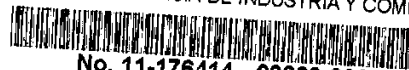


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-176414-00000-0000

Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE(IYI) Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO DERIVADOS DE SUERO AMILOIDE P, SU PREPARACION Y USO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE PROMEDIOR, INC.

DOMICILIO 371 PHOENIXVILLE PIKE HALVERN, PA. 19355, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDOÑEZ

22. BOGOTÁ, D.C., Diciembre 21, 2011



No. 11-176414- -00000-0000

Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE/II Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

ción

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIAFORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE :

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: PROMEDIOR, INC.

Dirección: 371 Phoenixville Pike Malvern, PA 19355 Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500

Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakermckenzie.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.366 Usaquén

TP 20281

④

INVENTOR (ES)

Nombre: WILLETT, W., Scott; CAIMI, Richard, J.

Dirección: Scott; 3820 Comley Circle Doylestown, PA 18901 (US); 1811 Norristown Road Maple Glen, PA 19002 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/037542

Fecha 04-06-2010

Publicación Internacional No. WO2010/141918

Fecha 09-12-2010

⑥

Título (54)

DERIVADOS DE SUERO AMILOIDE P, SU PREPARACIÓN Y USO

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07K 14/; A61K 38/17; A61P 29/00

⑧

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

04-06-2009

(31) Número de Solicitud

61/217,931

⑨

Comprobante de pago No.

11-111730 - 11-0098011 - 11-0098061 - 11-
0098062 - 11-111661 - 11-104007 - 11-
104008 - 11-111731 - 11-111732 - 11-
111733

Fecha

16-11-11 - 05-10-11 - 16-11-11
- 24-10-11 -

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos - Listado de Secuencias

11

FIGURA CARACTERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 111730
		Bogotá D.C., Noviembre 16 de 2011 - 17:33:43

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE	NI 900.034.906
--------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325105933	16/11/2011	113.625.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-176414- -00000-0000
Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0098011

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 17:08:26

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	412134424	04/10/2011	79.821.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-176414- -00000-0000

Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Octubre 5 de 2011 - 17:08:45

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0098061

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 17:08:26

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	412134424	04/10/2011	79.821.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	10.000.00	10.000.00
				\$10.000.00

SON: **DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-176414- -00000-0000

Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Octubre 5 de 2011 - 17:08:47

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0098062

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 17:08:26

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	V.R. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	412134424	04/10/2011	79.821.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	10.000.00	10.000.00
				\$10.000.00

SON: **DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-176414-00000-0000

Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 5 de 2011 - 17:08:47

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 111661

Bogotá D.C., Noviembre 16 de 2011 - 17:33:43

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325105933	16/11/2011	113.695.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES	DE MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	118.000.00	118.000.00
				\$118.000.00

SON: **CIENTO DIECIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-176414- -00000-0000
Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 104007
		Bogotá D.C., Octubre 24 de 2011 - 16:26:54

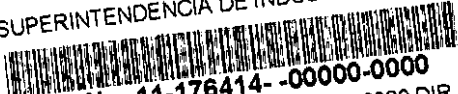
RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	V.R. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	410784006	24/10/2011	109.520.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL	289.000.00 289.000.00
			\$289.000.00

SON: **DOSCIENTOS OCHENTA Y NUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-176414-00000-0000
Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 104008

Bogotá D.C., Octubre 24 de 2011 - 16:26:54

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	410784006	24/10/2011	109.520.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL)	289.000.00	289.000.00
				\$289.000.00

SON: **DOSCIENTOS OCHENTA Y NUEVE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-176414- 00000-0000

Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 24 de 2011 - 16:27:10

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 111731

Bogotá D.C., Noviembre 16 de 2011 - 17:33:43

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325105933	16/11/2011	113.995.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-176414- -00000-0000

Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 16 de 2011 - 17:34:03

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 111732

Bogotá D.C., Noviembre 16 de 2011 - 17:33:43

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325105933	16/11/2011	113.695.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-176414- -00000-0000
Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 111733

Bogotá D.C., Noviembre 16 de 2011 - 17:33:43

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325105933	16/11/2011	113.695.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN
			571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-176414- -00000-0000

Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Noviembre 16 de 2011 - 17:34:03

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
SUPERINTENDENCIA		PATENTE DE INVENCION	PCT ☒
		MODELO DE UTILIDAD	DISEÑO INDUSTRIAL
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional: C07K 14/; A61K 38/17; A61P 29/00			
(71) Solicitante(s) PROMEDIOR, INC.			
(72) Inventor(es) WILLETT, W., Scott; CAIMI, Richard, J.			
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/217,931	04-06-2009	US
(85) Fecha inicio fase nacional: 04-01-2012		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 09-12-2010	
Fecha de presentación de la solicitud: 04-06-2010		N° publicación: WO2010/141918	
No. de solicitud PCT/US2010/037542			
(54) Título: DERIVADOS DE SUERO AMILOIDE P, SU PREPARACIÓN Y USO			

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMATICO	
PATENTE DE INVENCION		PCT ☒	MODELO DE UTILIDAD
DISEÑO INDUSTRIAL			
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional: C07K 14/; A61K 38/17; A61P 29/00			
(71) Solicitante(s) PROMEDIOR, INC.			
(72) Inventor(es) WILLETT, W., Scott; CAIMI, Richard, J.			
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) País
	61/217,931	04-06-2009	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 04-01-2012		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 09-12-2010	
Fecha de presentación de la solicitud: 04-06-2010		No. Publicación: WO2010/141918	
No. de solicitud PCT/US2010/037542			
(54) Título: DERIVADOS DE SUERO AMILOIDE P, SU PREPARACIÓN Y USO			
(57) Resumen: Un aspecto de la presente invención se relaciona con el sorprendente descubrimiento de que la modificación de una estructura glicano en un polipéptido SAP humano puede incrementar la actividad biológica del polipéptido SAP comparado con una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano. LA divulgación suministra tanto polipéptidos SAP variantes como métodos para fabricarlos. En particular, la presente invención suministra métodos y composiciones para agregar, remover ó modificar in vivo ó in vitro residuos de azúcar para producir polipéptidos SAP, tal como un polipéptido SAP humano, que tiene un patrón de glicosilación deseado.			
CONTINUA AL RESPALDO ...			

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 14/; A61K 38/17; A61P 29/00	
(22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) PROMEDIOR, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. 61/217,931	(32) Fecha 04-06-2009	(33) País US
		(72) Inventor(es) WILLETT, W., Scott; CAIMI, Richard, J.	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 04-01-2012		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 09-12-2010
	Fecha de presentación de la solicitud: 04-06-2010		N° publicación: WO2010/141918
	No. de solicitud PCT/US2010/037542		
(54) Título: DERIVADOS DE SUERO AMILOIDE P, SU PREPARACIÓN Y USO			

RESUMEN:

Un aspecto de la presente invención se relaciona con el sorprendente descubrimiento de que la modificación de una estructura glicano en un polipéptido SAP humano puede incrementar la actividad biológica del polipéptido SAP comparado con una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano. LA divulgación suministra tanto polipéptidos SAP variantes como métodos para fabricarlos. En particular, la presente invención suministra métodos y composiciones para agregar, remover ó modificar in vivo ó in vitro residuos de azúcar para producir polipéptidos SAP, tal como un polipéptido SAP humano, que tiene un patrón de glicosilación deseado.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 December 2010 (09.12.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/141918 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 14/47 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/037542

(22) International Filing Date:
4 June 2010 (04.06.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/217,931 4 June 2009 (04.06.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
PROMEDIOR, INC. [US/US]; 371 Phoenixville Pike,
Malvern, PA 19355 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WILLETT, W.,
Scott [US/US]; 3820 Comley Circle, Doylestown, PA
18901 (US). CAIMI, Richard, J. [US/US]; 1811 Norris-
town Road, Maple Glen, PA 19002 (US).

(74) Agent: HALSTEAD, David, P.; Ropes & Gray LLP,
Prudential Tower, 800 Boylston Street, Boston, MA
02199-3600 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: SERUM AMYLOID P DERIVATIVES AND THEIR PREPARATION AND USE

(57) Abstract: One aspect of the present invention relates to the surprising discovery that modification of a glycan structure on a human SAP polypeptide can increase the biological activity of the SAP polypeptide relative to a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human serum. The disclosure provides both variant human SAP polypeptides and methods for making the same. In particular, the present invention provides methods and compositions for in vitro and in vivo addition, deletion, or modification of sugar residues to produce SAP polypeptides, such as a human SAP polypeptide, having a desired glycosylation pattern.



WO 2010/141918 A1

SERUM AMYLOID P DERIVATIVES AND THEIR PREPARATION AND USE
CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

5 This application claims the benefit of U.S. Provisional Application Ser. No. 61/217,931 filed on June 4, 2009. All of the teachings of the above-referenced application is incorporated herein by reference.

10 **BACKGROUND OF THE INVENTION**

 Serum Amyloid P (SAP) is a member of the pentraxin family of proteins. SAP is secreted by the liver and circulates in the blood as a stable pentamer. Previous research demonstrates SAP has an important role in both the initiation and resolution phases of the immune response. SAP can bind to sugar residues on the surface of bacteria and thereby
15 promote their opsonization and engulfment by antigen-presenting cells. SAP also binds to free DNA and chromatin generated by apoptotic cells at the resolution of an immune response, thus preventing a secondary inflammatory response against these antigens. Molecules bound by SAP are removed from extracellular areas due to the ability of SAP to bind to all three classical Fc γ receptors (Fc γ R), having a particular affinity for Fc γ RII (CD32) and Fc γ RIII (CD16). After receptor binding, SAP and any attached complex are
20 generally internalized and processed by the cell.

 Recently, it has been suggested that SAP can be used as a therapeutic agent to treat various disorders, including fibrosis-related disorders, hypersensitivity disorders, autoimmune disorders, mucositis, and inflammatory disorders such as those cause by
25 microbial infection. See, for example, U.S. Patent Application Ser. Nos. 11/707,333, 12/217,617, 12/720,845, and 12/720,847. Protein therapeutics for treating human disease have revolutionized the health care industry. However, there are many difficulties in producing a protein therapeutic having the necessary potency and/or in sufficient quantity to be useful as a therapeutic agent. Many potential therapeutic agents are modified to
30 increase their biological activity, such as plasma half-life, relative to the naturally-derived protein. Recombinant expression technology is usually implemented to produce polypeptides in sufficient quantity. Unfortunately, many recombinant systems produce polypeptides having different biological properties than the naturally-derived forms, which may affect the pharmacokinetics, safety, and efficacy of a therapeutic product.

Therefore, a need remains for developing SAP polypeptides, and methods of manufacturing them, suitable for therapeutic treatment of humans.

SUMMARY OF THE INVENTION

5 In part, the disclosure provides variant Serum Amyloid P (SAP) polypeptides and methods for producing them. The present invention includes methods and compositions for *in vitro* and *in vivo* addition, deletion, or modification of sugar residues to produce variant SAP polypeptides having a desired glycosylation pattern.

10 In certain aspects, the disclosure provides a glycosylated human SAP polypeptide, comprising an N-linked or O-linked oligosaccharide chain that has at least one branch terminating with a α 2,3-linked sialic acid moiety.

 In certain aspects, the disclosure provides a glycosylated human SAP polypeptide, comprising an N-linked or O-linked oligosaccharide chain that has at least 50% fewer α 2,6-linked sialic acid moieties than wild-type SAP isolated from human serum.

15 In certain aspects, the disclosure provides methods of making a glycosylated human SAP polypeptide, comprising expressing a SAP polypeptide in a cell and isolating the SAP polypeptide from the cell. In a preferred embodiment, the cell is a CHO cell. In certain aspects, the cell is a CHO-S cell.

20 In certain aspects, the disclosure provides methods of making a human SAP polypeptide, comprising expressing a human SAP polypeptide in a CHO cell and isolating the human SAP polypeptide from the cell.

 In certain aspects, the disclosure provides methods of making a human SAP polypeptide, comprising providing a glycosylated human SAP polypeptide containing an N-linked or O-linked oligosaccharide chain and enzymatically or chemically altering the
25 N-linked or O-linked oligosaccharide chain of the SAP polypeptide to produce a modified glycosylated SAP polypeptide.

 In certain aspects, the disclosure provides methods of making a human SAP polypeptide, comprising providing a human SAP polypeptide and enzymatically or chemically altering the SAP polypeptide to produce a glycosylated SAP polypeptide
30 comprising an N-linked or O-linked oligosaccharide.

 In certain aspects, the disclosure provides a human SAP polypeptide prepared by a process comprising expressing a SAP polypeptide in a CHO cell and isolating the SAP polypeptide from the cell.

In certain aspects, the disclosure provides a CHO cell that contains a human SAP polypeptide with an N-linked oligosaccharide chain having at least one branch of the oligosaccharide chain terminating with a α 2,3-linked sialic acid moiety.

In certain aspects, the disclosure provides a CHO cell containing a polynucleotide
5 sequence encoding a human SAP polypeptide.

In certain aspects, the disclosure provides a human SAP polypeptide having an IC_{50} for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than one-half, less than one-third, less than one-fourth, less than one-tenth, or less than one-hundredth than that of a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human
10 serum.

In preferred embodiments, human SAP polypeptides of the invention have an N-linked oligosaccharide chain. In some embodiments, at least one branch of the N-linked oligosaccharide chain terminates with a α 2,3-linked sialic acid moiety. In some
15 embodiments, the N-linked oligosaccharide chain has at least 50% fewer α 2,6-linked sialic acid moieties than a wild-type SAP isolated from human serum. In some embodiments, all branches of the N-linked oligosaccharide chain terminate with α 2,3-linked sialic acid moieties. In some embodiments, the N-linked oligosaccharide chain is substantially free of α 2,6-linked sialic acid moieties. Glycovariant SAP polypeptides of the invention may comprise one or more branches, e.g., the N-linked oligosaccharide
20 chain may be characterized as having a bi-antennary, tri-antennary, tetra-antennary, or a penta-antennary structure. In some embodiments, the N-linked oligosaccharide chain comprises a pentasaccharide core of Man[(α 1,6-)-(Man(α 1,3))-Man(β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N)-Asn. In some embodiments, the N-linked oligosaccharide chain comprises at least one branch having the structure NeuNAc2 α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6. In some
25 embodiments, at least one branch of the N-linked oligosaccharide chain is substantially free of galactose and N-acetylglucosamine. In some embodiments, all the branches of the N-linked oligosaccharide chain are substantially free of galactose and N-acetylglucosamine. In some embodiments, at least one branch of the N-linked oligosaccharide chain comprises one or more mannose residues. In some embodiments,
30 the N-linked oligosaccharide chain comprises at least one fucose residue. Any of the glycovariant SAP polypeptides of the invention may comprise at least one modified glycosyl residue. A modified glycosyl residue may be conjugated to one or more

modifying groups selected from water-soluble and -insoluble polymers, therapeutic moieties, diagnostic agents, and biomolecules.

In certain aspects, the SAP polypeptide of the invention may be a recombinant polypeptide. SAP polypeptide of the invention may comprise an amino acid sequence at
5 least 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% identical to SEQ ID Nos. 1, 2, 3, or 4. Preferably, the SAP polypeptide is a human SAP protein. A human SAP polypeptide of the invention may comprise an amino acid sequence at least 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% identical to SEQ ID NO: 1.

In certain aspects, the human SAP polypeptide of the invention is a fusion protein
10 comprising an SAP domain and one or more heterologous domains. The heterologous domain may enhance one or more of *in vivo* stability, *in vivo* half-life, uptake/administration, tissue localization or distribution, formation of protein complexes, and/or purification.

In certain aspects, the human SAP polypeptide of the invention comprises one or
15 more modified amino acid residues, e.g., a PEGylated amino acid, a glycosylated (e.g., O-linked glycosylation) amino acid, a prenylated amino acid, an acetylated amino acid, a biotinylated amino acid, and/or an amino acid conjugated to an organic derivatizing agent. The modified amino acid residues may enhance one or more of *in vivo* stability, *in vivo* half-life, uptake/administration, tissue localization or distribution, formation of
20 protein complexes, and/or purification.

In preferred embodiments, human SAP polypeptides of the invention have increased biological activity relative to a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human serum. In certain aspects, the SAP polypeptides of the invention have an IC₅₀ for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than one-
25 half, less than one-third, less than one-fourth, less than one-tenth, or less than one-hundredth that of a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human serum.

In certain aspects, methods of making any of the human SAP polypeptides of the invention comprise an additional step of enzymatically or chemically altering the SAP polypeptide to attach an N-linked or O-linked oligosaccharide chain to the SAP
30 polypeptide or to modify the existing N-linked or O-linked oligosaccharide chain of the SAP polypeptide. In some embodiments, enzymatically or chemically altering the SAP polypeptide comprises treating the SAP polypeptide with one or more enzymatic proteins selected from glycosyltransferases, glycosidases, and phosphatases. In some

embodiments, the process of enzymatically or chemically altering the SAP polypeptide is effected in the presence of one or more sugar precursors. Suitable sugar precursors include, but are not limited to, UDP-N-acetylglucosamine, CMP-N-glycolylneuraminic acid, UDP-N-acetylgalactosamine, CMP-N-acetylneuraminic acid, UDP-galactose, and GDP-fucose. In some embodiments, the process of enzymatically or chemically altering the SAP polypeptide removes one or more terminal α 2,6-linked sialic acid moieties from the N-linked or O-linked oligosaccharide chain. In some embodiments, the process of enzymatically or chemically altering the isolated SAP polypeptide replaces one or more terminal α 2,6-linked sialic acid moieties on the oligosaccharide chain with one or more α 2,3-linked sialic acid moieties.

The disclosure further provides pharmaceutical preparations of human SAP polypeptides of the invention suitable for use in a mammal. Pharmaceutical preparations of the invention include at least one of the SAP polypeptides disclosed herein and a pharmaceutically acceptable carrier. In some embodiments, the pharmaceutical preparation further comprises an additional active agent. In some embodiments, the pharmaceutical preparation is prepared as a sustained release formulation. In some embodiments, pharmaceutical preparations of the disclosure are suitable for administration to a patient topically, by injection, by intravenous injection, by inhalation, by continuous depot, or by pump.

The disclosure further provides methods for treating or preventing SAP-responsive disorders or conditions by administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of one or more of the SAP polypeptides of the invention. SAP-responsive disorders or conditions include, but are not limited to, fibrotic or fibroproliferative disorders or conditions, hypersensitivity disorders or conditions, autoimmune disorders or conditions, inflammatory diseases or conditions, and mucositis. The SAP polypeptide of the invention may be administered to a patient topically, by injection, by intravenous injection, by inhalation, by continuous depot or pump, or a combination thereof. In some embodiments, the SAP polypeptide of the invention is administered with one or more additional active agents.

BRIEF DESCRIPTIONS OF THE DRAWINGS

Figure 1. Fibrocyte differentiation assay. An ELISA-based assay was used to measure production of MDC after incubation of monocytes with SAP polypeptides. The Y-axis indicates the average potency (i.e., average of 7 independent experiments) of human serum-derived SAP (hSAP) compared to recombinant human SAP (rhSAP) isolated from CHO-S cells. Relative activity of hSAP is set at 1.0.

Figure 2. Glycan structural analysis of variant SAP polypeptides. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS) analysis (A) and Anion-Exchange High Performance Liquid Chromatography (AEX-HPLC) analysis (B) was used to determine the sialic acid linkages on glycoremodeled recombinant human SAP isolated from CHO-S cells. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS) analysis (C) and Anion-Exchange High Performance Liquid Chromatography (AEX-HPLC) analysis (D) was used to determine the sialic acid linkages on glycoremodeled hSAP (human serum-derived SAP). Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS) analysis (E) and Anion-Exchange High Performance Liquid Chromatography (AEX-HPLC) analysis (F) was used to determine the sialic acid linkages on rhSAP that was treated with an α 2,3-sialyltransferase to increase the number of terminal 2,3-linked sialic acids on the SAP glycans. For LCMS figures, the X-axis represents mass in Daltons, and the Y-axis is represents relative intensity. For the HPLC traces, the X-axis is the time in minutes, and the Y-axis is absorbance units (mAU).

Figure 3. Fibrocyte differentiation assay. An ELISA-based assay was used to measure production of MDC after incubation of monocytes with SAP variant polypeptides. The Y-axis indicates the average relative activity of each SAP variant compared to a hSAP reference standard, for which the activity is set at 1.0 (see the left-most bar).

Figure 4. Fibrocyte differentiation assay. Monocytes were treated with hMCSF and then subsequently quantified for fibrocyte differentiation. The X-axis represents the concentration of hMCSF incubated with donor monocytes. The Y-axis indicates the amount of fibrocyte proliferation at day five as measured by the enumeration of fibrocytes per 5.0×10^4 cells.

Figures 5. Fibrocyte differentiation assay. Monocytes were treated with hSAP and then subsequently quantified for fibrocyte differentiation. The X-axis indicates the concentration of hSAP incubated with donor monocytes. The Y-axis indicates the amount of fibrocyte proliferation at day five as measured by the enumeration of fibrocytes per 5.0×10^4 cells.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Overview

Most naturally occurring peptides have carbohydrate moieties (i.e., glycans) attached to the peptide via specific linkages to certain amino acids along the length of the primary peptide chain, thus forming "glycopeptides." The glycosylation pattern on any given peptide can have enormous implications for the function of that peptide. For example, the structure of the N-linked glycans on a peptide can impact various characteristics of the peptide, including protease susceptibility, intracellular trafficking, secretion, tissue targeting, biological half-life, and antigenicity. The alteration of one or more of these characteristics greatly affects the efficacy of a peptide in its natural setting.

The glycan structures found in naturally occurring glycopeptides are typically divided into two classes, N-linked and O-linked glycans. Peptides expressed in eukaryotic cells are typically N-glycosylated on asparagine residues at sites in the peptide primary structure containing the sequence asparagine-X-serine/threonine, where X can be any amino acid except proline and aspartic acid. The carbohydrate portion of such peptides is known as an N-linked glycan or N-linked oligosaccharide. The early events of N-glycosylation occur in the endoplasmic reticulum (ER) and are conserved in mammals, plants, insects and other higher eukaryotes. First, an oligosaccharide chain comprising fourteen sugar residues is constructed on a lipid carrier molecule. As the nascent peptide is translated and translocated into the ER, the entire oligosaccharide chain is transferred to the amide group of the asparagine residue in a reaction catalyzed by a membrane-bound glycosyltransferase enzyme. The N-linked glycan is further processed both in the ER and in the Golgi apparatus. The further processing generally entails removal of some of the sugar residues and addition of other sugar residues in reactions catalyzed by glycosylases and glycosyltransferases specific for the sugar residues removed and added.

Typically, the final structures of the N-linked glycans are dependent upon the organism in which the peptide is produced. For example, peptides produced in bacteria are generally unglycosylated. Peptides expressed in insect cells typically contain high mannose or pauci-mannose N-linked oligosaccharide chains. Peptides produced in
5 mammalian cell culture are usually differentially glycosylated depending upon the species and cell culture conditions. Even in the same species and under the same conditions, a certain amount of heterogeneity in the glycosyl chain is sometimes encountered. In general, peptides produced in plant cells comprise glycan structures that differ significantly from those produced in animal cells.

10 A variety of methods have been proposed in the art to customize the glycosylation pattern of a peptide, including methods described in the Published International Applications Nos. WO 99/22764, WO 98/58964, and WO 99/54342 as well as in U.S. Pat. No. 5,047,335. Essentially, many of the enzymes required for the *in vitro* glycosylation of peptides have been cloned and sequenced. In some instances, these
15 enzymes have been used *in vitro* to add specific sugars to a glycan on a peptide. In other instances, cells have been genetically engineered to express a combination of enzymes and desired peptides such that addition of a desired sugar moiety to an expressed peptide occurs within the cell.

Two principal classes of enzymes are used in the synthesis of carbohydrates:
20 glycosyltransferases and glycosidases. Glycosyltransferases add or modify the existing oligosaccharide structures on a peptide. Glycosyltransferases are effective for producing specific products with good stereochemical and regiochemical control. Glycosyltransferases have been used to prepare oligosaccharides and to modify terminal N- and O-linked carbohydrate structures, particularly on peptides produced in mammalian
25 cells. For example, the terminal oligosaccharides of glycopeptides can be completely sialylated and/or fucosylated to provide more consistent sugar structures using glycosyltransferases, which may improve glycopeptide pharmacodynamics and a variety of other biological properties.

The glycosidases are further classified as exoglycosidases (e.g., β -mannosidase, β -glucosidase), and endoglycosidases (e.g. Endo-A, Endo-M). Glycosidases normally
30 catalyze the hydrolysis of a glycosidic bond. However, under appropriate conditions, they can be used to form this linkage. Most glycosidases used for carbohydrate synthesis are exoglycosidases; the glycosyl transfer occurs at the non-reducing terminus of the

substrate. The glycosidase binds a glycosyl donor in a glycosyl-enzyme intermediate that is either intercepted by water to yield the hydrolysis product, or by an acceptor, to generate a new glycoside or oligosaccharide. An exemplary pathway using an exoglycosidase is the synthesis of the core trisaccharide of all N-linked glycopeptides, including the β -mannoside linkage, which is formed by the action of β -mannosidase (Singh *et al.*, Chem. Commun. 993-994 (1996)). Although their use is less common than that of the exoglycosidases, endoglycosidases are also utilized to prepare carbohydrates. Endoglycosidases can be used to transfer an entire oligosaccharide chain, rather than a monosaccharide, onto a polypeptide. Oligosaccharide fragments have been added to substrates using endo- β -N-acetylglucosamines, such as endo-F and endo-M (Wang *et al.*, Tetrahedron Lett. 37: 1975-1978; and Haneda *et al.*, Carbohydr. Res. 292: 61-70 (1996)). Each of these classes of enzymes has been successfully used produce glycosylated peptides. For a general review, see, Crout *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 98-111 (1998).

Serum amyloid P (SAP) is a naturally occurring serum protein in mammals composed of five identical subunits, or "promoters", which are non-covalently associated in a disk-like complex. SAP belongs to the pentraxin super family of proteins, which are characterized by this cyclic pentameric structure. The classical short pentraxins include SAP as well as C-reactive protein (Osmand, A.P., *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 74: 739-743, 1997). SAP is normally synthesized in the liver and has a physiological half-life of twenty-four hours. The sequence of the human SAP subunit is disclosed below, which corresponds to amino acids 20-223 of Gene bank Accession NO. NP_001630 (signal sequence not depicted).

HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLTIPLEKPLQNFTLCFRAYSDDLRA
YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPV
HICVSWESSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQE QD
SYGGKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGTPLPANILD
WQALNYEIRGYVIKPLVWV (SEQ ID NO: 1)

The sequence of the *Gallus gallus* SAP subunit is disclosed below.

QEDLYRKVFVFPREDPSDAYVLLQVQLERPLLNFTVCLRSYTDLTRP
HSLFSYATKAQDNEILLFKPKPGYRFYVGGKYVTFRVPENRGEW
EHVCASWESGSGIAEFWLNGRPWPRKGLQKGYEVGNEAVVMLG

QEQDAYGGGFDVYNSFTGEMADVHLWDAGLSPDKMRSAYLALR
LPPAPLAWGRLRYEAKGDVVVKPRLREALGA (SEQ ID NO: 2)

The sequence of the *Bos taurus* SAP subunit is disclosed below.

5 QTDLRGKVFVFPRESSTDHVTLLITKLEKPLKNLTLCLRAYSDLSRG
YSLFSYNIHSDKDNELLVFKNGIGEYSLYIGKTKVTVRATEKFPSPVH
ICTSWESSTGIAEFWINGKPLVKRGLKQGYAVGAHPKIVLGQEQDS
YGGGFDKNQSFMGEGDLYMWDSVLSPEEILLVYQGSSSISPTILD
WQALKYEIKGYVIVKPMVWG (SEQ ID NO: 3)

10 The sequence of the *Cricetulus migratorius* SAP subunit is disclosed below.

QTDLTGKVFVFPRESESDYVKLIPRLEKPLENFTLCFRTYTDLSRPHSLFSYNTKN
KDNELLIYKERMGEYGLYIENVGAIVRGVEEFASPVHFCTSWESSSGIADFWVNG
IPWVKKGLKKGYTVKTQPSIILGQEQDNYGGGFDKSQSFVGEMGDLNMWDSVL
TP EEIKSVYEGSWLEPNILDWRALNYEMSGYAVIRPRVWH (SEQ ID NO: 4)

15 One aspect of the present invention relates to the surprising discovery that
modification of a glycan structure on a human SAP polypeptide can increase the
biological activity of the SAP polypeptide relative to a corresponding sample of wild-type
SAP isolated from human serum. As demonstrated by the examples of the disclosure,
isolated SAP from human serum contains only α 2,6-linked sialic acid residues. In
20 contrast, recombinant human SAP produced in CHO cells contains only α 2,3-linked sialic
acid residues. Using *in vitro* cell-based bioassays, α 2,3-linked sialic acid SAP
polypeptides were demonstrated to have consistently higher activity than wild-type SAP
(i.e., SAP comprising α 2,6-linked sialic acid moieties) isolated from human serum. The
variant SAP polypeptides of the invention would be more effective as therapeutic agents
25 due to their increased biological potency. For example, more potent SAP variants may
require lower dosing and/or less frequent dosing relative to wild-type SAP isolated from
human serum. The present disclosure provides both variant human SAP polypeptides and
methods for making the same. In particular, the disclosure includes methods and
compositions for *in vitro* and *in vivo* addition, deletion, or modification of sugar residues
30 to produce a human SAP polypeptide having a desired glycosylation pattern.

Definitions

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein generally have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art.

Generally, the nomenclature used herein and the laboratory procedures in cell culture, molecular genetics, organic chemistry, and nucleic acid chemistry and hybridization are those well known and commonly employed in the art. Standard techniques are used for nucleic acid and peptide synthesis. The techniques and procedures are generally performed according to conventional methods in the art and various general references (e.g., Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), which are provided throughout this document.

The articles "a" and "an" are used herein to refer to one or to more than one (i.e., to at least one) of the grammatical object of the article. By way of example, "an element" means one element or more than one element.

As used herein, the terms "treatment" and "treating", refer to obtaining a desired pharmacologic and/or physiologic effect. The effect may be prophylactic in terms of completely or partially preventing a disorder or symptom thereof and/or may be therapeutic in terms of a partial or complete cure for a disorder and/or adverse affect attributable to the disorder. "Treatment", as used herein, covers any treatment of a disease in a mammal, particularly in a human, and includes: (a) increasing survival time; (b) decreasing the risk of death due to the disease; (c) inhibiting the disease, i.e., arresting its development or reducing the rate of disease progression; and (d) relieving the disease, i.e., causing regression of the disease.

As used herein, a therapeutic that "inhibits" or "prevents" a disorder or condition is a compound that, in a statistical sample, reduces the occurrence of the disorder or condition in the treated sample relative to an untreated control sample, or delays the onset or reduces the severity of one or more symptoms of the disorder or condition relative to the untreated control sample.

As used herein the terms "subject" and "patient" refer to animals including mammals, such as humans. The term "mammal" includes primates, domesticated animals including dogs, cats, sheep, cattle, horses, goats, pigs, mice, rats, rabbits, guinea pigs, captive animals such as zoo animals, and wild animals.

As used herein the term "tissue" refers to an organ or set of specialized cells such as skin tissue, lung tissue, kidney tissue, and other types of cells.

The term "therapeutic effect" is art-recognized and refers to a local or systemic effect in animals, particularly mammals, and more particularly humans caused by a pharmacologically active substance. The phrase "therapeutically effective amount" means that amount of such a substance that produces some desired local or systemic effect at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any treatment. The therapeutically effective amount of such substance will vary depending upon the subject and disease condition being treated, the weight and age of the subject, the severity of the disease condition, the manner of administration, which can readily be determined by one of ordinary skill in the art. For example, certain compositions described herein may be administered in a sufficient amount to produce a desired effect at a reasonable benefit/risk ratio applicable to such treatment.

As used herein, the term "nucleic acid" refers to a polynucleotide such as deoxyribonucleic acid (DNA), and, where appropriate, ribonucleic acid (RNA). The term should also be understood to include, as equivalents, analogs of either RNA or DNA made from nucleotide analogs, and, as applicable to the embodiment being described, single-stranded (such as sense or antisense) and double-stranded polynucleotide.

The terms "peptides", "proteins" and "polypeptides" are used interchangeably herein. The term "purified protein" refers to a preparation of a protein or proteins that are preferably isolated from, or otherwise substantially free of, other proteins normally associated with the protein(s) in a cell or cell lysate. The term "substantially free of other cellular proteins" or "substantially free of other contaminating proteins" is defined as encompassing individual preparations of each of the proteins comprising less than 20% (by dry weight) contaminating protein, and preferably comprises less than 5% contaminating protein. Functional forms of each of the proteins can be prepared as purified preparations by using a cloned gene as is well known in the art. By "purified", it is meant that the indicated molecule is present in the substantial absence of other biological macromolecules, such as other proteins (particularly other proteins which may substantially mask, diminish, confuse or alter the characteristics of the component proteins either as purified preparations or in their function in the subject reconstituted mixture). The term "purified" as used herein preferably means at least 80% by dry weight, more preferably in the range of 85% by weight, more preferably 95-99% by weight, and

most preferably at least 99.8% by weight, of biological macromolecules of the same type present (but water, buffers, and other small molecules, especially molecules having a molecular weight of less than 5000, can be present). The term "pure" as used herein preferably has the same numerical limits as "purified" immediately above.

5 "N-linked" oligosaccharides are those oligosaccharides that are linked to a peptide backbone through asparagine, by way of an asparagine-N-acetylglucosamine linkage. N-linked oligosaccharides are also called "N-glycans." Naturally occurring N-linked oligosaccharides have a common pentasaccharide core of Man[(α 1,6-)-(Man(α 1,3)]-Man(β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N). They differ in the presence of, and in the
10 number of branches (also called antennae) of peripheral sugars such as N-acetylglucosamine, galactose, N-acetylgalactosamine, fucose, and sialic acid. Optionally, this structure may also contain a core fucose molecule and/or a xylose molecule.

The term "sialic acid" refers to any member of a family of nine-carbon carboxylated sugars. The most common member of the sialic acid family is N-acetyl-
15 neuraminic acid (often abbreviated as Neu5Ac, NeuAc, or NANA). A second member of the family is N-glycolyl-neuraminic acid (Neu5Gc or NeuGc), in which the N-acetyl group of NeuAc is hydroxylated. A third sialic acid family member is 2-keto-3-deoxy-nonulosonic acid (KDN) (Nadano *et al.* (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). Also included are 9-
20 substituted sialic acids such as a 9-O-C₁C₆-acyl-Neu5Ac like 9-O-lactyl-Neu5Ac or 9-O-acetyl-Neu5Ac, 9-deoxy-9-fluoro-Neu5Ac and 9-azido-9-deoxy-Neu5Ac. For review of the sialic acid family, see, e.g., Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992)).

25 A "genetically engineered" or "recombinant" cell is a cell having one or more modifications to the genetic material of the cell. Such modifications include, but are not limited to, insertions of genetic material, deletions of genetic material and insertion of genetic material that is extrachromosomal whether such material is stably maintained or not.

30 As used herein, the term "modified sugar," refers to a naturally- or non-naturally-occurring carbohydrate that is enzymatically added onto an amino acid or a glycosyl residue of a peptide in a process of the invention. The modified sugar is selected from a number of enzyme substrates including, but not limited to, sugar nucleotides (mono-, di-,

and tri-phosphates), activated sugars (e.g., glycosyl halides, glycosyl mesylates) and sugars that are neither activated nor nucleotides. A "modified sugar" maybe covalently functionalized with a "modifying group." Useful modifying groups include, but are not limited to, water-soluble and -insoluble polymers, therapeutic moieties, diagnostic
5 moieties, biomolecules. The locus of functionalization with the modifying group is selected such that it does not prevent the "modified sugar" from being added enzymatically to a peptide or glycosyl residue of the peptide.

Variant SAP Polypeptides

10 In part, the disclosure provides variant Serum Amyloid P (SAP) polypeptides. In particular, SAP variants of the invention include glycosylated human SAP polypeptides that comprise one or more N-linked or O-linked oligosaccharide chains each independently having one, two, three, four, five or more branches terminating with an α 2,3-linked sialic acid moiety. In some embodiments, all the branches of the N-linked or
15 O-linked oligosaccharide chains terminate in α 2,3-linked moieties. Other SAP variants of the invention include glycosylated human SAP polypeptides that contain an N-linked or O-linked oligosaccharide chains having at least 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, or even at least 95% fewer α 2,6-linked sialic acid moieties than a wild-type SAP polypeptide derived from human serum. In some
20 embodiments, the N-linked or O-linked oligosaccharide chains are substantially free of α 2,6-linked sialic acid moieties, e.g., having less than 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% or even less than 99% α 2,6-linked sialic acid moieties relative to a wild-type SAP polypeptide derived from human serum). Glycovariant SAP polypeptides of the invention may comprise an N-linked oligosaccharide or O-linked chain having one or more
25 branches (e.g., having a bi-antennary, tri-antennary, tetra-antennary, penta-antennary, etc. structure). In certain embodiments, SAP polypeptides of the invention comprise an N-linked or O-linked oligosaccharide chain wherein one, two, three, four, or five branches of the oligosaccharide chain are substantially free of galactose and N-acetylglucosamine (e.g., having less than 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% or even less than 99% N-
30 acetylglucosamine relative to a wild-type SAP polypeptide derived from human serum). Certain SAP polypeptides of the invention have N-linked or O-linked oligosaccharide chains that are substantially free of galactose and N-acetylglucosamine (e.g., having less than 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% or even less than 99% galactose and/or N-

acetylglucosamine relative to a wild-type SAP polypeptide derived from human serum).

In some embodiments, SAP polypeptides of the invention comprise an N-linked or O-linked oligosaccharide chain wherein one, two, three, four, or five branches of the oligosaccharide chain contain one or more mannose residues. In certain embodiments, the

5 SAP polypeptide of the invention comprises an N-linked oligosaccharide having a pentasaccharide core of Man[(α 1,6-)-(Man(α 1,3)]-Man(β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N)-Asn. This pentasaccharide core also may comprise one or more fucose or xylose residues. In certain embodiments, SAP polypeptides of the invention comprise an N-linked oligosaccharide chain wherein one, two, three, four, or five branches of the
10 oligosaccharide chain have the structure NeuNAc2 α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6. SAP polypeptides of the invention also may comprise an N-linked oligosaccharide chain wherein all branches have the structure NeuNAc2 α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6.

Variant SAP polypeptides of the invention may comprise one or more "modified" sugar residues. Modified sugars are substituted at any position that allows for the
15 attachment of the modifying moiety or group. In preferred aspects, modified sugar is substituted at a position that still allows the sugar to function as a substrate for an enzyme used to couple the modified sugar to the SAP peptide. A modifying group can be attached to a sugar moiety by enzymatic means, chemical means or a combination thereof, thereby producing a modified sugar, e.g., modified galactose, fucose, or sialic acid. Modifying
20 groups suitable for use in the present invention as well as methods for conjugating these modifying groups to sugar residues are described in the following section.

In preferred aspects, variant SAP polypeptides of the invention have an IC₅₀ for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than one-half that of a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human serum. In
25 some embodiments, variant SAP polypeptides of the invention have an IC₅₀ for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than 1/3, less than 1/4, less than 1/10, or less than 1/100 that of a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human serum.

Variant SAP polypeptides of the invention may be at least 60%, at least 70%, at
30 least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, at least 99%, or 100% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, as determined using the FASTDB computer program based on the algorithm of Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)). In a specific embodiment, parameters employed

to calculate percent identity and similarity of an amino acid alignment comprise:
Matrix=PAM 150, k-tuple=2, Mismatch Penalty=1, Joining Penalty=20, Randomization
Group Length=0, Cutoff Score=1, Gap Penalty=5 and Gap Size Penalty=0.05.

The term "SAP polypeptide" encompasses functional fragments and fusion
5 proteins comprising any of the preceding. Generally, an SAP polypeptide will be
designed to be soluble in aqueous solutions at biologically relevant temperatures, pH
levels and osmolarity. The SAP protomers that non-covalently associate together to form
a pentameric SAP complex may have identical amino acid sequences and/or post-
translational modifications or, alternatively, individual SAP protomers within a single
10 complex may have different sequences and/or modifications. The term SAP polypeptide
includes polypeptides comprising any naturally occurring SAP polypeptide as well as any
variant thereof (including mutants, fragments, and fusions). A SAP polypeptide of the
invention may be a recombinant polypeptide. In preferred embodiments, the SAP
polypeptide of the invention is a human SAP polypeptide.

15 In some embodiments, pharmaceutical compositions are provided comprising a
variant SAP polypeptide of the invention, or a functional fragment thereof. In some
aspects, the amino acid sequence of a SAP variant may differ from SEQ ID NO: 1 by one
or more conservative or non-conservative substitutions. As used herein, "conservative
substitutions" are residues that are physically or functionally similar to the corresponding
20 reference residues, i.e., a conservative substitution and its reference residue have similar
size, shape, electric charge, and/or chemical properties (e.g., the ability to form covalent
or hydrogen bonds). Preferred conservative substitutions are those fulfilling the criteria
defined for an accepted point mutation in Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and
Structure 5:345-352 (1978 & Supp.). Examples of conservative substitutions are
25 substitutions within the following groups: (a) valine, glycine; (b) glycine, alanine; (c)
valine, isoleucine, leucine; (d) aspartic acid, glutamic acid; (e) asparagine, glutamine; (f)
serine, threonine; (g) lysine, arginine, methionine; and (h) phenylalanine, tyrosine.
Additional guidance concerning which amino acid changes are likely to be phenotypically
silent can be found in Bowie *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990).

