

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 055**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/61** (2007.01)

**A61K 47/60** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2010 E 16168473 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 3081233**

54 Título: **Glicopolisialilación de proteínas diferentes de las proteínas de coagulación de la sangre**

30 Prioridad:

**27.07.2009 US 228828 P**

**21.05.2010 US 347136 P**

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

**27.09.2021**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (33.3%)**

**Thurgauerstrasse 130**

**8152 Glattpark, Opfikon, CH;**

**BAXALTA INCORPORATED (33.3%) y**

**LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED (33.3%)**

72 Inventor/es:

**JAIN, SANJAY;**

**GREGORIADIS, GREGORY;**

**DWIVEDI, ARCHANA;**

**NATH, SRIJIT;**

**SIEKMANN, JUERGEN;**

**HAIDER, STEFAN;**

**ROTTENSTEINER, HANSPETER y**

**TURECEK, PETER**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 856 055 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Glicopolisialilación de proteínas diferentes de las proteínas de coagulación de la sangre

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a materiales y procedimientos para conjugar el ácido polisiálico, a glicoproteínas que contienen carbohidratos diferentes de las proteínas de coagulación de la sangre, y a los conjugados obtenidos.

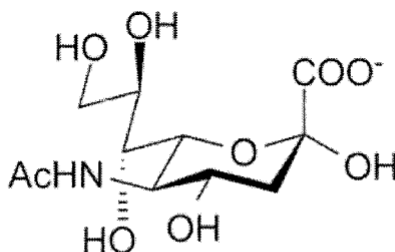
**Antecedentes de la invención**

10 La conjugación de fármacos polipeptídicos tales como mediante PEGilación o polisialilación las protege de la degradación en la circulación sanguínea y, por tanto, mejora sus perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos (Harris y Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003;2:214-21; S. Jain, D. Hreczuk-Hirst, P. Laing y G. Gregoriadis, Drug Delivery Systems and Sciences, 4 (N.º 1): 3-9, 2004). El proceso de PEGilación une unidades de repetición de etilenglicol (polietilenglicol (PEG)) a un fármaco polipeptídico. Las moléculas de PEG tienen un gran volumen hidrodinámico (5-10 veces el tamaño de las proteínas globulares), son muy solubles en agua y se hidratan, no son tóxicas, no son inmunógenas y se eliminan rápidamente del cuerpo. La PEGilación de las moléculas puede producir un aumento en la resistencia de los fármacos a la degradación enzimática, aumento de la semivida *in vivo*, reducción de la frecuencia de dosificación, disminución de la inmunogenicidad, aumento de la estabilidad física y térmica, aumento de la solubilidad, aumento de la estabilidad en medio líquido y una reducción en la agregación. Los primeros fármacos PEGilados fueron homologados por la FDA a principios de los años 90 del siglo XX. Desde entonces, la FDA ha homologado algunos fármacos PEGilados para la administración oral, inyectable y tópica.

15 Los ácidos siálicos (denominados también ácidos N-acetil neuramínicos) y los ácidos polisiálicos se encuentran ampliamente distribuidos en tejidos animales y en una menor extensión en otras especies que varían desde plantas y hongos a levaduras y bacterias, principalmente en glicoproteínas y gangliósidos.

La abreviatura "PSA" usada en el presente documento se refiere a la expresión "ácido polisiálico". De manera similar, el término "mPSA" usado en el presente documento se refiere a la expresión "ácido polisiálico modificado".

25 Los PSA consisten en polímeros (generalmente homopolímeros) de ácido N-acetilneuramínico. El grupo amino secundario normalmente lleva un grupo acetilo, pero puede a su vez llevar un grupo glicolilo. Los posibles sustituyentes en los grupos hidroxilo incluyen grupos acetilo, lactilo, etilo, sulfato y fosfato.



