Produto de degradação de TNF --	Tuvirumab Novartis TV-4710 -
Oncotech	Teva
receptor de TNF -- Immunex	TWEAK receptor -- Immunex
receptor de TNF 1, soluble --	TXU-PAP
Amgen	TY-10721- TOA Eiyo
Fator de necrose tumoral deTNF -	vacina de diabetes Tipo I --
Alfa -Asahi Kasei, Genetech,	Research Corp
Mochida	vacina tifóide CVD 908
inibidor de TNF-Alfa -- Tripep	U 143677 -- Pharmacia
terapia de gene de TNFR:Fc -	U 81749 -- Pharmacia
Targeted Genetics	UA 1248 -- Arizona UGIF -
TNF-SAM2	Sheffield
Tolerimab -- Innogenetics	U IC 2
vacina de Toxoplasma gondii -	UK 101
GlaxoSmithKline	UK-279276 - Corvas Intl.
TP 9201 -- Telios	urodilatin Pharis
TP10 -- Avant	urofolitrofin Serono
TP20 -- Avant	Urokinase -- Abbott
tPA -- Centocor	uteroferina-- Pepgen
trafermin Scios	V 20 -- GLYCODEsign
TRAIUAp02L Immunex	vacinas de terapia de gene de
TRAIL-R1 Mab - Cambridge Anticorpo	receptor de vasopressina V2 --
Technologies	Active Biotech
proteínas de ligação de	
transferrina- CAMR	

FIGURA 7AB

vacina de glicoproteína de	vacina de WT1 -- Corixa
Varicella zoster -Research	WX-293 Willex BioTech.
Corporation Technologies	WX-360 Willex BioTech.
vacina de vírus vivo de	WX-UK1 Willex BioTech.
Varicella zoster- Cantab	XMP-500 XOMA
Pharmaceuticals	XomaZyme-791 XOMA
fator de cresc. endotelial	XTL 001 -- XTL
Vascular- Genentech, University	Biopharmaceuticals XTL 002 XTL
of California fatores de cresc.	Biopharmaceuticals sistema de
endotelial Vascular - R&D	liberação de levedura --
Systems	GlobelImmune
Agentes de direcionamento	vacina de Yersinia pestis
vascular -- Peregrine	YIGSR-Stealth -- Johnson &
agentes de intensif. de	Johnson Yisum Project No. D-0460
vasopermeação -Peregrine	-- Yisum YM 207 -- Yamanouchi
vasostatina NIH	YM 337 -- Proteína Design Labs
VCL -- Bio-Tech. General	Biotina rotulada com Ítrio -90
VEGF -- Genentech, Scios	anti-CEA MAb T84.66rotulada com
inibidor de VEGF -- Chugai	Ítrio -90
VEGF-2 -- Human Genome Sciences	ZD 0490 -- AstraZeneca
VEGF-Trap -- Regeneron	ziconotide -- Elan
viscumin, recombinante -- Madaus	ZK 157138 -- Berlex Laboratories
Vitaxin	Zolimomab aritox
Vitraxe ISTA Pharmaceuticals	Zorcell -- Immune Response
vacina de vírus do Oeste do Nilo	peptídeos ZRXL -- Novartis
-- Bavarian Nordic	
WP 652	