30 Variant SAP polypeptides and fragments thereof that retain biological function are
useful in the pharmaceutical compositions and methods described herein. In some
embodiments, a variant SAP polypeptide or fragment thereof binds FcγRI, FcγRIIA,
and/or FcγRIIIB. In some embodiments, a variant SAP polypeptide or fragment thereof

inhibits one or more of fibrocyte, fibrocyte precursor, myofibroblast precursor, and/or hematopoietic monocyte precursor differentiation. SAP variants may be generated by modifying the structure of an SAP polypeptide for such purposes as enhancing therapeutic efficacy or stability (e.g., *ex vivo* shelf life and resistance to proteolytic degradation *in vivo*).

In certain aspects, the variant SAP polypeptides of the disclosure may further comprise post-translational modifications in addition to any that are naturally present in the SAP polypeptide. Such modifications include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation (e.g., O-linked oligosaccharides, N-linked oligosaccharides, etc.), phosphorylation, and lipidation. As a result, the modified SAP polypeptide may contain non-amino acid elements, such as polyethylene glycols, lipids, poly- or mono-saccharides, and phosphates.

In certain aspects, one or more modifications to the SAP polypeptide described herein may enhance the stability of the SAP polypeptide. For example, such modifications may enhance the *in vivo* half-life of the SAP polypeptide or reduce proteolytic degradation of the SAP polypeptide.

In certain aspects, variant SAP polypeptides of the invention include fusion proteins having at least a portion of the human SAP polypeptide and one or more fusion domains or heterologous portions. Well known examples of such fusion domains include, but are not limited to, polyhistidine, Glu-Glu, glutathione S transferase (GST), thioredoxin, protein A, protein G, and immunoglobulin heavy chain constant region (Fc), maltose binding protein (MBP), or human serum albumin. A fusion domain may be selected so as to confer a desired property. For example, some fusion domains are particularly useful for isolation of the fusion proteins by affinity chromatography. For the purpose of affinity purification, relevant matrices for affinity chromatography, such as glutathione-, amylase-, and nickel-, or cobalt-conjugated resins are used. As another example, a fusion domain may be selected so as to facilitate detection of the SAP polypeptides. Examples of such detection domains include the various fluorescent protein (e.g., GFP) as well as "epitope tags," which are usually short peptide sequences for which a specific antibody is available. Well known epitope tags for which specific monoclonal antibodies are readily available include FLAG, influenza virus hemagglutinin (HA) and c-myc tags. In some cases, the fusion domains have a protease cleavage site that allows the relevant protease to partially digest the fusion proteins and thereby liberate the

recombinant protein therefrom. The liberated proteins can then be isolated from the fusion domain by subsequent chromatographic separation. In some cases, the SAP polypeptide may be fused to a heterologous domain that stabilizes the SAP polypeptide *in vivo*. By "stabilizing" is meant anything that increases serum half-life, regardless of whether this is because of decreased destruction, decreased clearance by the kidney, or other pharmacokinetic effect. Fusions with the Fc portion of an immunoglobulin and serum albumin are known to confer increased stability.

It is understood that different elements of the fusion proteins may be arranged in any manner that is consistent with the desired functionality. For example, an SAP polypeptide may be placed C-terminal to a heterologous domain, or, alternatively, a heterologous domain may be placed C-terminal to an SAP polypeptide. The SAP polypeptide and the heterologous domain need not be adjacent in a fusion protein, and additional domains or amino acid sequences (e.g., linker sequences) may be included C- or N-terminal to either domain or between the domains.

Methods of Producing Altered N-Glycosylation Molecules

Described herein are methods of producing variant human SAP polypeptides. The methods generally involve a step of contacting an SAP polypeptide with one or more chemical or enzymatic agents to produce or modify a glycosylation structure on the SAP polypeptide. The methods can be cell-based or non-cell based.

Enzymes useful for producing or modifying glycan structures are well known in the art. Most enzymes/proteins useful in the methods of the disclosure can be categorized into one of two functional classes: glycosyltransferases and glycosidases. Glycosyltransferases (e.g., N- acetylglucosaminyl-transferases, galactosyl-transferases, fucosyl-transferases, sialyl-transferases, glucosyl-transferases, mannosyl-transferases, etc.), as used herein, refers to any enzyme/protein that has the ability to transfer a donor sugar to an acceptor moiety. Glycosidases (e.g., glucosidases, mannosidases, N- acetylglucosaminidases, sialidases, fucosidases, etc.), as used herein, refers to any enzyme/protein that has the ability to catalyze the hydrolysis of the glycosidic linkage between sugar moieties.

Cell-based methods for producing altered glyco-forms of an SAP polypeptide use either wild-type (e.g., CHO cells) or genetically engineered cells that have at least one modified glycosylation activity relative to a human cell. Cells suitable for the methods of

the disclosure include, for example, fungal cells, prokaryotic cell (i.e., bacteria, Archaea) plant cells, or animal cells (e.g., nematode, insect, plant, bird, reptile, or mammal (e.g., a mouse, rat, rabbit, hamster, gerbil, dog, cat, goat, pig, cow, horse, whale, monkey, or human)). The cells can be primary cells, immortalized cells, or transformed cells. Such
5 cells can be obtained from a variety of commercial sources and research resource facilities, e.g., the American Type Culture Collection (Rockville, Md.). In certain aspects, the cell used for producing a variant SAP polypeptide is a CHO cell.

The term "glycosylation activity" refers to any activity that is (i) capable of adding N-linked or O-linked glycans to a target molecule (i.e., an oligosaccharyl-transferase
10 activity); (ii) removing N-linked or O-linked glycans from a target molecule; (iii) modifying one or more N-linked or O-linked glycans on a target molecule; (iv) modifying dolichol-linked oligosaccharides; (v) capable of aiding the activity of one or more of the activities under i-iv. Accordingly, glycosylation activity includes, for example, glycosidase activity, glycosyltransferase activity, sugar nucleotide synthesis,
15 modification, or transporter activity. Modification of one or more N-linked or O-linked glycans on a target molecule includes the action of a mannosylphosphoryl-transferase activity, a kinase activity, or a phosphatase activity, e.g., a mannosylphosphoryl-transferase, a kinase, or a phosphatase activity that alters the phosphorylation state of glycans on target molecules.

Engineered cells useful in the methods of the disclosure may have one or more genetic modifications including, but not limited to: (i) deletion of an endogenous gene encoding a protein having glycosylation activity; (ii) introduction of a recombinant nucleic acid encoding a mutant form of a protein (e.g., endogenous or exogenous protein) having an glycosylation activity; (iii) introduction or expression of an RNA molecule that
25 interferes with the functional expression of a protein having the glycosylation activity; (iv) introduction of a recombinant nucleic acid encoding a wild-type (e.g., endogenous or exogenous) protein having glycosylation activity; or (v) altering the promoter or enhancer elements of one or more endogenous genes encoding proteins having glycosylation activity to thus alter the expression of the encoded proteins. RNA molecules described
30 above include, for example, small-interfering RNA (siRNA), short hairpin RNA (shRNA), anti-sense RNA, or micro RNA (miRNA). It is understood that item (ii) includes, for example, replacement of an endogenous gene (e.g., by homologous recombination) with a gene encoding a protein having greater glycosylation activity

relative to the endogenous gene so replaced.

The genetically engineered cells described herein have one or more altered glycosylation activities such as: (i) an increase in one or more glycosylation activities in the genetically modified cell, (ii) a decrease in one or more glycosylation activities in the genetically modified cell, (iii) a change in the localization or intracellular distribution of one or more glycosylation activities in the genetically modified cell, or (iv) a change in the ratio of one or more glycosylation activities in the genetically modified cell relative to an unmodified cell of the same origin. It is understood that an increase in the amount of glycosylation activity can be due to overexpression of one or more proteins having glycosylation activity, an increase in copy number of an endogenous gene (e.g., gene duplication), or an alteration in the promoter, enhancer, or suppressor of an endogenous gene that stimulates an increase in expression of the protein encoded by the gene. A decrease in one or more glycosylation activities can be due to overexpression of a mutant form (e.g., a dominant negative form) of one or more proteins having glycosylation - altering activities, introduction or expression of one or more interfering RNA molecules that reduce the expression of one or more proteins having an glycosylation activity, or deletion of one or more endogenous genes that encode a protein having glycosylation activity.

Genetically engineered cells used by the methods of the disclosure can express (e.g., overexpress) wild-type or mutant genes encoding proteins having glycosylation activity. Such genes include, but are not limited to, ALG7, ALG13, ALG14, ALG1, ALG2, ALG11, RFT1, ALG3, ALG9, ALG12, ALG6, ALG8, ANL1, ALG10, ALG5, OST3, OST4, OST6, STT3, OST1, OST5, WBP1, SWP1, OST2, DPM1, SEC59, OCH1, MNN9, VAN1, MNN8, MNN10, MNN11, HOC1, MNN2, MNN5, MNN6, KTR1, YUR1, MNN4, KRE2, KTR2, KTR3, MNN1, MNS1, MNN4, PNO1, MNN9, glucosidase I, glucosidase II, or endomannosidase. Genes encoding proteins having glycosylation activity can be from any species (e.g., lower eukaryotes (e.g., fungus (including yeasts) or trypanosomes), prokaryotes (i.e., bacteria or Archaea), plant, or animal (e.g., insect, bird, reptile, or mammal, such as mouse or rat, dog, cat, horse, goat, cow, pig, non-human primate, or human). It is understood that genetically engineered cells used for the methods of the disclosure can express any number of genes (e.g., genes encoding proteins having glycosylation activity) and/or any combination of one or more (e.g., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, or 20 or more) of any of the genes recited herein.

In addition, any genetically engineered cells used by the methods of the disclosure may comprise any number of mutations that alter or abrogate one or more glycosylation activities.

5 In some embodiments, the term "gene expression" or "expression" refers to the cellular processes by which a biologically active polypeptide is produced from a DNA sequence and exhibits a biological activity in a cell. As such, gene expression involves the processes of transcription and translation, but also involves post-transcriptional and post-translational processes that can influence a biological activity of a gene or gene product. These processes include, but are not limited to, RNA syntheses, processing, and transport,
10 as well as polypeptide synthesis, transport, and post-translational modification of polypeptides.

For example, the disclosure provides methods for making an SAP polypeptide of the invention by expressing a SAP gene in a cell. In some embodiments, the cell may contain an endogenous SAP gene or fragment thereof. In other embodiments, a
15 polynucleotide coding for an exogenous SAP polypeptide or fragment thereof may be introduced (e.g., transformed, transfected, etc.) into a cell. Suitable SAP polynucleotides that can be introduced into a cell include nucleic acid fragments as well as nucleic acid constructs or expression vectors. In preferred embodiments, the endogenous or exogenous gene encodes a human SAP polypeptide.

20 In some embodiments, the nucleic acid fragment, e.g., encoding a human SAP polypeptide, used to transform the host cell may include a Shine-Dalgarno site (e.g., a ribosome binding site) and a start site (e.g., the codon ATG) to initiate translation of the transcribed message to produce the enzyme. It may, also include a termination sequence to end translation. A termination sequence is typically a codon for which there exists no
25 corresponding aminoacyl-tRNA, thus ending polypeptide synthesis. In some embodiments, a nucleic acid construct encoding an SAP polypeptide can be delivered, for example, as an expression plasmid that, when transcribed in the cell, produces as SAP polypeptide.

In some embodiments, a suitable expression vector comprises a nucleotide
30 sequence encoding an SAP polypeptide of the invention operably linked to at least one regulatory sequence. Regulatory sequences are art-recognized and are selected to direct expression of any of the polypeptides of the disclosure. Accordingly, the term regulatory sequence includes promoters, enhancers and other expression control elements.

Exemplary regulatory sequences are described in Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). For instance, any expression control sequence that regulates the expression of a DNA sequence when operatively linked to it may be used in these vectors to express any of the polypeptides of the disclosure. Such useful expression control sequences, include, for example, the early and late promoters of SV40, *tet* promoter, adenovirus or cytomegalovirus immediate early promoter, the *lac* system, the *trp* system, the TAC or TRC system, T7 promoter whose expression is directed by T7 RNA polymerase, the major operator and promoter regions of phage lambda, the control regions for fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, the promoters of acid phosphatase, e.g., Pho5, the promoters of the yeast α -mating factors, the polyhedron promoter of the baculovirus system and other sequences known to control the expression of genes of prokaryotic or eukaryotic cells or their viruses, and various combinations thereof. It should be understood that the design of the expression vector may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed and/or the type of protein desired to be expressed. Moreover, the vector's copy number, the ability to control that copy number and the expression of any other protein encoded by the vector, such as antibiotic markers, should also be considered.

In some embodiments, the nucleic acid fragment or expression system used to transform the host cell optionally may include one or more marker sequences. Generally speaking, suitable marker sequences typically encode a gene product, usually an enzyme that inactivates or otherwise detects or is detected by a compound in the growth medium. For example, the inclusion of a marker sequence may render the transformed cell resistant to an antibiotic, or it may confer compound-specific metabolism on the transformed cell. Examples of suitable marker sequences that confer resistance include kanamycin, ampicillin, chloramphenicol and tetracycline. Alternatively, rather than selective pressure, a marker gene may be used that allows for detection of particular colonies containing the gene, such as β -galactosidase, where a substrate is employed that provides for a colored product.

A variety of methods are suitable for transforming a cell of the present invention with a nucleic acid fragment or expression vector. Common transformation methods include electroporation, liposomal-mediated transformation, calcium-mediated transformation, and viral-mediated transfection

In certain aspects, when a host cell is transformed with a nucleic acid fragment or expression system of the present invention, the gene (e.g., human SAP) in said system can be integrated into the chromosomal DNA of the host cells by a so-called homologous recombination and the expression system will be carried stably in the host.

5 In order to integrate the expression system in the vector into chromosomal DNA of the host cells, an appropriate selection marker gene may be used wherein said marker gene has a sequence homologous to the gene on chromosomal DNA of the specific host cell. Selection markers for such a purpose can be easily selected by a skilled person. As an example, a preferred marker is a gene that exists on a chromosome and relates to the metabolism of the host cells. Namely, it is preferred to use a host which has been
10 modified in such a manner that the above-mentioned gene on the chromosome will be inactivated by an appropriate means such as a mutation. The host can then be subjected to a homologous recombination with an expression vector containing the corresponding intact gene, whereupon only transformants which contain the normal metabolism gene
15 can grow to be selected. Therefore, if such a marker gene has been introduced to the expression vector, a homologous recombination will take place between the marker gene in said expression vector and the corresponding portion of the chromosomal DNA, whereby the expression cassette of the heterologous gene will simultaneously be integrated into the chromosomal DNA.

20 In some embodiments, the term "expressing" a protein in a cell also includes methods of introducing a protein itself into cells. Therefore, in certain aspects, the disclosure provides methods for making an SAP polypeptide of the invention by introducing an SAP polypeptide into a cell. Techniques for introducing polypeptides directly into a cell are known in the art and generally involve a process of cell membrane permeation. Such techniques include, but are not limited to, microinjection of SAP
25 polypeptides; encapsulating an SAP polypeptide within membrane vesicles (e.g., liposomes, capsular bodies, erythrocyte ghosts, protoplasts, etc.) and contacting them with a cell membrane to thereby cause intracellular introduction of the SAP polypeptide by fusion; using physical methods (e.g., mechanical, chemical, electrical, etc.) that rely on
30 macromolecules entering cells by diffusion through holes transiently introduced in their plasma membranes (e.g., scrape-loading, bead-loading, etc.); and by uptake through natural endocytosis owing to cellular phagocytosis. A method of intracellular introduction may utilize a receptor-mediated pathway, wherein one of various receptors expressed on

the cell surface is set as a target and an SAP polypeptide is attached (covalently or non-covalently) to the cognate ligand that acts as a carrier moiety. Several methods have been described for introducing proteins into living cells using electrostatic adsorption, wherein the protein is first cationized and then contacted with the negatively charged surface of a cell (See Japanese Patent Publication No. 2004/049214).

In certain aspects, the disclosure provides CHO cells that express a SAP polypeptide. In some embodiments, the CHO cell expresses an exogenous SAP polypeptide. In preferred embodiments, the CHO cell expresses a human SAP polypeptide. In some embodiments, the disclosure provides CHO cells comprising a polynucleotide sequence encoding an SAP polypeptide. In preferred embodiments, the polynucleotide sequence encodes a human SAP polypeptide. Any of the aforementioned techniques may be used to "express" an SAP polypeptide of the invention in a CHO cell or any other suitable cell disclosed herein.

Where any of the glycosylation activities of the wild-type or genetically engineered cell are inducible or conditional on the presence of an inducing cue (e.g., a chemical or physical cue), the wild-type or genetically engineered cell can, optionally, be cultured in the presence of an inducing agent before, during, or subsequent to the introduction of the nucleic acid encoding a SAP polypeptide or a SAP polypeptide. For example, following introduction of the SAP polypeptide into the cell can be exposed to a chemical inducing agent that is capable of promoting the expression of one or more proteins having a wild-type or altered N-glycosylation activity. Where multiple inducing cues induce conditional expression of one or more proteins having wild-type and/or altered N-glycosylation activity, a cell can be contacted with multiple inducing agents. In some embodiments, the culture medium may be modified to produce the desired glycan structure on the SAP polypeptide. For example, the serum, glucose, and/or lipid (e.g., dolichol) concentration of the medium may be modified for optimal production of the desired SAP glycovariant. In some embodiments, the temperature, pH, and/or osmolarity of culture medium may be altered for optimal production of the desired SAP glycovariant.

A variant SAP polypeptide of the invention can be further processed *in vivo* or can be processed *in vitro* prior to or following isolation from the cell or cell medium. The further processing can include modification of one or more glycan residues of the SAP polypeptide or modification to the SAP polypeptide other than to its glycan structure(s). In some embodiments, the additional processing of the SAP polypeptide can include the

addition (covalent or non-covalent joining) of one or more heterologous moieties. In some embodiments, the further processing involves enzymatic or chemical treatment of the SAP polypeptide. Enzymatic treatment can involve contacting the SAP polypeptide with one or more glycosidase, phosphodiesterase, phospholipase, glycosyltransferase, or protease for a time sufficient to induce the modification, addition, or deletion of glycan residues (e.g., galactose, mannose, fucose, sialic acid, xylose, N-acetylglucosamine, etc.) on the SAP polypeptide. Customization of an N-linked oligosaccharide chain may be accomplished by the sequential modification, addition, or deletion of the desired sugar moieties, using techniques well known in the art. Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on peptide variants can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura *et al.*, 1987, Meth. Enzymol. 138: 350.

Exemplary methods of adding sugar moieties are disclosed in U.S. Pat. Nos. 5,876,980, 6,030,815, 5,728,554, and 5,922,577.

In certain embodiments, modification of the SAP glycan structure requires the presence of one or more sugar nucleotides. Exemplary sugar nucleotides that are used in the present invention include nucleotide mono-, di- or triphosphates or analogs thereof. In a preferred embodiment, the modified sugar nucleotide is selected from a UDP-glycoside, CMP-glycoside, or a GDP-glycoside. Even more preferably, the sugar nucleotide is selected from an UDP-galactose, UDP-galactosamine, UDP-glucose, UDP-glucosamine, GDP-mannose, GDP-fucose, CMP-sialic acid, CMP-N-glycolylneuraminic acid or CMP-NeuAc. In certain embodiments, a modified sugar nucleotide is utilized to add a modified sugar residue to the SAP polypeptide. N-acetylamine derivatives of the sugar nucleotides are also of use in the method of the invention.

Chemical addition or removal of glycosyl moieties can be carried out by any suitable method. For example, chemical deglycosylation may involve exposure of the SAP polypeptide to trifluoromethanesulfonic acid, or another strong acid. This treatment results in the cleavage of most or all sugars except the linking sugar (N-acetylglucosamine or N-acetylgalactosamine), while leaving the peptide intact. Methods of chemical deglycosylation are described by Haldmuddin *et al.*, 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 and by Edge *et al.*, 1981, Anal. Biochem. 118: 131. Chemical treatment can, for example, involve contacting the altered SAP polypeptide with an acid, such as hydrofluoric acid, for a time sufficient to induce modification of the SAP polypeptide. Hydrofluoric acid treatment, under certain conditions, specifically removes the mannose

residues that are phosphodiester-linked to glycans, while leaving the phosphate on the glycan. An altered SAP polypeptide can be further processed by addition or removal of a phosphate group from one or more N-glycans. For example, an altered SAP polypeptide can be contacted with a mannosyl kinase or a mannosyl phosphatase.

5 In certain aspects, it is desirable to modify only terminal sugar moieties on the SAP polypeptide glycan structure (N-linked or O-linked oligosaccharide). In some embodiments, one or more branches of the SAP glycan structure are modified by the addition, removal, substitution or modification of at least one terminal sialic acid residue. Suitable methods for modifying glycans described herein may be used to alter only the
10 terminal sugar moiety on the SAP glycan structure. In some embodiments, a terminal sialic acid residue having an α 2,6-linkage, α 2,8-linkage, or α 2,9-linkage is replaced with one or more terminal α 2,3-linked sialic acid residue. In a particular aspect, human SAP comprising terminal α 2,6-linked sialic residues is modified according to one of methods of the disclosure in order to replace one or more of the terminal α 2,6-linked sialic
15 residues with one or more α 2,3-linked sialic acid residues. In some embodiments, a terminal α 2,3-linked sialic acid residue is modified to add one or more α 2,6-linked, α 2,8-linked, and/or α 2,9-linked sialic acid residues.

 In certain aspects, the process of making an SAP polypeptide of the invention involves a first step of deglycosylating the SAP polypeptide. The SAP polypeptide may
20 be partially or fully deglycosylated. In some embodiments, the first step of deglycosylation involves removing only terminal sugar moieties from at least one branch of the glycan structure on the SAP polypeptide. In some embodiments, the first step of deglycosylation removes at least one α 2,6-linked sialic acid residue. In some
25 embodiments, the first step of deglycosylation removes at least one O-linked glycan. In some embodiments, the first step of deglycosylation removes at least one N-linked glycan. In some embodiments, the first step of deglycosylation removes all O-linked and N-linked glycans. In some embodiments, a deglycosylated SAP polypeptide (partially or fully) is further processed according to the methods of the disclosure, which includes but is not limited to, enzymatically or chemically modifying the partially or fully
30 deglycosylated SAP polypeptide, introducing the partially or fully deglycosylated SAP polypeptide into a cell, or combination thereof, wherein the method(s) produce a variant SAP polypeptide of the invention. In some embodiments, after a partially or fully deglycosylated SAP polypeptide has been introduced into a cell, it may be further

modified, *in vivo* or *in vitro*, according to the methods of the disclosure to produce a variant SAP polypeptide of the invention. Similarly, a partial or fully deglycosylated SAP polypeptide that is modified *in vitro*, using enzymatic or chemical methods described herein, may be introduced into a cell to produce a variant SAP polypeptide of the invention.

It is understood that an SAP polypeptide of the invention can be, but need not be, processed in a cell. For example, the disclosure also provides cell-free methods of producing a variant SAP polypeptide of the invention. In some aspects the cell-free methods include the step of contacting an SAP polypeptide, under glycosylation conditions, with a cell lysate prepared from a wild-type cell (e.g., a fungal cell, a plant cell, or an animal cell) or genetically engineered cell having at least one modified glycosylation activity, wherein contacting the SAP polypeptide with the cell lysate attaches an N-linked or O-linked oligosaccharide to the SAP polypeptide or modifies an existing N-linked or O-linked oligosaccharide on the SAP polypeptide. By "N-glycosylation conditions" is meant that a mixture (e.g., of SAP polypeptide and cell lysate) is incubated under conditions that allow for the desired altered N-glycosylation.

Suitable methods for obtaining cell lysates that preserve the activity or integrity of one or more glycosylation activities in the lysate can include the use of appropriate buffers and/or inhibitors, including nuclease, protease and phosphatase inhibitors that preserve or minimize changes in N-glycosylation activities in the cell lysate. Such inhibitors include, for example, chelators such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol bis(P-aminoethyl ether) N,N,N1,N1-tetraacetic acid (EGTA), protease inhibitors such as phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), aprotinin, leupeptin, antipain, and phosphatase inhibitors such as phosphate, sodium fluoride, and vanadate. Inhibitors can be chosen such that they do not interfere with or only minimally adversely affect the N-glycosylation activity, or activities, of interest. Appropriate buffers and conditions for obtaining lysates containing enzymatic activities are described in, e.g., Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Burtis and Ashwood, eds. W.B. Saunders, Philadelphia, (1999).

A cell lysate can be further processed to eliminate or minimize the presence of

interfering substances, as appropriate. If desired, a cell lysate can be fractionated by any of a variety of methods well known to those skilled in the art, including subcellular fractionation, and chromatographic techniques such as ion exchange, hydrophobic and reverse phase, size exclusion, affinity, and hydrophobic charge-induction chromatography (see, e.g., Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, third edition, Springer-Verlag, New York (1993); Burton and Harding, *J. Chromatogr. A* 814:71-81 (1998)), or any other suitable purification technique.

A cell lysate can be prepared in which whole cellular organelles remain intact and/or functional. For example, a lysate can contain one or more of intact rough endoplasmic reticulum, intact smooth endoplasmic reticulum, or intact Golgi apparatus. Suitable methods for preparing lysates containing intact cellular organelles and testing for the functionality of the organelles are described in, e.g., Moreau *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266(7):4329-4333; Moreau *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266(7):4322-4328; Rexach *et al.* (1991) *J. Cell Biol.* 114(2):219-229; and Paulik *et al.* (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 367(2):265-273; the disclosures of each of which are incorporated herein by reference in their entirety.

The SAP polypeptide can be contacted with just one purified protein having glycosylation activity. In some embodiments, the SAP polypeptide can be contacted with more than one purified proteins having glycosylation activity. One or more proteins having glycosylation activity can be purified using standard protein isolation techniques. An SAP polypeptide can be contacted with one or more proteins in a suitable buffer for a time sufficient to induce modification of the SAP polypeptides as described above. The SAP polypeptide can be contacted with more than one protein at the same time or sequentially. Where the SAP polypeptide is contacted sequentially to more than one protein having glycosylation activity, the SAP polypeptide can, but need not, be purified after one or more steps. That is, an SAP polypeptide can be contacted with protein activity "A" and then purified before contacting the molecule to protein activity "B". Methods of modifying peptides as such are known in the art, e.g., Lee and Park (2002) 30(6):716-720 and Fujita and Takegawa (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282(3):678-682, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entirety.

In certain aspects, the methods of the disclosure comprise a step of isolating an SAP polypeptide, e.g., from a cell or from components of a cell lysate. Many standard

techniques for protein isolation are known in the art. For example, methods of isolating polypeptides include, but are not limited to, size-exclusion chromatography, reverse-phase chromatography, liquid chromatography (e.g., HPLC), affinity chromatography (e.g., metal chelation or immunoaffinity chromatography), ion-exchange chromatography, hydrophobic-interaction chromatography, precipitation, differential solubilization, immunoprecipitation, centrifugation (e.g., ultracentrifugation, sucrose gradient centrifugation, etc.) or any combination thereof. In some embodiments, the SAP polypeptide may be conjugated to an affinity tag to facilitate purification of the polypeptide. Suitable affinity tags for SAP purification include, but are not limited to, chitin binding protein (CBP), maltose binding protein (MBP), glutathione-S-transferase (GST), streptavidin, biotin, and poly(His) tags. Affinity tags may be produced as part of the recombinant protein (i.e., as a fusion protein comprising a heterologous affinity tag domain and an SAP polypeptide domain) or attached (covalently or non-covalently) *in vivo* or *in vitro* to the SAP polypeptide. In some embodiments, multiple steps of purification can be used to isolate an SAP polypeptide. For example, an SAP polypeptide comprising a purification tag can be affinity-purified from a cell lysate or multi-component mixture using affinity purification. Then the affinity-purified SAP polypeptide can be further purified to remove any minor unwanted contaminants by an additional purification step, e.g., size exclusion chromatography or RP-HPLC. Where a polypeptide of the invention is produced in a cell, the SAP polypeptide can be isolated from the cell itself or from the media in which cell was cultured. In some embodiments, SAP polypeptides of the invention are produced and secreted from a cell into the culture media. In these embodiments, isolation may comprise separation of the cellular fraction from the soluble, SAP-containing fraction (e.g., by centrifugation).

In some aspects, it can be advantageous to link the SAP polypeptide to a solid-phase support prior to contacting the target molecule with one or more N-glycosylation activities. Such linkage can allow for easier purification following the N-glycosylation modifications. Suitable solid-phase supports include, but are not limited to, multi-well assay plates, particles (e.g., magnetic or encoded particles), a chromatography column, or a membrane.

In some embodiments, any of the altered SAP polypeptides described herein can be attached to a heterologous moiety using enzymatic or chemical means. A "heterologous moiety" refers to any constituent that is joined (e.g., covalently or non-

covalently) to the altered target molecule, which constituent is different from a constituent originally present on the SAP polypeptide. Heterologous moieties include, for example, water-soluble and -insoluble polymers, targeting moieties, therapeutic moieties, diagnostic moieties, and biomolecules.

5 SAP polypeptides of the invention may comprise one or more "modified" sugar residues. A modifying group can be attached to a sugar moiety by enzymatic means, chemical means or a combination thereof, thereby producing a modified sugar, e.g., modified galactose, fucose, or sialic acid. When a modified sialic acid is used, either a sialyl-transferase or a trans-sialidase can be used in these methods. The sugars may be
10 substituted at any position that allows for the attachment of the modifying moiety, yet which still allows the sugar to function as a substrate for the enzyme used to couple the modified sugar to the peptide.

 In general, the sugar moiety and the modifying group are linked together through the use of reactive groups, which are typically transformed by the linking process into a
15 new organic functional group or unreactive species. The sugar reactive functional group(s) may be located at any position on the sugar moiety. Reactive groups and classes of reactions useful in practicing the present invention are generally those that are well known in the art of bioconjugate chemistry. Currently favored classes of reactions available with reactive sugar moieties are those which proceed under relatively mild
20 conditions. These include, but are not limited to nucleophilic substitutions (e.g., reactions of amines and alcohols with acyl halides, active esters), electrophilic substitutions (e.g., enamine reactions) and additions to carbon-carbon and carbon-heteroatom multiple bonds (e.g., Michael reaction, Diels-Alder addition). These and other useful reactions are discussed in, for example, Smith and March, *Advanced Organic Chemistry*, 5th Ed., John
25 Wiley & Sons, New York, 2001; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; and Feeney *et al.*, *Modification of Proteins*; *Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

 Useful reactive functional groups pendent from a sugar nucleus or modifying group include, but are not limited to: (a) carboxyl groups and various derivatives thereof
30 (e.g., N-hydroxysuccinimide esters, N-hydroxybenzotriazole esters, acid halides, acyl imidazoles, thioesters, p-nitrophenyl esters, alkyl, alkenyl, alkynyl and aromatic esters); (b) hydroxyl groups, which can be converted to, e.g., esters, ethers, aldehydes, etc.; (c) haloalkyl groups, wherein the halide can be later displaced with a nucleophilic group such

as, for example, an amine, a carboxylate anion, thiol anion, carbanion, or an alkoxide ion, thereby resulting in the covalent attachment of a new group at the functional group of the halogen atom; (d) dienophile groups, which are capable of participating in Diels-Alder reactions such as, for example, maleimido groups (e) aldehyde or ketone groups, such that subsequent derivatization is possible via formation of carbonyl derivatives such as, for example, imines, hydrazones, semicarbazones or oximes, or via such mechanisms as Grignard addition or alkyllithium addition; (f) sulfonyl halide groups for subsequent reaction with amines, for example, to form sulfonamides; (g) thiol groups, which can be, for example, converted to disulfides or reacted with alkyl and acyl halides; (h) amine or sulfhydryl groups, which can be, for example, acylated, alkylated or oxidized; (i) alkenes, which can undergo, for example, cycloadditions, acylation, Michael addition, metathesis, Heck reaction, etc.; (j) epoxides, which can react with, for example, amines and hydroxyl compounds.

The reactive functional groups can be chosen such that they do not participate in, or interfere with, the reactions necessary to assemble the reactive sugar nucleus or modifying group. Alternatively, a reactive functional group can be protected from participating in the reaction by the presence of a protecting group. Those of skill in the art understand how to protect a particular functional group such that it does not interfere with a chosen set of reaction conditions. For examples of useful protecting groups, see, for example, Greene *et al.*, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

In some embodiments, the modified sugar is an activated sugar. Activated modified sugars useful in the present invention are typically glycosides which have been synthetically altered to include an activated leaving group. As used herein, the term "activated leaving group" refers to those moieties which are easily displaced in enzyme-regulated nucleophilic substitution reactions. Many activated sugars are known in the art. See, for example, Vocadlo *et al.*, In *Carbohydrate Chemistry and Biology*, Vol. 2, Ernst *et al.* Ed., Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2000; Kodama *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 34: 6419 (1993); Loughheed, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 37717 (1999)). Examples of such leaving groups include fluoro, chloro, bromo, tosylate, mesylate, triflate and the like. Preferred activated leaving groups for use in the present invention are those that do not significantly sterically encumber the enzymatic transfer of the glycoside to the acceptor. Accordingly, preferred embodiments of activated glycoside derivatives include glycosyl

fluorides and glycosyl mesylates, with glycosyl fluorides being particularly preferred. Among the glycosyl fluorides, α -galactosyl fluoride, α -mannosyl fluoride, α -glucosyl fluoride, α -fucosyl fluoride, α -xylosyl fluoride, α -sialyl fluoride, α -N-acetylglucosaminyl fluoride, α -N-acetylglucosaminyl fluoride, β -galactosyl fluoride, β -mannosyl fluoride, β -glucosyl fluoride, β -fucosyl fluoride, β -xylosyl fluoride, β -sialyl fluoride, β -N-acetylglucosaminyl fluoride and β -N-acetylgalactosaminyl fluoride are most preferred.

In certain aspects, a modified sugar residue is conjugated to one or more water-soluble polymers. Many water-soluble polymers are known to those of skill in the art and are useful in practicing the present invention. The term water-soluble polymer encompasses species such as saccharides (e.g., dextran, amylose, hyaluronic acid, poly(sialic acid), heparans, heparins, etc.); poly(amino acids); nucleic acids; synthetic polymers (e.g., poly(acrylic acid), poly(ethers), e.g., poly(ethylene glycol)); peptides, proteins, and the like. The present invention may be practiced with any water-soluble polymer with the sole limitation that the polymer must include a point at which the remainder of the conjugate can be attached.

Methods and chemistry for activation of water-soluble polymers and saccharides as well as methods for conjugating saccharides and polymers to various species are described in the literature. Commonly used methods for activation of polymers include activation of functional groups with cyanogen bromide, periodate, glutaraldehyde, bi-epoxides, epichlorohydrin, divinyl sulfone, carbodiimide, sulfonyl halides, trichlorotriazine, etc. (see, R. F. Taylor, (1991), Protein Immobilization, Fundamentals and Applications, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson *et al.*, (1993), Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, N.Y.; Dunn, R. L., *et al.*, Eds. Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

In certain aspects, a modified sugar residue is conjugated to one or more water-insoluble polymers. In some embodiments, conjugation to a water-insoluble polymer can be used to deliver a therapeutic peptide in a controlled manner. Polymeric drug delivery systems are known in the art. See, for example, Dunn *et al.*, Eds. Polymeric drugs and Drug Delivery Systems, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Those of skill in the art will appreciate that substantially any known drug delivery system is applicable to the conjugates of the present invention.

Representative water-insoluble polymers include, but are not limited to, polyphosphazenes, poly(vinyl alcohols), polyamides, polycarbonates, polyalkylenes, polyacrylamides, polyalkylene glycols, polyalkylene oxides, polyalkylene terephthalates, polyvinyl ethers, polyvinyl esters, polyvinyl halides, polyvinylpyrrolidone, polyglycolides, polysiloxanes, polyurethanes, poly(methyl methacrylate), poly(ethyl methacrylate), poly(butyl methacrylate), poly(isobutyl methacrylate), poly(hexyl methacrylate), poly(isodecyl methacrylate), poly(lauryl methacrylate), poly(phenyl methacrylate), poly(methyl acrylate), poly(isopropyl acrylate), poly(isobutyl acrylate), poly(octadecyl acrylate) polyethylene, polypropylene, poly(ethylene glycol), poly(ethylen oxide), poly(ethylene terephthalate), poly(vinyl acetate), polyvinyl chloride, polystyrene, polyvinyl pyrrolidone, pluronics, and polyvinylphenol, and copolymers thereof.

These and the other polymers discussed herein can be readily obtained from commercial sources such as Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), Polysciences (Warrenton, Pa.), Aldrich (Milwaukee, Wis.), Fluka (Ronkonkoma, N.Y.), and BioRad (Richmond, Calif.), or else synthesized from monomers obtained from these suppliers using standard techniques. Representative biodegradable polymers useful in the conjugates of the invention include, but are not limited to, polylactides, polyglycolides and copolymers thereof poly(ethylene terephthalate), poly(butyric acid), poly(valeric acid), poly(lactide-co-caprolactone), poly(lactide-co-glycolide), polyanhydrides, polyorthoesters, blends and copolymers thereof. Of particular use are compositions that form gels, such as those including collagen, and pluronics.

In a preferred embodiment, one or more modified sugar residues are conjugated to one or more PEG molecules.

In certain aspects, the modified sugar is conjugated to a biomolecule. Biomolecule of the invention may include, but are not limited to, functional proteins, enzymes, antigens, antibodies, peptides, nucleic acids (e.g., single nucleotides or nucleosides, oligonucleotides, polynucleotides and single- and higher-stranded nucleic acids), lectins, receptors or a combination thereof. Some preferred biomolecules are essentially non-fluorescent, or emit such a minimal amount of fluorescence that they are inappropriate for use as a fluorescent marker in an assay. Other biomolecules may be fluorescent.

In some embodiments, the biomolecule is a targeting moiety. A "targeting moiety" and "targeting agent", as used herein, refer to species that will selectively localize in a

particular tissue or region of the body. In some embodiments, a biomolecule is selected to direct the SAP polypeptide of the invention to a specific intracellular compartment, thereby enhancing the delivery of the peptide to that intracellular compartment relative to the amount of underivatized peptide that is delivered to the tissue. The localization is mediated by specific recognition of molecular determinants, molecular size of the targeting agent or conjugate, ionic interactions, hydrophobic interactions and the like. Other mechanisms of targeting an agent to a particular tissue or region are known to those of skill in the art.

In some embodiments, the modified sugar includes a therapeutic moiety. Those of skill in the art will appreciate that there is overlap between the category of therapeutic moieties and biomolecules, i.e., many biomolecules have therapeutic properties or potential.

Classes of useful therapeutic moieties include, for example, non-steroidal anti-inflammatory drugs; steroidal anti-inflammatory drugs; adjuvants; antihistaminic drugs; antitussive drugs; antipruritic drugs; anticholinergic drugs; anti-emetic and antinauseant drugs; anorexic drugs; central stimulant drugs; antiarrhythmic drugs; β -adrenergic blocker drugs; cardiotonic drugs; antihypertensive drugs; diuretic drugs; vasodilator drugs; vasoconstrictor drugs; antiulcer drugs; anesthetic drugs; antidepressant drugs; tranquilizer and sedative drugs; antipsychotic drugs; and antimicrobial drugs.

Other drug moieties useful in practicing the present invention include antineoplastic drugs, cytocidal agents, anti-estrogens, and antimetabolites. Also included within this class are radioisotope-based agents for both diagnosis (e.g., imaging) and therapy, and conjugated toxins.

The therapeutic moiety can also be a hormone, a muscle relaxant, an antispasmodic, bone activating agent, endocrine modulating agent, modulator of diabetes, androgen, antidiuretics, or calcitonin drug.

Other useful modifying groups include immunomodulating drugs, immunosuppressants, etc. Groups with anti-inflammatory activity, such as sulindac, etodolac, ketoprofen and ketorolac, are also of use. Other drugs of use in conjunction with the present invention will be apparent to those of skill in the art.

The altered N-glycosylation SAP polypeptides produced by the methods of the disclosure can be homogeneous (i.e., the sample of SAP polypeptide is uniform in specific N-glycan structure) or substantially homogeneous. By "substantially

homogeneous" is meant that at least about 25% (e.g., at least about 27%, at least about 30%, at least about 35%, at least about 40%, at least about 45%, at least about 50%, at least about 55%, at least about 60%, at least about 65%, at least about 70%, at least about 75%, at least about 80%, at least about 85%, at least about 90%, or at least about 95%, or
5 at least about 99%) of the SAP polypeptides contain the same specific N-glycan structure.