### Ácido N-acetil neuramínico Neu5Ac

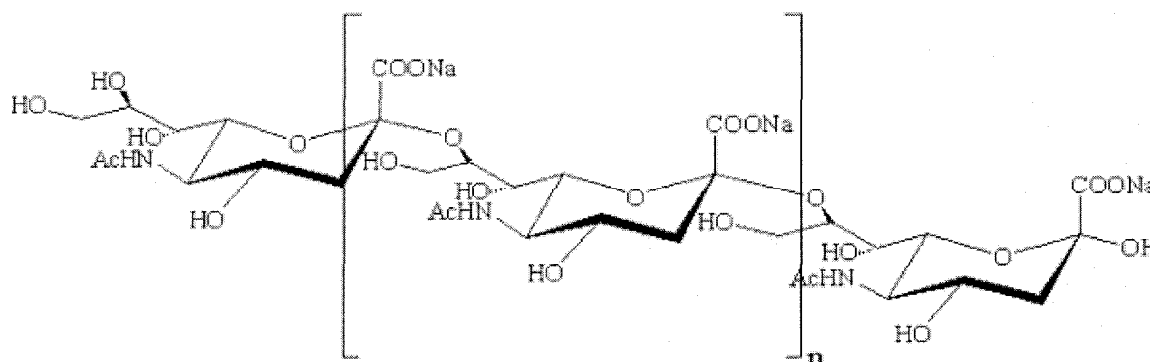
Estructura del ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico)

30 Los PSA y mPSA comprenden generalmente polímeros lineales que consisten esencialmente en restos de ácido N-acetilneuramínico unidos por enlaces 2,8-glicosídicos o 2,9-glicosídicos o combinaciones de estos (por ejemplo, alternando enlaces 2,8 y 2,9). En los PSA y mPSA particularmente preferidos, los enlaces glicosídicos son  $\alpha$ -2,8. Dichos PSA y mPSA se derivan convenientemente de ácidos colomínicos, y se denominan en el presente documento "CA" y "mCA". Los PSA y mPSA típicos comprenden al menos 2, preferentemente al menos 5, más preferentemente al menos 10, y lo más preferente al menos 20 restos de ácido N-acetilneuramínico. Por tanto, pueden comprender de 5 a 500 restos de ácido N-acetilneuramínico, preferentemente de 10 a 300 restos de ácido N-acetilneuramínico. Los PSA y los CA pueden ser polímeros que comprenden diferentes restos azucarados. Pueden ser copolímeros. Los PSA y los CA preferentemente están esencialmente exentos de restos azucarados diferentes del ácido N-acetilneuramínico. Los PSA y los CA comprende preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % y lo más preferente al menos 98 % de restos de ácido N-acetilneuramínico.

40 Cuando los PSA y los CA comprende otros restos de ácido N-acetilneuramínico (como, por ejemplo, en los mPSA y mCA), estos están preferentemente localizados en uno o ambos de los extremos de la cadena polimérica. Dichos "otros" restos pueden ser, por ejemplo, restos derivados de restos de ácido N-acetilneuramínico en el extremo mediante oxidación o reducción.

Por ejemplo, el documento WO-A-0187922 describe dichos mPSA y mCA en el que la unidad del ácido N-acetilneuramínico en el extremo se convierte en un grupo aldehído mediante reacción con peryodato de sodio. Adicionalmente, el documento WO 2005/016974 describe dichos mPSA y mCA en que la unidad de ácido N-acetilneuramínico en el extremo reductor se somete a reducción para abrir reductivamente el anillo en la unidad de ácido N-acetilneuramínico en el extremo reductor, por lo cual se forma un grupo diol vecinal, seguido por oxidación para convertir el grupo diol vecinal en un grupo aldehído.

Las glicoproteínas ricas en ácido siálico se unen a la selectina en seres humanos y otros organismos. Juegan un importante papel en las infecciones de la gripe humana. Por ejemplo, el ácido siálico puede ocultar los antígenos de manosa sobre la superficie de las células hospedadoras o bacterias e lectinas de unión a manosa. Esto evita la activación del complemento. Los ácidos siálicos ocultan también el penúltimo resto de galactosa evitando por tanto la rápida eliminación de la glicoproteína por el receptor de la galactosa sobre las células del parénquima hepático.