In some embodiments, variant SAP polypeptides of the invention have an IC_{50} for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than 1/2, less than 1/3, less than 1/4, less than 1/10, or less than 1/100 that of a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human serum. There are many well characterized
10 methods for determining the responsiveness of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) or monocyte cells to SAP for fibrocyte differentiation. These methods may be used to determine the relative potency of any of the SAP variant polypeptides of the invention in comparison to a sample of human serum-derived SAP, any other SAP variant polypeptide, or other fibrocyte suppressant or activating agent. PBMCs or monocytes
15 suitable for use in these methods may be obtained from various tissue culture lines. Alternatively, suitable cells for fibrocyte differentiation assays may be obtained from any biological sample that contains PBMC or monocyte cells. The biological sample may be obtained from serum, plasma, healthy tissue, or fibrotic tissue. In general, fibrocyte differentiation assays are conducted by incubating PBMC or monocyte cells in media
20 with various concentrations of a SAP polypeptide to determine the degree of fibrocyte differentiation. The concentration of SAP can range from 0.0001 $\mu\text{g/mL}$ to 1 mg/mL , and in some embodiments is 0.001 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 35 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 45 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$, or 500 $\mu\text{g/mL}$. In some assays, the media can be supplemented
25 with between 1-100 ng/mL hMCSF; the preferred concentration of hMCSF being 25 ng/mL . The indication that PBMC and monocytes have differentiated into fibrocytes can be determined by one skilled in the art. In general, fibrocytes are morphologically defined as adherent cells with an elongated spindle-shape and the presence of an oval nucleus. In some assays, cells are fixed and stained with Hema 3 before enumerating fibrocytes by
30 direct counting, e.g., using an inverted microscope. The amount of fibrocyte differentiation is interpreted by one skilled in the art as an indication of a cell's responsiveness to SAP. As indicated by the examples of the disclosure, a greater suppression of fibrocyte differentiation indicates a greater degree of SAP responsiveness.

An alternative method of measuring fibrocyte differentiation involves determining the expression of fibrocyte-specific cell surface markers or secreted factors, e.g., cytokines (e.g., IL-1ra, ENA-78/CXCL-5, PAI-1), fibronectin, collagen-1. Methods of detecting and/or quantifying cell surface markers or secreted factors are well known in the art, including but not limited to various ELISA- and FACS-based techniques using immunoreactive antibodies against one or more fibrocyte specific markers. As described in the examples of the disclosure, measuring the expression of Macrophage Derived Chemokine (MDC) is an effective method of determining fibrocyte differentiation.

Methods for detecting and/or characterizing N-glycosylation (e.g., altered N-glycosylation) of a SAP polypeptide include DNA sequencer-assisted (DSA), fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) or surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS). For example, an analysis can utilize DSA-FACE in which, for example, glycoproteins are denatured followed by immobilization on, e.g., a membrane. The glycoproteins can then be reduced with a suitable reducing agent such as dithiothreitol (DATA) or β -mercaptoethanol. The sulfhydryl groups of the proteins can be carboxylated using an acid such as iodoacetic acid. Next, the N-glycans can be released from the protein using an enzyme such as N-glycosidase F. N-glycans, optionally, can be reconstituted and derivatized by reductive amination. The derivatized N-glycans can then be concentrated. Instrumentation suitable for N-glycan analysis includes, for example, the ABI PRISM[®] 377 DNA sequencer (Applied Biosystems). Data analysis can be performed using, for example, GENESCAN[®]. 3.1 software (Applied Biosystems). Optionally, isolated mannoproteins can be further treated with one or more enzymes to confirm their N-glycan status. Exemplary enzymes include, for example, α -mannosidase or α -1,2 mannosidase. Additional methods of N-glycan analysis include, for example, mass spectrometry (e.g., MALDI-TOF-MS), high-pressure liquid chromatography (HPLC) on normal phase, reversed phase and ion exchange chromatography (e.g., with pulsed amperometric detection when glycans are not labeled and with UV absorbance or fluorescence if glycans are appropriately labeled). See also Callewaert *et al.* (2001) Glycobiology 11(4):275-281 and Freire *et al.* (2006) Bioconjug. Chem. 17(2):559-564, the disclosures of each of which are incorporated herein by reference in their entirety.

Treatment methods

In one aspect, the disclosure provides methods for treating an SAP-responsive disorder in a patient by administering a therapeutically effective amount of a variant SAP polypeptide of the invention to a patient in need thereof. The dosage and frequency of treatment can be determined by one skilled in the art and will vary depending on the symptoms, age and body weight of the patient, and the nature and severity of the disorder to be treated or prevented. In some embodiments, a variant SAP polypeptide is administered to a patient once or twice per day, once or twice per week, once or twice per month, or just prior to or at the onset of symptoms.

Dosages may be readily determined by techniques known to those of skill in the art or as taught herein. Toxicity and therapeutic efficacy of SAP may be determined by standard pharmaceutical procedures in experimental animals, for example, determining the LD₅₀ and the ED₅₀. The ED₅₀ (Effective Dose 50) is the amount of drug required to produce a specified effect in 50% of an animal population. The LD₅₀ (Lethal Dose 50) is the dose of drug which kills 50% of a sample population.

In some embodiments, the SAP-responsive disorder is fibrosis. The use of SAP as a therapeutic treatment for fibrosis is described in U.S. Patent Application No. 2007/0243163, which is hereby incorporated by reference. Fibrosis related disorders that may be amenable to treatment with the subject method include, but are not limited to, collagen disease, interstitial lung disease, human fibrotic lung disease (e.g., obliterative bronchiolitis, idiopathic pulmonary fibrosis, pulmonary fibrosis from a known etiology, tumor stroma in lung disease, systemic sclerosis affecting the lungs, Hermansky-Pudlak syndrome, coal worker's pneumoconiosis, asbestosis, silicosis, chronic pulmonary hypertension, AIDS-associated pulmonary hypertension, sarcoidosis, moderate to severe asthma and the like), fibrotic vascular disease, arterial sclerosis, atherosclerosis, varicose veins, coronary infarcts, cerebral infarcts, myocardial fibrosis, musculoskeletal fibrosis, post-surgical adhesions, human kidney disease (e.g., nephritic syndrome, Alport syndrome, HIV-associated nephropathy, polycystic kidney disease, Fabry's disease, diabetic nephropathy, chronic glomerulonephritis, nephritis associated with systemic lupus, and the like), progressive systemic sclerosis (PSS), primary sclerosing cholangitis (PSC), liver fibrosis, liver cirrhosis, renal fibrosis, pulmonary fibrosis, cystic fibrosis, chronic graft versus host disease, scleroderma (local and systemic), Grave's ophthalmopathy, diabetic retinopathy, glaucoma, Peyronie's disease, penis fibrosis, urethrostenosis after cystoscopy, inner accretion after surgery, scarring, myelofibrosis,

5 idiopathic retroperitoneal fibrosis, peritoneal fibrosis from a known etiology, drug-induced ergotism, fibrosis incident to benign or malignant cancer, fibrosis incident to microbial infection (e.g., viral, bacterial, parasitic, fungal, etc.), Alzheimer's disease, fibrosis incident to inflammatory bowel disease (including stricture formation in Crohn's disease and microscopic colitis), stromal cell tumors, mucositis, fibrosis induced by chemical or environmental insult (e.g., cancer chemotherapy, pesticides, or radiation (e.g., cancer radiotherapy)).

10 In some embodiments, the fibrosis related disorder is selected from systemic or local scleroderma, keloids, hypertrophic scars, atherosclerosis, restenosis, pulmonary inflammation and fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, liver cirrhosis, fibrosis as a result of chronic hepatitis B or C infection, kidney disease, heart disease resulting from scar tissue, macular degeneration, and retinal and vitreal retinopathy. In some embodiments, the fibrosis related disorder results from chemotherapeutic drugs, radiation-induced fibrosis, and injuries and burns. In some embodiments, the fibrosis-related disorder or condition results from post-surgical scarring, e.g., following trabeculectomy or other filtration surgery of the eye.

20 In some embodiments, the SAP-responsive disorder is a hypersensitivity disorder such as those mediated by Th1 or Th2 responses. The use of SAP as a therapeutic treatment for hypersensitivity disorders is also described in U.S. Provisional Application No 61/209,795, which is hereby incorporated by reference. Hypersensitivity related disorders that may be amenable to treatment with SAP include, but are not limited to, allergic rhinitis, allergic sinusitis, allergic conjunctivitis, allergic bronchoconstriction, allergic dyspnea, allergic increase in mucus production in the lungs, atopic eczema, dermatitis, urticaria, anaphylaxis, pneumonitis, and allergic-asthma.

25 In some embodiments, a variant SAP polypeptide of the invention may be used to treat allergen-specific immune responses, such as anaphylaxis, to various antigens, including, but not limited to, antimicrobials (e.g., cephalosporins, sulfonamides, penicillin and other β -lactams), anticonvulsants (e.g., phenytoin, phenobarbital, carbamazepine, dapsone, allopurinol, and minocycline), chemotherapeutics (e.g., taxanes, platinum compounds, asparaginases, and epipodophyllotoxins), heparin, insulin, protamine, aspirin
30 and other non-steroidal anti-inflammatory drugs, muscle relaxants (e.g., succinylcholine, atracurium, vecuronium, and pancuronium), induction agents (e.g., barbiturates, etomidate, propofol), narcotics (e.g., fentanyl, meperidine, morphine), colloids for

intravascular volume expansion, radiocontrast materials, blood products, latex, animal products, animal dander, dust mites, insects (e.g., bites, stings or venom), cosmetics, metals (e.g., nickel, cobalt, and chromate), plants, spores, pollen, food (e.g., milk, eggs, wheat, soy, peanuts and tree nuts, seafood), vaccination, and fungal antigens (e.g.,
5 *Aspergillus*, *Curvularia*, *Exserohilum*, and *Alternaria* species).

In some embodiments, the SAP-responsive disorder is an autoimmune disorder such as those mediated by Th1 or Th2 responses. The use of SAP as a therapeutic treatment for autoimmune disorders is also described in U.S. Provisional Application No 61/209,845, which is hereby incorporated by reference. Autoimmune related disorders
10 that may be amenable to treatment with SAP include, but are not limited to, type I diabetes, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, autoimmune myocarditis, pemphigus, myasthenia gravis, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, Addison's disease, autoimmune hepatitis, chronic Lyme arthritis, familial dilated cardiomyopathy, juvenile dermatomyositis, polychondritis, Sjogren's syndrome, psoriasis,
15 juvenile idiopathic arthritis, inflammatory bowel disease, systemic lupus erythematosus, chronic obstructive pulmonary disease, and graft-versus-host disease.

In some embodiments, the SAP-responsive disorder is a mucositis. The use of SAP as a therapeutic treatment for mucositis is also described in U.S. Application No 12/217,614, which is hereby incorporated by reference. Methods of the invention may be
20 useful for treating oral, esophageal, and gastrointestinal mucositis, as well as gastric and duodenal ulcers, or erosions of the stomach and esophagus.

In some embodiments, a variant SAP polypeptide of the invention may be used to treat an inflammatory disease or condition. In some embodiments, the inflammatory disease may be a viral, bacterial, fungal, or parasitic infection. The use of SAP as a
25 therapeutic treatment for viral infection has also been described in U.S. Patent 6,406,698 and in International Patent Application No. WO1997/026906, which are both incorporated by reference herein.

Pharmaceutical Preparations and Formulations

30 In certain embodiments, the methods described herein involve administration of at least one variant SAP polypeptide of the invention to a subject as a therapeutic agent. The therapeutic agents of the invention may be formulated in a conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers or excipients. For example, therapeutic

agents and their physiologically acceptable salts and solvates may be formulated for administration by, for example, injection (e.g. SubQ, IM, IP), inhalation or insufflation (either through the mouth or the nose) or oral, buccal, sublingual, transdermal, nasal, parenteral or rectal administration. In certain embodiments, therapeutic agents may be administered locally, at the site where the target cells are present, i.e., in a specific tissue, organ, or fluid (e.g., blood, cerebrospinal fluid, tumor mass, etc.).

The present invention further provides use of any variant SAP polypeptide of the invention in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of a disorder or a condition, as described herein, in a patient, for example, the use of a variant SAP polypeptide in the manufacture of medicament for the treatment of a disorder or condition described herein. In some aspects, any variant SAP polypeptide of the invention may be used to make a pharmaceutical preparation for the use in treating or preventing a disease or condition described herein.

Therapeutic agents can be formulated for a variety of modes of administration, including systemic and topical or localized administration. Techniques and formulations generally may be found in Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. For parenteral administration, injection is preferred, including intramuscular, intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous. For injection, the compounds can be formulated in liquid solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hank's solution or Ringer's solution. In addition, the compounds may be formulated in solid form and dissolved or suspended immediately prior to use. Lyophilized forms are also included. In some embodiments, the therapeutic agents can be administered to cells by a variety of methods known to those familiar in the art, including, but not restricted to, encapsulation in liposomes, by iontophoresis, or by incorporation into other vehicles, such as hydrogels, cyclodextrins, biodegradable nanocapsules, and bioadhesive microspheres.

For oral administration, the pharmaceutical compositions may take the form of, for example, tablets, lozenges, or capsules prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g., pregelatinized maize starch, polyvinylpyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen phosphate); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulphate). The tablets may be coated by methods well

known in the art. Liquid preparations for oral administration may take the form of, for example, solutions, syrups or suspensions, or they may be presented as a dry product for constitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations may be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as
5 suspending agents (e.g., sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or acacia); non-aqueous vehicles (e.g., almond oil, oily esters, ethyl alcohol or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid). The preparations may also contain buffer salts, flavoring, coloring and sweetening agents as appropriate. Preparations for oral
10 administration may be suitably formulated to give controlled release of the active compound.

For administration by inhalation (e.g., pulmonary delivery), therapeutic agents may be conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g.,
15 dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of e.g., gelatin, for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

20 In the methods of the invention, the pharmaceutical compounds can also be administered by intranasal or intrabronchial routes including insufflation, powders, and aerosol formulations (for examples of steroid inhalants, see Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacology. 35:1187-1193; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75:107-111). For example, aerosol formulations can be placed into pressurized acceptable propellants,
25 such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen, and the like. They also may be formulated as pharmaceuticals for non-pressured preparations such as in a nebulizer or an atomizer. Typically, such administration is in an aqueous pharmacologically acceptable buffer.

Pharmaceutical compositions suitable for respiratory delivery (e.g., intranasal,
30 inhalation, etc.) of variant SAP polypeptides may be prepared in either solid or liquid form.

SAP polypeptides of the invention may be formulated for parenteral administration by injection, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations

for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents.

- 5 Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

In addition, SAP polypeptides of the invention may also be formulated as a depot preparation. Such long-acting formulations may be administered by implantation (for example subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for
10 example, therapeutic agents may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt. Controlled release formula also includes patches.

In certain embodiments, the compounds described herein can be formulated for
15 delivery to the central nervous system (CNS) (reviewed in Begley, Pharmacology & Therapeutics 104: 29-45 (2004)). Conventional approaches for drug delivery to the CNS include: neurosurgical strategies (e.g., intracerebral injection or intracerebroventricular infusion); molecular manipulation of the agent (e.g., production of a chimeric fusion protein that comprises a transport peptide that has an affinity for an endothelial cell
20 surface molecule in combination with an agent that is itself incapable of crossing the blood-brain-barrier in an attempt to exploit one of the endogenous transport pathways of the blood-brain-barrier); pharmacological strategies designed to increase the lipid solubility of an agent (e.g., conjugation of water-soluble agents to lipid or cholesterol carriers); and the transitory disruption of the integrity of the BBB by hyperosmotic
25 disruption (resulting from the infusion of a mannitol solution into the carotid artery or the use of a biologically active agent such as an angiotensin peptide).

In certain embodiments, SAP polypeptides of the invention are incorporated into a topical formulation containing a topical carrier that is generally suited to topical drug administration and comprising any such material known in the art. The topical carrier
30 may be selected so as to provide the composition in the desired form, e.g., as an ointment, lotion, cream, microemulsion, gel, oil, solution, or the like, and may be comprised of a material of either naturally occurring or synthetic origin. It is preferable that the selected carrier not adversely affect the active agent or other components of the

topical formulation. Examples of suitable topical carriers for use herein include water, alcohols and other nontoxic organic solvents, glycerin, mineral oil, silicone, petroleum jelly, lanolin, fatty acids, vegetable oils, parabens, waxes, and the like.

Pharmaceutical compositions (including cosmetic preparations) may comprise
5 from about 0.00001 to 100% such as from 0.001 to 10% or from 0.1% to 5% by weight of one or more of the variant SAP polypeptides described herein. In certain topical formulations, the active agent is present in an amount in the range of approximately 0.25 wt. % to 75 wt. % of the formulation, preferably in the range of approximately 0.25 wt. % to 30 wt. % of the formulation, more preferably in the range of approximately 0.5 wt. % to 15 wt. % of the formulation, and most preferably in the range of approximately 1.0 wt. % to 10 wt. % of the formulation.
10

Conditions of the eye can be treated or prevented by, e.g., systemic, topical, intraocular injection of therapeutic agents, or by insertion of a sustained release device that releases therapeutic agents. SAP polypeptides of the invention may be delivered in a
15 pharmaceutically acceptable ophthalmic vehicle, such that the compound is maintained in contact with the ocular surface for a sufficient time period to allow the compound to penetrate the corneal and internal regions of the eye, as for example the anterior chamber, conjunctiva, posterior chamber, vitreous body, aqueous humor, vitreous humor, cornea, iris/ciliary, lens, choroid/retina and sclera. The pharmaceutically acceptable ophthalmic vehicle may, for example, be an ointment, vegetable oil or an encapsulating material. Alternatively, the compounds may be injected directly into the vitreous and aqueous humour. In a further alternative, the compounds may be administered systemically, such as by intravenous infusion or injection, for treatment of the eye.
20

Therapeutic agents described herein may be stored in oxygen-free environment according to methods in the art.
25

Exemplary compositions comprise an SAP polypeptide with one or more pharmaceutically acceptable carriers and, optionally, other therapeutic ingredients. The carrier(s) must be "pharmaceutically acceptable" in the sense of being compatible with
30 the other ingredients of the composition and not eliciting an unacceptable deleterious effect in the subject. Such carriers are described herein or are otherwise well known to those skilled in the art of pharmacology. In some embodiments, the pharmaceutical compositions are pyrogen-free and are suitable for administration to a human patient. In

some embodiments, the pharmaceutical compositions are irritant-free and are suitable for administration to a human patient. In some embodiments, the pharmaceutical compositions are allergen-free and are suitable for administration to a human patient. The compositions may be prepared by any of the methods well known in the art of pharmacy.

5 In some embodiments, an SAP polypeptide is administered in a time release formulation, for example in a composition which includes a slow release polymer. An SAP polypeptide can be prepared with carriers that will protect against rapid release. Examples include a controlled release vehicle, such as a polymer, microencapsulated delivery system, or bioadhesive gel. Alternatively, prolonged delivery of an SAP
10 polypeptide may be achieved by including in the composition agents that delay absorption, for example, aluminum monostearate hydrogels and gelatin.

Methods for delivering nucleic acid compounds are known in the art (see, e.g., Akhtar *et al.*, 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; and Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Sullivan *et al.*, International Application
15 No. WO 94/02595). These protocols can be utilized for the delivery of virtually any nucleic acid compound. Nucleic acid compounds can be administered to cells by a variety of methods known to those familiar to the art, including, but not restricted to, encapsulation in liposomes, by iontophoresis, or by incorporation into other vehicles, such as hydrogels, cyclodextrins, biodegradable nanocapsules, and bioadhesive
20 microspheres. Alternatively, the nucleic acid/vehicle combination is locally delivered by direct injection or by use of an infusion pump. Other routes of delivery include, but are not limited to, oral (tablet or pill form) and/or intrathecal delivery (Gold, 1997, Neuroscience, 76, 1153-1158). Other approaches include the use of various transport and carrier systems, for example though the use of conjugates and biodegradable polymers.
25 For a comprehensive review on drug delivery strategies, see Ho *et al.*, 1999, Curr. Opin. Mol. Ther., 1, 336-343 and Jain, Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities, Decision Resources, 1998 and Groothuis *et al.*, 1997, J. NeuroVirol., 3, 387-400. More detailed descriptions of nucleic acid delivery and administration are provided in Sullivan *et al.*, supra, Draper *et al.*, PCT WO93/23569, Beigelman *et al.*,
30 International Application No. WO99/05094, and Klimuk *et al.*, International Publication No. WO99/04819.

The following examples serve to more fully describe the manner of using the above-described invention, as well as to set forth the best modes contemplated for carrying out various aspects of the invention. It is understood that these examples in no way serve to limit the true scope of this invention, but rather are presented for illustrative purposes.

EXEMPLIFICATION

Example 1: Recombinant SAP is more potent than human serum-derived SAP.

Recombinant human SAP isolated from CHO-S cells (rhSAP) and human serum-derived SAP (hSAP) were assayed for bioactivity using an *in vitro* bioassay. In this assay, monocyte enriched Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were incubated with varying concentrations of either rhSAP or hSAP for 96 hours. Following this incubation, resulting culture supernatants were removed and assayed by ELISA to quantify the amount of Macrophage Derived Chemokine (MDC) that was produced. MDC is produced by fibrocytes and therefore an indicator of monocyte differentiation into fibrocytes. By comparing the inhibitory concentration, 50% (IC₅₀) of the sample to the hSAP reference standard, the relative potency of a SAP glycovariant can be determined. The result is expressed as an IC₅₀ ratio of the sample versus the hSAP reference standard.

All SAP samples and standards were initially diluted to a concentration of 1.0 mg/mL in Supplemented FibroLife Media. SAP standards were serially diluted to generate working standard concentrations of 60, 30, 20, 13.4, 8.8, 6.0, 3.0, 1.5, and 0.75 µg/mL (final standard concentration of 30, 15, 10, 6.7, 4.4, 3.0, 1.5, 0.75, and 0.375 µg/mL). See the following Table 1.

Working rhSAP Standard Concentration (µg/mL)	Volume of Standard	Volume of Supplemented FibroLife Media
60	60 (1mg/mL)	940
30	600 (60 µg/mL)	600
20	800 (30 µg/mL Std)	400
13.4	800 (20 µg/mL Std)	400
8.8	800 (13.4 µg/mL Std)	400
6.0	800 (8.8 µg/mL Std)	400
3.0	600 (6.0 µg/mL Std)	600
1.5	600 (3.0 µg/mL Std)	600
0.75	600 (1.5 µg/mL Std)	600

To prepare for the ELISA assay, the capture antibody (i.e., mouse anti-human MDC) was diluted to the working concentration in PBS without carrier protein. The diluted capture antibody was used to coat 96-well plates, and then each plate was sealed and incubated overnight at room temperature. Before using the coated plates, each well was aspirated and washed with wash buffer, repeating the process two times for a total of three washes. The plates were then blocked by adding 300 μ L of reagent diluent to each well and incubating at room temperature for one hour. After incubation the aspiration and well-washing procedure was repeated.

For the ELISA assay, 100 μ L samples of either the supernatants from the monocyte/fibrocyte cultures or the SAP standards were added to each well. The plate was then incubated at room temperature for 2 hours before aspirating and washing the wells. Then 100 μ L of a working dilution of Streptavidin-HRP was added to each well. The plate was incubated for 20 minutes at room temperature before adding 50 μ L of Stop Solution to each well. Immediately, the optical density of each well was measured using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction was available, the microplate reader was set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction was not available, then the readings at 540 nm or 570 nm were subtracted from the readings at 450 nm. This subtraction corrects for optical imperfections in the plate.

Both RHSAP and hSAP were assayed for bioactivity using this assay (Figure 1). On average, RHSAP is 3.4-fold more active than hSAP (average of 7 independent experiments).

Example 2: Modification of SAP glycan structures

Using *in vitro* glycoremodeling techniques, glycan moieties on a sample of recombinant human SAP (rhSAP) were modified to replace terminal α 2,3-linked sialic acid moieties with α 2,6-linked sialic acid moieties (Figure 2, A and B). Similarly, a sample of human serum-derived SAP (hSAP) was also modified to replace terminal α 2,6-linked sialic acid moieties with α 2,3-linked sialic acid moieties (Figure 2, C and D). In addition, as rhSAP isolated from CHO-S cells is only partially sialylated, a sample of rhSAP was treated to fully sialylate the attached glycan structures with α 2,3-linked sialic acid moieties (Figure 2, E and F).

Both rhSAP and hSAP (Calbiochem Cat#970549) were treated with a α 2,3,6,8,9-sialidase (Sigma Cat #N8271) to fully desialylate the polypeptides. After sialidase treatment for 17 hours, desialylated (i.e. asialo) rhSAP and hSAP were purified using phosphoethanolamine (PE) affinity and size exclusion (Sephadex 200 prep grade) chromatography. Purified asialo SAP polypeptides were then enzymatically treated using either α 2,3- or α 2,6-sialyltransferases (Calbiochem Cat #566223) in the presence of CMP-sialic acid (Calbiochem Cat #233264) for 17 hours at 37°C. The following tables provide details on each reaction mixture.

Asialo rhSAP Reactions (Rxns)			
Treatment with α 2,3 sialyltransferase (ST3Gal3)			
	parameter	units	value
rhSAP, ST3Gal3 reagent stocks	[asialo rhSAP] stk	mg/mL	10.8
	asialo rhSAP MW	g/mol	116293
	[asialo rhSAP] stk	μ M	93
	max [Galactose]	μ M	929
	[ST3Gal3] stk	mg/mL	0.9
	ST3Gal3 MW	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	μ M	10.7
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	CMP-SA MW	g/mol	658.4
	[CMP-SA] stk	mM	38
rxn volumes	μ L asialo rhSAP in rxn	μ L	260
	μ L ST3Gal3 in rxn	μ L	50
	μ L CMP-SA in rxn	μ L	75
	buffer (10mM HEPES/150 mM NaCl, pH 8)	μ L	615
	tot rxn vol	μ L	1000
rxn concentrations	[asialo rhSAP] rxn	μ M	24.1
	max [Galactose]	μ M	241
	[SAP] rxn	mg/mL	2.8
	[ST3Gal3] rxn	μ M	0.5357
	[ST3Gal3] rxn	mg/mL	0.045
	[CMP-SA] rxn	mM	2.85
	asialo rhSAP:ST3	mass ratio	62
	asialo rhSAP:ST3	molar ratio	45
	CMP-SA:ST3	molar ratio	5316
	CMP-SA:asialo rhSAP	molar ratio	118

	CMP-SA:Galactose	molar ratio	11.8
Treatment with α2,6 sialyltransferase (ST6 Rxn)			
	parameter	units	value
rhSAP, ST6 reagent stocks	[asialo rhSAP] stk	mg/mL	10.8
	asialo rhSAP MW	g/mol	116293
	[asialo rhSAP] stk	μM	93
	max [Galactose]	μM	929
	[ST6] stk	mg/mL	0.205
	ST6 MW	g/mol	42000
	[ST6] stk	μM	4.9
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	CMP-SA MW	g/mol	658.4
	[CMP-SA] stk	mM	38
rxn volumes	μL asialo rhSAP 1 in rxn	μL	260
	μL ST6 in rxn	μL	30
	μL CMP-SA in rxn	μL	75
	buffer (10mM HEPES/150 mM NaCl, pH 8)	μL	635
	tot rxn vol	μL	1000
rxn concentrations	[asialo rhSAP] rxn	μM	24.1
	max [Galactose]	μM	241
	[asialo rhSAP] rxn	mg/mL	2.8
	[ST6] rxn	μM	0.146
	[ST6] rxn	mg/mL	0.006
	[CMP-SA] rxn	mM	2.85
	asialo rhSAP:ST6	mass ratio	457
	asialo rhSAP:ST6	molar ratio	165
	CMP-SA:ST6	molar ratio	19448
	CMP-SA:asialo rhSAP	molar ratio	118
	CMP-SA:Galactose	molar ratio	11.8

Asialo hSAP Rxns			
Treatment with α2,3 sialyltransferase (ST3Gal3)			
	parameter	units	value
hSAP, ST3Gal3 reagent stocks	[asialo hSAP] stk	mg/mL	5.6
	SAP MW	g/mol	116293
	[asialo hSAP] stk	μM	48
	max [Galactose]	μM	482
	[ST3Gal3] stk	mg/mL	0.9
	ST3Gal3 MW	g/mol	84000

	[ST3Gal3] stk	μM	10.7
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	CMP-SA MW	g/mol	658.4
	[CMP-SA] stk	mM	38
rxn volumes	μL asialo hSAP in rxn	μL	500
	μL ST3Gal3 in rxn	μL	50
	μL CMP-SA in rxn	μL	75
	buffer (10mM HEPES/150 mM NaCl, pH 8)	μL	375
	tot rxn vol	μL	1000
rxn concentrations	[asialo hSAP] rxn	μM	24.1
	max [Galactose]	μM	241
	[asialo hSAP] rxn	mg/mL	2.8
	[ST3Gal3] rxn	μM	0.54
	[ST3Gal3] rxn	mg/mL	0.045
	[CMP-SA] rxn	mM	2.85
	asialo hSAP:ST3	mass ratio	62
	asialo hSAP:ST3	molar ratio	45
	CMP-SA:ST3	molar ratio	5316
	CMP-SA:asialo hSAP	molar ratio	118
	CMP-SA:Galactose	molar ratio	11.8
	Treatment with α2,6 sialyltransferase (ST6 Rxn)		
	parameter	units	value
hSAP, ST6 reagent stocks	[asialo hSAP] stk	mg/mL	5.6
	asialo hSAP MW	g/mol	116293
	[asialo hSAP] stk	μM	48
	max [Galactose]	μM	482
	[ST6] stk	mg/mL	0.205
	ST6 MW	g/mol	42000
	[ST6] stk	μM	4.9
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	CMP-SA MW	g/mol	658.4
	[CMP-SA] stk	mM	38
rxn volumes	μL asialo hSAP in rxn	μL	500
	μL ST6 in rxn	μL	30
	μL CMP-SA in rxn	μL	75
	buffer (10mM HEPES/150 mM NaCl, pH 8)	μL	395
	tot rxn vol	μL	1000
rxn	[asialo hSAP] rxn	μM	24.1

concentrations	max [Galactose]	μM	241
	[asialo hSAP] rxn	mg/mL	2.8
	[ST6] rxn	μM	0.146
	[ST6] rxn	mg/mL	0.006
	[CMP-SA] rxn	mM	2.85
	asialo hSAP:ST6	mass ratio	455
	asialo hSAP:ST6	molar ratio	164
	CMP-SA:ST6	molar ratio	19448
	CMP-SA:asialo hSAP	molar ratio	118
	CMP-SA:Galactose	molar ratio	11.8

In a separate reaction, complete sialylation of rhSAP using the α2,3-sialyltransferase without first desialylating the molecule was preformed at 37 °C for 17 hours according to the following table.

Treatment with α2,3 sialyltransferase (ST3Gal3)			
	parameter	units	value
rhSAP ST3Gal3 reagent stocks	[rhSAP] stk	mg/mL	19.0
	rhSAP MW	g/mol	116293
	[rhSAP] stk	μM	163
	max [Galactose]	μM	1634
	[ST3Gal3] stk	mg/mL	0.9
	ST3Gal3 MW	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	μM	10.7
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	CMP-SA MW	g/mol	658.4
	[CMP-SA] stk	mM	38
rxn volumes	μL rhSAP in rxn	μL	500
	μL ST3Gal3 in rxn	μL	50
	μL CMP-SA in rxn	μL	100
	buffer (10mM HEPES/150 mM NaCl, pH 8)	μL	350
	tot rxn vol	μL	1000
rxn concentrations	[rhSAP] rxn	μM	81.7
	max [Galactose]	μM	817
	[rhSAP] rxn	mg/mL	9.5
	[ST3Gal3] rxn	μM	0.54
	[ST3Gal3] rxn	mg/mL	0.045
	[CMP-SA] rxn	mM	3.80
	BTA-02-17:ST3	mass ratio	211
	BTA-02-17:ST3	molar ratio	152

	CMP-SA:ST3	molar ratio	7088
	CMP-SA:BTB-02-17	molar ratio	46
	CMP-SA:Galactose	molar ratio	4.6

After sialylation treatment, both sialylated rhSAP and hSAP variants were purified using PE affinity chromatography followed by dialysis into 10 mM NaPi/5% sorbitol pH 7.5 (P5S buffer). Confirmation of the desired sialic acid linkages (i.e, α 2,3-linked hSAP and α 2,6-linked RHSAP) was preformed using both Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Figure 2; A, C, and E) and Anion-Exchange High Performance Liquid Chromatography (Figure 2; B, D, and F) following treatment of the glycovariant SAP polypeptides with α 2,3 sialidase (Calbiochem Cat#480706) at 37°C for 24 hours.

10

Example 3: *In vitro* bioassays to determine SAP glycovariant potency for inhibiting monocyte differentiation into fibrocytes.

Glycoremodeled rhSAP and hSAP were assayed for bioactivity using the same *in vitro* bioassay described in Example 1. In brief, monocyte enriched peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were incubated with varying concentrations of an SAP polypeptide for 96 hours. Following this incubation, resulting culture supernatants were removed and assayed by ELISA to quantify the about of Macrophage Derived Chemokine (MDC) that was produced. The results were expressed as an IC₅₀ ratio of the sample versus the hSAP reference standard and plotted as relative activity (relative activity of hSAP = 1). All α 2,3-sialic acid linkage containing test materials are $\geq$ 2.4-fold more active than hSAP (Figure 3). Equal mixtures of α 2,3-and α 2,6-linked sialic acid derivatives of SAP show intermediate activity levels between 100% α 2,6-linked and 100% α 2,3-linked SAP as expected (two rightmost bars in Figure 3).

An alternative method of quantifying fibrocyte differentiation involves directly enumerating the number of fibrocytes that are generated after monocytes are incubated with a fibrocyte suppressant (e.g., SAP or variant thereof) or activating agent (e.g., M-CSF). In one experiment, monocytes were purified from whole blood-derived PBMC using negative magnetic bead selection standard in the art (e.g. CAT# 113-41D, Invitrogen, Carlsbad, CA) and cultured in a 96-Well tissue culture plate containing

25

FibroLife Media supplemented with 25 or 50 ng/ml of M-CSF in triplicate. The plate was incubated for 96 hours at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. The cells were then fixed with paraformaldehyde and stained with Hema 3 stain (Cat # 122-911, Hema 3 Stain, Fisher Scientific, Hampton, NH). The number of fibrocytes per well were determined by

- 5 summing the count of five different fields per well using an inverted microscope. Fibrocytes were defined morphologically as adherent cells with an elongated spindle-shape and the presence of an oval nucleus. The data indicated that either 25 or 50 ng/ml of M-CSF was sufficient to increase the number of fibrocytes differentiating from monocytes by ~50% in this donor (Figure 4). Subsequent experiments used FibroLife
- 10 Media supplemented with 25 ng/ml of M-CSF as needed and defined below.

FibroLife Media: (Cat # LM-0001, Lifeline Cell Technology, Walkersville, MD) supplemented with 10 mM HEPES (Cat # H0887, Sigma-Aldrich), 1 x non-essential amino acids (Cat # M7145, Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate (Cat # S8636, Sigma-Aldrich), 2 mM glutamine (Cat # 25030-149, Invitrogen),

15 100 U/ml penicillin and 100 ug/ml streptomycin (Cat # P0781, Sigma-Aldrich), and ITS-3 (Cat # I2771, 500 ug/ml bovine serum albumin, 10 ug/ml insulin, 5ug/ml transferrin, 5 ng/ml sodium selenite, 5 ug/ml linoleic acid, and 5 ug/ml oleic acid; Sigma-Aldrich).

In an additional experiment, PBMC or monocytes were purified from whole blood

20 and cultured in FibroLife Media supplemented with various amounts of SAP in triplicate (as described above). The plate was incubated for 96 hours at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. The cells were then fixed with paraformaldehyde and stained with Hema 3 stain (Cat # 122-911, Hema 3 Stain, Fisher Scientific, Hampton, NH). The number of fibrocytes per well were determined by summing the count of five different fields per

25 well using an inverted microscope. The minimum concentration of SAP necessary to provide maximum inhibition of fibrocyte differentiation in this system was determined to be 2ug/ml (Figure 5). The number of fibrocytes decreases with increasing SAP concentration in all donors.

30 INCORPORATION BY REFERENCE

All publications and patents mentioned herein are hereby incorporated by reference in their entirety as if each individual publication or patent was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

While specific embodiments of the subject matter have been discussed, the above specification is illustrative and not restrictive. Many variations will be apparent to those skilled in the art upon review of this specification and the below-listed claims. The full scope of the invention should be determined by reference to the claims, along with their
5 full scope of equivalents, and the specification, along with such variations.

We claim:

1. A glycosylated human Serum Amyloid P (SAP) polypeptide comprising an N-linked oligosaccharide chain, wherein at least one branch of the oligosaccharide chain terminates with a α 2,3-linked sialic acid moiety.
2. A glycosylated human SAP polypeptide comprising an N-linked oligosaccharide chain, wherein the oligosaccharide chain has at least 50% fewer α 2,6-linked sialic acid moieties than wild-type SAP isolated from human serum.
3. The glycosylated human SAP polypeptide of claim 1, wherein all branches of the oligosaccharide chain terminate with α 2,3-linked sialic acid moieties.
4. The glycosylated human SAP polypeptide of claim 2, wherein the oligosaccharide chain is substantially free of α 2,6-linked sialic acid moieties.
5. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-4, wherein the oligosaccharide chain has a bi-antennary structure.
6. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-4, wherein the oligosaccharide chain has a tri-antennary structure.
7. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-4, wherein the oligosaccharide chain has a tetra-antennary structure.
8. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-4, wherein the oligosaccharide chain has a penta-antennary structure.
9. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-8, wherein the N-linked oligosaccharide chain comprises a pentasaccharide core of Man[(α 1,6-)(Man(α 1,3))-Man(β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N)-Asn.
10. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-9, wherein the oligosaccharide chain comprises at least one branch having the structure NeuNAc2 α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6.
11. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-10, wherein at least one branch of the oligosaccharide chain is substantially free of galactose and N-acetylglucosamine.
12. The glycosylated human SAP polypeptide of claim 11, wherein all the branches of the oligosaccharide chain are substantially free of galactose and N-acetylglucosamine.
13. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-12, wherein at least one branch of the oligosaccharide chain comprises one or more mannose residues.
14. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-13, wherein the oligosaccharide chain comprises at least one fucose residue.

15. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-14, wherein the oligosaccharide chain comprises at least one modified glycosyl residue.
- 5 16. The glycosylated human SAP polypeptide of claim 15, wherein at least one modified glycosyl residue is conjugated to one or more modifying groups selected from water-soluble and -insoluble polymers, therapeutic moieties, diagnostic agents, and biomolecules.
- 10 17. The glycosylated human SAP polypeptide any one of claims 1-16, wherein the SAP polypeptide is a recombinant polypeptide.
18. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-17, wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence at least 85% identical to SEQ ID NO: 1.
- 15 19. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-17, wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence at least 95% identical to SEQ ID NO: 1.
- 20 20. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-19, wherein the polypeptide is a fusion protein comprising an SAP domain and one or more heterologous domains.
21. The glycosylated human SAP polypeptide of claim 20, wherein the one or more heterologous domains enhance one or more of *in vivo* stability, *in vivo* half-life, uptake/administration, tissue localization or distribution, formation of protein complexes, and/or purification.
- 25 22. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-21, wherein the polypeptide comprises one or more modified amino acid residues.
- 30 23. The glycosylated human SAP polypeptide of claim 22, wherein the one or more modified amino acid residues comprise a PEGylated amino acid, a prenylated amino acid, an acetylated amino acid, a biotinylated amino acid, and/or an amino acid conjugated to an organic derivatizing agent.
- 35 24. The glycosylated human SAP polypeptide of claim 23, wherein the one or more modified amino acid residues enhance one or more of *in vivo* stability, *in vivo* half-life, uptake/administration, tissue localization or distribution, formation of protein complexes, and/or purification.
- 40 25. The glycosylated human SAP polypeptide of any one of claims 1-24, wherein the SAP polypeptide has an IC₅₀ for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than one-half that of a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human serum.
- 45 26. A pharmaceutical preparation suitable for use in a mammal comprising the human SAP polypeptide of any one of claims 1-25 and a pharmaceutically acceptable carrier.

27. The pharmaceutical preparation of claim 26 further comprising an additional active agent.
28. The pharmaceutical preparation of claim 26, wherein the pharmaceutical preparation is prepared as a sustained release formulation.
29. The pharmaceutical preparation of claim 26, wherein the pharmaceutical preparation is suitable for administration to a patient topically, by injection, by intravenous injection, by inhalation, continuous depot or pump.
30. A method of treating or preventing a fibrotic or fibroproliferative disorder or condition in a patient, the method comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the SAP polypeptide of any one of claims 1-25.
31. A method of treating or preventing a hypersensitivity disorder or condition in a patient, the method comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the SAP polypeptide of any one of claims 1-25.
32. A method of treating or preventing mucositis in a patient, the method comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the SAP polypeptide of any one of claims 1-25.
33. A method of treating or preventing an autoimmune disorder or condition in a patient, the method comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the SAP polypeptide of any one of claims 1-25.
34. The method of any one of claims 30-33, wherein the SAP polypeptide is administered topically, by injection, by intravenous injection, by inhalation, by continuous depot or pump, or a combination thereof.
35. The method of any one of claims 30-33 further comprising administering to the patient an additional active agent.
36. A method of making a glycosylated human SAP polypeptide, comprising:
i) expressing the SAP polypeptide of any one of claims 1-24 in a cell; and
ii) isolating the SAP polypeptide from the cell.
37. A method of making a human SAP polypeptide, comprising:
i) expressing a human SAP polypeptide in a CHO cell; and
ii) isolating the human SAP polypeptide from the cell.
38. The method of claim 37, wherein the SAP polypeptide comprises an N-linked oligosaccharide chain, and wherein at least one branch of the oligosaccharide chain terminates with a α 2,3-linked sialic acid moiety.
39. The method claim 37, wherein the SAP polypeptide comprises an N-linked oligosaccharide chain, and wherein the oligosaccharide chain has at least 50% fewer α 2,6-linked sialic acid moieties than wild-type SAP isolated from human serum.

40. The method of claim 37, wherein the SAP polypeptide comprises an N-linked oligosaccharide chain, and wherein all branches of the oligosaccharide chain terminate with α 2,3-linked sialic acid moieties.
- 5 41. The method of claim 37, wherein the SAP polypeptide comprises an N-linked oligosaccharide chain, and wherein the oligosaccharide chain is substantially free of α 2,6-linked sialic acid moieties.
- 10 42. The method of any one of claims 38-41, wherein the oligosaccharide chain has a bi-antennary structure.
43. The method of any one of claims 38-41, wherein the oligosaccharide chain has a tri-antennary structure.
- 15 44. The method of any one of claims 38-41, wherein the oligosaccharide chain has a tetra-antennary structure.
45. The method of any one of claims 38-44, wherein the isolated human SAP polypeptide has an IC_{50} for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than one-half that of a corresponding sample wild-type SAP isolated from human serum.
- 20 46. The method of any one of claims 38-45, wherein the N-linked oligosaccharide chain comprises a pentasaccharide core of Man[(α 1,6-)-(Man(α 1,3)]-Man(β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N)-Asn.
- 25 47. The method of any one of claims 38-46, wherein the oligosaccharide chain comprises at least one branch having the structure NeuNAc2 α 4Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6.
- 30 48. The method of any one of claims 38-47, wherein at least one branch of the oligosaccharide chain is substantially free of galactose and N-acetylglucosamine.
49. The method of claim 48, wherein all the branches of the oligosaccharide chain are substantially free of galactose and N-acetylglucosamine.
- 35 50. The method of any one of claims 38-49, wherein at least one branch of the oligosaccharide chain comprises one or more mannose residues.
51. The method of any one of claims 38-50, wherein the oligosaccharide chain comprises at least one fucose residue.
- 40 52. The method of any one of claims 38-51, wherein the oligosaccharide chain comprises at least one modified glycosyl residue.
- 45 53. The method of claim 52, wherein at least one modified glycosyl residue is conjugated to one or more modifying groups selected from water-soluble and -insoluble polymers, therapeutic moieties, diagnostic agents, and biomolecules.
54. The method of claim 36, wherein the cell is a CHO cell.

55. The method of claim 35 or 36, further comprising enzymatically or chemically altering the isolated SAP polypeptide to produce an SAP polypeptide having a modified oligosaccharide chain.
56. The method of claim 55, wherein the process of enzymatically or chemically altering the isolated SAP polypeptide comprises treating the isolated SAP polypeptide with one or more enzymatic proteins selected from glycosyltransferases, glycosidases, and phosphatases.
57. The method of claim 55, wherein the process of enzymatically or chemically altering the isolated SAP polypeptide is effected in the presence of one or more sugar precursors.
58. The method of claim 57, wherein the one or more sugar precursors are selected from UDP-N-acetylglucosamine, UDP-N-acetylgalactosamine, CMP-N-acetylneuraminic acid, UDP-galactose, and GDP-fucose.
59. The method of claim 55, wherein the process of enzymatically or chemically altering the isolated SAP polypeptide removes one or more terminal α 2,6-linked sialic acid moieties from the oligosaccharide chain.
60. The method of claim 55, wherein the process of enzymatically or chemically altering the isolated SAP polypeptide replaces one or more terminal α 2,6-linked sialic acid moieties on the oligosaccharide chain with one or more α 2,3-linked sialic acid moieties.
61. The method of any one of claims 36-60, wherein the isolated SAP polypeptide has an IC₅₀ for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than one-half that of a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human serum.
62. A method of making an SAP polypeptide, comprising:
 - i) providing a glycosylated SAP polypeptide, wherein the glycosylated SAP polypeptide comprises an N-linked oligosaccharide chain; and
 - ii) enzymatically or chemically altering the N-linked oligosaccharide chain of the SAP polypeptide to produce a modified glycosylated SAP polypeptide.
63. The method of claim 62, wherein the process of enzymatically or chemically altering the N-linked oligosaccharide chain of the SAP polypeptide removes one or more terminal α 2,6-linked sialic acid moieties from the oligosaccharide chain.
64. The method of claim 62, wherein the process of enzymatically or chemically altering the N-linked oligosaccharide chain of the SAP polypeptide replaces one or more terminal α 2,6-linked sialic acid moieties on the oligosaccharide chain with one or more α 2,3-linked sialic acid moieties.
65. The method of any one of claims 62-64, wherein the process of enzymatically or chemically altering the N-linked oligosaccharide chain of the SAP polypeptide comprises

treating the SAP polypeptide with one or more enzymatic proteins selected from glycosyltransferases, glycosidases, and phosphatases.

5 66. The method of any one of claims 62-65, wherein the process of enzymatically of chemically altering the N-linked oligosaccharide chain of the SAP polypeptide is effected in the presence of one or more sugar precursors.

10 67. The method of claim 66, wherein the one or more sugar precursors are selected from UDP-N-acetylglucosamine, UDP-N-acetylgalactosamine, CMP-N-acetylneuraminic acid, UPD-galactose, or GDP-fucose.

15 68. The method of any one of claims 62-67, wherein the N-linked oligosaccharide chain has at least 50% fewer α 2,6-linked sialic acid moieties than a wild-type human SAP protein isolated from human serum.

69. The method of any one of claims 62-67, wherein the N-linked oligosaccharide chain is substantially free of α 2,6-linked sialic acid moieties.

20 70. The method of any one of claims 62-69, wherein the N-linked oligosaccharide has a bi-antennary structure.

71. The method of any one of claims 62-69, wherein the N-linked oligosaccharide has a tri-antennary structure.

25 72. The method of any one of claims 62-69, wherein the N-linked oligosaccharide has a tetra-antennary structure.

73. The method of any one of claims 62-69, wherein the N-linked oligosaccharide has a penta-antennary structure.

30 74. The method of any one of claims 62-73, wherein at least one branch of the oligosaccharide chain terminates in an α 2,3-linked sialic acid moiety.

35 75. The method of claim 74, wherein all branches of the oligosaccharide chain terminate in α 2,3-linked sialic acid moieties.

76. The method of any one of claims 62-75, wherein the N-linked oligosaccharide chain has at least one modified glycosyl residue.

40 77. The method of claim 76, wherein at least one modified glycosyl residue is conjugated to one or more modifying groups selected from water-soluble and -insoluble polymers, therapeutic moieties, diagnostic agents, and biomolecules.

45 78. The human SAP polypeptide of any one of claims 62-77, wherein the modified glycosylated SAP polypeptide has an IC_{50} for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than one-half that of a corresponding sample wild-type SAP isolated from human serum.

79. A method of making an SAP polypeptide, comprising:

i) providing an SAP polypeptide, and
 ii) enzymatically or chemically altering the SAP polypeptide to produce a glycosylated SAP polypeptide comprising an N-linked oligosaccharide.

5 80. The method of claim 79, wherein the process of enzymatically or chemically altering the SAP polypeptide comprises treating the SAP polypeptide with one or more enzymatic proteins selected from glycosyltransferases, glycosidases, and phosphatases.

10 81. The method of claim 79 or 80, wherein the process of enzymatically or chemically altering the SAP polypeptide is effected in the presence of one or more sugar precursors.

82. The method of claim 81, wherein the one or more sugar precursors are selected from UDP-N-acetylglucosamine, UDP-N-acetylgalactosamine, CMP-N-acetylneuraminic acid, UDP-galactose, or GDP-fucose.

15 83. The method of any one of claims 79-82, wherein the N-linked oligosaccharide chain has at least 50% fewer α 2,6-linked sialic acid moieties than a wild-type human SAP protein isolated from human serum.

20 84. The method of any one of claims 79-82, wherein the N-linked oligosaccharide chain is substantially free of α 2,6-linked sialic acid moieties.

85. The method of any one of claims 79-84, wherein the N-linked oligosaccharide has a bi-antennary structure.

25 86. The method of any one of claims 79-84, wherein the N-linked oligosaccharide has a tri-antennary structure.

30 87. The method of any one of claims 79-84, wherein the N-linked oligosaccharide has a tetra-antennary structure.

88. The method of any one of claims 79-84, wherein the N-linked oligosaccharide has a penta-antennary structure.

35 89. The method of any one of claims 79-88, wherein at least one branch of the oligosaccharide chain terminates in an α 2,3-linked sialic acid moiety.

90. The method of claim 89, wherein all branches of the oligosaccharide chain terminate in α 2,3-linked sialic acid moieties.

40 91. The method of any one of claims 79-90, wherein the N-linked oligosaccharide chain has at least one modified glycosyl residue.

45 92. The method of claim 91, wherein at least one modified glycosyl residue is conjugated to one or more modifying groups selected from water-soluble and -insoluble polymers, therapeutic moieties, diagnostic agents, and biomolecules.

93. The human SAP polypeptide of any one of claims 79-92, wherein the glycosylated SAP polypeptide has an IC_{50} for inhibiting the differentiation of monocytes into

fibrocytes *in vitro* that is less than one-half that of a corresponding sample wild-type SAP isolated from human serum.

- 5 94. A human SAP polypeptide prepared by a process comprising:
i) expressing a SAP polypeptide in a CHO cell; and
ii) isolating the SAP polypeptide from the cell.
- 10 95. The human SAP polypeptide of claim 94, wherein the SAP polypeptide has an IC₅₀ for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than one-half that of a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human serum.
96. The human SAP polypeptide of claim 94 or 95, wherein the process further comprises altering the glycosylation structure of the isolated SAP polypeptide.
- 15 97. A CHO cell that comprises a human SAP polypeptide comprising an N-linked oligosaccharide chain, wherein at least one branch of the oligosaccharide chain terminates with a α 2,3-linked sialic acid moiety.
- 20 98. A CHO cell comprising a nucleic acid encoding an exogenous SAP polypeptide.
99. A human SAP polypeptide having an IC₅₀ for inhibiting the differentiation of monocytes into fibrocytes *in vitro* that is less than one-half that of a corresponding sample of wild-type SAP isolated from human serum.
- 25 100. A method of treating or preventing an inflammatory disorder or condition in a patient, the method comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of the SAP polypeptide of any one of claims 1-15.

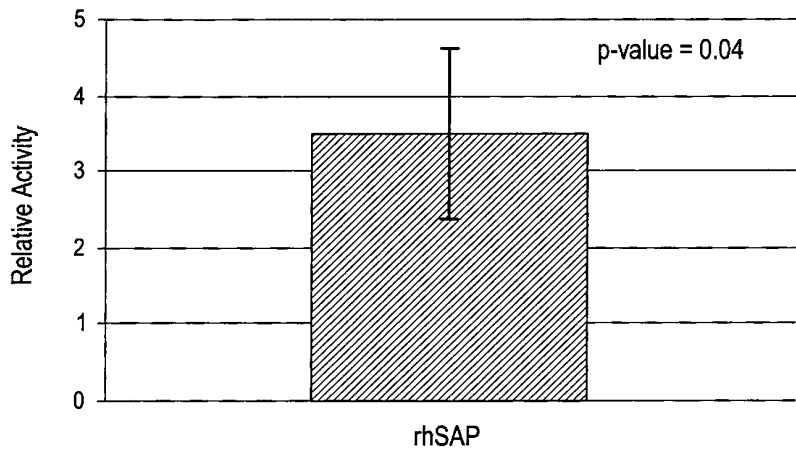


FIGURE 1

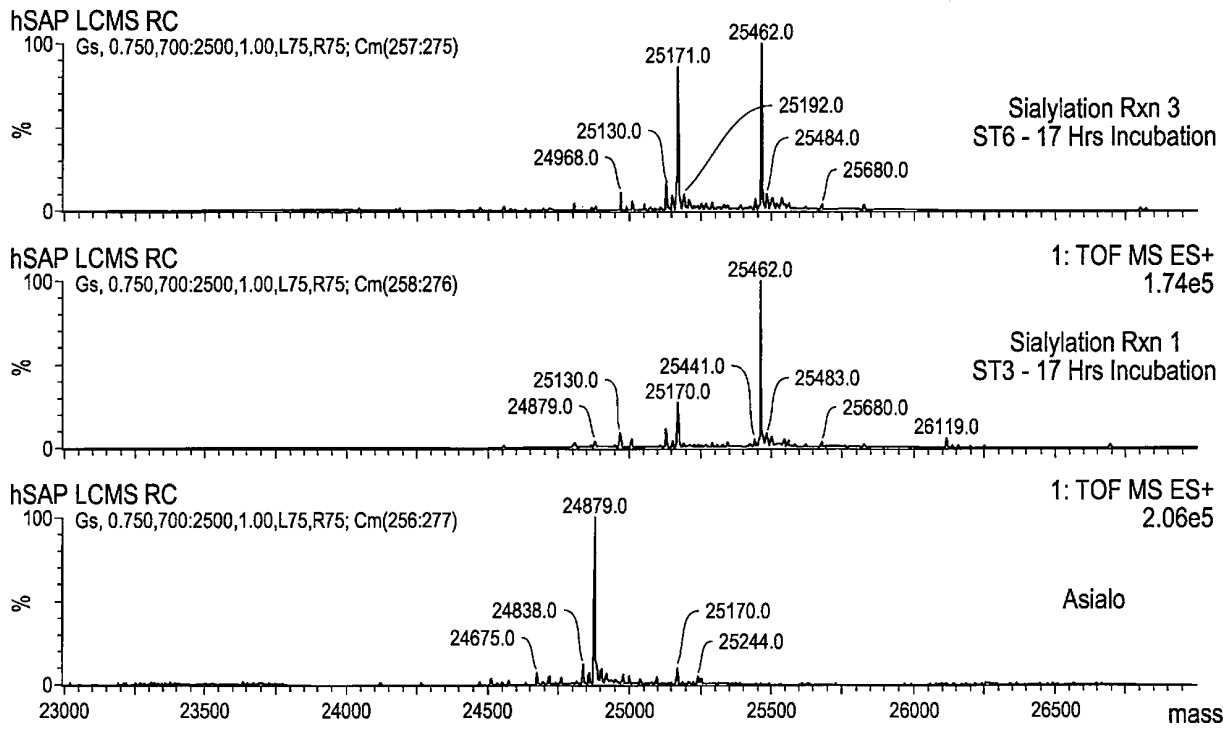


FIGURE 2A

7

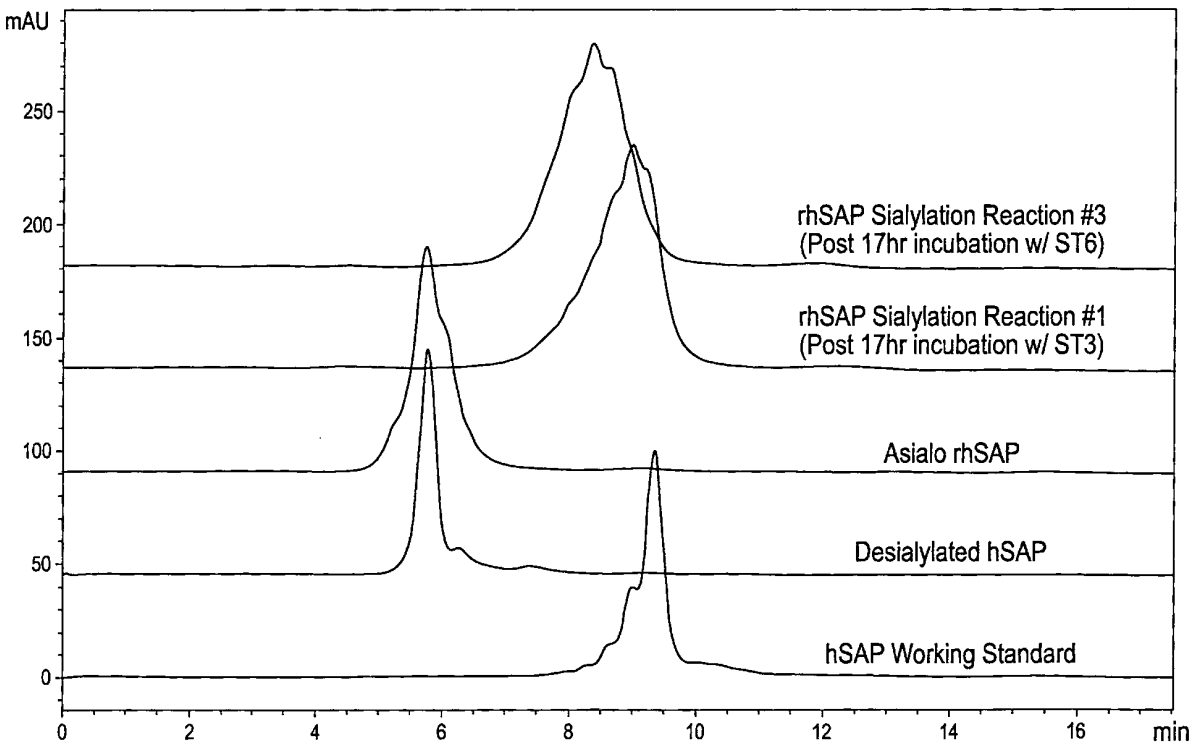


FIGURE 2B

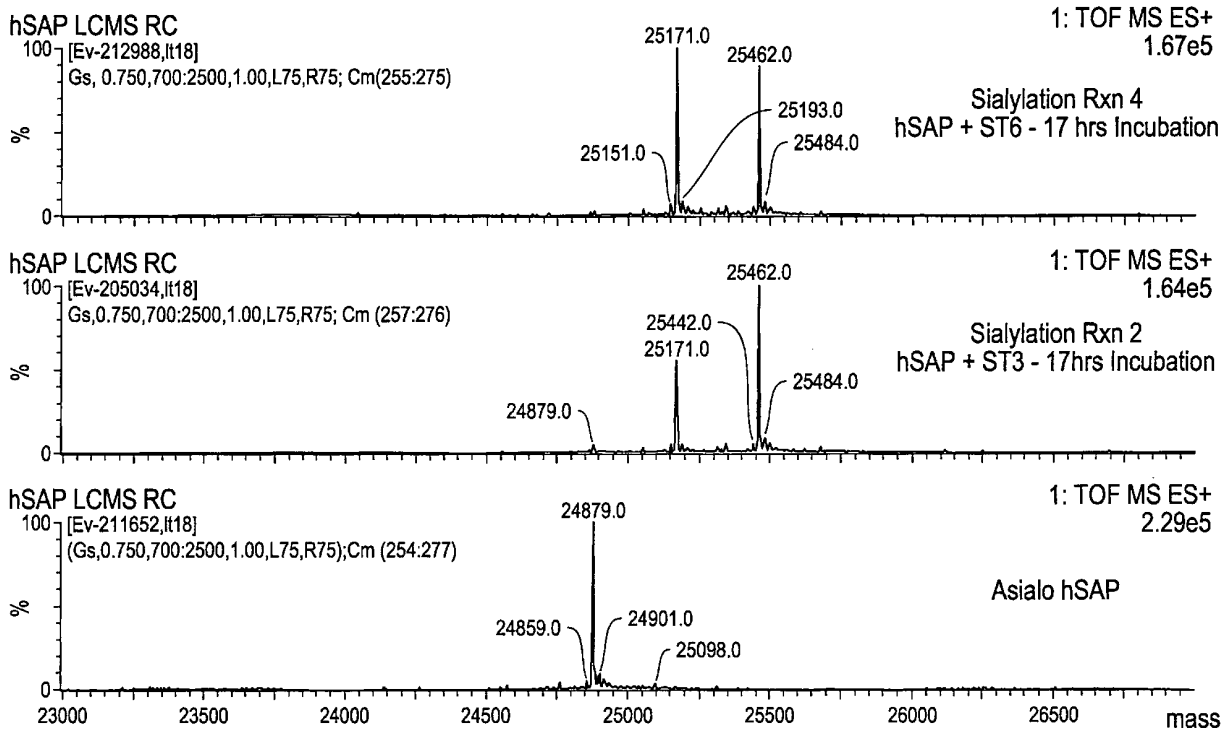


FIGURE 2C

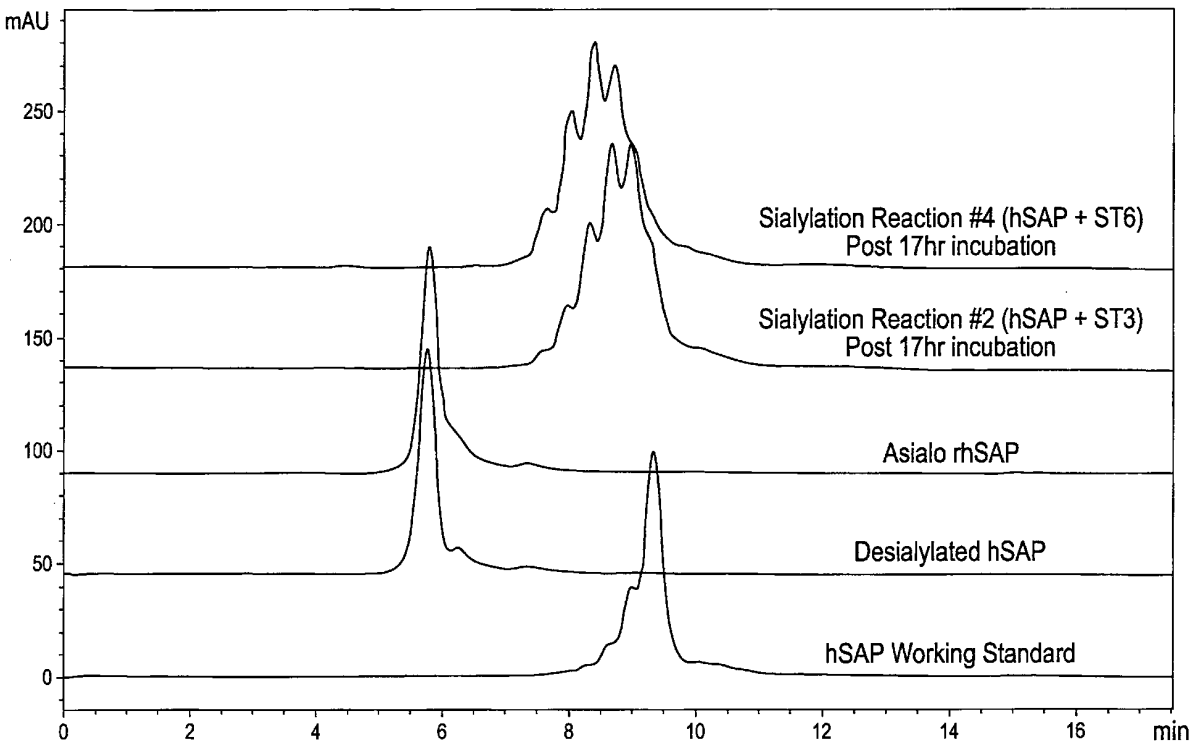


FIGURE 2D

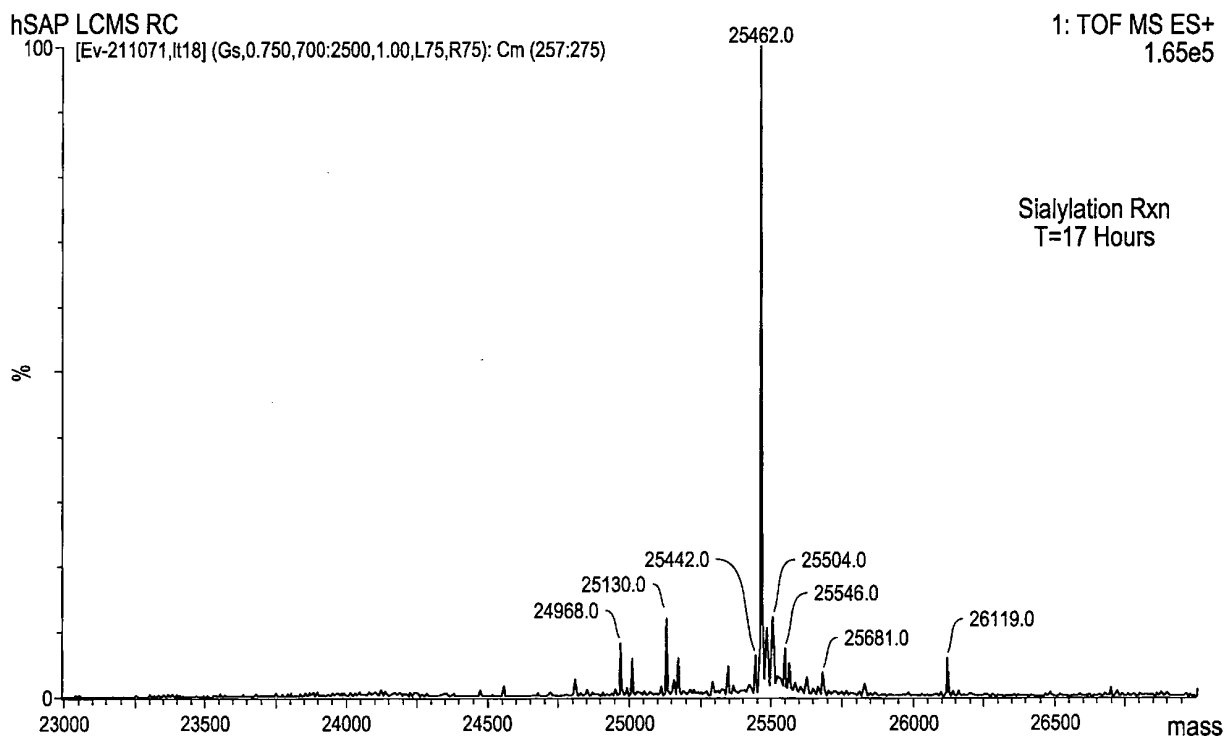


FIGURE 2E

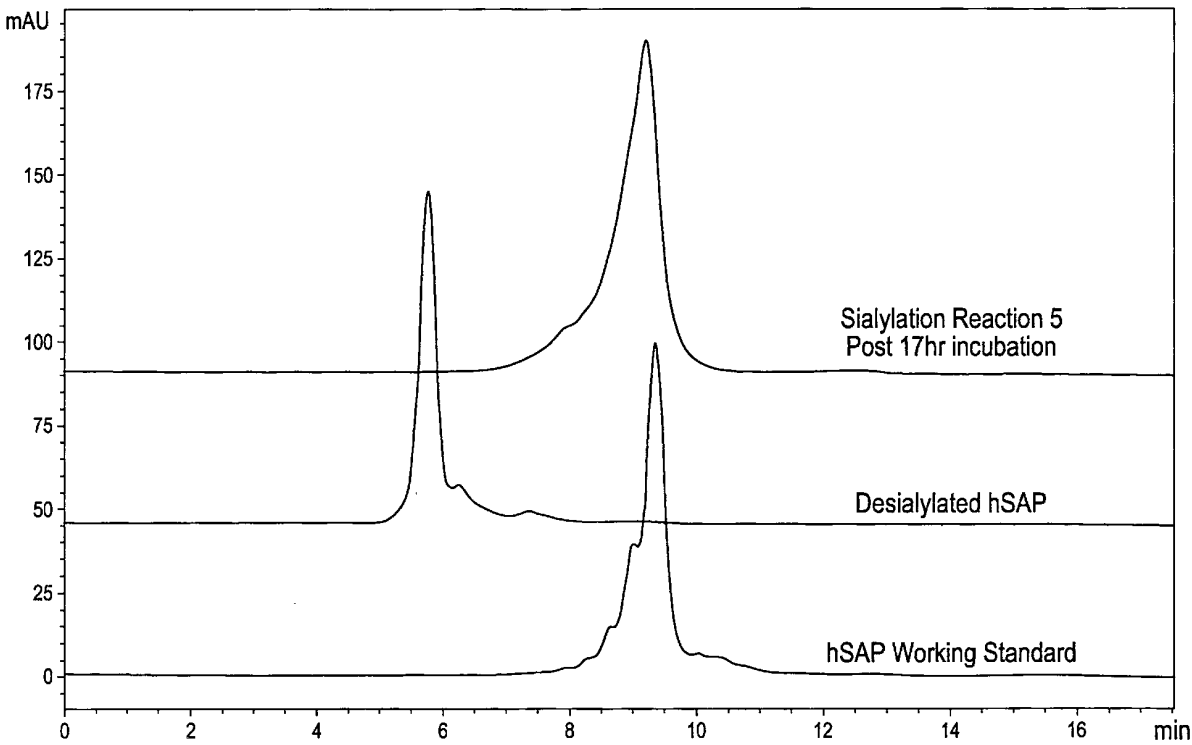


FIGURE 2F

7/10

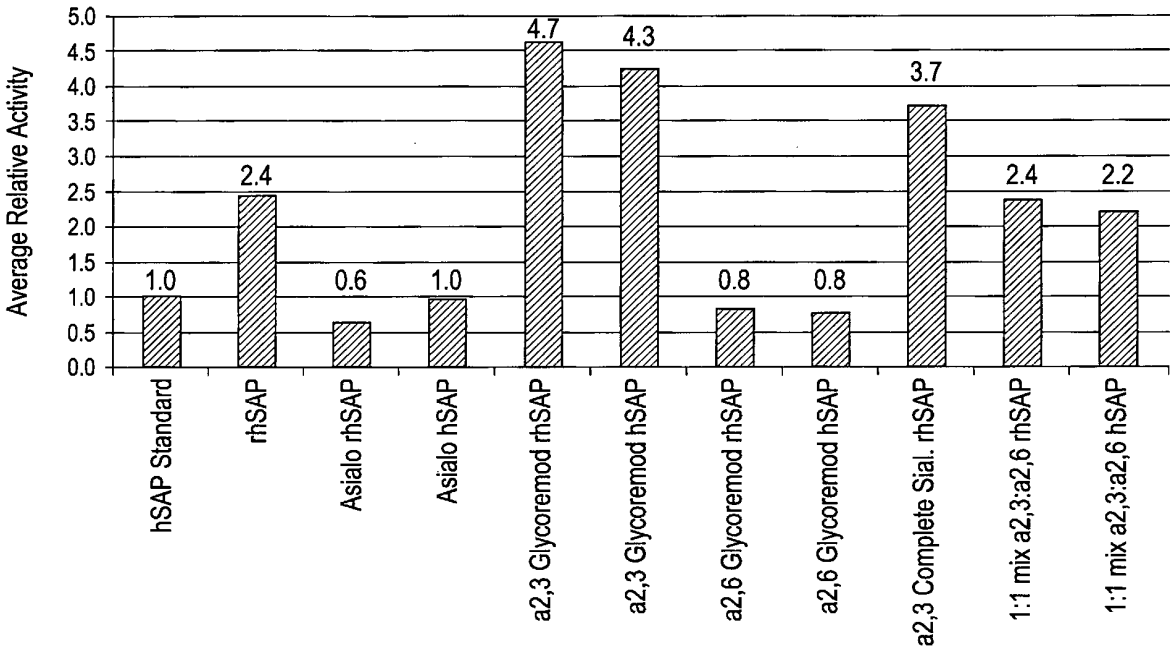


FIGURE 3

1041120020w1.txt
SEQUENCE LISTING

<110> PROMEDIOR, INC.

<120> SERUM AMYLOID P DERIVATIVES AND THEIR PREPARATION AND USE

<130> 104112-0020-W01

<140>

<141> 2010-06-04

<150> 61/217,931

<151> 2009-06-04

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 204

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Thr Asp Leu Ser Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Val
1 5 10 15

Thr Asp His Val Asn Leu Ile Thr Pro Leu Glu Lys Pro Leu Gln Asn
20 25 30

Phe Thr Leu Cys Phe Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg Ala Tyr Ser
35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Asn Thr Gln Gly Arg Asp Asn Glu Leu Leu Val Tyr
50 55 60

Lys Glu Arg Val Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Arg His Lys Val
65 70 75 80

Thr Ser Lys Val Ile Glu Lys Phe Pro Ala Pro Val His Ile Cys Val
85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile Asn Gly Thr
100 105 110

Pro Leu Val Lys Lys Gly Leu Arg Gln Gly Tyr Phe Val Glu Ala Gln
115 120 125

Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Lys Phe
130 135 140

Asp Arg Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Ile Gly Asp Leu Tyr Met Trp
145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Pro Pro Glu Asn Ile Leu Ser Ala Tyr Gln Gly Thr
165 170 175

Pro Leu Pro Ala Asn Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Asn Tyr Glu Ile
180 185 190

Arg Gly Tyr Val Ile Ile Lys Pro Leu Val Trp Val
195 200

1041120020w1.txt

<210> 2
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<400> 2
 Gln Glu Asp Leu Tyr Arg Lys Val Phe Val Phe Arg Glu Asp Pro Ser
 1 5 10 15

Asp Ala Tyr Val Leu Leu Gln Val Gln Leu Glu Arg Pro Leu Leu Asn
 20 25 30

Phe Thr Val Cys Leu Arg Ser Tyr Thr Asp Leu Thr Arg Pro His Ser
 35 40 45

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

Lys Pro Lys Pro Gly Glu Tyr Arg Phe Tyr Val Gly Gly Lys Tyr Val
 65 70 75 80

Thr Phe Arg Val Pro Glu Asn Arg Gly Glu Trp Glu His Val Cys Ala
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Gly Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Leu Asn Gly Arg
 100 105 110

Pro Trp Pro Arg Lys Gly Leu Gln Lys Gly Tyr Glu Val Gly Asn Glu
 115 120 125

Ala Val Val Met Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly Gly Phe
 130 135 140

Asp Val Tyr Asn Ser Phe Thr Gly Glu Met Ala Asp Val His Leu Trp
 145 150 155 160

Asp Ala Gly Leu Ser Pro Asp Lys Met Arg Ser Ala Tyr Leu Ala Leu
 165 170 175

Arg Leu Pro Pro Ala Pro Leu Ala Trp Gly Arg Leu Arg Tyr Glu Ala
 180 185 190

Lys Gly Asp Val Val Val Lys Pro Arg Leu Arg Glu Ala Leu Gly Ala
 195 200 205

<210> 3
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 3
 Gln Thr Asp Leu Arg Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Asp His Val Thr Leu Ile Thr Lys Leu Glu Lys Pro Leu Lys Asn
 20 25 30

Leu Thr Leu Cys Leu Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg Gly Tyr Ser
 Page 2

1041120020w1.txt

35

40

45

Leu Phe Ser Tyr Asn Ile His Ser Lys Asp Asn Glu Leu Leu Val Phe
 50 55 60

Lys Asn Gly Ile Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Lys Thr Lys Val
 65 70 75 80

Thr Val Arg Ala Thr Glu Lys Phe Pro Ser Pro Val His Ile Cys Thr
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Thr Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile Asn Gly Lys
 100 105 110

Pro Leu Val Lys Arg Gly Leu Lys Gln Gly Tyr Ala Val Gly Ala His
 115 120 125

Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Gly Phe
 130 135 140

Asp Lys Asn Gln Ser Phe Met Gly Glu Ile Gly Asp Leu Tyr Met Trp
 145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Ser Pro Glu Glu Ile Leu Leu Val Tyr Gln Gly Ser
 165 170 175

Ser Ser Ile Ser Pro Thr Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Lys Tyr Glu
 180 185 190

Ile Lys Gly Tyr Val Ile Val Lys Pro Met Val Trp Gly
 195 200 205

<210> 4

<211> 204

<212> PRT

<213> Cricetulus migratorius

<400> 4

Gln Thr Asp Leu Thr Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Glu
 1 5 10 15

Ser Asp Tyr Val Lys Leu Ile Pro Arg Leu Glu Lys Pro Leu Glu Asn
 20 25 30

Phe Thr Leu Cys Phe Arg Thr Tyr Thr Asp Leu Ser Arg Pro His Ser
 35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Asn Thr Lys Asn Lys Asp Asn Glu Leu Leu Ile Tyr
 50 55 60

Lys Glu Arg Met Gly Glu Tyr Gly Leu Tyr Ile Glu Asn Val Gly Ala
 65 70 75 80

Ile Val Arg Gly Val Glu Glu Phe Ala Ser Pro Val His Phe Cys Thr
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Asp Phe Trp Val Asn Gly Ile
 100 105 110

1041120020w1.txt

Pro Trp Val Lys Lys Gly Leu Lys Lys Gly Tyr Thr Val Lys Thr Gln
115 120 125

Pro Ser Ile Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Asn Tyr Gly Gly Gly Phe
130 135 140

Asp Lys Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Met Gly Asp Leu Asn Met Trp
145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Thr Pro Glu Glu Ile Lys Ser Val Tyr Glu Gly Ser
165 170 175

Trp Leu Glu Pro Asn Ile Leu Asp Trp Arg Ala Leu Asn Tyr Glu Met
180 185 190

Ser Gly Tyr Ala Val Ile Arg Pro Arg Val Trp His
195 200

DERIVADOS DE SUERO AMILOIDE P, SU PREPARACIÓN Y USO

REFERENCIAS CRUZADAS CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional
5 Estadounidense Serie No. 61/217.931 presentada el 4 de junio de 2009. Todas las enseñanzas de la solicitud antes relacionada se incorporan a la presente como referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El Suero Amiloideo P (SAP) es un miembro de la familia de las
10 pentraxinas de las proteínas. El SAP es secretado por el hígado y circula en la sangre como un pentámero estable. Investigaciones previas han demostrado que el SAP juega un papel importante tanto en las fases de iniciación como de resolución de la respuesta inmune. El SAP puede ligarse a residuos de
15 azúcar sobre la superficie de bacterias y por lo tanto promover su opsonización y atrapamiento por células que presentan antígeno. El SAP también se liga a ADN libre y a cromatina generada por células apoptóticas en la resolución de una respuesta inmune, impidiendo así una respuesta
inflamatoria secundaria contra estos antígenos. Las moléculas ligadas por el SAP son removidas de las áreas extracelulares debido a la capacidad del
20 SAP de ligarse a todos los tres receptores FcY clásicos (FcYR), con una afinidad particular por el FcYRII (CD32) y el FcYRIII (CD16). Después del ligado del receptor, el SAP y cualquier complejo unido es en general internalizado y procesado por la célula.

Recientemente, se ha sugerido que el SAP puede ser utilizado como
25 un agente terapéutico para tratar diversos trastornos, incluyendo trastornos relacionados con fibrosis, trastornos de hipersensibilidad, trastornos autoinmunes, mucositis, y trastornos inflamatorios tales como aquellos causados por infección microbiana. Ver, por ejemplo las solicitudes de patente Estadounidenses Series Nos. 11/707.333, 12/217.617, 12/720.845, y

12/720.847. Las proteínas terapéuticas para tratar enfermedades humanas han revolucionado la industria del cuidado de la salud. Sin embargo, existen muchas dificultades en la producción de una proteína terapéutica que tenga la potencia necesaria ó en cantidad suficiente para que sea útil como agente terapéutico. Muchos agentes terapéuticos potenciales son modificados para incrementar su actividad biológica, tal como la vida promedio en plasma, con relación a la proteína derivada naturalmente. La tecnología de la expresión recombinante es usualmente implementada para producir polipéptidos en cantidad suficiente. Desafortunadamente, muchos sistemas recombinantes producen polipéptidos que tienen diferentes propiedades biológicas a las de las formas naturalmente derivadas, lo que puede afectar la farmacocinética, la seguridad, y la eficacia de un producto terapéutico.

Por lo tanto, todavía permanece una necesidad de desarrollar polipéptidos SAP, y métodos de fabricación, adecuados para el tratamiento terapéutico de humanos.

RESUMEN DE LA INVENCION

En parte, esta divulgación suministra variantes de polipéptidos de Suero Amiloideo P (SAP) y métodos para su producción. La presente invención incluye métodos y composiciones para la adición, eliminación, ó modificación *in vitro* e *in vivo* de residuos de azúcar para producir variantes de polipéptidos SAP que posean un patrón de glicosilación deseado.

En ciertos aspectos, la divulgación suministra un polipéptido SAP humano glicosilado, que comprende una cadena de oligosacáridos N-ligados u O-ligados que tenga por lo menos una rama terminal con una parte ácida siálica ligada con $\alpha 2, 3$.

En ciertos aspectos, la divulgación suministra un polipéptido SAP humano glicosilado, que comprende una cadena de oligosacáridos N-ligados u O-ligados que tenga un 50% menos de partes ácidas siálicas $\alpha 2, 3$ -ligadas que el SAP tipo natural aislado del suero humano.

En ciertos aspectos, la divulgación suministra métodos para hacer un polipéptido SAP humano glicosilado, que comprende expresar un polipéptido SAP en una célula y aislar el polipéptido SAP de la célula. En una modalidad preferida, la célula es una célula CHO. En ciertos aspectos, la célula es una
5 célula CHO-S.

En ciertos aspectos, la divulgación suministra métodos para hacer un polipéptido SAP humano, que comprende expresar un polipéptido SAP humano en una célula CHO y aislar el polipéptido SAP humano de la célula.

En ciertos aspectos, la divulgación suministra métodos para hacer un
10 polipéptido SAP humano, que comprende suministrar un polipéptido SAP humano glicosilado que contiene una cadena de oligosacáridos N-ligados u O-ligados del polipéptido SAP para producir un polipéptido SAP glicosilado modificado.

En ciertos aspectos, la divulgación suministra métodos para hacer un
15 polipéptido SAP humano, que comprende suministrar un polipéptido SAP humano y alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP para producir un polipéptido SAP glicosilado que comprende oligosacáridos N-ligados u O-ligados.

En ciertos aspectos, la divulgación suministra un polipéptido SAP
20 humano preparado mediante un proceso que comprende expresar un polipéptido SAP en una célula CHO y aislar el polipéptido SAP de la célula.