Estructura del ácido colominico (homopolímero de ácido N-acetilneuramínico)

Se produjeron los CA, entre otras, por cepas concretas de *Escherichia coli* que contienen el antígeno K1. Los CA pueden tener muchas funciones fisiológicas. Son importantes como materia prima de fármacos y cosméticos.

Los estudios comparativos *in vivo* con asparaginasa polisialilada y no modificada desvelaron que la polisialilación aumentó la semivida de la enzima (Fernandes y Gregoriadis, *Biochimica Biophysica Acta* 1341: 26-34, 1997).

La preparación de conjugados formando un enlace covalente entre el polímero soluble en agua y la proteína terapéutica puede llevarse a cabo mediante una variedad de procedimientos químicos. Una estrategia para acoplar PSA a las proteínas terapéuticas es la conjugación de los polímeros mediante los restos carbohidrato de la proteína. Los grupos hidroxilo (OH) vecinales de los carbohidratos en las proteínas pueden oxidarse fácilmente con peryodato de sodio ( $\text{NaIO}_4$ ) para formar grupos aldehído activos (Rothfus y Smith, *J Biol Chem* 1963; 238:1402-10; van Lenten y Ashwell, *J Biol Chem* 1971;246:1889-94). Posteriormente, el polímero se puede acoplar a los grupos aldehído de los carbohidratos mediante el uso de reactivos que contienen, por ejemplo, un grupo hidrazida activo (Wilchek M y Bayer EA, *Methods Enzymol* 1987;138:429-42). Una tecnología más reciente es el uso de reactivos que contienen grupos aminooxi que reaccionan con aldehídos para formar enlaces oxima (documento WO 96/40662, documento WO2008/025856).

Ejemplos adicionales que describen la conjugación de un PSA con una proteína terapéutica se describen en la publicación de EE.UU. n.º 2009/0076237 que enseña la oxidación de rFVIII y el posterior acoplamiento a PSA y otros polímeros solubles en agua (p. ej., PEG, HES, dextrano) usando química de la hidrazida; el documento WO 2008/025856 que enseña la oxidación de diferentes factores de coagulación, p. ej., rFIX, FVIII y FVIIa y el posterior acoplamiento a un polímero, p. ej., PEG; el documento WO2006/016168 que enseña la conjugación del PSA que tiene un grupo N-hidroxisuccinimida a grupos amino de las proteínas.

Recientemente, se ha descrito un procedimiento mejorado que comprende una oxidación suave del peryodato de los ácidos siálicos para generar aldehídos, seguido por reacción con un grupo aminooxi que contiene el reactivo en presencia de cantidades catalíticas de anilina (Dirksen A y Dawson PE, *Bioconjugate Chem.* 2008; 19,2543-8; y Zeng Y y col., *Nature Methods* 2009;6:207-9). Los catalizadores de anilina aceleran drásticamente la ligadura de la oxima, permitiendo el uso de concentraciones muy bajas de reactivos.

Entendiendo los procedimientos disponibles para conjugar polímeros solubles en agua con proteínas terapéuticas, sigue existiendo necesidad de desarrollar materiales y procedimientos para conjugar polímeros solubles en agua con compuestos que contienen carbohidratos diferentes de las proteínas de coagulación de la sangre que mejoren las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas del compuesto, minimizando a la vez el coste asociado de los diversos reactivos.

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona materiales y procedimientos para conjugar un polímero soluble en agua a un compuesto que contiene carbohidrato diferente de una proteína de coagulación de la sangre que mejora las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas del compuesto minimizando a la vez el coste asociado de los diversos reactivos.