En ciertos aspectos, la divulgación suministra una célula CHO que contiene un polipéptido SAP humano con una cadena de oligosacáridos N-ligados que tiene al menos una rama de la cadena de oligosacáridos que
25 termina con una parte ácida siálica α 2,3-ligada.

En ciertos aspectos, la divulgación suministra una célula CHO que contiene una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido SAP humano.

En ciertos aspectos, la divulgación suministra un polipéptido SAP humano que tiene un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor que la mitad, menor a un tercio, menor a un cuarto, menor a un quinto, ó menor a centésimo del de una muestra de un SAP tipo natural aislado de suero humano.

En modalidades preferidas, los polipéptidos SAP humanos de la invención tienen una cadena de oligosacáridos N-ligados. En algunas modalidades, por lo menos una rama de la cadena de oligosacáridos N-ligados termina con una parte ácida siálica $\alpha 2$, 3-ligadas. En algunas modalidades, la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene al menos 50% menos de partes ácidas siálicas $\alpha 2$, 6-ligadas que las del SAP tipo natural aislado de suero humano. En algunas modalidades, todas las ramas de la cadena de oligosacáridos N-ligados terminan con partes ácidas siálicas $\alpha 2$, 3-ligadas. En algunas modalidades, la cadena de oligosacáridos N-ligados está sustancialmente libre de partes ácidas siálicas $\alpha 2$, 6-ligadas. Los polipéptidos SAP glicovariantes de la invención pueden comprender una ó más ramas, por ejemplo, la cadena de oligosacáridos N-ligados puede estar caracterizada por tener una estructura biantenaria, triantenaria, tetraantenaria, ó pentaantenaria. En algunas modalidades, la cadena de oligosacáridos N-ligados comprende un núcleo pentasacárido de $Man[(\alpha 1,6)-(MAN(\alpha 1,3)]-Man(\beta 1,4)-GlcNAc(\beta 1,4)-GlcNAc(\beta 1,N)-Asn$. En algunas modalidades, la cadena de oligosacáridos N-ligados comprende al menos una rama que tiene la estructura $NeuNAc2\alpha 3Gal\beta 4GlcNAc\beta 2Man\alpha 6$. En algunas modalidades, al menos una rama de la cadena de oligosacáridos N-ligados está sustancialmente libre de galactosa y N-acetilglucosamina. En algunas modalidades, todas las ramas de la cadena de oligosacáridos N-ligados están sustancialmente libres galactosa y N-acetilglucosamina. En algunas modalidades, al menos una rama de la cadena de oligosacáridos N-ligados comprende uno ó más residuos de manosa. En algunas modalidades, la cadena de oligosacáridos N-ligados comprende al menos un residuo de fucosa. Cualquiera de los polipéptidos SAP glicovariantes de la invención puede comprender al menos un residuo de glicosilo modificado. Un residuo de

glicosilo modificado puede estar conjugado con uno ó más grupos modificantes seleccionados entre polímeros solubles e insolubles en agua, partes terapéuticas, agentes de diagnóstico, y biomoléculas.

En ciertos aspectos, el polipéptido SAP de la invención puede ser un polipéptido recombinante. El polipéptido SAP de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% a las SEQ ID Nos. 1, 2, 3 ó 4. Preferiblemente, el polipéptido SAP es una proteína SAP humana. Un polipéptido SAP humano de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% a las SEQ ID No.: 1.

En ciertos aspectos, el polipéptido SAP humano de la invención es una proteína de fusión que comprende un dominio SAP y uno ó más dominios heterólogos. El dominio heterólogo puede promover uno ó más entre estabilidad *in vivo*, vida media *in vivo*, toma/administración, localización ó distribución de tejido, formación de complejos de proteína, ó purificación.

En ciertos aspectos el polipéptido SAP humano de la invención comprende uno ó más residuos de aminoácido modificado, por ej., un aminoácido PEGilado, un aminoácido glicosilado (por ejemplo, glicosilación O-ligada), un aminoácido prenilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilao, ó un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico. Los residuos de aminoácido modificados pueden promover uno ó más entre estabilidad *in vivo*, vida media *in vivo*, toma/administración, localización ó distribución de tejido, formación de complejos de proteína, ó purificación.

En modalidades preferidas, los polipéptidos SAP humanos de la invención tienen actividad biológica incrementada con relación a una muestra correspondiente del SAP tipo natural aislado de suero humano. En ciertos aspectos, los polipéptidos SAP de la invención tienen un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor que la mitad, menor a un tercio, menor a un cuarto, menor a un décimo, ó menor a un

centésimo del de una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano.

En ciertos aspectos, los métodos para hacer cualquiera de los polipéptidos SAP humanos de la invención comprenden una etapa adicional de alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP para ligar una cadena de oligosacáridos N-ligados u O-ligados al polipéptido SAP ó para modificar la cadena de oligosacáridos N-ligados u O-ligados existentes del polipéptido SAP. En algunas modalidades, alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP comprende tratar el polipéptido SAP con una ó más proteínas enzimáticas seleccionadas de glicosiltransferasas, glicosidasas, y fosfatasas. En algunas modalidades, el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP se lleva a cabo en la presencia de uno ó más precursores de azúcar. Los precursores de azúcar adecuados incluyen, sin limitarse a, UDP-N-acetilglucosamina, ácido CMP-N-glicolilneuramínico, UDP-N-acetilgalactosamina, ácido CMP-N-acetilneuramínico, UDP-galactosa, y GDP-fucosa. En algunas modalidades, el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP remueve una ó más partes terminales de ácido siálico $\alpha 2$, 6-ligadas de la cadena de oligosacáridos N-ligados u O-ligados. En algunas modalidades, el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP reemplaza una ó más partes terminales de ácido siálico $\alpha 2$, 6-ligadas en la cadena de oligosacáridos con una ó más partes de ácido siálico $\alpha 2$, 3-ligadas.

La divulgación suministra adicionalmente preparaciones farmacéuticas de polipéptidos SAP humanos de la invención adecuados para uso en mamíferos. Las preparaciones farmacéuticas de la invención incluyen al menos uno de los polipéptidos SAP descritos aquí y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la preparación farmacéutica comprende además un agente activo adicional. En algunas modalidades, la preparación farmacéutica es preparada como una formulación de liberación sostenida. En algunas modalidades, las preparaciones farmacéuticas de la divulgación son adecuadas para ser

administradas a un paciente tópicamente, por inyección, por inyección intravenosa, por inhalación, por depósito continuo, ó por bomba.

La presente divulgación suministra además métodos para tratar ó prevenir trastornos ó condiciones responsivos al SAP mediante administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de uno ó más polipéptidos SAP de la invención. Los trastornos ó condiciones responsivos al SAP incluyen, sin limitarse a, trastornos ó condiciones fibróticas ó fibroproliferativas, trastornos ó condiciones de hipersensibilidad, trastornos ó condiciones autoinmunes, enfermedades ó condiciones inflamatorias, y mucositis. El polipéptido SAP de la invención puede ser administrado a un paciente tópicamente, por inyección, por inyección intravenosa, por inhalación, por depósito continuo, ó por bomba, ó una combinación de estos. En algunas modalidades, el polipéptido SAP de la invención es administrado con uno ó más agentes activos adicionales.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Ensayo de diferenciación de fibrocitos. Un ensayo con base en ELISA fue usado para medir la producción de MDC después de la incubación de monocitos con polipéptidos SAP. El eje Y indica la potencia promedio (es decir, promedio de 7 experimentos independientes) del SAP derivado del suero humano (hSAP) en comparación con el SAP humano recombinante (rhSAP) aislado de células CHO-S. LA actividad relativa del hSAP se establece en 1,0.

Figura 2. Análisis estructural del glicano de los polipéptidos SAP variantes. Se usó el análisis (A) por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) y el análisis (B) por Cromatografía líquida de alto rendimiento por intercambio aniónico para determinar los enlaces de ácido siálico sobre el SAP humano recombinante glicoremodelado aislado de células CHO-S. Se usó el análisis (C) por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) y el análisis

(D) por Cromatografía líquida de alto rendimiento por intercambio aniónico para determinar los enlaces de ácido siálico sobre el hSAP glicoremodelado (SAP derivado de suero humano). Se usó el análisis (E) por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) y el análisis (F) por Cromatografía líquida de alto rendimiento por intercambio aniónico para determinar los enlaces de ácido siálico sobre el rhSAP que fue tratado con $\alpha 2$, 3-sialiltransferasa para incrementar el número de ácidos siálicos 2,3-ligados terminales en los glicanos SAP. En las figuras del LCMS, el eje X representa la masa en Dalton, y el eje Y representa la intensidad relativa. En las trazas HPLC, el eje X es el tiempo en minutos, y el eje Y representa las unidades de absorbencia (mAU).

Figura 3. Ensayo de diferenciación de fibrocitos. Un ensayo con base en ELISA fue usado para medir la producción de MDC después de la incubación de monocitos con polipéptidos SAP. El eje Y indica la actividad relativa promedio de cada variante SAP comparada con un estándar de referencia hSAP, para el cual la actividad se establece en 1,0 (ver la barra más a la izquierda).

Figura 4. Ensayo de diferenciación de fibrocitos. Los monocitos fueron tratados con hMCSF y luego cuantificados subsiguientemente para la diferenciación de fibrocitos. El eje X representa la concentración de hMCSF incubados con monocitos donantes. El eje Y indica la cantidad de proliferación de fibrocitos en el día cinco según se midió por la enumeración de fibrocitos por $5,0 \times 10^4$ células.

Figura 5. Ensayo de diferenciación de fibrocitos. Los monocitos fueron tratados con hSAP y luego cuantificados subsiguientemente para la diferenciación de fibrocitos. El eje X representa la concentración de hSAP incubados con monocitos donantes. El eje Y indica la cantidad de proliferación

de fibroцитos en el día cinco según se midió por la enumeración de fibroцитos por $5,0 \times 10^4$ células.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 General

La mayoría de los péptidos de ocurrencia natural tienen partes de carbohidratos (es decir, glicanos) unidas al péptido mediante enlaces específicos a ciertos aminoácidos a lo largo de la longitud de la cadena principal de péptidos, formando así los "glicopéptidos". El patrón de glicosilación sobre cualquier péptido dado puede tener implicaciones enormes en la función de ese péptido. Por ejemplo, la estructura de los glicanos N-ligados a un péptido puede impactar varias características del péptido, incluyendo la susceptibilidad a la proteasa, el tráfico intracelular, la secreción, tejido objetivo, vida media biológica, y antigenicidad. La alteración de una ó más de estas características afecta grandemente la eficacia de un péptido en su entorno natural.

Las estructuras de los glicanos encontradas en glicopéptidos de ocurrencia natural se dividen típicamente en dos clases, glicanos N-ligados y O-ligados. Los péptidos expresados en células eucarióticas están típicamente N-glicosiladas sobre residuos de asparagina en sitios en la estructura principal del péptido que contienen la secuencia asparagina-X-serine/treonina, en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico. La porción carbohidrato de tales péptidos se conoce como un glicano N-ligado u oligosacárido N-ligado. Los eventos tempranos de la N-glicosilación ocurren en el retículo endoplásmico (ER) y se conservan en los mamíferos, plantas, insectos y otros eucariotes mayores. Primero, una cadena de oligosacáridos que comprende catorce residuos de azúcar se construye sobre una molécula portadora de lípidos. A medida que el péptido naciente es traducido y translocado al ER, la cadena completa de oligosacáridos es transferida al grupo amida del residuo de asparagina en una reacción catalizada por una

enzima glicosiltransferasa ligada a membrana. El glicano N-ligado es procesado adicionalmente tanto en el ER como en el aparato Golgi. El procesamiento adicional conlleva generalmente la remoción de los residuos de azúcar y la adición de otros residuos de azúcar en reacciones catalizadas por glicosilasas y glicosiltransferasas específicas para los residuos de azúcar removidos y agregados.

Típicamente, las estructuras finales de los glicanos N-ligados son dependientes del organismo en el cual el péptido es producido. Por ejemplo, los péptidos producidos en bacterias en general no están glicosilados. Los péptidos expresados en células de insectos contienen típicamente alta manosa ó cadenas de oligosacáridos N-ligados con pauci-manosa. Los péptidos producidos en cultivos de células de mamíferos usualmente se encuentran diferencialmente glicosilados dependiendo de las especies y de las condiciones del cultivo celular. Aún en las mismas especies y bajo las mismas condiciones, se encuentra algunas veces una cierta cantidad de heterogeneidad en la cadena de glicosilo. En general, los péptidos producidos en células de plantas comprenden estructuras de glicanos que difieren significativamente de aquellas producidas en células animales.

Una variedad de métodos han sido propuestos en la técnica para adaptar el patrón de glicosilación de un péptido, incluyendo los métodos descritos en las solicitudes Internacionales Publicadas Nos. WO 99/22764, WO 98/58964, y WO 99/54342 lo mismo que en la Patente Estadounidense No. 5.047.335. Esencialmente, muchas de las enzimas requeridas para la glicosilación *in vitro* de los péptidos han sido clonadas y secuenciadas. En algunos casos, estas enzimas han sido usadas *in vitro* para agregar azúcares especiales a un glicano en un péptido. En otros casos, las células han sido construidas mediante ingeniería genética para expresar una combinación de enzimas y péptidos deseados tal que la adición de una parte de azúcar deseada a un péptido expresado ocurre dentro de la célula.

Dos clases principales de enzimas se usan en la síntesis de carbohidratos: glicosiltransferasas y glicosidasas. Las glicosiltransferasas

agregan ó modifican las estructuras de oligosacáridos existentes en un péptido. Las glicosiltransferasas son efectivas para producir productos específicos con buen control estereoquímico y regioquímico.

Las glicosiltransferasas han sido usadas para preparar oligosacáridos y para modificar estructuras terminales de carbohidratos N- y O-ligados, particularmente en péptidos producidos en células de mamíferos. Por ejemplo, los oligosacáridos terminales de glicopéptidos pueden estar completamente sialilados ó fucosilados para suministrar estructuras de azúcar más consistentes usando glicosiltransferasas, lo que puede mejorar la farmacodinámica del glicopéptido y una variedad de otras propiedades biológicas.

Las glicosidasas son clasificadas adicionalmente como exoglicosidasas (por ejemplo, β -manosidasa, β -glucosidasa), y endoglicosidasas (por ejemplo, Endo-A, Endo-M). Las glicosidasas normalmente catalizan la hidrólisis de un enlace glicosídico. Sin embargo, bajo condiciones apropiadas, estas pueden ser usadas para formar este enlace. La mayoría de las glicosidasas usadas para la síntesis de carbohidratos son exoglicosidasas; la transferencia de glicosilo ocurre en el terminal no reductor del sustrato. La glicosidasa se liga a un donante de glicosilo en un intermedio glicosil-enzima que es interceptado por agua para producir el producto de hidrólisis, ó por un aceptador, para generar una nueva glicosida u oligosacárido. Una vía ilustrativa que usa una exoglicosidasa es la síntesis del núcleo trisacárido de todos los glicopéptidos N-ligados, incluyendo el enlace β -manosida, que está formado por la acción de la β -manosidasa (Singh *et al.*, Chem. Commun. 993-994 (1996)). Aunque su uso es menos común que aquel de las exoglicosidasas, las endoglicosidasas también son utilizadas para preparar carbohidratos. Las endoglicosidasas pueden ser usadas para transferir una cadena completa de oligosacáridos, en vez de un monosacárido, dentro de un polipéptido. Los fragmentos de oligosacáridos han sido agregados a sustratos que usan endo- β -N-acetilglucosaminas, tal como endo-F y endo-M (Wang *et al.*, Tetrahedron Lett. 37: 1975-1978; y Haneda *et al.*, Carbohydr. Res. 292: 61-70 (1996)). Cada una de estas clases de enzimas ha sido usada exitosamente para

producir péptidos glicosilados. Para un análisis general, ver, Crout *et al.*, Curr, Opin, Chem. Biol. 2: 98-111 (1998).

El suero amiloideo P (SAP) es una proteína de suero de ocurrencia natural en los mamíferos compuesta de cinco subunidades idénticas, ó
 5 "promotores", que están asociados de manera no covalente en un complejo similar a disco. El SAP pertenece a la súper familia de proteínas pentraxinas, que están caracterizadas por esta estructura pentamérica cíclica. Las pentraxinas cortas clásicas incluyen SAP lo mismo que proteína C-reactiva (Osmand, A.P., et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 74: 739-743, 1997). El SAP es
 10 normalmente sintetizado en el hígado y tiene una vida media fisiológica de veinticuatro horas. La secuencia de la subunidad SAP humana se da enseguida, la cual corresponde a los aminoácidos 20-223 del Gene bank Accession NO. NP_001630 (no se ilustra la secuencia de señal).

HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLTPLKPLQNFTLCFRAYS DLSRA
 YSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPV
 HICVSWESSSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQE QD
 SYGGKFD RSQS FVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGTPLPANILD
 WQALNYEIRGYVIIKPLVWV (SEQ ID NO: 1)

15 La secuencia de la subunidad SAP *Gallus gallus* se da enseguida.

QEDLYRKVFVFREDPSDAYVLLQVQLERPLLNFTVCLRSYTDLTRP
 HSLFSYATKAQDNEILLFKPKPGEYRFYVGGKYVTFRVPENRGEW
 EHV CASWESGSGIAEFWLNGRPWPRKGLQKGYEVGNEAVVMLG
 QE QDAYGGGFDVYNSFTGEMADVHLWDAGLSPDKMRSAYLALR
 LPPAPLAWGRLRYEAKGDVVVKPRLREALGA (SEQ ID NO: 2)

La secuencia de la subunidad SAP *Bos taurus* se da enseguida.

QTDLRGKVFVFPRESSTDHVTLITKLEKPLKNLTLCLRAYSDLSRG
YSLFSYNIHSKDNELLVFKNGIGEYSLYIGKTKVTVRATEKFPSPVH
ICTSWESSTGIAEFWINGKPLVKRGLKQGYAVGAHPKIVLGQEQDS
YGGGFDKNQSFMGEIGDLYMWDSVLSPEEILLVYQGSSSISPTILD
WQALKYEIKGYVIVKPMVWG (SEQ ID NO: 3)

La secuencia de la subunidad SAP *Cricetulus migratorius* se da enseguida.

QTDLTGKVFVFPRESESDYVKLIPRLEKPLENFTLCFRTYTDLSRPHSLFSYNTKN
KDNELLYKERMGEYGLYIENVGAIVRGVEEFASPVHFCTSWESSSGIADFWVNG
IPWVKKGLKKGYYTVKTQPSIILGQEQDNYGGGFDKSQSFVGEMGDLNMWDSVL
TP EEIKSVYEGSWLEPNILDWRALNYEMSGYAVIRPRVWH (SEQ ID NO: 4)

Un aspecto de la presente invención se relaciona con el
5 descubrimiento sorprendente de que la modificación de una estructura de
glicanos en un polipéptido SAP humano puede incrementar la actividad
biológica del polipéptido SAP con relación a una muestra de SAP tipo natural
aislado de suero humano. Como se demostró mediante los ejemplos de la
presente divulgación, el SAP aislado del suero humano contiene solo residuos
10 de ácido siálico $\alpha 2$, 6-ligados. En contraste el SAP humano recombinante
producido en células CHO contiene solamente residuos de ácido siálico $\alpha 2$, 3-
ligados. Usando bioensayos con base celular in vitro, los polipéptidos SAP de
ácido siálico $\alpha 2$, 3-ligados probaron tener una actividad consistentemente más
alta que el SAP tipo natural aislado (es decir, SAP que comprende partes de
15 ácido siálico $\alpha 2$, 6-ligados) del suero humano. Los polipéptidos SAP variantes
de la invención serían más efectivos como agentes terapéuticos debido a su
potencia biológica incrementada. Por ejemplo, las variantes SAP más
potentes pueden requerir menos dosificación ó dosificación menos frecuente
en comparación con el SAP tipo natural aislado del suero humano. LA
20 presente divulgación suministra tanto polipéptidos SAP humanos variantes
como métodos para fabricarlos. En particular, la divulgación incluye métodos y
composiciones para agregar, eliminar, ó modificar residuos de azúcares *in*
vitro e *in vivo* para producir un polipéptido SAP humano que tenga un patrón
de glicosilación deseado.

Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados aquí en general tienen el mismo significado que comúnmente entienden aquellos versados en la técnica. En general, la nomenclatura usada aquí y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica, y química e hibridación del ácido nucleico son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Las técnicas estándar son usadas para la síntesis del ácido nucleico y el péptido. Las técnicas y procedimientos se llevan a cabo en general de acuerdo con métodos convencionales en la técnica y varias referencias generales (por ejemplo, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se suministran en este documento.

Los artículos “un”, “uno”, “una” son usados aquí para referirse a uno ó más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Como ejemplo, “un elemento” significa un elemento ó más de un elemento.

Como se usa aquí, los términos “tratamiento” y “tratar”, se refieren a obtener un efecto farmacológico ó fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa ó parcialmente un desorden ó síntoma del mismo ó puede ser terapéutico en términos de una cura parcial ó completa del desorden ó del efecto adverso atribuible al desorden. “Tratamiento”, como se usa aquí, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un humano, e incluye: (a) incrementar el tiempo de supervivencia; (b) disminuir el riesgo de muerte debido a la enfermedad; (c) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo ó reducir la velocidad del progreso de la enfermedad; y (d) aliviar la enfermedad, es decir causar la regresión de la enfermedad.

Como se usa aquí, un agente terapéutico que “inhibe” ó “previene” un desorden ó condición es un compuesto que, en una muestra estadística,

reduce la ocurrencia del desorden ó condición en la muestra tratada con relación a una muestra de control no tratada, ó retarda el establecimiento ó reduce la severidad de uno ó más síntomas del desorden ó condición con relación a la muestra no tratada.

- 5 Como se usa aquí, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a animales incluyendo mamíferos, tal como humanos. El término "mamífero" incluye primates, animales domésticos tales como perros, gatos, ovejas, ganado vacuno, caballos, cabras, cerdos, ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, animales cautivos tales como los animales de zoológico, y animales
10 salvajes.

 Como se usa aquí, el término "tejido" se refiere a un órgano ó conjunto de células especializadas tal como tejido de piel, tejido de pulmón, tejido de riñón, y otros tipos de células.

- El término "efecto terapéutico" es reconocido en la técnica y se refiere a
15 un efecto local ó sistémico en animales, particularmente mamíferos, y más particularmente humanos causado por una sustancia farmacológicamente activa. La frase "cantidad terapéuticamente activa" significa la cantidad de esa sustancia que produce algún efecto local ó sistémico en una proporción de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad
20 terapéuticamente efectiva de tal sustancia varía dependiendo del sujeto y la condición de la enfermedad a ser tratada, el peso y la edad del sujeto, la severidad de la condición de la enfermedad, la forma de administración, que puede ser determinada fácilmente por una persona versada en la materia. Por ejemplo, ciertas composiciones descritas aquí pueden ser administradas en
25 una cantidad suficiente para producir un efecto deseado en una proporción de beneficio/riesgo aplicable a tal tratamiento.

- Como se usa aquí, el término "ácido nucleico" se refiere a un polinucleótido tal como el ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando es apropiado, el ácido ribonucleico (ARN). El término también incluye, como
30 equivalentes, análogos del ARN ó del ADN hechos de análogos de nucleótidos, y, según sea aplicable a la modalidad que se describe, un

polinucleótido de una cadena (tal como en sentido ó antisentido) ó de cadena doble.

Los términos "péptidos", "proteínas" y "polipéptidos" se usan aquí de manera intercambiable. El término "proteína purificada" se refiere a una
5 preparación de una proteína ó proteínas que son preferiblemente aisladas de, ó de otras maneras sustancialmente libres de, otras proteínas normalmente asociadas con la (s) proteína(s) en una célula ó lisado celular. El término "sustancialmente libre de otras proteínas celulares" ó "sustancialmente libre de otras proteínas contaminantes" está definido para abarcar preparaciones
10 individuales de cada una de las proteínas que comprendan menos del 20% (en peso seco) de proteína contaminante, y preferiblemente comprenda menos de 5% de proteína contaminante. Las formas funcionales de cada una de las proteínas pueden ser preparadas como preparaciones purificadas mediante usar un gen clonado como es bien conocido en el arte. Por
15 "purificado", se quiere decir que la molécula indicada está presente en la ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, tal como otras proteínas (particularmente otras proteínas que puedan enmascarar, disminuir, confundir ó alterar sustancialmente las características de las proteínas componentes sea en preparaciones purificadas ó en su función la mezcla reconstituida objeto). El término "purificado" como se usa aquí significa
20 preferiblemente al menos 80% en peso seco, más preferiblemente en el rango entre 85% en peso, más preferiblemente 95% a 99% en peso, y más preferiblemente al menos 99,8% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo presentes (pero agua, amortiguadores, y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular menor a
25 5000, pueden estar presentes). El término "puro" como se usa aquí preferiblemente tiene los mismos límites numéricos del término "purificado" explicado antes.

Oligosacáridos "N-ligados" son aquellos oligosacáridos que están
30 ligados a una estructura principal de un péptido mediante asparagina, por vía de un enlace asparagina-N-acetilglucosamina. Los oligosacáridos N-ligados se llaman también "N-glicanos". Los oligosacáridos N-ligados de ocurrencia

natural tienen un núcleo pentasacárido común de Man[(α 1,6)-(MAN(α 1,3))-
 Man(β 1,4)-GlcNAc(β 1,4)-GlcNAc(β 1,N)]. Estos difieren en la presencia de, y
 en el número de ramas (también llamadas antenas) de azúcares periféricos
 tal como N-acetilglucosamina, galactosa, N-acetilgalactosamina, fucosa, y
 5 ácido siálico. Opcionalmente, esta estructura puede también contener una
 molécula con núcleo de fucosa ó una molécula de xilosa.

El término "ácido siálico" se refiere a cualquier miembro de una familia
 de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la
 familia del ácido siálico es el ácido N-acetil-neuramínico (frecuentemente
 10 abreviado como Neu5Ac, NeuAc, ó NANA). Un segundo miembro de la familia
 es el ácido N-glicolil-neuramínico (Neu5Gc ó NeuGc), en el cual el grupo N-
 acetilo del NeuAc está hidroxilado. Un tercer miembro de la familia del ácido
 siálico es el ácido 2-keto-3-deoxi-nonulosónico (KDN) (Nadano *et al.*, (1986)
 J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori *et al.*, J. Biol. Chem. 261: 21811-
 15 21819 (1990)), También están incluidos los ácidos 9-sustituídos tal como un
 9-O-C1C6-acil-Neu5Ac como 9--lactil-Neu5Ac ó 9- O-acetil-Neu5Ac, 9-deoxi-
 9-fluoro-Neu5Ac y 9-azido-9-deoxi-Neu5Ac. Como repaso de la familia del
 ácido siálico se puede ver, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids:
 Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New
 20 York (1992)).

Una célula "construida mediante ingeniería genética" ó "recombinante"
 es una célula que tiene una ó más modificaciones en el material genético de
 la célula. Tales modificaciones incluyen, sin limitarse a, inserciones de
 material genético, eliminaciones de material genético e inserción de material
 25 genético que es extracromosómico sea que tal material se haya mantenido
 estable ó no.

Como se usa aquí, el término "azúcar modificada", se refiere a un
 carbohidrato sea de ocurrencia natural ó no que ha sido agregado
 enzimáticamente en un aminoácido ó un residuo glicosilo de un péptido en un
 30 proceso de la invención. El azúcar modificado se selecciona de un número de
 sustratos de enzimas que incluye, sin limitarse a, nucleótidos de azúcar

(mono-, di-, y trifosfatos), azúcares activados (por ejemplo, haluros de glicosilo, mesilatos de glicosilo) y azúcares que ni son activados ni nucleótidos. Un "azúcar modificado" puede ser funcionalizado covalentemente con un "grupo modificador". Grupos modificadores útiles incluyen, sin limitarse a, polímeros solubles e insolubles en agua, partes terapéuticas, partes de diagnóstico, biomoléculas. El sitio de funcionalización con el grupo modificador se selecciona de modo que no impida que el "azúcar modificado" sea agregado enzimáticamente a un péptido ó a un residuo glicosilo del péptido.

10

Polipéptidos SAP Variantes

En parte, la divulgación suministra polipéptidos (SAP) Amiloideos P de Suero variantes. En particular, la variantes SAP de la invención incluyen una ó más cadenas de oligosacáridos N-ligados u O-ligados que tienen cada una independientemente, una, dos, tres, cuatro, cinco ó más ramas que terminan con una parte de ácido siálico α 2,3-ligada. En algunas modalidades, todas las ramas de las cadenas de oligosacáridos N-ligados u O-ligados terminan en partes α 2, 3-ligadas. Otras variantes de SAP de la invención incluyen polipéptidos SAP humanos glicosilados que contienen cadenas de oligosacáridos N-ligados u O-ligados que tienen al menos 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, ó aún al menos 95% menos de partes de ácido siálico α 2, 6-ligadas que las de un polipéptido SAP tipo natural derivado del suero humano. En algunas modalidades, las cadenas de oligosacáridos N-ligados u O-ligados están sustancialmente libres de partes de ácido siálico α 2,6-ligadas, por ejemplo tienen menos de 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ó aún menos de 99% de partes de ácido siálico α 2,6-ligadas en comparación con las de un polipéptido SAP tipo natural derivado del suero humano). Los polipéptidos SAP glicovariantes de la invención pueden comprender una cadena de oligosacáridos N-ligados u O-ligados que tiene una ó más ramas (por ejemplo, tienen una estructura biantenaria,

triantenaria, tetraantennaria, etc.). En ciertas modalidades, los polipéptidos SAP de la invención comprenden una cadena de oligosacáridos N-ligados u O-ligados en donde una, dos, tres, cuatro ó cinco ramas de la cadena de oligosacáridos están sustancialmente libres de galactosa y N-acetilglucosamina (por ejemplo, tienen menos de 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ó aún menos de 99% de N-acetilglucosamina con relación a un polipéptido SAP tipo natural derivado del suero humano). Ciertos polipéptidos SAP de la invención tienen cadenas de oligosacáridos N-ligados u O-ligados que están sustancialmente libres de galactosa y N-acetilglucosamina (por ejemplo, tienen menos de 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ó aún menos de 99% de galactosa ó N-acetilglucosamina con relación a un polipéptido SAP tipo natural derivado del suero humano). En algunas modalidades, Los polipéptidos SAP de la invención comprenden una cadena de oligosacáridos N-ligados u O-ligados en donde una, dos, tres, cuatro ó cinco ramas de la cadena de oligosacáridos contienen uno ó más residuos de manosa. En ciertas modalidades, el polipéptido SAP de la invención comprende un oligosacárido N-ligado que tiene un núcleo pentasacárido de $\text{Man}[(\alpha 1,6)-(\text{Man}(\alpha 1,3)]-\text{Man}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,N)-\text{Asn}$. Este núcleo pentasacárido puede también comprender uno ó más residuos de fucosa ó xilosa. En ciertas modalidades, los polipéptidos SAP de la invención comprenden una cadena de oligosacáridos N-ligados en donde una, dos, tres, cuatro ó cinco ramas de la cadena de oligosacáridos, tiene la estructura $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$. Los polipéptidos SAP de la invención también pueden comprender una cadena de oligosacáridos N-ligados en donde todas las ramas tienen la estructura $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$.

Los polipéptidos SAP variantes de la invención pueden comprender uno ó más residuos de azúcares "modificados". Los azúcares modificados se sustituyen en cualquier posición que permita el ligado de la parte ó grupo modificador. En aspectos preferidos, el azúcar modificado es sustituido en una posición que todavía permite que el azúcar funcione como un sustrato para una enzima usada para acoplar el azúcar modificado al péptido SAP. Un

grupo modificador puede ligarse a una parte de azúcar mediante medios enzimáticos, medios químicos ó una combinación de estos, produciendo así un azúcar modificado, por ejemplo, galactosa, fucosa, ó ácido siálico modificados. Los grupos modificadores de residuos de azúcar se describen en la siguiente sección.

En aspectos preferidos, los polipéptidos SAP variantes de la invención tienen un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor que la mitad de aquel de una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado del suero humano. En algunas modalidades, los polipéptidos SAP variantes de la invención tienen un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor que 1/3, menor que 1/4, menor que 1/10, ó menor que 1/100 de aquel de una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado del suero humano.

Los polipéptidos SAP variantes de la invención puede ser al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, ó 100% idénticos a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, según se determinó usando el programa de computador FASTDB con base en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. APP. Biosci., 6:237-245 (1990)). En una modalidad específica, los parámetros empleados para calcular el porcentaje de identidad y similitud de una alineación de aminoácidos comprende: Matriz=PAM 150, $k^{uplo}=2$, Falta de disparidad=1, Falta de unión= 20, Longitud del Grupo de aleatorización=0, Calificación de corte= 1, Falta de espacio=5 y Falta de tamaño del espacio =0,05.

El término "polipéptido SAP" abarca fragmentos funcionales y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de las anteriores. En general, un polipéptido SAP será diseñado para ser soluble en soluciones acuosas a temperaturas biológicamente relevantes, niveles de pH y osmolaridad. Los protómeros SAP que se asocian de manera no covalente entre ellos para formar un complejo pentamérico SAP pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas ó modificaciones posteriores a la traducción ó,

alternativamente, los protómeros SAP individuales dentro de un solo complejo pueden tener secuencias diferentes ó modificaciones. El término polipéptido SAP incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido SAP de ocurrencia natural al igual que variantes del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, y fusiones). Un polipéptido SAP de la invención puede ser un polipéptido recombinante. En modalidades preferidas, el polipéptido SAP de la invención es un polipéptido SAP humano.

En algunas modalidades, se suministran composiciones farmacéuticas que comprenden variantes del polipéptido SAP de la invención, ó fragmentos funcionales de estos. En algunos aspectos, la secuencia de aminoácidos de una variante SAP puede diferir de la SEQ ID NO: 1 en una ó más sustituciones conservativas ó no conservativas. Como se usa aquí, "sustituciones conservativas" son residuos que son físicamente ó funcionalmente similares a los residuos de referencia correspondientes, es decir, una sustitución conservativa y su residuo de referencia tienen tamaño, forma, carga eléctrica, ó propiedades químicas similares (por ejemplo, la capacidad de formar enlaces covalentes ó de hidrógeno). Las sustituciones conservativas preferidas son aquellas que cumplen con los criterios definidos para una mutación puntual aceptada en Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 (1978 & Supp.). Ejemplos de sustituciones conservativas son las sustituciones dentro de los siguientes grupos: (a) valina, glicina; (b) glicina, alanina; (c) valina, isoleucina, leucina; (d) ácido aspártico, ácido glutámico; (e) asparagina, glutamina; (f) serina, treonina; (g) lisina, arginina, metionina; y (h) fenilalanina, tirosina. Una guía adicional para saber cuáles cambios de aminoácidos probablemente serán fenotípicamente silenciosos se puede encontrar en Bowie *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990).

Los polipéptidos SAP variantes y sus fragmentos que retienen la función biológica son útiles en las composiciones farmacéuticas y los métodos descritos aquí. En algunas modalidades, un polipéptido SAP variante ó un fragmento de este se liga a FcYRI, FcYRIIA, ó FcYRIIIB. En algunas modalidades, un polipéptido SAP variante ó un fragmento del mismo inhibe

una ó más diferenciaciones entre fibroцитos, precursor de fibroцитos, precursor de miofibroblastos, ó precursor de monocitos hematopoyéticos. Las variantes SAP pueden ser generadas mediante modificar la estructura de un polipéptido SAP para promover la eficacia ó la estabilidad terapéutica (por ejemplo, la vida en almacenamiento *ex vivo* y la resistencia contra la degradación proteolítica *in vivo*).

En ciertos aspectos, los polipéptidos SAP variantes de la presente divulgación pueden comprender adicionalmente modificaciones posteriores a la traducción además de cualquiera presente naturalmente en el polipéptido SAP. Tales modificaciones incluyen, sin limitarse a, acetilación, carboxilación, glicosilación (por ejemplo, oligosacáridos O-ligados, oligosacáridos N-ligados, etc.), fosforilación, y lipidación. Como resultado, el polipéptido SAP modificado puede contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilen glicoles, lípidos, poli ó mono sacáridos, y fosfatos.

En ciertos aspectos, una ó más modificaciones al polipéptido SAP descritas aquí pueden promover la estabilidad del polipéptido SAP. Por ejemplo, tales modificaciones pueden promover la vida media *in vivo* del polipéptido SAP ó reducir la degradación proteolítica del polipéptido SAP.

En ciertos aspectos, los polipéptidos SAP variantes de la invención incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción del polipéptido SAP humano y uno ó más dominios de fusión ó porciones heterólogas. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, sin limitarse a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, y región constante (Fc) de la cadena pesada de inmunoglobulina, proteína que liga a la maltosa (MBP), ó albúmina de suero humano. Un dominio de fusión puede ser seleccionado para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para aislar las proteínas de fusión mediante cromatografía por afinidad. Con el propósito de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para cromatografía por afinidad, tales como glutatión-, amilasa-, y resines conjugadas con níquel ó cobalto. Como otro ejemplo, un dominio de fusión

puede ser seleccionado para facilitar la detección de polipéptidos SAP. Ejemplos de tales dominios para detección incluyen las varias proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) al igual que las "etiquetas epítipo", que usualmente son secuencias cortas de péptidos en las cuales está disponible un anticuerpo específico. Etiquetas epítipo bien conocidas en las cuales hay disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen FLAG, hemaglutinina del virus de la influenza (HA) y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen sitios de división de proteasa que permiten que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y así se libere la proteína recombinante de estas. Las proteínas liberadas pueden entonces ser aisladas del dominio de fusión mediante separación cromatográfica subsiguiente. En algunos casos, el polipéptido SAP puede ser fusionado a un dominio heterólogo que estabiliza al polipéptido SAP *in vivo*. Por "estabilizar" se quiere significar cualquier cosa que incremente la vida media del suero, sin importar si esto es debido a destrucción disminuida, limpieza disminuida por el riñón, u otro efecto farmacocinético. Las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina y albúmina de suero son conocidas porque confieren una estabilidad incrementada.

Se entiende que elementos diferentes de las proteínas de fusión pueden estar dispuestos de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido SAP puede ser colocado en un terminal C en un dominio heterólogo, ó alternativamente, un dominio heterólogo puede ser colocado en un terminal C en un polipéptido SAP. El polipéptido SAP y el dominio heterólogo no requieren ser adyacentes en una proteína de fusión, y dominios adicionales ó secuencias de aminoácidos (por ejemplos, secuencias enlazadoras) pueden ser incluidas en terminal C ó N en cualquier dominio ó entre dominios.

30 Métodos para producir moléculas alteradas por N-glicosilación

Se describen aquí métodos para producir polipéptidos SAP humanos variantes. Los métodos en general involucran una etapa de poner en contacto un polipéptido SAP con uno ó más agentes químicos ó enzimáticos para producir ó modificar una estructura de glicosilación en el polipéptidos SAP.

5 Los métodos pueden estar basados en células ó no.

Las enzimas útiles para producir ó modificar estructuras de glicanos son bien conocidas en el arte. La mayoría de las enzimas/proteínas útiles en los métodos de la divulgación pueden ser categorizadas en una de dos clases funcionales: glicotransferasas y glicosidasas. Las glicotransferasas (por
10 ejemplo, N-acetilglucosaminil-transferasas, galactosil-transferasas, fucosil-transferasas, sialil-transferasas, glucosil-transferasas, manosil-transferasas, etc.), como se usa aquí, se refiere a cualquier enzima/proteína que tenga la capacidad de transferir un azúcar donante a una parte aceptadora. Glicosidasas (por ejemplo, glucosidasas, manosidasas, N-acetil
15 glucosaminidasas, sialidasas, fucosidasas, etc.), como se usa aquí, se refiere a cualquier enzima/proteína que tenga la capacidad de catalizar la hidrólisis del enlace glicosídico entre partes de azúcares.

Los métodos con base en células para producir forma glico alteradas de un polipéptido SAP usan células tipo natural (por ejemplo células CHO) ó
20 producidas mediante ingeniería genética que tengan al menos una actividad de glicosilación modificada con relación a una célula humana. Las células adecuadas para los métodos de esta invención incluyen, por ejemplo, células fúngicas, células procarióticas (es decir, bacterias, Arqueas), células de plantas, ó células de animales (por ejemplo, nematodos, insectos, plantas, pájaros, reptiles, ó mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, hámster,
25 jerbos, perros, gatos, cabras, cerdos, vacas, caballos, ballenas, micos, ó humanos)). Las células pueden ser células primarias, células inmortalizadas, ó células transformadas. Tales células pueden ser obtenidas de una variedad de fuentes comerciales y de entidades de recursos de investigación, por
30 ejemplo la American Type Culture Collection (Rockvile, Md.). En ciertos aspectos, la célula usada para producir un polipéptido SAP variante es una célula CHO.

El término "actividad de glicosilación" se refiere a cualquier actividad que es (i) capaz de agregar glicanos N-ligados u O-ligados a una molécula objetivo (es decir, una actividad de oligosacaril-transferasa); (ii) capaz de remover glicanos N-ligados u O-ligados de una molécula objetivo; (iii) capaz de modificar uno ó más glicanos N-ligados u O-ligados en una molécula objetivo; (iv) capaz de modificar oligosacáridos ligados a dolicol; (v) capaz de ayudar en la actividad de una ó más de las actividades descritas bajo los puntos i-iv. De acuerdo a lo anterior, la actividad de glicosilación incluye, por ejemplo, actividad de glicosidasa, actividad de glicosiltransferasa, síntesis de nucleótido de azúcar, actividad de modificación ó transportadora. La modificación de uno ó más de los glicanos N-ligados u O-ligados a una molécula objetivo incluye la acción de una actividad manosilfosforil-transferasa, una actividad quinasa, ó una actividad fosfatasa que altere el estado de fosforilación de los glicanos en la molécula objetivo.

Las células de ingeniería útiles en los métodos de la presente divulgación pueden tener una ó más modificaciones genéticas incluyendo, sin limitarse a; (i) eliminación de un gen endógeno que codifica una proteína que tiene actividad de glicosilación; (ii) introducción de un ácido nucleico recombinante que codifica una forma mutante de una proteína (por ejemplo, proteína endógena ó exógena) que tiene una actividad de glicosilación; (iii) introducción ó expresión de una molécula de ARN que interfiera con la expresión funcional de una proteína que tiene la actividad de glicosilación; (iv) introducción de un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína tipo natural (por ejemplo, endógena ó exógena) que tiene actividad de glicosilación; ó (v) alterar los elementos promotores ó mejoradores de uno ó más genes endógenos que codifican proteínas. Las moléculas de ARN descritas antes incluyen, por ejemplo, ARN de poca interferencia (siARN), ARN de horquilla corta (shARN), ARN antisentido, ó micro ARN (miARN). Se entiende que el elemento (ii) incluye, por ejemplo, el reemplazo de un gen endógeno (por ejemplo, mediante recombinación homóloga) con un gen que codifica una proteína que tiene una actividad de glicosilación más grande que la del gen endógeno que ha sido reemplazado.

Las células creadas por ingeniería genética descritas aquí tienen una ó más actividades de glicosilación alteradas tal como: (i) un incremento en una ó más actividades de glicosilación en la célula modificada genéticamente, (ii) una disminución en una ó más actividades de glicosilación en la célula modificada genéticamente, (iii) un cambio en la localización ó distribución intracelular de una ó más actividades de glicosilación en la célula modificada genéticamente, ó (iv) un cambio en la proporción de una ó más actividades de glicosilación en la célula modificada genéticamente con respecto a una célula no modificada que tenga el mismo origen. Se entiende que un incremento en la cantidad de actividad de glicosilación puede deberse a una sobre expresión de una ó más proteínas que tienen actividad de glicosilación, un incremento en el número de copias de un gen endógeno (por ejemplo, duplicación del gen), ó una alteración en el promotor, mejorador, ó supresor de un gen endógeno que estimule un incremento en la expresión de la proteína codificada por el gen. Una disminución en una ó más actividades de glicosilación puede deberse a la sobreexpresión de una forma mutante (por ejemplo, una forma dominante negativa) de una ó más proteínas que tienen actividades de alteración de la glicosilación, la introducción ó expresión de una ó más moléculas de interferencia del ARN que reduzcan la expresión de una ó más proteínas que tienen una actividad de glicosilación, ó la eliminación de uno ó más genes endógenos que codifican una proteína que tiene actividad de glicosilación.

Las células diseñadas genéticamente usadas en los métodos de la presente divulgación pueden expresar (por ejemplo, sobre expresar) genes mutantes ó naturales que codifican proteínas que tienen actividad de glicosilación. Tales genes incluyen, sin limitarse a,

ALG7, ALG13, ALG14, ALG1, ALG2, ALG11, RFT1, ALG3, ALG9, ALG12, ALG6, ALG8, ANL1, ALG10, ALG5, OST3, OST4, OST6, STT3, OST1, OST5, WBP1, SWP1, OST2, DPM1, SEC59, OCH1, MNN9, VAN1, MNN8, MNN10, MNN11, HOC1, MNN2, MNN5, MNN6, KTR1, YUR1, MNN4, KRE2, KTR2, KTR3, MNN1, MNS1, MNN4, PNO1, MNN9,

Glucosidasa I, glucosidasa II, ó endomanosidasa. Los genes que codifican proteínas que tienen actividad de glicosilación pueden ser de cualquier especie (por ejemplo, eucariotas menores (por ejemplo, hongos (incluyendo levadura) ó tripanosomas), procariotas (es decir, bacterias ó Arqueas),
5 plantas, ó animales (por ejemplo, insectos, aves, reptiles, ó mamíferos, tales como ratones ó ratas, perros, gatos, caballos, cabras, vacas, cerdos, primates no humanos, ó humanos). Se entiende que las células diseñadas genéticamente usadas en los métodos de la divulgación pueden expresar cualquier número de genes (por ejemplo, genes que codifican proteínas que
10 tienen actividad de glicosilación) ó cualquier combinación de uno ó más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, ó 20 ó más) de cualquiera de los genes mencionados aquí en la presente. Adicionalmente, cualesquier células diseñadas genéticamente usadas en los métodos de la presente divulgación pueden comprender cualquier número de mutaciones que alteren ó abroguen
15 una ó más actividades de glicosilación.

En algunas modalidades, el término “expresión de gen” ó “expresión” se refiere a los procesos celulares mediante los cuales se produce un polipéptido activo biológicamente de una secuencia de ADN y exhibe una actividad biológica en una célula. Como tal, la expresión de genes involucra
20 los procesos de transcripción y traducción, aunque también involucra procesos post transcripcionales y post traducción que pueden influenciar en una actividad biológica de un gen ó producto de gen. Estos procesos incluyen, sin limitarse a, síntesis, procesamiento, y transporte de ARN, lo mismo que la síntesis, transporte, y modificación post traducción de
25 polipéptidos.

Por ejemplo, la divulgación suministra métodos para hacer un polipéptido SAP de la invención mediante expresar un gen SAP en una célula. En algunas modalidades, la célula puede contener un gen SAP endógeno ó un fragmento de este. En otras modalidades, un polinucleótido que codifica
30 para un polipéptido SAP endógeno o un fragmento de este puede ser introducido (por ejemplo, transformado, transfectado, etc.) en una célula. Los polinucleótidos SAP adecuados que pueden ser introducidos en una célula

incluyen fragmentos de ácido nucleico lo mismo que construcciones de ácido nucleico ó vectores de expresión. En modalidades preferidas, los genes endógenos ó exógenos codifican un polipéptido SAP humano.

En algunas modalidades, el fragmento de ácido nucleico, por ejemplo, que codifica un polipéptido SAP humano, usado para transformar la célula anfitrión puede incluir un sitio Shine-Dalgarno (por ejemplo, un sitio de ligado de ribosoma) y un sitio de inicio (por ejemplo, el codón ATG) para iniciar la traducción del mensaje transcrito para producir la enzima. Puede también incluir una secuencia de terminación para finalizar la traducción. Una secuencia de terminación es típicamente un codón para el cual no existe un aminoacetil-tARN correspondiente, y por lo tanto finaliza la síntesis del polipéptido. En algunas modalidades, se puede suministrar una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido SAP, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando es transcrito en la célula, produce un polipéptido SAP.

En algunas modalidades, un vector de expresión adecuado comprende una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido SAP de la invención operativamente vinculado ó ligado a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son conocidas en el arte y se seleccionan para la expresión directa de cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación. De acuerdo a lo anterior, el término secuencia reguladora incluye promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión.

Las secuencias reguladoras ilustrativas se describen en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquier secuencia de control de expresión que regula la expresión de una secuencia de ADN cuando está operativamente ligada puede ser usada en estos vectores para expresar cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación. Tales secuencias de control de expresión, incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos del SV40, el promotor *tet*, el promotor temprano inmediato de adenovirus ó citomegalovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema TAC ó

TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la polimerasa T7 del ARN, las regiones mayores operadoras y promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácido, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento de la levadura α , el promotor polihedrón del sistema baculovirus y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procarióticas ó eucarióticas ó sus virus, y varias combinaciones de los anteriores. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de tales factores como la escogencia de la célula anfitrión que va a ser transformada ó el tipo de proteína que se desea expresar. Más aún, también deben considerarse el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como los marcadores antibióticos.

En algunas modalidades, el fragmento de ácido nucleico ó sistema de expresión usado para transformar la célula anfitrión puede incluir opcionalmente una ó más secuencias marcadoras. Hablando en general, las secuencias marcadoras adecuadas típicamente codifican un producto de genes, usualmente una enzima que inactiva ó de otra manera detecta ó es detectada por un compuesto en el medio de crecimiento. Por ejemplo, la inclusión de una secuencia marcadora puede hacer que la célula transformada se vuelva resistente a un antibiótico, ó puede conferir un metabolismo específico para el compuesto en la célula transformada. Ejemplos de secuencias marcadoras adecuadas que confieren resistencia incluyen canamicina, ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina. Alternativamente, en vez de presión selectiva, un gen marcador puede ser usado de modo que permita la detección de colonias particulares que contienen el gen, tal como la β -galactosa, en donde se emplea un sustrato para suministrar un producto coloreado.

Una variedad de métodos son adecuados para transformar una célula de la presente invención con un fragmento de ácido nucleico ó vector de

expresión. Los métodos de transformación comunes incluyen electroporación, transformación liposomal, transformación mediante calcio, y transfección viral.

En ciertos aspectos, cuando una célula anfitrión es transformada con un fragmento de ácido nucleico ó sistema de expresión de la presente invención, el gen (por ejemplo, SAP humano) en dicho sistema puede ser
5 integrado en ADN cromosómico de las células anfitrión mediante la llamada recombinación homóloga y el sistema de expresión será estable en el anfitrión.

Para poder integrar el sistema de expresión del vector en el ADN cromosómico de las células anfitrión, se puede usar un gen marcador de
10 selección apropiado en donde dicho gen marcador tiene una secuencia homóloga a la del gen en el ADN cromosómico de la célula anfitrión específica. Los marcadores de selección para tal propósito pueden ser seleccionados fácilmente por una persona versada en la materia. Como
15 ejemplo, un marcador preferido es un gen que existe en un cromosoma y se relaciona con el metabolismo de las células anfitrión. En particular, se prefiere usar un anfitrión que haya sido modificado de tal manera que el gen antes mencionado en el cromosoma estará inactivado por un medio apropiado tal como una mutación. El anfitrión puede entonces someterse a recombinación
20 homóloga con un vector de expresión que contiene el gen intacto correspondiente, por lo cual solo transformantes que contienen el gen de metabolismo normal pueden crecer para ser seleccionados. Por lo tanto, si tal gen marcador ha sido introducido en el vector de expresión, tendrá lugar una recombinación homóloga entre el gen marcador en dicho vector de expresión
25 y la porción correspondiente del ADN cromosómico, por lo cual el casete de expresión del gen heterólogo será integrado simultáneamente en el ADN cromosómico.

En algunas modalidades, el término "que expresa" una proteína en una célula también incluye métodos para introducir una proteína misma en
30 células. Por lo tanto, en ciertos aspectos, la divulgación suministra métodos para hacer un polipéptido SAP de la invención mediante introducir un

polipéptido SAP dentro de una célula. Las técnicas para introducir polipéptidos directamente dentro de una célula son conocidas en el arte y en general involucran un proceso de permeación de la membrana celular. Tal técnica incluye, sin limitarse a, micro inyección de los polipéptidos SAP; encapsular un polipéptido SAP dentro de las vesículas de la membrana (por ejemplo, liposomas, cuerpos capsulares, fantasmas de eritrocitos, protoplastos, etc.) y ponerlos en contacto con una membrana celular para así causar la introducción intracelular del polipéptido SAP por fusión; usando métodos físicos (por ejemplo, mecánicos, químicos, eléctricos, etc.) que se apoyan en macromoléculas que entran en las células por difusión por agujeros introducidos transitoriamente en sus membranas del plasma (por ejemplo, carga mediante raspado, carga por bolas, etc.); y mediante toma por endocitosis natural propia de la fagocitosis celular. Un método de introducción intracelular puede utilizar un camino mediado por receptor, en donde uno de varios receptores expresados sobre la superficie celular se establece como un objetivo y un polipéptido SAP es ligado (covalentemente ó no) al ligando afín que actúa como una parte portadora. Se han descrito varios métodos para introducir proteínas en células vivas mediante el uso de adsorción electrostática, en donde la proteína es primeramente cationizada y luego puesta en contacto con la superficie cargada negativamente de una célula (Ver la publicación de la Patente Japonesa No. 2004/049214).

En ciertos aspectos, la presente descripción suministra células CHO que expresan un polipéptido SAP. En algunas modalidades, las células CHO expresan un polipéptido SAP exógeno. En modalidades preferidas, la células CHO expresa un polipéptido SAP humano. En algunas modalidades, la invención suministra células CHO que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido SAP. En modalidades preferidas, la secuencia de polinucleótidos codifica un polipéptido SAP humano. Cualquiera de las técnicas ya mencionadas puede usarse para "expresar" un polipéptido SAP de la invención en una célula CHO ó cualquier otra célula adecuada descrita aquí.

En donde cualquiera de las actividades de glicosilación de la célula tipo natural ó genéticamente transformada es inducible ó condicional en la presencia de una cola inductora (por ejemplo, una cola química ó física), la célula tipo natural ó genéticamente transformada puede, opcionalmente, ser

5 cultivada en la presencia de un agente de inducción antes, durante ó después de la introducción del ácido nucleico que codifica un polipéptido SAP ó un polipéptido SAP. Por ejemplo, luego de la introducción del polipéptido SAP en la célula se puede exponer a un agente de inducción química que es capaz de promover la expresión de una ó más proteínas con actividad N-

10 glicosilación natural ó alterada. En donde múltiples colas inductoras inducen la expresión condicional de una ó más proteínas que tienen actividad N-glicosilación natural ó alterada, una célula puede ser puesta en contacto con múltiples agentes de inducción. En algunas modalidades, el medio de cultivo puede ser modificado para producir la estructura de glicano deseada en el

15 polipéptido SAP. Por ejemplo, la concentración de suero, glucosa ó lípidos (por ejemplo, dolicol) del medio puede ser modificada para lograr óptima producción del glicovariante SAP deseado. En algunas modalidades, la temperatura, pH, ó osmolaridad del medio de cultivo pueden ser alterados para la producción óptima del glicovariante SAP deseado.

20 Un polipéptido SAP variante de la invención puede ser procesado adicionalmente *in vivo* ó puede ser procesado *in vitro* antes de ó luego del ser aislado de la célula ó del medio celular. El procesamiento adicional puede incluir la modificación de uno ó más residuos de glicano del polipéptido SAP ó la modificación en el polipéptido SAP distinta de su estructura de glicano. En

25 algunas modalidades, el procesamiento adicional del polipéptido SAP puede incluir la adición (unión covalente ó no) de una ó más partes heterólogas. En algunas modalidades, el procesamiento adicional involucra el tratamiento enzimático ó químico del polipéptido SAP. El tratamiento enzimático puede involucrar el poner en contacto el polipéptido SAP con una ó más entre

30 glicosidasa, fosfodiesterasa, fosfolipasa, glicosiltransferasa, ó proteasa durante un tiempo suficiente para inducir la modificación, adición, ó eliminación de los residuos de glicano (por ejemplo, galactosa, manosa,

fucosa, ácido siálico, xilosa, N-acetilglucosamina, etc.) en el polipéptido SAP. La adaptación de una cadena de oligosacáridos N-ligados puede ser lograda por la modificación, adición, ó eliminación secuencial de las partes de azúcares deseados, usando técnicas bien conocidas en el arte. La división
5 enzimática de las partes carbohidrato en variantes de péptidos puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo y exoglicosidasas como se describió en Thotakura *et al.*, 1987, Meth. Enzymol. 138: 350. Métodos de ejemplo de agregar partes de azúcar se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 5.876.980, 6.030.815, 5.728554, y 5.922.577.

10 En ciertas modalidades, la modificación de la estructura del glicano SAP requiere la presencia de uno ó más nucleótidos de azúcar. Algunos nucleótidos de azúcar ejemplares que son usados en la presente invención incluyen nucleótidos mono, di ó trifosfatos ó análogos de estos. En una modalidad preferida, el nucleótido de azúcar modificado se selecciona de
15 entre una UDP-glicosida, CMP-glicosida, ó GDP-glicosida. Aún más preferiblemente, el nucleótido de azúcar se selecciona entre UDP-galactosa, UDP-galactosamina, UDP-glucosa, UDP-glucosamina, GDP-manosa, GDP-fucosa, CMP-ácido siálico, ácido CMP-N-glicolilneuramínico ó CMP-NeuAc. En ciertas modalidades, un nucleótido de azúcar modificado es utilizado para
20 agregar un residuo de azúcar modificado al polipéptido SAP. Los derivados de N-acetilamina de los nucleótidos de azúcar también son útiles en el método de la invención.

La adición ó remoción química de partes glicosilo puede llevarse a cabo mediante un método adecuado. Por ejemplo, la desglicosilación química
25 puede involucrar el exponer el polipéptido SAP al ácido trifluorometanosulfónico, ó a otro ácido fuerte. Este tratamiento resulta en la división de la mayor parte ó todos los azúcares con la excepción del azúcar de enlace (N-acetilglucosamina ó N-acetilgalactosamina), mientras se deja intacto al péptido. Los métodos de desglicosilación química se describen en
30 Haldmuddin *et al.*, 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 y en Edge *et al.*, 1981, Anal. Biochem. 118:131. El tratamiento químico puede, por ejemplo, involucrar la puesta en contacto del polipéptido SAP alterado con un ácido, tal

como el ácido fluorhídrico, durante un tiempo suficiente para inducir la modificación del polipéptido SAP. El tratamiento con ácido fluorhídrico, bajo ciertas condiciones, remueve específicamente los residuos de manosa que se ligados por fosfodiéster a los glicanos, mientras deja el fosfato en el glicano.

- 5 Un polipéptido SAP alterado puede ser procesado adicionalmente mediante adición ó remoción de un grupo fosfato de uno ó más N-glicanos. Por ejemplo, un polipéptido SAP alterado puede ponerse en contacto con una manisil quinasa ó una manasil fosfatasa.

- 10 En ciertos aspectos, es deseable modificar solamente partes de azúcar terminales en la estructura polipéptido SAP glicano (oligosacárido N-ligado u O-ligado). En algunas modalidades, una ó más ramas de la estructura glicano SAP son modificadas mediante adición, remoción, sustitución ó modificación de por lo menos un residuo terminal de ácido siálico. Los métodos adecuados para modificar glicanos descritos aquí pueden usarse para alterar solamente
- 15 la parte terminal de azúcar en la estructura glicano SAP. En algunas modalidades, un residuo terminal de ácido siálico que tiene enlace $\alpha 2, 6$, enlace $\alpha 2, 8$, ó un enlace $\alpha 2, 9$ es reemplazado con uno ó más residuos terminales de ácido siálico $\alpha 2, 3$ -ligados. En un aspecto particular, el SAP humano comprende residuos siálicos ligados a terminales $\alpha 2, 6$ se modifica
- 20 de acuerdo con uno de los métodos de la divulgación para poder reemplazar uno ó más residuos de ácido siálico $\alpha 2, 6$ -ligados con uno ó más residuos de ácido siálico $\alpha 2, 3$ -ligados. En algunas modalidades, un residuo terminal de ácido siálico $\alpha 2, 3$ -ligado se modifica para agregar uno –o más residuos de ácido siálico $\alpha 2, 6$ -ligados, $\alpha 2, 8$ -ligados ó $\alpha 2, 9$ -ligados.

- 25 En ciertos aspectos, el proceso para hacer un polipéptido SAP de la invención involucra una primera etapa de desglicosilar el polipéptido SAP. El polipéptido SAP puede ser parcial ó completamente desglicosilado. En algunas modalidades, la primera etapa de desglicosilación involucra remover solamente partes terminales de azúcar de al menos una rama de la estructura
- 30 glicano en el polipéptido SAP. En algunas modalidades, la primera etapa de desglicosilación remueve al menos un residuo de ácido siálico $\alpha 2, 6$ -ligado. En algunas modalidades, la primera etapa de desglicosilación remueve al

menos un glicano O-ligado. En algunas modalidades, la primera etapa de desglicosilación remueve al menos un glicano N-ligado. En algunas modalidades, la primera etapa de desglicosilación remueve todos los glicanos O-ligados y N-ligados. En algunas modalidades, un polipéptido SAP
5 desglicosilado (parcial ó completamente) es procesado adicionalmente de acuerdo con los métodos de la presente divulgación, lo que incluye pero sin limitarse a, modificar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP desglicosilado parcial ó completamente, introducir el polipéptido SAP desglicosilado parcial ó completamente dentro de una célula, ó
10 combinaciones de los anteriores, en donde el método (los métodos) produce una variante del polipéptido SAP de la invención. En algunas modalidades, después que el polipéptido SAP desglicosilado ha sido introducido dentro de una célula, este puede ser modificado adicionalmente, *in vivo* ó *in vitro*, de acuerdo con los métodos de la divulgación para producir una variante del
15 polipéptido SAP de la invención. Similarmente, un polipéptido SAP desglicosilado parcial ó completamente que es modificado *in vitro*, usando los métodos enzimáticos ó químicos descritos aquí, puede ser introducido dentro de una célula para producir una variante del polipéptido SAP de la invención.

Se entiende que un polipéptido SAP de la invención puede, pero no
20 requiere, ser procesado en una célula. Por ejemplo, la divulgación suministra también métodos sin células para producir un polipéptido SAP variante de la invención. En algunos aspectos los métodos libres de células incluyen la etapa de poner en contacto un polipéptido SAP, bajo condiciones de glicosilación, con un lisado celular preparado con células naturales (por
25 ejemplo, células fúngicas, células de plantas, ó células de animales) ó células diseñadas mediante ingeniería genética que tienen al menos una actividad de glicosilación modificada, en donde el poner en contacto el polipéptido SAP con el lisado celular une un oligosacárido N-ligado u O-ligado al polipéptido SAP. Por "condiciones de N-glicosilación" se quiere decir que una mezcla (por
30 ejemplo, de un polipéptido SAP y un lisado celular) es incubada bajo condiciones que permitan la N-glicosilación alterada deseada.

Métodos adecuados para obtener lisados celulares que preserven la actividad ó integridad de una ó más actividades de glicosilación en el lisado pueden incluir el uso de amortiguadores ó inhibidores apropiados, incluyendo inhibidores de nucleasa, proteasa y fosfatasa que preserven ó minimicen los cambios en las actividades de glicosilación en el lisado celular. Tales inhibidores incluyen, por ejemplo, quelatores tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido bis(P-aminoetil éter)N,N,N1,N1-tetraacético etilén glicol (EGTA), inhibidores de proteasa tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina, antídolor, e inhibidores de fosfatasa tales como fosfato, fluoruro de sodio, y vanadato. Los inhibidores pueden ser escogidos de modo que no interfieran con ó solamente afecten adversamente de manera mínima la actividad de glicosilación, ó las actividades, de interés. Los amortiguadores apropiados y condiciones para obtener lisados que contienen actividades enzimáticas se describen en, por ejemplo, Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999); Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Burtis and Ashwood, eds. W.B. Saunders, Philadelphia, (1999).

Un lisado celular puede ser procesado adicionalmente para eliminar ó minimizar la presencia de sustancia de interferencia, según sea apropiado. Si se desea, un lisado celular puede ser fraccionado por cualquiera de una variedad de métodos bien conocidos para aquellos versados en el arte, incluyendo fraccionamiento subcelular, y técnicas cromatográficas tal como intercambio iónico, fase inversa e hidrofóbica, exclusión de tamaño, afinidad, y cromatografía hidrofóbica por inducción de cargas (ver, por ejemplo, Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, third Edition, Springer-Verlag, New York (1993); Burton and Harding, J. Chromatogr. A 814:71-81 (1998)). Ó cualquiera otra técnica de purificación adecuada.

Un lisado celular puede ser preparado en el cual los organelos celulares completos permanecen intactos ó funcionales. Por ejemplo, un lisado puede contener uno ó más entre retículo endoplásmico duro intacto,

retículo endoplásmico blando intacto, ó aparato de Golgi intacto. Los métodos adecuados para preparar lisados que contienen organelos celulares intactos y para probar la funcionalidad de los organelos se describen en, por ejemplo, Moreau *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 266(7): 4329-4333; Moreau *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 266(7): 4322-4328; Rexach *et al.* (1991) J. Cell Biol. 114(2): 219-229; and Paulik *et al.* (1999) Arch. Biochem. Biophys. 367(2):265-273; cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

El polipéptido SAP puede ponerse en contacto solo una proteína purificada que tenga actividad de glicosilación. En algunas modalidades, el polipéptido SAP puede ponerse en contacto con más de una proteína purificada que tenga actividad de glicosilación. Una ó más proteínas con actividad de glicosilación pueden ser purificadas usando técnicas estándar de aislamiento de proteínas. Un polipéptido SAP puede ponerse en contacto con una ó más proteínas en un amortiguador adecuado durante un tiempo suficiente para inducir la modificación de los polipéptidos SAP según se describió antes. El polipéptido SAP puede ponerse en contacto con una ó más proteínas al mismo tiempo ó secuencialmente. Cuando el polipéptido SAP se pone en contacto secuencialmente con más de una proteína que tiene actividad de glicosilación, el polipéptido SAP puede, pero no requiere, ser purificado después de una ó más etapas. Esto es, un polipéptido SAP puede ponerse en contacto con la proteína con actividad "A" y luego ser purificado antes de poner en contacto la molécula con la proteína con actividad "B". Los métodos para modificar péptidos como tales son conocidos en el arte, por ejemplo, Lee and Park (2002) 30(6):716-720 y Fujita and Takegawa (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 282(3): 678-682, cuyos contenidos se incorporan a la presente en su totalidad.

En ciertos aspectos, los métodos de la presente divulgación comprenden una etapa de aislar un polipéptido SAP, por ejemplo, de una célula ó de los componentes de un lisado celular. Muchas técnicas estándar para aislar proteínas son conocidas en el arte. Por ejemplo, los métodos para aislar polipéptidos incluyen, sin limitarse a, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de fase inversa, cromatografía líquida (por ejemplo,

HPLC), cromatografía por afinidad (por ejemplo, cromatografía por quelación de metal ó por inmutioafinidad), cromatografía por intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, precipitación, solubilización diferencial, inmunoprecipitación centrifugación (por ejemplo, ultra 5 centrifugación, centrifugación con gradiente de sacarosa, etc.) ó cualquier combinación de las anteriores. En algunas modalidades, el polipéptido SAP puede estar conjugado con una etiqueta de afinidad para facilitar la purificación del polipéptido. Etiquetas de afinidad adecuadas para purificación del SAP incluyen, sin limitarse a, proteína de unión a chitina (CBP), proteína 10 de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), etiquetas de estreptavidina, biotina, y poli (His). Las etiquetas de afinidad pueden ser producidas como parte de la proteína recombinante (es decir, como una proteína de fusión que comprende un dominio de etiqueta de afinidad heterólogo y un dominio de polipéptido SAP) ó unidas (covalentemente ó no) 15 *in vivo* ó *in vitro* al polipéptido SAP. En algunas modalidades, se pueden usar múltiples etapas de purificación para aislar un polipéptido SAP. Por ejemplo, un polipéptido SAP que comprende una etiqueta de purificación puede ser purificado por afinidad desde un lisado celular ó mezcla multicomponente usando purificación por afinidad. Entonces el polipéptido SAP purificado por 20 afinidad puede ser purificado adicionalmente para remover cualesquier contaminantes menores no deseados mediante una etapa de purificación adicional, por ejemplo, cromatografía por exclusión de tamaño ó RP-HPLC. Cuando un polipéptido de la invención es producido en una célula, el polipéptido SAP puede ser aislado de la célula misma ó del medio en el cual 25 la célula fue cultivada. En algunas modalidades, los polipéptidos SAP de la invención son producidos y secretados por una célula en el medio de cultivo. En estas modalidades, el aislamiento puede comprender la separación de la fracción celular de la fracción soluble que contiene el SAP (por ejemplo mediante centrifugación).

30 En algunos aspectos, puede ser ventajoso vincular al polipéptido SAP con un soporte de fase sólida antes de poner en contacto la molécula objetivo con una ó más actividades de N-glicosilación. Tal enlace puede permitir una

más fácil purificación después de las modificaciones de N-glicosilación. Soportes de fase sólida adecuados incluyen, sin limitarse a, placas de ensayo de múltiples posos, partículas (por ejemplo, partículas magnéticas ó codificadas), una columna de cromatografía, ó una membrana.

- 5 En algunas modalidades, cualquiera de los polipéptidos SAP alterados descritos aquí puede ser sujetos a una parte heteróloga usando medios enzimáticos ó químicos. Una "parte heteróloga" se refiere a cualquier constituyente que está unido (por ejemplo, covalentemente ó no) a la molécula objetivo alterada, dicho constituyente es diferente de un
- 10 constituyente originalmente presente en el polipéptido SAP. La parte heteróloga incluye, por ejemplo, polímeros solubles e insolubles en agua, partes objetivo, partes terapéuticas, partes de diagnóstico, y biomoléculas.

- Los polipéptidos SAP de la invención pueden comprender uno ó más residuos de azúcar "modificados". Un grupo modificador puede sujetarse a
- 15 una parte de azúcar mediante medios enzimáticos, medios químicos ó una combinación de estos, para producir así un azúcar modificado, por ejemplo, galactosa, fucosa, ó ácido siálico modificados. Cuando se usa un ácido siálico modificado, se pueden usar en estos métodos una sialil-transferasa ó una transsialidasa. Los azúcares pueden ser sustituidos en cualquier posición que
- 20 permita la sujeción de la parte modificadora, que todavía permita al azúcar funcionar como un sustrato para la enzima usada para acoplar el azúcar modificado al péptido.

- En general, la parte de azúcar y el grupo modificador están ligados juntos mediante el uso de grupos reactivos, los cuales son típicamente
- 25 transformados por el proceso de enlace en un nuevo grupo funcional orgánico ó especie no reactiva. El(los) grupo(s) de azúcar funcional reactivo puede(n) estar localizado(s) en cualquier posición en la parte de azúcar. Los grupos reactivos y las clases de reacción útiles para practicar la presente invención son en general aquellos bien conocidos en el arte de la química bioconjugada.
- 30 Clases de reacciones actualmente preferidas disponibles con partes de azúcar reactivo son aquellos que proceden bajo condiciones relativamente

suaves. Estas incluyen, sin limitarse a, sustituciones nucleofílicas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con ésteres activos de haluros de acilo) y adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacciones Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se discuten en, por ejemplo, Smith y March, *Advanced Organic Chemistry*, 5th Ed., John Wiley & sons, New York, 2001; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney *et al.*, *Modification of Proteins; Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

- 10 Grupos funcionales reactivos útiles que penden de un núcleo de azúcar ó grupo modificador incluyen, sin limitarse a. (a) grupos carboxilo y varios derivados de estos (por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros ácidos, acil imidazoles, tioesteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo y aromáticos); (b) grupos
- 15 hidroxilo, que pueden ser convertidos a, por ejemplo, ésteres, éteres, aldehídos, etc.; (c) grupos haloalquilo, en donde el haluro puede posteriormente ser desplazado con un grupo nucleofílico tal como por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, un anión tiol, carbanión, ó un ión acoxida, resultando así en la sujeción covalente de un nuevo grupo en el grupo
- 20 funcional del átomo halógeno; (d) grupos dienofilo, que son capaces de participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos maleimido; (e) grupos aldehído ó cetona, tal que la derivación subsiguiente es posible por vía de la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, ó por vía de tales
- 25 mecanismos como la adición de Grignard ó la adición de alquil litio; (f) grupos sulfonil haluro para reaccionar posteriormente con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas; (g) grupos tiol, que pueden ser, por ejemplo, convertidos a disulfuros ó reaccionar con haluros de alquilo y acilo; (h) grupos amina ó sulfidrilo, que pueden ser, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados; (i)
- 30 alquenos, que pueden sufrir, por ejemplo, cicloadiciones, acilación, adición de Michael, metatésis, reacción de Heck, etc.; (j) epóxidos, que pueden reaccionar con, Por ejemplo, compuestos de aminas e hidroxilos.

Los grupos funcionales reactivos pueden ser escogidos de modo que no participen en, ó interfieran con, las reacciones necesarias para ensamblar los núcleos de azúcar reactivos ó los grupos modificadores. Alternativamente, un grupo funcional reactivo puede estar protegido para no participar en la
5 reacción por la presencia de un grupo protector. Aquellos versados en el arte entienden y saben cómo proteger un grupo funcional particular de modo que este no interfiera con un conjunto escogido de condiciones de reacción. Ejemplos de grupos protectores útiles, se pueden ver, por ejemplo, en Greene et al., *m Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New
10 York, 1991.

En algunas modalidades, el azúcar modificados un azúcar activado. Los azúcares modificados activados útiles en la presente invención son típicamente glicosidas que han sido alterados sintéticamente para incluir un grupo de salida activado. Como se usa aquí, el término "grupo de salida
15 activado" se refiere a aquellas partes que son fácilmente desplazadas en reacciones reguladas de sustitución nucleofílica. Muchos azúcares activados son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Vocadlo *et al.*, In *Carbohydrate Chemistry and Biology*, Vol. 2, Ernst *et al.*, Ed. Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2000; Kodama *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 34: 6419 (1993); Loughheed,
20 *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 37717 (1999)). Ejemplos de tales grupos de salida incluyen fluor, cloro, bromo, tosilato, mesilato, triflato y similares. Los grupos de salida activados preferidos para uso en la presente invención son aquellos que no estorban estéricamente y significativamente la transferencia enzimática de la glicosida al aceptador. De acuerdo a lo anterior, las
25 modalidades preferidas de derivados de glicosida activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, siendo los fluoruros de glicosilo los preferidos. Entre los fluoruros de glicosilo los más preferidos son fluoruro de α -galactosilo, fluoruro de α -manosilo, fluoruro de α -glucosilo, fluoruro de α -fucosilo, fluoruro de α -xilosilo, fluoruro de α -sialilo, fluoruro de α -
30 N-acetilglucosaminilo, fluoruro de α -N-acetilgalactosaminilo, fluoruro de β -galactosilo, fluoruro de β -manosilo, fluoruro de β -glucosilo, fluoruro de β -

fucosilo, fluoruro de β -xilosilo, fluoruro de β -sialilo, fluoruro de β -N-acetilglucosaminilo y fluoruro de β -N-acetilgalactosaminilo.

En ciertos aspectos, un residuo de azúcar modificado es conjugado a uno ó más polímeros solubles en agua. Muchos polímeros solubles en agua son conocidos por aquellos versados en el arte y son útiles para practicar la presente invención. El término polímero soluble en agua abarca especies tales como sacáridos (por ejemplo, dextrán, amilosa, ácido hialurónico, poli(ácido siálico), heparanas, heparinas, etc.); poli(aminoácidos); ácidos nucleicos; polímeros sintéticos (por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(éteres), por ejemplo, poli(etilén glicol)); péptidos, proteínas y similares. La presente invención puede ser practicada con cualquier polímero soluble en agua con la única limitación de que el polímero debe incluir un punto en el cual el resto del conjugado pueda ser sujetado.

Los métodos y química para la activación de polímeros y sacáridos solubles en agua al igual que los métodos para conjugar sacáridos y polímeros con varias especies se describen en la literatura. Los métodos comúnmente usados para la activación de polímeros incluyen la activación de grupos funcionales con bromuro de cianógeno, periodato, glutaraldehído, biepóxidos, epiclorhidrina, divinil sulfona, carbodiimida, haluros de sulfonilo, triclorotriazina, etc. (ver, R. F. Taylor, (1991), Protein Immobilization, Fundamentals and applications, Marcel Dekker, N. Y.; S. S. Wong, (1992), chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, CRC Press, Boca Ratón; G. T. Hermanson *et al.*, (1993), Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, N. Y.; Dunn, R. L., *et al.*, Eds. Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

En ciertos aspectos, un residuo de azúcar modificado es conjugado con uno ó más polímeros insolubles en agua. En algunas modalidades, la conjugación con un polímero insoluble en agua puede ser usada para suministrar un péptido terapéutico de una manera controlada. Los sistemas poliméricos de suministro de drogas son conocidos en el arte. Ver, por

ejemplo, Dunn et al., Eds. Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Aquellos versados en la técnica podrán apreciar que sustancialmente cualquier sistema de suministro de fármacos conocido es aplicable a los
5 conjugados de la presente invención.

Polímeros insolubles en agua representativos incluyen, sin limitarse a, polifosfacenos, poli(vinil alcoholes), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poliacrilamidas, polialquilén glicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, polivinil éteres, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo,
10 polivinilpirrolidona, poliglicolidas, polisiloxanos, 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,
15 poli(etilén glicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(acetato de vinilo), cloruro de polivinilo, poliestireno, polivinil pirrolidona, plurónicos, y polivinilofenol, y copolímeros de estos.

Estos y otros polímeros discutidos aquí pueden ser obtenidos fácilmente de fuentes comerciales tales como Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), Polysciences (Warrenton, Pa.), Aldrich (Milwaukee, Wis.), Fluka (Ronkonkoma, N.Y.), y BioRad (Richmond, Calif.), ó pueden ser sintetizados de monómeros obtenidos de los citados proveedores usando técnicas estándar. Polímeros biodegradables representativos útiles en los conjugados de la invención incluyen, sin limitarse a, poliláctidos, poliglicolidas y copolímeros de
25 estos, poli(tereftalato de etileno), poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(láctido-co-caprolactona), poli(láctido-co-glicolida), polianhídridos, poliortoésteres, mezclas y copolímeros de estos. Las composiciones que forman geles, tales como las que incluyen colágeno y plurónicos son de uso particular.

30 En modalidades preferidas, uno ó más residuos de azúcar modificados son conjugados con una ó más moléculas PEG.

En ciertos aspectos, el azúcar modificado es conjugado con una biomolécula. La biomolécula de la invención puede incluir, pero sin limitarse a, proteínas funcionales, enzimas, antígenos, anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos ó nucleosidas individuales, oligonucleótidos y ácidos nucleicos de una ó más cadenas), lectinas, receptores ó una combinación de estos. Algunas biomoléculas preferidas son esencialmente no fluorescentes, ó emiten una mínima cantidad de fluorescencia por lo que son inapropiadas para uso como un marcador fluorescente en un ensayo. Otras biomoléculas pueden ser fluorescentes.

10 En algunas modalidades, la biomolécula es una parte objetivo. Una "parte objetivo" y un "agente objetivo", como se usa aquí, se refiere a especies que se localizan selectivamente en un tejido particular ó región del cuerpo. En algunas modalidades, una biomolécula es seleccionada para dirigir el polipéptido SAP de la invención a un compartimiento intracelular específico, por lo tanto mejorando el suministro del péptido a ese compartimiento intracelular relativo a la cantidad de péptido no derivado que se suministra al tejido. La localización es mediada por el reconocimiento específico de determinantes moleculares, tamaño molecular del agente ó conjugado objetivo, interacciones iónicos, interacciones hidrofóbicos y similares. Otros
15 20 mecanismos de hacer un agente objetivo para un tejido ó región particular son conocidos a aquellos versados en la materia.

En algunas modalidades, el azúcar modificado incluye una parte terapéutica. Aquellos que son versados en la técnica podrán apreciar que existe una superposición entre la categoría de partes terapéuticas y biomoléculas, es decir, que muchas biomoléculas tienen propiedades ó potencial terapéuticos.

Clases de partes terapéuticas útiles incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroides; fármacos antiinflamatorios esteroides; adyuvantes; fármacos antihistamínicos; fármacos antitusivo; fármacos antipruríticos; fármacos anticolinérgicos; fármacos antieméticos y antináuseas; fármacos para la anorexia; fármacos de estímulo central;

fármacos antiarrítmicos; fármacos bloqueadores β -adrenérgicos; fármacos cardiotónicos; fármacos antihipertensivos; fármacos diuréticos; fármacos vasodilatadores; fármacos vasoconstrictores; fármacos antiúlceras; fármacos anestésicos; fármacos antidepresores; fármacos tranquilizadores y sedantes; 5 fármacos antosicóticos; y fármacos antiomicrobianos.

Otras partes fármacos útiles para practicar la presente invención incluyen fármacos antineoplásicos, agentes citocidales, antiestrógenos, y antimetabolitos. También están incluidos dentro de esta clase los agentes con base en radioisótopos tanto para diagnóstico (por ejemplo, imágenes) como 10 para terapia, y toxinas conjugadas.

Las partes terapéuticas también pueden ser una hormona, un relajante muscular, un antiespasmódico, agentes activadores de los huesos, agentes moduladores endocrinos, moduladores de diabetes, andrógenos, antidiuréticos, ó fármacos de calcitonina.

15 Otros grupos modificadores útiles incluyen fármacos inmunomoduladores, inmunosupresores, etc. Grupos con actividad antiinflamatoria, tal como sulindac, etodolac, cetoprofeno y cetorolac, también son útiles. Otros fármacos para uso en conjunción con la presente invención serán evidentes para aquellos que son versados en la materia.

20 Los polipéptidos SAP alterados por N-glicosilación producidos por los métodos de esta divulgación pueden ser homogéneos (es decir, la muestra del polipéptido SAP es uniforme en la estructura N-glicano específica) ó sustancialmente homogénea. Por "sustancialmente homogénea" se quiere significar que al menos cerca del 25% (por ejemplo, al menos cerca del 27%, 25 al menos cerca del 30%, al menos cerca del 35%, al menos cerca del 40%, al menos cerca del 45%, al menos cerca del 50%, al menos cerca del 55%, al menos cerca del 60%, al menos cerca del 65%, al menos cerca del 70%, al menos cerca del 75%, al menos cerca del 80%, al menos cerca del 85%, al menos cerca del 90%, ó al menos cerca del 95%, ó al menos cerca del 99%) 30 de los polipéptidos SAP contienen la misma estructura de N-glicano específica.

En algunas modalidades, los polipéptidos SAP variantes de la invención tienen un IC50 para inhibir la diferenciación de monocitos en fibroцитos in vitro que es menos de $\frac{1}{2}$, menos de $\frac{1}{3}$, menos de $\frac{1}{4}$, menos de $\frac{1}{10}$, ó menos de $\frac{1}{100}$ del de una muestra correspondiente del SAP tipo natural aislado de suero humano. Existen muchos métodos bien caracterizados para determinar la sensibilidad de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) ó células monocitos en SAP para la diferenciación de fibroцитos. Estos métodos pueden ser usados para determinar la potencia relativa de cualquiera de los polipéptidos SAP variantes de la invención en comparación con una muestra de SAP derivado del suero humano, cualquier otro polipéptido SAP variante, u otro agente supresor ó activador de fibroцитos. Los PBMC ó monocitos adecuados para uso en estos métodos pueden obtenerse de diversas líneas de cultivos de tejidos. Alternativamente, las células adecuadas para los ensayos de diferenciación de fibroцитos pueden ser obtenidas de cualquier muestra biológica que contenga células PBMC ó monocitos. La muestra biológica puede obtenerse de suero, plasma, tejido saludable, ó tejido fibrótico. En general, los ensayos de diferenciación de fibroцитos se llevan a cabo mediante incubar células PBMC ó monocitos en medios con diversas concentraciones de un polipéptido SAP para determinar el grado de diferenciación de fibroцитos. La concentración del SAP puede variar entre 0,0001 $\mu\text{g/mL}$ a 1 mg/mL , y en algunas modalidades es 0,001 $\mu\text{g/mL}$, 1,0 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 35 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 45 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$, ó 500 $\mu\text{g/mL}$. En algunos ensayos, el medio puede ser suplementado con entre 1 a 100 ng/mL de hMCSF; la concentración preferida del hMCSF es de 25 ng/mL . La indicación de que las PBMC y los monocitos han sido diferenciadas en fibroцитos puede ser determinada por una persona versada en la técnica. En general, los fibroцитos son morfológicamente definidos como células adherentes con una forma de huso alargado y con la presencia de un núcleo ovalado. En algunos ensayos, las células se fijan y se marcan con Hema 3 antes de enumerar los fibroцитos por conteo directo, por ejemplo, usando un microscopio invertido. La cantidad de diferenciación de fibroцитos es interpretada por una persona versada como una indicación de la

sensibilidad de una célula al SAP. Como se indicó por los ejemplos de la presente descripción, una supresión mayor de diferenciación de fibrocitos indica un mayor grado de sensibilidad al SAP.

Un método alternativo para medir la diferenciación de fibrocitos involucra determinar la expresión de marcadores de superficie celular ó factores secretados específicos a fibrocitos, por ejemplo, citocinas (por ejemplo, IL-1ra, ENA-78/CXCL-5, PAI-1), fibronectina, colágeno-1. Los métodos para detectar ó cuantificar marcadores de superficie celular ó factores secretados son bien conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitarse a, varias técnicas basadas en ELISA y FACS usando anticuerpos inmunoreactivos contra uno ó más marcadores específicos a fibrocitos. Como se describió en los ejemplos de la presente divulgación, medir la expresión de Quimiocina Derivada de Macrófago (MDC) es un método efectivo para determinar la diferenciación de fibrocitos.

Los métodos para detectar ó caracterizar la N-glicosilación (por ejemplo, N-glicosilación alterada) de un polipéptido SAP incluye secuenciador de AND asistido (DSA), electroforesis de carbohidratos fluoróforo asistido (FACE) ó Espectrometría de masa por tiempo de vuelo de superficie mejorada por láser de desorción/ionización (SELDI-TOF MS). Por ejemplo, un análisis puede usar DSA-FACE en el cual, por ejemplo, las glicoproteínas son desnaturalizadas seguido por inmovilización, por ejemplo, sobre una membrana. Las glicoproteínas pueden entonces ser reducidas con un agente reductor adecuado tal como ditioneitol (DATA) ó β -mercaptoetanol. Los grupos sulfhidrilo de las proteínas pueden ser carboxilados usando un ácido tal como el ácido yodoacético. Luego, los N-glicanos pueden ser liberados de la proteína usando una enzima tal como N-glicosidasa F. Los N-glicanos, opcionalmente, pueden ser reconstituidos y derivados mediante aminación reductiva. Los N-glicanos derivados pueden entonces ser concentrados. La instrumentación adecuada para el análisis de los N-glicanos incluye, por ejemplo, el secuenciador de ADN ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems). El análisis de datos se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, el software GENESCAN®.3.1 (Applied Biosystems). Opcionalmente, las manoproteínas

aisladas pueden ser tratadas adicionalmente con una ó más enzimas para confirmar su estado de N-glicano. Enzimas de ejemplo incluyen, por ejemplo, α -manosidasa ó α -1,2manosidasa. Métodos adicionales de análisis de N-glicanos incluyen, por ejemplo, espectrometría de masa (por ejemplo, MALDI-TOF-MS), cromatografía con líquido a alta presión (HPLC) en fase normal, cromatografía de fase inversa e intercambio iónico (por ejemplo, con detección amperométrica pulsada cuando los glicanos no están etiquetados y con absorbencia ó fluorescencia con UV si los glicanos están etiquetados apropiadamente). Ver también Callewaert *et al.* (2001) *Glyobiology* 11(4):275-281 y Freire *et al.* (2006) *Bioconjug. Chem.* 17(2):559-564, cuyos contenidos se incorporan a la presente como referencia en su totalidad.

Métodos de tratamiento

En un aspecto, la divulgación suministra métodos para tratar un desorden sensible al SAP en un paciente mediante administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido SAP variante de la invención a un paciente que lo necesita. La dosificación y la frecuencia del tratamiento puede determinarse por aquellos versados en el arte y variará dependiendo de los síntomas, edad y peso corporal del paciente, y la naturaleza y severidad de desorden que va a ser tratado ó prevenido. En algunas modalidades, un polipéptido SAP variante es administrado a un paciente una ó dos veces por día, una ó dos veces por semana, una ó dos veces por mes, ó justo antes ó durante la aparición de los síntomas.

Las dosificaciones pueden ser fácilmente determinadas por técnicas conocidas de aquellos versados en la materia ó como se enseña en la presente. La toxicidad y la eficacia terapéutica del SAP se pueden determinar por los procedimientos farmacéuticos estándar en animales experimentales, por ejemplo, determinar el LD₅₀ y el ED₅₀. El ED₅₀ (Dosis Efectiva 50) es la cantidad de fármaco requerida para producir un efecto especificado en el 50% de una población animal. El LD₅₀ (Dosis Letal 50) es la dosis del fármaco que mata el 50% de una muestra de población.

En algunas modalidades, el desorden sensible al SAP es fibrosis. El uso de SAP como tratamiento terapéutico para la fibrosis se ha descrito en la solicitud de patente Estadounidense No. 2007/0243163, la cual se incorpora a la presente como referencia. Los trastornos relacionados con la fibrosis que

5 pueden tener la posibilidad de ser tratados con el método objeto incluyen, sin limitarse a, enfermedad de colágeno, enfermedad intersticial de pulmón, enfermedad fibrótica humana de pulmón (por ejemplo, bronquiolitis obliterativa, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar de una etiología conocida, estroma tumoral en enfermedad del pulmón, esclerosis sistémica

10 que afecta los pulmones, el síndrome de Hermansky-Pudlak, neumoconiosis de los trabajadores del carbón, asbestosis, silicosis, hipertensión pulmonar crónica, hipertensión pulmonar asociada con el SIDA, sarcoidosis, asma moderada a severa y similares), enfermedad vascular fibrótica, esclerosis arterial, aterosclerosis, venas varicosas, infartos coronarios, infartos

15 cerebrales, fibrosis miocárdica, fibrosis musculoesquelética, adhesiones post quirúrgicas, enfermedad del riñón humano (por ejemplo, síndrome nefrítico, síndrome de Alport, nefropatía asociada con el SIDA, enfermedad policística del riñón, enfermedad de Fabry, nefropatía diabética, glomerulonefritis crónica, nefritis asociada con lupus sistémico, y similares), esclerosis

20 sistémica progresiva (PSS), colangitis biliar primaria (PSC), fibrosis hepática, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, fibrosis cística, enfermedad crónica de injerto versus anfitrión, escleroderma (local y sistémica), oftalmopatía de Grave, retinopatía diabética, glaucoma, enfermedad de Peyronie, fibrosis del pene, uretroestenosis después de cistoscopia, acreción

25 interna después de cirugía, cicatrices, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal idiopática, fibrosis peritoneal de una etiología conocida, ergotismo inducido por drogas o fármacos, fibrosis incidente en cáncer benigno o maligno, fibrosis incidente en infección microbiana (por ejemplo, viral, bacteriana, parasítica, fúngica, etc.), enfermedad de Alzheimer, fibrosis incidente en

30 enfermedad inflamatoria intestinal (incluyendo la formación de estenosis en la enfermedad de Crohn y la colitis microscópica), tumores de células estromales, fibrosis inducida por contaminación química o ambiental (por

ejemplo, quimioterapia contra el cáncer, pesticidas, ó radiación (por ejemplo, radioterapia contra el cáncer)).

En algunas modalidades, el desorden relacionado con fibrosis se selecciona entre escleroderma sistémico ó local, queloides, cicatrices hipertróficas, aterosclerosis, restenosis, inflamación y fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis como resultado de la infección de hepatitis B ó C crónica, enfermedad renal, enfermedad cardíaca que resulta de un tejido de cicatriz, degeneración macular, y retinopatía retinal y vitreal. En algunas modalidades, el desorden relacionado con la fibrosis resulta de fármacos de quimioterapia, fibrosis inducida por radiación, y daños y quemaduras. En algunas modalidades, el trastorno ó condición relacionado con la fibrosis resulta de el cicatrizado post quirúrgico, por ejemplo, después de trabeculectomía u otra cirugía de filtración del ojo.

En algunas modalidades, el desorden sensible al SAP es un desorden de hipersensibilidad tal como aquellos mediados por respuestas Th 1 ó Th 2. El uso del SAP como un tratamiento terapéutico para los trastornos de hipersensibilidad también se ha descrito en la solicitud Provisional Estadounidense No. 61/209.795, la cual se incorpora a la presente como referencia. Los trastornos relacionados con la hipersensibilidad que pueden ser tratados con SAP incluyen, sin limitarse a, rinitis alérgica, sinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, broncoconstricción alérgica, disnea alérgica, incremento alérgico en la producción de moco en los pulmones, eccema atópico, dermatitis, urticaria, anafilaxis, neumonitis, y asma alérgico.

En algunas modalidades, un polipéptido SAP variante de la invención puede ser usado para tratar respuestas inmunes específicas a alérgenos, tal como anafilaxis, a varios antígenos, incluyendo, sin limitarse a, antimicrobianos (por ejemplo, cefalosporinas, sulfonamidas, penicilina y otras β -lactamas), anticonvulsiantes (por ejemplo, fenitoina, fenobarbital, carbamazepina, dapsona, alopurinol, y minociclina), quimioterapéuticos (por ejemplo, taxanos, compuestos de platino, asparaginasa y epipodofilotoxinas), heparina, insulina, protamina, aspirina y otros fármacos

antiinflamatorios no esteroideos, relajantes musculares (por ejemplo, succinilcolina, atracurium, vecuronio y pancuronio), agentes de inducción (por ejemplo, barbituratos, etomidato, propofol), narcóticos (por ejemplo, fentanil, meperidina, morfina), coloides para expansión del volumen intravascular, materiales de radiocontraste, productos de sangre, látex, productos animales, caspa animal, ácaros del polvo, insectos (por ejemplo, picaduras, mordeduras ó veneno), cosméticos, metales (por ejemplo, níquel, cobalto, y cromados), plantas, esporas, polen, alimentos (por ejemplo, leche, huevos, trigo, soya, maní y nueces de árbol, comida de mar), vacunas, y antígenos fúngicos (por ejemplo, las especies *Aspergillus*, *Curvularia*, *Exserohilum*, y *Alternaria*).

En algunas modalidades, el desorden sensible al SAP es un desorden autoinmune tal como aquellos mediados por respuestas Th 1 y Th 2. El uso del SAP como un tratamiento terapéutico para trastornos autoinmunes se describe también en la solicitud provisional Estadounidense No. 61/209.845, la cual se incorpora a la presente como referencia. Los trastornos relacionados con autoinmunidad que pueden ser tratados con SAP incluyen, sin limitarse a, diabetes tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriática, miocarditis autoinmune, pénfigo, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, artritis de Lyme crónica, cardiomiopatía dilatada familiar, dermatomiositis juvenil, policondritis, síndrome de Sjogren, psoriasis, artritis idiopática juvenil, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y enfermedad de injerto contra anfitrión.

En algunas modalidades, el desorden sensible al SAP es una mucositis. El uso del SAP como un tratamiento terapéutico de la mucositis se describe también en la solicitud provisional Estadounidense No. 12/217.614, la cual se incorpora a la presente como referencia. Los métodos de la invención pueden ser útiles para tratar la mucositis oral, esofageal y gastrointestinal, al igual que úlceras gástricas y duodenales, ó erosiones del estómago y esófago.

En algunas modalidades, un polipéptido SAP variante de la invención puede ser usado para tratar una enfermedad ó condición inflamatoria. En algunas modalidades, la enfermedad inflamatoria puede ser una infección viral, bacteriana, fúngica ó parasítica. El uso del SAP como un tratamiento terapéutico de la infección viral se ha descrito también en la patente Estadounidense 6.406.698 y en la solicitud de patente internacional No. WO1997/026906, las cuales se incorporan a la presente como referencia.

Preparaciones y formulaciones farmacéuticas

En algunas modalidades, los métodos descritos aquí involucran la administración de al menos un polipéptido SAP variante de la invención como agente terapéutico a un sujeto. Los agentes terapéuticos de la invención pueden ser formulados de una manera convencional usando uno ó más portadores ó excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, los agentes terapéuticos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden ser formulados para la administración por, por ejemplo, inyección (por ejemplo, SubQ, IM, IP), inhalación ó insuflación (sea por la boca ó por la nariz) ó administración oral, bucal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral ó rectal. En ciertas modalidades, los agentes terapéuticos pueden ser administrados localmente, en el sitio donde se encuentran presentes las células objetivo, es decir, en un tejido, órgano, ó fluido específico (por ejemplo, sangre, fluido cerebroespinal, masa tumoral, etc.).

La presente invención suministra adicionalmente el uso de cualquier polipéptido SAP variante de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento ó prevención de un desorden ó condición, como se describió aquí, en un paciente. En algunos aspectos, cualquier polipéptido SAP variante de la invención puede ser usado para hacer una preparación farmacéutica para uso en el tratamiento ó prevención de una enfermedad ó condición según se ha descrito aquí.

Los agentes terapéuticos pueden ser formulados en una variedad de modos de administración, incluyendo la administración sistémica, tópica ó localizada. Las técnicas y formulaciones por lo general pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA.

- 5 Para la administración parenteral, se prefiere la inyección, incluyendo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, y subcutánea. Para la inyección, los compuestos pueden ser formulados en soluciones líquidas, preferiblemente en amortiguadores fisiológicamente compatibles aceptables tales como la solución de Hank ó la solución de Ringer. Adicionalmente, los
- 10 compuestos pueden ser formulados en forma sólida y pueden ser disueltos ó suspendidos inmediatamente antes de uso. Las formas liofilizadas también se incluyen. En algunas modalidades, los agentes terapéuticos pueden ser administrados a células mediante una variedad de métodos conocidos por aquellos conocedores de la materia, incluyendo, pero sin limitarse a,
- 15 encapsulación en liposomas, por iontoforesis, ó por la incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, y microesferas bioadhesivas.

- Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas, pastillas, ó cápsulas preparadas por
- 20 medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tal como agentes de ligado (por ejemplo, almidón de maíz previamente gelatinizado, polivinilpirrolidona ó hidroxipropil metilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, ó hidrogenfosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco ó sílice);
- 25 desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa ó glicolato de almidón de sodio); ó agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Las tabletas pueden ser recubiertas por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes ó suspensiones, ó pueden presentarse
- 30 como un producto seco para ser reconstituido con agua ú otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden ser preparados por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales

como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol jarabe, derivados de celulosa ó grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsificantes (por ejemplo, lecitina ó acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, etil alcohol ó aceites vegetales fraccionados); y preservativos (por ejemplo, metil ó propil-p-hidroxibenzoatos ó ácido sórbico). Las preparaciones pueden también contener sales amortiguadoras, saborizantes, colorantes y agentes edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden ser formuladas adecuadamente para dar liberación controlada del compuesto activo.

10 Para la administración por inhalación (por ejemplo, suministro pulmonar), los agentes terapéuticos pueden ser convenientemente suministrados en la forma de una presentación de rociado en aerosol desde paquetes presurizados ó nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, 15 diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono ú otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede ser determinada mediante suministrar una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas ó cartuchos de por ejemplo, gelatina, para uso en un inhalador ó insuflador pueden ser formuladas para contener una mezcla de polvo del 20 compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa ó almidón.

En los métodos de la invención, los compuestos farmacéuticos también pueden ser administrados por rutas intranasales ó intrabronquiales incluyendo insuflación, polvos, y formulaciones en aerosol (ejemplos de inhalantes esteroides, se puede ver Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacology. 35:1187- 25 1193; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75: 107-111). Por ejemplo, las formulaciones en aerosol pueden ser colocadas en propelentes presurizados aceptables, tales como diclorofluorometano, propano, nitrógeno, y similares. Estos también pueden ser formulados como preparaciones farmacéuticas no presurizadas tales como un nebulizador ó un atomizador. 30 Típicamente, talo administración se encuentra en un amortiguador acuoso farmacológicamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para suministro respiratorio (por ejemplo, intranasal, inhalación, etc.) de polipéptidos SAP variantes se puede preparar en forma sólida ó líquida.

Los polipéptidos SAP de la invención pueden ser formulados para administración parenteral mediante inyección, mediante inyección bolo ó infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden ser presentadas en formas de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas ó en recipientes de múltiples dosis, con un preservativo agregado. Las composiciones pueden tomar tales formas como suspensiones, soluciones ó emulsiones en vehículos aceitosos ó acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores ó de dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril libre de pirógeno, antes del uso.

Además, los polipéptidos SAP de la invención pueden también ser formulados como preparación en depósito. Tales formulaciones de larga acción pueden ser administradas por implantación (por ejemplo, subcutáneamente ó intramuscularmente) ó por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los agentes terapéuticos pueden ser formulados con materiales poliméricos ó hidrofóbicos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) ó con resinas de intercambio iónico, ó como derivados poco solubles, por ejemplo, sales poco solubles. La fórmula de liberación controlada incluye también parches.

En ciertas modalidades, los compuestos descritos aquí pueden ser formulados para ser suministrados al sistema nervioso central (CNS) (revisado en Begley, Pharmacology & Therapeutics 104: 29-45 (2004)). Los modelos convencionales para suministro de fármacos al CNS incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral ó infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, la producción de una proteína quimérica de fusión que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad por una molécula de superficie celular endotelial en combinación con un agente que es en si mismo incapaz de

cruzar la barrera sangre-cerebro en un intento de explotar uno de los caminos de transporte endógenos de la barrera sangre-cerebro); estrategias farmacológicas diseñadas para incrementar la solubilidad de lípidos en un agente (por ejemplo, conjugación de agentes solubles en agua con portadores de lípidos ó colesterol); y la disrupción transitoria de la integridad del BBB por disrupción hiperosmótica (que resulta de la infusión de una solución de manitol dentro de la arteria carótida ó el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

En ciertas modalidades, los polipéptidos SAP de la invención se incorporan en una formulación tópica que contiene un portador tópico que es en general adecuado para la administración de fármacos tópicos y comprende cualquier material conocido en el arte. El portador tópico puede seleccionarse de modo que se suministre la composición en la forma deseada, por ejemplo, como un ungüento, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, solución, ó similares, y puede comprender un material de origen natural ó sintético. Es preferible que el portador seleccionado no afecte de manera adversa al agente activo ó a otros componentes de la formulación tópica. Ejemplos de portadores tópicos adecuados para uso en la presente invención incluyen agua, alcoholes y otros solventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, jalea de petróleo, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras, y similares.

Las composiciones farmacéuticas (incluyendo preparaciones cosméticas) pueden comprender cerca de 0,00001 a 100% tal como desde 0,001 a 10% ó desde 0,1% a 5% en peso de uno ó más de los polipéptidos SAP variantes descritos aquí. En ciertas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el rango de aproximadamente 0,25% en peso a 75% en peso de la formulación, preferiblemente en el rango de aproximadamente 0,25% en peso a 30% en peso de la formulación, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 0,5% en peso a 15% en peso de la formulación, y más preferiblemente en el rango de aproximadamente 1,0% en peso a 10% en peso de la formulación.

Las condiciones del ojo pueden ser tratadas ó prevenidas mediante, por ejemplo, la inyección sistémica, tópica, intraocular de los agentes terapéuticos, ó por la inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libere los agentes terapéuticos. Los polipéptidos SAP de la invención pueden ser suministrados en un vehículo oftalmológico farmacéuticamente aceptable, de modo que el compuesto es mantenido en contacto con la superficie ocular durante un tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre las regiones cornea e interna del ojo, como por ejemplo la cámara anterior, conjuntiva, la cámara posterior, el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el humor vítreo, la córnea, el iris/ciliar, lentes, coroides/retina y esclera. El vehículo oftalmológico farmacéuticamente aceptable puede, por ejemplo, ser un ungüento, aceite vegetal ó una material de encapsulación. Alternativamente, los compuestos pueden ser inyectados directamente en el humor vítreo y acuoso. En una alternativa adicional, los compuestos pueden ser administrados de manera sistémica, tal como por infusión ó inyección intravenosa, para el tratamiento del ojo.

Los agentes terapéuticos descritos aquí pueden ser almacenados en un ambiente libre de oxígeno de acuerdo con los métodos del arte.

Composiciones ilustrativas comprenden un polipéptido SAP con uno –o más portadores farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. El(los) portador(es) debe(n) ser “farmacéuticamente aceptables” en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no provocar un efecto dañino inaceptable en el sujeto. Tales portadores se describen aquí ó de otra forma son bien conocidos para aquellos versados en el arte de la farmacología. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas están libres de pirógenos y son adecuadas para su administración en pacientes humanos. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas no irritan y son adecuadas para su administración en pacientes humanos. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas están libres de alérgenos y son adecuadas para su administración en pacientes humanos. Las composiciones farmacéuticas

pueden ser preparadas por cualquiera de los métodos bien conocidos en el arte de la farmacia.

En algunas modalidades, un polipéptido SAP es administrado en una formulación de liberación temporizada, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de baja liberación. Un polipéptido SAP puede ser logrado mediante incluir en la composición agentes que retardan la absorción, por ejemplo, hidrogeles de monoestearato de aluminio y gelatina.

Los métodos para suministrar compuestos de ácido nucleico son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Akhtar *et al.*, 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; y Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Sullivan *et al.*, Solicitud Internacional No. WO 94/02595). Estos protocolos pueden ser utilizados para el suministro de virtualmente cualquier compuesto de ácido nucleico. Los compuestos de ácido nucleico pueden ser administrados a las células mediante una variedad de métodos conocidos por aquellos versados en la técnica, incluyendo, sin limitarse a, encapsulación en liposomas, por iontoforesis, ó mediante la incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, y microesferas bioadhesivas. Alternativamente, la combinación ácido nucleico y vehículo se suministra localmente mediante inyección directa ó mediante el uso de una bomba de infusión. Otras rutas de suministro incluyen, sin limitarse a, suministro oral (forma de tableta ó píldora) ó intratecal (Gold, 1997, Neuroscience, 76, 1153-1158). Otros modelos incluyen el uso de varios sistemas portadores y de transporte, por ejemplo por medio del uso de conjugados y polímeros biodegradables. Para tener una visión comprensible de las estrategias de suministro de fármacos, ver Ho *et al.*, 1999, Curr. Opin. Mol. Ther., 1, 336-343 y Jain, Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities, Decision Resources, 1998 y Groothuis *et al.*, 1997, J. Neuro Virol., 3, 387-400. Descripciones más detalladas del suministro y administración del ácido nucleico se proveen en Sullivan *et al.*, supra, Draper *et al.*, PCT WO93/23569, Beigelman *et al.*, Solicitud Internacional No. WO99/05094, y Klimuk *et al.*, Publicación de Solicitud Internacional No. WO99/04819.

Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la invención anteriormente descrita, al igual que para establecer lo mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos de ninguna manera
5 sirven para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino que se presentan con propósitos ilustrativos.

EJEMPLOS

**Ejemplo 1: El SAP recombinante es más potente que el SAP derivado del
10 suero humano.**

El SAP humano recombinante aislado de células CHO-S (rhSAP) y el SAP derivado del suero humano (hSAP) fueron ensayados en cuanto a bioactividad usando un bioensayo *in vitro*. En este ensayo, Celulas Mononucleares de Sangre Periférica enriquecidas con monocitos (PBMC)
15 fueron incubadas con concentraciones variables de rhSAP ó hSAP durante 96 horas. Luego de esta incubación, los sobrenadantes del cultivo resultantes fueron removidos y ensayados mediante ELISA para cuantificar la cantidad de Quimiocina Derivada de Macrofagos (MDC) producida. El MDC es producido por fibrocitos y por lo tanto es un indicador de la diferenciación de monocitos
20 en fibrocitos. Mediante comparar la concentración inhibitoria, 50% (IC₅₀) de la muestra con el estándar de referencia hSAP, la potencia relativa del SAP glicovariante puede ser determinada. El resultado es expresado en una proporción del IC₅₀ de la muestra contra el estándar de referencia hSAP.

Todas las muestras y estándares de SAP fueron diluidos inicialmente
25 hasta una concentración de 1,0 mg/mL en el Medio Suplementado FibroLife. Los estándares de SAP fueron diluidos de manera seriada para generar concentraciones estándar de trabajo de 60, 30, 20, 13,4, 8,8, 6,0, 3,0, 1,5, y 0,75 µg/mL (concentración estándar final de 30, 15, 10, 6,7, 4,4, 3,0, 1,5, 0,75 y 0,375 µg/mL. Ver la siguiente Tabla 1.

Concentración	estándar	Volumen	del	Volumen	del	Medio
---------------	----------	---------	-----	---------	-----	-------

del rhSAP de trabajo	estándar	Suplementado FibroLife
60	60 (1mg/mL)	940
30	600 (60µg/mL)	600
20	800 (30µg/mL Std)	400
13,4	800 (20µg/mL Std)	400
8,8	800 (13,4µg/mL Std)	400
6,0	800 (8,8µg/mL Std)	400
3,0	600 (6,0µg/mL Std)	600
1,5	600 (3,0µg/mL Std)	600
0,75	600 (1,5µg/mL Std)	600

Con el objeto de prepararse para el ensayo ELISA, el anticuerpo de captura (es decir, el MDC antihumano de ratón) fue diluido a la concentración de trabajo en PBS sin proteína portadora. El anticuerpo de captura diluido fue
5 usado para recubrir placas de 96 pozos, y luego cada una de las placas fue sellada e incubada durante la noche a temperatura ambiente. Antes de usar las placas recubiertas, cada pozo fue aspirado y lavado con amortiguador de lavado, se repitió el proceso dos veces para un total de tres lavados. Las placas fueron entonces bloqueadas mediante agregar 300 µL del reactivo
10 diluyente a cada pozo e incubar a temperatura ambiente durante una hora. Después de la incubación se repitió el procedimiento de aspiración y lavado de los pozos.

Para el ensayo ELISA, se agregó a cada pozo los sobrenadantes de los cultivos de monocitos/fibroцитos ó los estándares SAP. La placa es
15 entonces incubada a temperatura ambiente durante 2 horas antes de aspirar y

lavar los pozos. Entonces se agregaron a cada pozo 100 μ L de una dilución de trabajo de Streptavidina-HRP. La placa fue incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de agregar 50 μ L de Solución Stop a cada pozo. Inmediatamente, la densidad óptica de cada pozo fue medida usando un lector de microplaca calibrado a 450 nm. Si hubo corrección de longitud de onda disponible, el lector de microplaca se calibró a 540 nm ó 570 nm. Si la corrección de longitud de onda no estaba disponible, entonces las lecturas a 540 nm ó 570 nm fueron restadas de las lecturas a 450 nm. Esta resta corrige las imperfecciones ópticas en la placa.

10 Tanto el rhSAP como el hSAP fueron ensayados en cuanto a bioactividad usando este ensayo (Figura 1). En promedio, el rhSAP es 3,4 veces más activo que el hSAP (el promedio es de 7 experimentos independientes).

15 **Ejemplo 2: Modificación de las estructuras glicano del SAP**

Usando técnicas de glicomodelado *in vitro*, las partes glicano en una muestra de SAP humano recombinante (rhSAP) fueron modificadas para reemplazar las partes de ácido siálico terminales α 2,3-ligadas con partes de ácido siálico terminales α 2,6-ligadas (Figura 2, A y B). De manera similar, una muestra de SAP derivado de suero humano (hSAP) fue también modificado reemplazando las partes de ácido siálico terminales α 2,6-ligadas con partes de ácido siálico terminales α 2,3 ligadas (Figura 2, C y D). Además, como el rhSAP aislado de células CHO-S está solamente sializado parcialmente, una muestra de rhSAP fue tratada para sialisar completamente las estructuras glicano unidas con partes de ácido siálico terminales α 2,3 ligadas (Figura 2, E y F).

Tanto el rhSAP como el hSAP (Calbiochem Cat#970549) fueron tratados con α 2,3,6,8,9-sialidasa (Sigma Cat#N8271) para desialisar completamente los péptidos. Después del tratamiento con sialidasa durante 17 horas, el rhSAP y el hSAP desializados (es decir asialo) fueron purificados

usando cromatografía por afinidad con fosfoetanolamina (PE) y exclusión por tamaño (Sephadex 200 prep grade). Los polipéptidos SAP asialos purificados fueron entonces tratados enzimáticamente usando α 2,3- ó α 2,6-sialiltransferasas (Calbiochem Cat#566223) en la presencia de CMP-ácido siálico (Calbiochem Cat#233264) durante 17 horas a 37°C. Las siguientes Tablas suministran los detalles de cada mezcla de reacción.

Reacciones de rhSAP asialo (Rxns)			
Tratamiento con α 2,3 sialiltransferasa (ST3Gal3)			
	parámetro	unidades	valor
Materiales reactivos rhSAP, ST3Gal3	[rhSAP asialo] stk	mg/mL	10,8
	PM del rhSAP asialo	g/mol	116293
	[rhSAP asialo] stk	μ M	93
	Max [Galactosa]	μ M	929
	[ST3Gal3] stk	mg/mL	0,9
	PM de ST3Gal3	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	μ M	10,7
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	PM del CMP-SA	g/mol	658,4
	[CMP-SA] stk	mM	38
Volúmenes de rxn	μ L de rhSAP asialo en rxn	μ L	260
	μ L de ST3Gal3 en rxn	μ L	50
	μ L de CMP-SA en rxn	μ L	75
	Amortiguador (10mM de HEPES/150 mM de NaCl, pH 8)	μ L	615
	Tot vol de rxn	μ L	1000
Concentraciones rxn	[rhSAP asialo] rxn	μ M	24,1
	Max [Galactosa]	μ M	241
	[SAP] rxn	mg/mL	2,8

	[ST3Gal3] rxn	µM	0,5357
	[ST3Gal3] rxn	mg/mL	0,045
	[CMP-SA] rxn	mM	2,85
	rhSAP asialo:ST3	Prop. De masa	62
	rhSAP asialo:ST3	Prop. Molar	45
	CMP-SA:ST3	Prop. Molar	5316
	CMP-SA: rhSAP asialo	Prop. Molar	118
	CMP-SA:Galactosa	Prop. Molar	11,8
Tratamiento con α2,6 sialiltransferasa (ST6 Rxn)			
	Parámetro	unidades	valor
Materiales reactivos rhSAP, ST6	[rhSAP asialo] stk	mg/mL	10,8
	PM del rhSAP asialo	g/mol	116293
	[rhSAP asialo] stk	µM	93
	Max [Galactosa]	µM	929
	[ST6] stk	mg/mL	0,205
	PM del ST6	g/mol	42000
	[ST6] stk	µM	4,9
	[[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	PM del CMP-SA	g/mol	658,4
	[CMP-SA] stk	mM	38
Volúmenes rxn	µL de rhSAP asialo en rxn	µL	260
	µL de ST6 en rxn	µL	30
	µL de CMP-SA en rxn	µL	75
	Amortiguador (10mM de HEPES/150 mM de NaCl, pH 8)	µL	635
	Tot vol de rxn	µL	1000
	[rhSAP asialo] rxn	µM	24,1
	Max [Galactosa]	µM	241
	[rhSAP asialo] rxn	mg/mL	2,8

Concentraciones rxn	[ST6] rxn	µM	0,146
	[ST6] rxn	mg/mL	0,006
	[CMP-SA] rxn	mM	2,85
	rhSAP asialo:ST6	Prop. de masa	457
	rhSAP asialo:ST6	Prop. Molar	165
	CMP-SA:ST6	Prop. Molar	19448
	CMP-SA: rhSAP asialo	Prop. Molar	118
	CMP-SA:Galactosa	Prop. Molar	11,8

hSAP asialo Rxns			
Tratamiento con α2,3 sialiltransferasa (ST3Gal3)			
	parámetro	unidades	Valor
Materiales reactivos hSAP, ST3Gal3	[hSAP asialo] stk	mg/mL	5,6
	PM del SAP	g/mol	116293
	[hSAP asialo] stk	µM	48
	Max [Galactosa]	µM	482
	[ST3Gal3] stk	mg/mL	0,9
	PM de ST3Gal3	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	µM	10,7
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	PM del CMP-SA	g/mol	658,4
	[CMP-SA] stk	mM	38
Volúmenes de rxn	µL de hSAP asialo en rxn	µL	500
	µL de ST3Gal3 en rxn	µL	50
	µL de CMP-SA en rxn	µL	75
	Amortiguador (10mM de HEPES/150 mM de NaCl, pH 8)	µL	375
	Tot vol de rxn	µL	1000

Concentraciones rxn	[hSAP asialo] rxn	µM	24,1
	Max [Galactosa]	µM	241
	[hSAP asialo] rxn	mg/mL	2,8
	[ST3Gal3] rxn	µM	0,54
	[ST3Gal3] rxn	mg/mL	0,045
	[CMP-SA] rxn	mM	2,85
	hSAP asialo:ST3	Prop. De masa	62
	hSAP asialo:ST3	Prop. Molar	45
	CMP-SA:ST3	Prop. Molar	5316
	CMP-SA: hSAP asialo	Prop. Molar	118
	CMP-SA:Galactosa	Prop. Molar	11,8
Tratamiento con α2,6 sialiltransferasa (ST6 Rxn)			
	Parámetro	unidades	Valor
Materiales reactivos hSAP, ST6	[hSAP asialo] stk	mg/mL	5,6
	PM del hSAP asialo	g/mol	116293
	[hSAP asialo] stk	µM	48
	Max [Galactosa]	µM	482
	[ST6] stk	mg/mL	0,205
	PM del ST6	g/mol	42000
	[ST6] stk	µM	4,9
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	PM del CMP-SA	g/mol	658,4
	[CMP-SA] stk	mM	38
Volúmenes rxn	µL de hSAP asialo en rxn	µL	500
	µL de ST6 en rxn	µL	30
	µL de CMP-SA en rxn	µL	75
	Amortiguador (10mM de HEPES/150 mM de NaCl, pH 8)	µL	395
	Tot vol de rxn	µL	1000

Concentraciones rxn	[hSAP asialo] rxn	μM	24,1
	Max [Galactosa]	μM	241
	[hSAP asialo] rxn	mg/mL	2,8
	[ST6] rxn	μM	0,146
	[ST6] rxn	mg/mL	0,006
	[CMP-SA] rxn	mM	2,85
	hSAP asialo:ST6	Prop. de masa	455
	hSAP asialo:ST6	Prop. Molar	164
	CMP-SA:ST6	Prop. Molar	19448
	CMP-SA: hSAP asialo	Prop. Molar	118
	CMP-SA:Galactosa	Prop. Molar	11,8

En una reacción separada, se llevó a cabo la sialización completa usando α2,3-sialiltransferasa sin primero desialisar la molécula, a 37°C durante 17 horas de acuerdo con la siguiente tabla.

Tratamiento con α2,3 sialiltransferasa (ST3Gal3)			
	parámetro	unidades	valor
Materiales reactivos rhSAP, ST3Gal3	[rhSAP] stk	mg/mL	19,8
	PM del rhSAP	g/mol	116293
	[rhSAP] stk	μM	163
	Max [Galactosa]	μM	1634
	[ST3Gal3] stk	mg/mL	0,9
	PM de ST3Gal3	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	μM	10,7
	[CMP-SA] stk	mg/mL	25
	PM del CMP-SA	g/mol	658,4
	[CMP-SA] stk	mM	38
	μL de rhSAP en rxn	μL	500
	μL de ST3Gal3 en rxn	μL	50

Volúmenes de rxn	µL de CMP-SA en rxn	µL	100
	Amortiguador (10mM de HEPES/150 mM de NaCl, pH 8)	µL	350
	Tot vol de rxn	µL	1000
Concentraciones rxn	[rhSAP] rxn	µM	81,7
	Max [Galactosa]	µM	817
	[SAP] rxn	mg/mL	9,5
	[ST3Gal3] rxn	µM	0,54
	[ST3Gal3] rxn	mg/mL	0,045
	[CMP-SA] rxn	mM	3,80
	BTA-02-17:ST3	Prop. De masa	211
	BTA-02-17:ST3	Prop. Molar	152
	CMP-SA:ST3	Prop. Molar	7088
	CMP-SA: bta-02-17	Prop. Molar	46
	CMP-SA:Galactosa	Prop. Molar	4,6

Después del tratamiento de sialisación, tanto las variantea de rhSAP sialisado y hSAP fueron purificadas unsando cromatografía por afinidad PE seguida por diálisis en 10 mM de NaPi/5% de sorbitol pH 7,5 (amortiguador P5S). La confirmación de los enlaces de ácido siálico deseados (es decir, hSAP α2,3-ligado y rhSAP α2,6-ligado) se llevó a cabo usando tanto espectrometría de Masa Cromatografía Líquida (Figura 2; A, C, y E) como Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento por Intercambio Iónico (Figura 2; B, D, y F) luego del tratamiento de los polipéptidos SAP glicovariantes con 2,3 sialidasa (Calbiochem Cat#480706) a 37°C durante 24 horas.

Ejemplo 3: Bioensayos *in vitro* para determinar la potencia del SAP glicovariante para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos.

El rhSAP glicoremodelado y el hSAP fueron ensayado en cuanto a la bioactividad usando el mismo ensayo *in vitro* descrito en el Ejemplo 1. Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica enriquecidas con monocitos (PBMC) fueron incubadas con concentraciones variables de un polipéptido SAP durante 96 horas. Luego de esta incubación, los sobrenadantes del cultivo resultantes fueron removidos y ensayados por ELISA para cuantificar la Quimiocina Derivada de MACrofagos (MDC) promedio producida. Los resultados fueron expresados como una proporción IC50 de la muestra contra el estándar de referencia de hSAP y se graficaron como actividad relativa (la actividad relativa de hSAP = 1). Todos los enlaces α 2,3-ácido siálico que contienen materiales de ensayo resultaron $\geq$ a 2,4 veces más activos que el hSAP (Figura 3). Mezclas iguales de ácido siálico α 2,3-ligado y α 2,6-ligado derivados de SAP muestran unos niveles de actividad intermedios entre los SAP 100% α 2,6-ligados y 100% α 2,3-ligados como se esperaba (las dos barras más a la derecha en la Figura 3).

Un método alternativo para cuantificar la diferenciación de fibrocitos involucra enumerar directamente el número de fibrocitos que son generados luego de que los monocitos son incubados con un supresor de fibrocitos (por ejemplo, SAP ó variante del mismo) ó un agente activador (por ejemplo, M-CSF). En un experimento, los monocitos fueron purificados del PBMC derivado de sangre completa usando la selección de granos magnéticos negativos estándar el el arte (por ejemplño, CAT# 113-41D, Invitrogen, Carlsbad, CA) y fueron cultivados en una placa para cultivo de tejidos de 96 pozos que contenía el medio FibroLife suplementado con 25 ó 50 ng/ml de M-CSF por triplicado. La placa fue incubada durante 96 horas a 37°C en una incubadora Con 5% de CO₂. Las células fueron entonces fijadas con paraformaldehido y manchadas con la mancha Hema 3 (Cat # 122-911, Hema 3 Satain, Fisher Scientific, Hampton, NH). El número de fibrocitos por pozo se determinó sumando la cuenta de cinco campos diferentes por pozo usando un microscopio invertido. Los fibrocitos fueron definidos morfológicamente como células adherentes con una forma de huso alargado y con la presencia de un núcleo ovalado. Los datos indicaron que 25 ó 50 ng/ml de M-CSF fue

suficiente para incrementar el número de fibrocitos diferenciados de los monocitos en ~ 50% en este donante (Figura 4). Experimentos subsiguientes usaron el Medio FibroLife suplementado con 25 ng/ml de M-CSF según se necesitó y se definió adelante.

- 5 Medio FibroLife: (Cat # LM-0001, Lifeline Cell Technology, Walkersville, MD) suplementado con 10 mM de HEPES (Cat # H0887, Sigma-Aldrich), 1 x aminoácidos no esenciales (Cat # M7145, Sigma-Aldrich), 1 mM de piruvato de sodio (Cat # S8636, Sigma-Aldrich), 2 mM de glutamina (Cat # 25030-149, Invitrogen), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Cat # P0781, Sigma-Aldrich), e ITS-3 (Cat # I2771, 500 µg/ml de albúmina de suero bovino, 10 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, 5 ng/ml de selenita de sodio, 5 µg/ml de ácido linoleico, y 5 µg/ml de ácido oláico; Sigma-Aldrich).
- 10
- 15 En un experimento adicional, los PBMC ó monocitos fueron purificados de sangre completa y cultivados en Medio FibroLife suplementado con varias cantidades de SAP por triplicado (como se describió antes). La placa fue incubada durante 96 horas a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂. Las células fueron entonces fijadas con paraformaldehído y manchadas con Hema
- 20 3 stain (Cat # 122-911, Hema 3 Stain, Fisher Scientific, Hampton, NH). El número de fibrocitos por pozo se determinó mediante sumar la cuenta de cinco campos diferentes por pozo usando un microscopio invertido. La concentración mínima del SAP necesario para suministrar la inhibición máxima de diferenciación de fibrocitos en este sistema se determinó ser 2
- 25 µg/ml (Figura 5). El número de fibrocitos disminuye con el incremento de la concentración de SAP en todos los donantes.

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA

- 30 Todas las publicaciones t patentes mencionadas aquí se incorporan a la presente como referencias en su totalidad como si se hubiera indicado

específicamente e individualmente para cada publicación ó patente que se incorpora como referencia.

Aunque se han discutido modalidades específicas de la materia objeto, la anterior especificación es ilustrativa y no limitativa. Muchas variaciones
5 serán evidentes para aquellos versados en la materia luego de revisar esta especificación y las reivindicaciones que siguen. El alcance completo de la invención debería determinarse con referencia a las reivindicaciones, junto con su alcance completo de los equivalentes, y la especificación, junto con tales variaciones.

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido glicosilado Amiloide P de suero humano (SAP) comprende una cadena de oligosacáridos N-ligados, en donde al menos una
5 rama de la cadena de oligosacáridos termina con una parte de ácido siálico α 2,3-ligada.
2. Un polipéptido glicosilado Amiloide P de suero humano (SAP) comprende una cadena de oligosacáridos N-ligados, en donde la cadena de
10 oligosacáridos tiene al menos 50% menos de partes de ácido siálico α 2,6-ligadas que las del SAP tipo natural aislado de suero humano.
3. El polipéptido SAP glicosilado humano de la reivindicación 1, en donde todas las ramas de la cadena de oligosacáridos termina con partes de ácido
15 siálico α 2,3-ligadas.
4. El polipéptido SAP glicosilado humano de la reivindicación 2, en donde todas las ramas de la cadena de oligosacáridos termina con partes de ácido
siálico α 2, 6-ligadas.
20
5. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cadena de oligosacáridos tiene una estructura bi-antenaria.
- 25 6. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cadena de oligosacáridos tiene una estructura tri-antenaria.

7. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cadena de oligosacáridos tiene una estructura tetra-antenaria.
- 5 8. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cadena de oligosacáridos tiene una estructura penta-antenaria.
9. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las
10 reivindicaciones 1 a 8, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados comprende un núcleo penta sacárido de $\text{Man}[(\alpha 1,6)\text{-(MAn}(\alpha 1,3)\text{)]-Man}(\beta 1,4)\text{-GlcNAc}(\beta 1,4)\text{-GlcNAc}(\beta 1,N)\text{-Asn}$.
10. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 9, en donde la cadena de oligosacáridos comprende al menos una rama que tiene la estructura $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$.
11. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 10, en donde al menos una rama de la cadena de oligosacáridos está sustancialmente libre de galactosa y N-acetilglucosamina.
12. El polipéptido SAP glicosilado humano de la reivindicación 11, en donde todas las ramas de la cadena de oligosacáridos está sustancialmente libre de galactosa y N-acetilglucosamina.

13. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde al menos una rama de la cadena de oligosacáridos comprende uno ó más residuos de manosa.
- 5 14. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la cadena de oligosacáridos comprende al menos un residuo de fucosa.
- 10 15. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la cadena de oligosacáridos comprende al menos un residuo de glicosilo modificado.
- 15 16. El polipéptido SAP glicosilado humano de la reivindicación 15, en donde al menos un residuo de glicosilo modificado es conjugado con uno ó más grupos modificadores seleccionados entre polímeros solubles e insolubles en agua, partes terapéuticas, agentes de diagnóstico, y biomoléculas..
- 20 17. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el polipéptido SAP es un polipéptido recombinante.
- 25 18. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 85% idéntica a la SEQ ID NO. 1.

19. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a la SEQ ID NO. 1.
- 5 20. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un dominio SAP y uno ó más dominios heterólogos.
- 10 21. El polipéptido SAP glicosilado humano de la reivindicación 20, en donde dichos uno ó más dominios heterólogos mejoran una ó más características entre estabilidad in vivo, vida media in vivo, toma/administración, localización ó distribución del tejido, formación de complejos de proteína, ó purificación.
- 15 22. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el polipéptido comprende uno ó más residuos modificados de aminoácidos.
- 20 23. El polipéptido SAP glicosilado humano de la reivindicación 22, en donde dichos uno ó más residuos de aminoácidos modificados comprenden un aminoácido PEGilado, un aminoácido prenilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, ó un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico.
- 25 24. El polipéptido SAP glicosilado humano de la reivindicación 23, en donde dichos uno ó más residuos de aminoácidos modificados mejoran una ó más características entre estabilidad in vivo, vida media in vivo,

toma/administración, localización ó distribución del tejido, formación de complejos de proteína, ó purificación.

25. El polipéptido SAP glicosilado humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde el polipéptido SAP tiene un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor que la mitad del de una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano.

26. Una preparación farmacéutica adecuada para uso en mamíferos que comprende el polipéptido SAP humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y un portador farmacéuticamente aceptable.

27. La preparación farmacéutica de la reivindicación 26 comprende adicionalmente un agente activo.

28. La preparación farmacéutica de la reivindicación 26, en donde la preparación farmacéutica se prepara como una formulación de liberación sostenida.

20

29. La preparación farmacéutica de la reivindicación 26, en donde la preparación farmacéutica es adecuada para la administración a un paciente tópicamente, por inyección, por inyección intravenosa, por inhalación, depósito continuo ó bomba.

25

30. Un método para tratar ó prevenir un desorden ó condición fibrótico ó fibroproliferativo en un paciente, el método comprende administrar a un

paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

31. Un método para tratar ó prevenir un desorden ó condición de
5 hipersensibilidad en un paciente, el método comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

32. Un método para tratar ó prevenir la mucositis en un paciente, el método
10 comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

33. Un método para tratar ó prevenir un desorden ó condición autoinmune
15 en un paciente, el método comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

34. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, en donde
20 el polipéptido SAP es administrado tópicamente, por inyección, por inyección intravenosa, por inhalación, depósito continuo ó bomba, ó una combinación de estos.

35. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33 que
25 comprende además administrar al paciente un agente activo adicional.

36. Un método para hacer un polipéptido SAP glicosilado humano, comprende:

i) expresar el polipéptido SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 en una célula; y

5 ii) aislar el polipéptido SAP de la célula.

37. Un método para hacer un polipéptido SAP humano, comprende:

i) expresar el polipéptido SAP humano en una célula CHO; y

ii) aislar el polipéptido SAP humano de la célula.

10

38. El método de la reivindicación 37, en donde el polipéptido SAP comprende una cadena de oligosacáridos N-ligados, y donde al menos una rama de la cadena de oligosacáridos termina con una parte de ácido siálico α 2,3-ligada.

15

39. El método de la reivindicación 37, en donde polipéptido SAP comprende una cadena de oligosacáridos N-ligados, y en donde la cadena de oligosacáridos tiene al menos 50% menos de partes de ácido siálico α 2,6-ligadas que las del SAP tipo natural aislado del suero humano.

20

40. El método de la reivindicación 37, en donde el polipéptido SAP comprende una cadena de oligosacáridos N-ligados, y en donde todas las ramas de la cadena de oligosacáridos termina con partes de ácido siálico α 2,3-ligadas.

25

41. El método de la reivindicación 37, en donde el polipéptido SAP comprende una cadena de oligosacáridos N-ligados en donde la cadena de oligosacáridos está sustancialmente libre de partes de ácido siálico $\alpha 2,6$ -ligadas.

5

42. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, en donde la cadena de oligosacáridos tiene una estructura bi-antenaria.

43. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, en donde
10 la cadena de oligosacáridos tiene una estructura tri-antenaria.

44. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 41, en donde la cadena de oligosacáridos tiene una estructura tetra-antenaria.

15 45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 44, en donde el polipéptido SAP humano aislado tiene un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor que la mitad del de una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano.

20 46. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 45, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados comprende al menos una rama que tiene la estructura $Man[(\alpha 1,6)-(Man(\alpha 1,3))-Man(\beta 1,4)-GlcNAc(\beta 1,4)-GlcNAc(\beta 1,N)-Asn]$.

25 47. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 46, en donde la cadena de oligosacáridos comprende al menos una rama que tiene la estructura $NeuNAc2\alpha 3Gal\beta 4GlcNAc\beta 2Man\alpha 6$.

48. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 47, en donde al menos una rama de la cadena de oligosacáridos está sustancialmente libre de galactosa y N-acetilglucosamina.

5

49. El método de la reivindicación 48, en donde todas las ramas de la cadena de oligosacáridos están sustancialmente libres de galactosa y N-acetilglucosamina.

10 50. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 49, en donde al menos una rama de la cadena de oligosacáridos comprende uno ó más residuos de manosa.

15 51. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 50, en donde la cadena de oligosacáridos comprende al menos un residuo de fucosa.

52. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 51, en donde la cadena de oligosacáridos comprende al menos un residuo de glicosilo modificado.

20

53. El método de la reivindicación 52, en donde al menos un residuo de glicosilo modificado es conjugado con uno ó más grupos modificadores seleccionados entre polímeros solubles e insolubles en agua, partes terapéuticas, agentes de diagnóstico, y biomoléculas.

25

54. El método de la reivindicación 36, en donde la célula es una célula CHO.

55. El método de la reivindicación 35 ó 36, que además comprende alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP aislado para producir un polipéptido SAP que tiene una cadena de oligosacáridos modificada.

5

56. El método de la reivindicación 55, en donde el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP aislado comprende tratar el polipéptido SAP aislado con una ó más proteínas enzimáticas seleccionadas entre glicosiltransferasas, glicosidasas, y fosfatasas.

10

57. El método de la reivindicación 55, en donde el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP aislado se efectúa en la presencia de uno ó más precursores de azúcar.

15

58. El método de la reivindicación 57, en donde dichos uno ó más precursores de azúcar se seleccionan entre UDP-N-acetilglucosamina, ácido CMP-N-glicolilneuramínico, UDP-N-acetilgalactosamina, ácido CMP-N-acetilneuramínico, UDP-galactosa, y GDP-fucosa.

20

59. El método de la reivindicación 55, en donde el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP aislado remueve uno ó más partes terminales de ácido siálico α 2,6-ligadas de la cadena de oligosacáridos.

25

60. El método de la reivindicación 55, en donde el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP aislado reemplaza uno ó más partes de ácido siálico α 2,6-ligadas en la cadena de oligosacáridos con una ó más partes de ácido siálico α 2,3-ligadas.

61. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 60, en donde el polipéptido SAP aislado tiene un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibroцитos *in vitro* que es menor que la mitad del de una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano.

62. Un método para hacer un polipéptido SAP, comprende:

- i) suministrar un polipéptido SAP glicosilado, en donde el polipéptido SAP glicosilado comprende una cadena de oligosacáridos N-ligados; y
- 10 ii) alterar enzimáticamente ó químicamente la cadena de oligosacáridos N-ligados del polipéptido SAP para producir un polipéptido SAP glicosilado modificado.

63. El método de la reivindicación 62, en donde el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente la cadena de oligosacáridos N-ligados del polipéptido SAP remueve una ó más partes terminales de ácido siálico $\alpha 2,6$ -ligadas de la cadena de oligosacáridos.

64. El método de la reivindicación 62, en donde el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente la cadena de oligosacáridos N-ligados del polipéptido SAP reemplaza uno ó más partes de ácido siálico $\alpha 2,6$ -ligadas en la cadena de oligosacáridos con una ó más partes de ácido siálico $\alpha 2,3$ -ligadas.

25 65. El método de una de las reivindicaciones 62 a 64, en donde el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente la cadena de oligosacáridos N-ligados del polipéptido SAP comprende tratar el polipéptido SAP aislado con

una ó más proteínas enzimáticas seleccionadas entre glicosiltransferasas, glicosidasas, y fosfatasas.

66. El método de una de las reivindicaciones 62 a 65, en donde el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente la cadena de oligosacáridos N-ligados del polipéptido SAP se efectúa en la presencia de uno ó más precursores de azúcar.

67. El método de la reivindicación 66, en donde dichos uno ó más precursores de azúcar se seleccionan entre UDP-N-acetilglucosamina, ácido CMP-N-glicolilneuramínico, UDP-N-acetilgalactosamina, ácido CMP-N-acetilneuramínico, UDP-galactosa, y GDP-fucosa.

68. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 62 a 67, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene al menos 50% menos de partes de ácido siálico α 2,6-ligadas que las del SAP tipo natural aislado del suero humano.

69. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 62 a 67, en donde la cadena de oligosacáridos n-ligados está sustancialmente libre de partes de ácido siálico α 2,6-ligadas.

70. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 62 a 69, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene una estructura bi-antenaria.

25

71. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 62 a 69, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene una estructura tri-antenaria.

72. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 62 a 69, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene una estructura tetra-antenaria.
- 5 73. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 62 a 69, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene una estructura penta-antenaria.
74. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 62 a 73, en donde al menos una rama de la cadena de oligosacáridos termina en una parte de
10 ácido siálico α 2,3-ligada.
75. El método de la reivindicación 74, en donde todas las ramas de la cadena de oligosacáridos terminan en una parte de ácido siálico α 2,3-ligada.
- 15 76. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 62 a 75, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene al menos un residuo de glicosilo modificado.
77. El método de la reivindicación 76, en donde al menos un residuo de
20 glicosilo modificado es conjugado con uno ó más grupos modificadores seleccionados entre polímeros solubles e insolubles en agua, partes terapéuticas, agentes de diagnóstico, y biomoléculas.
78. El polipéptido SAP humano de una cualquiera de las reivindicaciones
25 62 a 77, en donde el polipéptido SAP modificado tiene un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor que la mitad

del de una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano.

79. Un método para hacer un polipéptido SAP, comprende:

- 5 i) suministrar un polipéptido SAP; y
- ii) alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP para producir un polipéptido SAP glicosilado modificado que comprende un oligosacárido N-ligado.

10 80. El método de la reivindicación 79, en donde el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP comprende tratar el polipéptido SAP con una ó más proteínas enzimáticas seleccionadas entre glicosiltransferasas, glicosidasas, y fosfatasas.

15 81. El método de la reivindicación 79 u 80, en donde el proceso de alterar enzimáticamente ó químicamente el polipéptido SAP se efectúa en la presencia de uno ó más precursores de azúcar.

20 82. El método de la reivindicación 81, en donde dichos uno ó más precursores de azúcar se seleccionan entre UDP-N-acetilglucosamina, ácido CMP-N-glicolilneuramínico, UDP-N-acetilgalactosamina, ácido CMP-N-acetilneuramínico, UDP-galactosa, y GDP-fucosa.

25 83. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 82, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene al menos 50% menos de partes de ácido siálico α 2,6-ligadas que las del SAP tipo natural aislado del suero humano.

84. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 82, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados está sustancialmente libre de partes de ácido siálico α 2,6-ligadas.

5

85. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 84, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene una estructura bi-antenaria.

86. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 84, en donde
10 la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene una estructura tri-antenaria.

87. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 84, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene una estructura tetra-antenaria.

15 88. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 84, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene una estructura penta-antenaria.

89. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 88, en donde al menos una rama de la cadena de oligosacáridos termina en una parte de
20 ácido siálico α 2,3-ligada.

90. El método de la reivindicación 89, en donde todas las ramas de la cadena de oligosacáridos terminan en una parte de ácido siálico α 2,3-ligada.

91. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 90, en donde la cadena de oligosacáridos N-ligados tiene al menos un residuo de glicosilo modificado.
- 5 92. El método de la reivindicación 91, en donde al menos un residuo de glicosilo modificado es conjugado con uno ó más grupos modificadores seleccionados entre polímeros solubles e insolubles en agua, partes terapéuticas, agentes de diagnóstico, y biomoléculas.
- 10 93. El polipéptido SAP humano de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 92, en donde el polipéptido SAP glicosilado tiene un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor que la mitad del de una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano.
- 15 94. Un polipéptido SAP humano preparado por un proceso que comprende:
- i) expresar el polipéptido SAP en una célula CHO; y
 - ii) aislar el polipéptido SAP de la célula.
- 20 95. El polipéptido SAP humano de la reivindicación 94, en donde el polipéptido SAP tiene un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor que la mitad del de una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano.

96. El polipéptido SAP humano de una cualquiera de las reivindicaciones 94 ó 9524, en donde el proceso comprende adicionalmente alterar la estructura de glicosilación del polipéptido SAP aislado.
- 5 97. Una célula CHO que comprende un polipéptido SAP humano que comprende una cadena de oligosacáridos N-ligados, en donde una rama de la cadena de oligosacáridos termina en una parte de ácido siálico α 2,3-ligada.
- 10 98. Una célula CHO que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido SAP exógeno.
- 15 99. Un polipéptido SAP humano que tiene un IC_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro* que es menor que la mitad del de una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano.
- 20 100. Un método para tratar ó prevenir un trastorno ó condición inflamatorios en un paciente, el método comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

RESUMEN

Un aspecto de la presente invención se relaciona con el sorprendente descubrimiento de que la modificación de una estructura glicano en un polipéptido SAP humano puede incrementar la actividad biológica del polipéptido SAP comparado con una muestra correspondiente de un SAP tipo natural aislado de suero humano. LA divulgación suministra tanto polipéptidos SAP variantes como métodos para fabricarlos. En particular, la presente invención suministra métodos y composiciones para agregar, remover ó modificar in vivo ó in vitro residuos de azúcar para producir polipéptidos SAP, tal como un polipéptido SAP humano, que tiene un patrón de glicosilación deseado.

B/BOGDMS-918375-V1-P2011_000047-0100.DOC

15

20

25

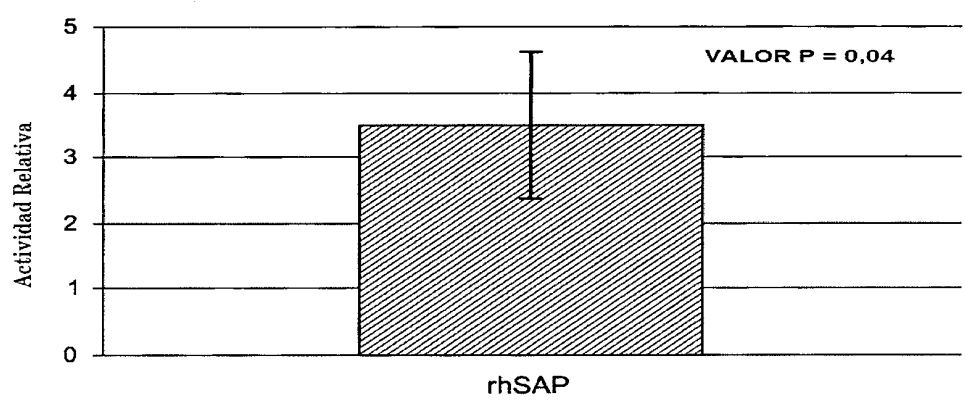


FIGURA 1

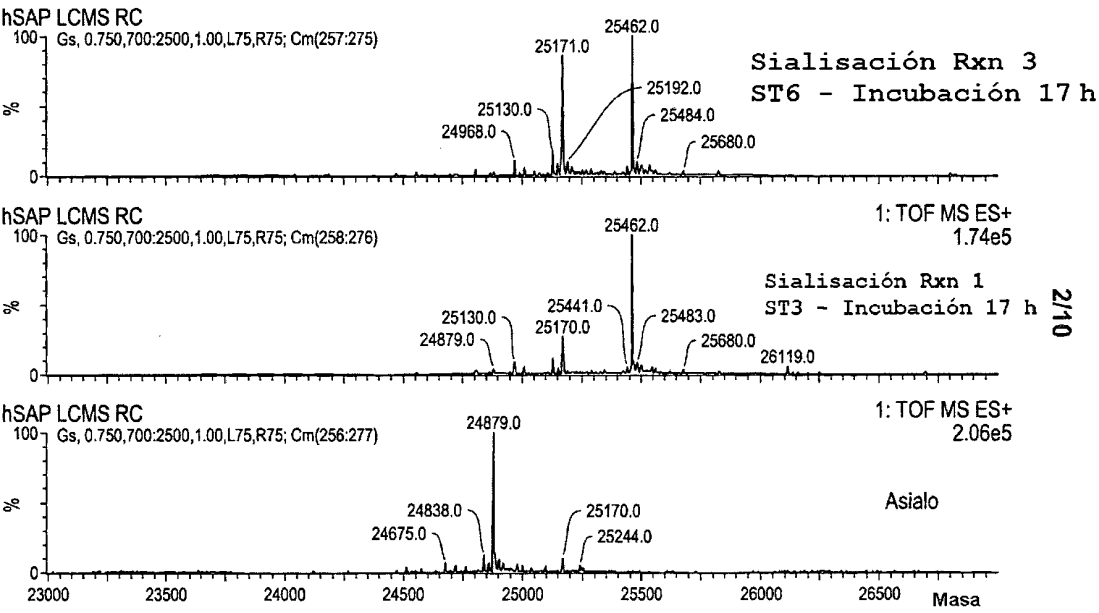


FIGURA 2A

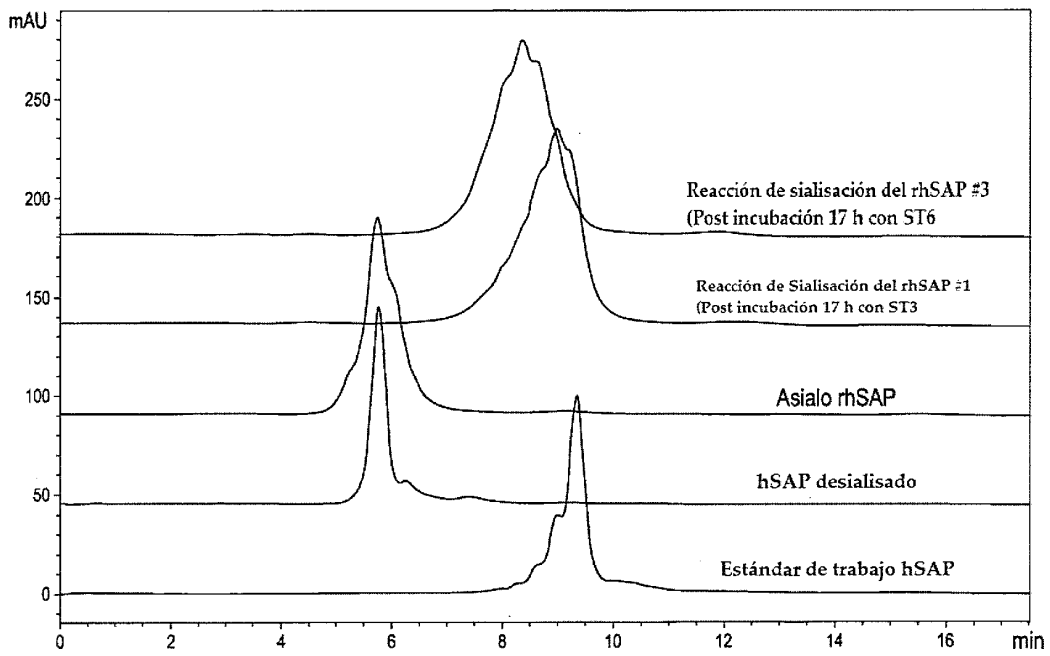


FIGURA 2C

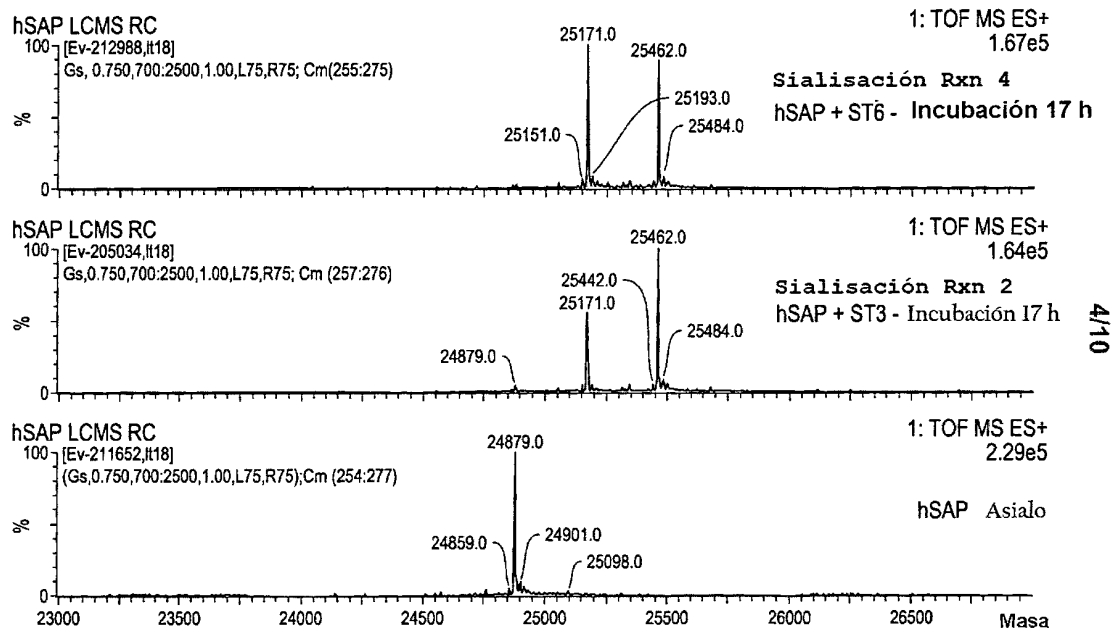


FIGURA 2 C

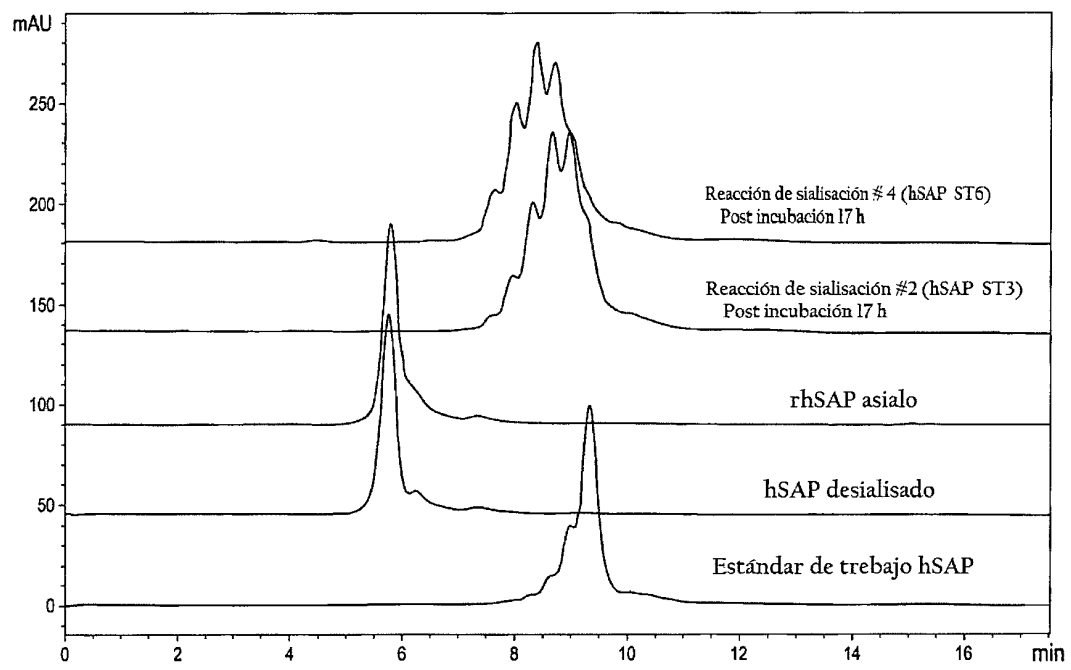


FIGURA 2D

5/10

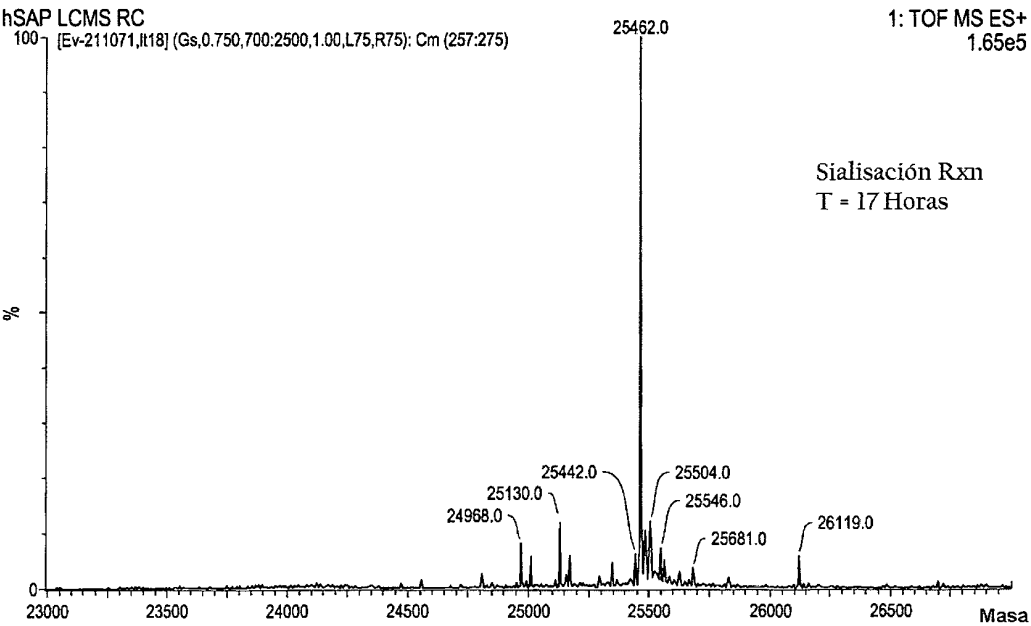


FIGURA 2E

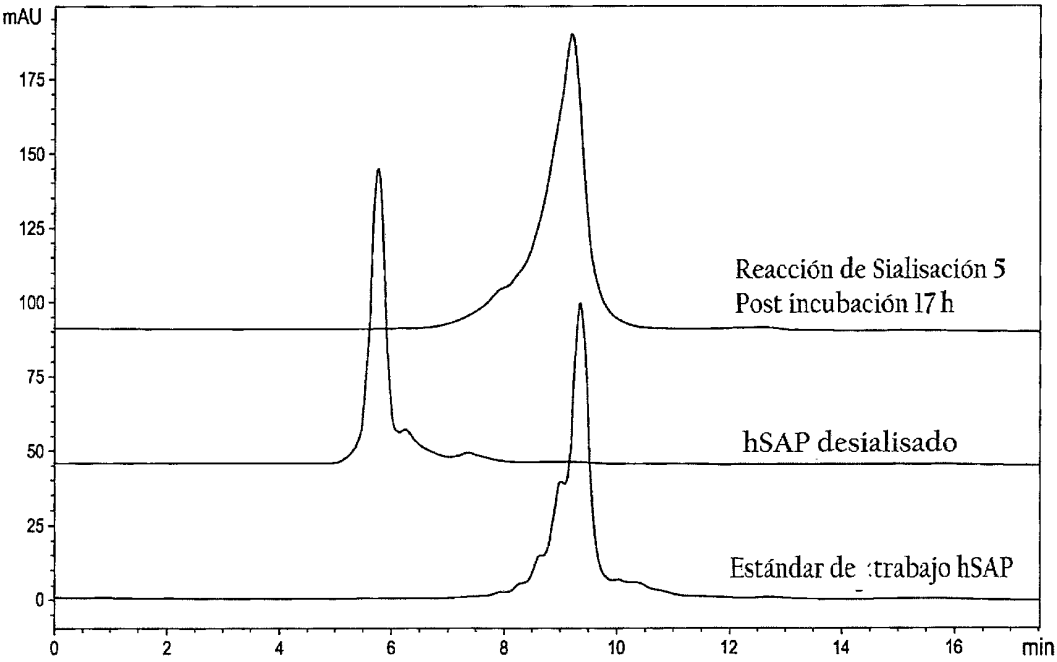


FIGURA 2 F

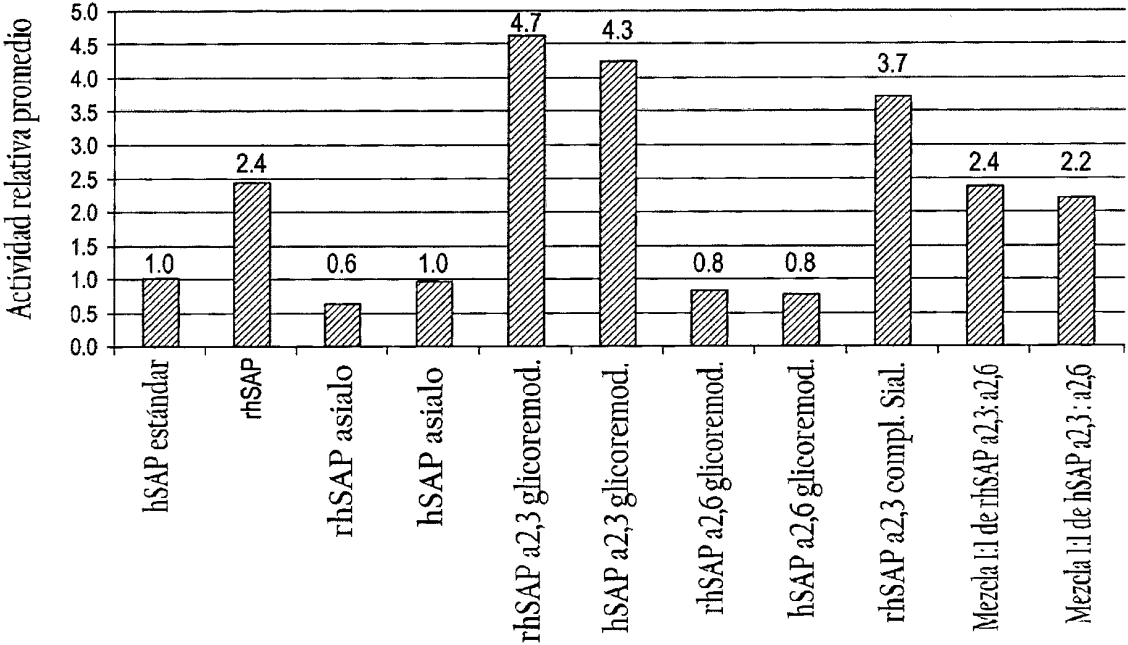


FIGURA 3

1041120020w1.txt
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PROMEDIOR, INC.

<120> DERIVADOS DE AMILOIDE P DE SUERO Y SUS PREPARACIONES Y USO

<130> 104112-0020-w01

<140>

<141> 2010-06-04

<150> 61/217,931

<151> 2009-06-04

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 204

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Thr Asp Leu Ser Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Val
1 5 10 15

Thr Asp His Val Asn Leu Ile Thr Pro Leu Glu Lys Pro Leu Gln Asn
20 25 30

Phe Thr Leu Cys Phe Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg Ala Tyr Ser
35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Asn Thr Gln Gly Arg Asp Asn Glu Leu Leu Val Tyr
50 55 60

Lys Glu Arg Val Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Arg His Lys Val
65 70 75 80

Thr Ser Lys Val Ile Glu Lys Phe Pro Ala Pro Val His Ile Cys Val
85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile Asn Gly Thr
100 105 110

Pro Leu Val Lys Lys Gly Leu Arg Gln Gly Tyr Phe Val Glu Ala Gln
115 120 125

Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Lys Phe
130 135 140

Asp Arg Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Ile Gly Asp Leu Tyr Met Trp
145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Pro Pro Glu Asn Ile Leu Ser Ala Tyr Gln Gly Thr
165 170 175

Pro Leu Pro Ala Asn Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Asn Tyr Glu Ile
180 185 190

Arg Gly Tyr Val Ile Ile Lys Pro Leu Val Trp Val
195 200

1041120020w1.txt

<210> 2
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<400> 2
 Gln Glu Asp Leu Tyr Arg Lys Val Phe Val Phe Arg Glu Asp Pro Ser
 1 5 10 15

Asp Ala Tyr Val Leu Leu Gln Val Gln Leu Glu Arg Pro Leu Leu Asn
 20 25 30

Phe Thr Val Cys Leu Arg Ser Tyr Thr Asp Leu Thr Arg Pro His Ser
 35 40 45

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

Lys Pro Lys Pro Gly Glu Tyr Arg Phe Tyr Val Gly Gly Lys Tyr Val
 65 70 75 80

Thr Phe Arg Val Pro Glu Asn Arg Gly Glu Trp Glu His Val Cys Ala
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Gly Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Leu Asn Gly Arg
 100 105 110

Pro Trp Pro Arg Lys Gly Leu Gln Lys Gly Tyr Glu Val Gly Asn Glu
 115 120 125

Ala Val Val Met Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly Gly Phe
 130 135 140

Asp Val Tyr Asn Ser Phe Thr Gly Glu Met Ala Asp Val His Leu Trp
 145 150 155 160

Asp Ala Gly Leu Ser Pro Asp Lys Met Arg Ser Ala Tyr Leu Ala Leu
 165 170 175

Arg Leu Pro Pro Ala Pro Leu Ala Trp Gly Arg Leu Arg Tyr Glu Ala
 180 185 190

Lys Gly Asp Val Val Val Lys Pro Arg Leu Arg Glu Ala Leu Gly Ala
 195 200 205

<210> 3
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 3
 Gln Thr Asp Leu Arg Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Asp His Val Thr Leu Ile Thr Lys Leu Glu Lys Pro Leu Lys Asn
 20 25 30

Leu Thr Leu Cys Leu Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg Gly Tyr Ser
 Page 2

1041120020w1.txt
45

35

40

Leu Phe Ser Tyr Asn Ile His Ser Lys Asp Asn Glu Leu Leu Val Phe
50 55 60

Lys Asn Gly Ile Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Lys Thr Lys Val
65 70 75 80

Thr Val Arg Ala Thr Glu Lys Phe Pro Ser Pro Val His Ile Cys Thr
85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Thr Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile Asn Gly Lys
100 105 110

Pro Leu Val Lys Arg Gly Leu Lys Gln Gly Tyr Ala Val Gly Ala His
115 120 125

Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Gly Phe
130 135 140

Asp Lys Asn Gln Ser Phe Met Gly Glu Ile Gly Asp Leu Tyr Met Trp
145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Ser Pro Glu Glu Ile Leu Leu Val Tyr Gln Gly Ser
165 170 175

Ser Ser Ile Ser Pro Thr Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Lys Tyr Glu
180 185 190

Ile Lys Gly Tyr Val Ile Val Lys Pro Met Val Trp Gly
195 200 205

<210> 4
<211> 204
<212> PRT
<213> Cricetulus migratorius

<400> 4
Gln Thr Asp Leu Thr Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Glu
1 5 10 15

Ser Asp Tyr Val Lys Leu Ile Pro Arg Leu Glu Lys Pro Leu Glu Asn
20 25 30

Phe Thr Leu Cys Phe Arg Thr Tyr Thr Asp Leu Ser Arg Pro His Ser
35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Asn Thr Lys Asn Lys Asp Asn Glu Leu Leu Ile Tyr
50 55 60

Lys Glu Arg Met Gly Glu Tyr Gly Leu Tyr Ile Glu Asn Val Gly Ala
65 70 75 80

Ile Val Arg Gly Val Glu Glu Phe Ala Ser Pro Val His Phe Cys Thr
85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Asp Phe Trp Val Asn Gly Ile
100 105 110

1041120020w1.txt

Pro Trp Val Lys Lys Gly Leu Lys Lys Gly Tyr Thr Val Lys Thr Gln
 115 120 125

Pro Ser Ile Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Asn Tyr Gly Gly Gly Phe
 130 135 140

Asp Lys Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Met Gly Asp Leu Asn Met Trp
 145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Thr Pro Glu Glu Ile Lys Ser Val Tyr Glu Gly Ser
 165 170 175

Trp Leu Glu Pro Asn Ile Leu Asp Trp Arg Ala Leu Asn Tyr Glu Met
 180 185 190

Ser Gly Tyr Ala Val Ile Arg Pro Arg Val Trp His
 195 200



No. 11-176414-00000-0000

Fecha: 2011-12-21 16:32:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONESMODELO DE UTILIDAD ☐

Art. 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