5 En una realización de la invención se proporciona un procedimiento para conjugar un polímero soluble en agua a un resto carbohidrato oxidado de un compuesto que contiene carbohidrato diferente de una proteína de coagulación de la sangre, que comprende poner en contacto el resto carbohidrato oxidado con un polímero soluble en agua en condiciones que permitan la conjugación, en el que dicho polímero soluble en agua contiene un grupo hidrazida y se forma un enlace hidrazona entre el resto carbohidrato oxidado y el grupo hidrazida del polímero soluble en agua. El compuesto es una glicoproteína diferente de una proteína de coagulación de la sangre.

El resto carbohidrato puede oxidarse usando una enzima oxidante específica de azúcar (p. ej., galactosa o glucosa oxidasa) o mediante incubación con un tampón que comprende un agente oxidante seleccionado entre peryodato de sodio ( $\text{NaIO}_4$ ), tetraacetato de plomo ( $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ) y perrutenato de potasio ( $\text{KRuO}_4$ ).

El resto carbohidrato puede oxidarse a un resto de ácido siálico, manosa, galactosa o glucosa.

15 El polímero soluble en agua usado en la invención es PSA, mPSA, CA o mCA.

En los siguientes ejemplos de referencia, el polímero soluble en agua es PEG o PEG ramificado.

En realizaciones concretas adicionales de la invención ilustrada en los ejemplos siguientes, el polímero soluble en agua es ácido polisialílico (PSA) o un PSA modificado (mPSA). El PSA o el mPSA puede tener un intervalo de pesos moleculares de 350 Da a 120.000 Da, 500 Da a 100.000 Da, 1000 Da a 80.000 Da, 1500 Da a 60.000 Da, 2.000 Da a 45.000 Da o 3.000 Da a 35.000 Da.

El PSA o el mPSA puede ser ácido colomínico o ácido colomínico modificado.

En otra realización de la invención, el PSA o el mPSA está comprendido por aproximadamente 2-500 o 10-300 unidades de ácido siálico. En otra realización más, se proporciona el procedimiento anteriormente mencionado en el que el agente oxidante es peryodato de sodio ( $\text{NaIO}_4$ ).

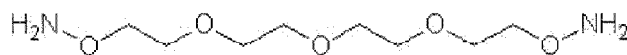
25 Se desvela también en el presente documento, pero sin que forme parte de la invención, un procedimiento que comprende oxidar el polímero soluble en agua para formar un grupo aldehído o una unidad de ácido siálico en un extremo del polímero soluble en agua, y hacer reaccionar el polímero soluble en agua oxidado con un enlazador de aminooxi.

En otro aspecto más de la divulgación, se proporciona el procedimiento anteriormente mencionado en el que se prepara el polímero soluble en agua haciendo reaccionar un enlazador aminooxi activado con un polímero soluble en agua oxidado en el que el enlazador es un enlazador homobifuncional o heterobifuncional. El enlazador homobifuncional puede tener la fórmula general  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n\text{ONH}_2$ , en el que  $n = 1-50$ , preferentemente 1-11, más preferentemente 1-6. El enlazador puede seleccionarse específicamente entre:

un enlazador de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina de fórmula:



y un enlazador 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina de fórmula:



40 PSA o mPSA pueden oxidarse por incubación con un agente oxidante para formar un grupo aldehído en el extremo en el extremo no reductor del PSA.

El procedimiento puede comprender oxidar el polímero soluble en agua para formar un grupo aldehído en una unidad en el extremo del polímero soluble en agua, p. ej., una unidad de ácido siálico en el extremo del PSA o del mPSA, y hacer reaccionar el polímero soluble en agua oxidado con un enlazador aminooxi. En otro aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un procedimiento anteriormente mencionado en el que el enlazador aminooxi es 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina. En un aspecto relacionado, el agente oxidante es  $\text{NaIO}_4$ .

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona el procedimiento anteriormente mencionado en el que la puesta en contacto del resto carbohidrato oxidado con el polímero soluble en agua activado se produce en un tampón que comprende un catalizador nucleofílico seleccionado entre el grupo que consiste en anilina y derivados de anilina.

Se puede formar un grupo hidrazida de acuerdo con la invención en el polímero soluble en agua haciendo reaccionar un polímero soluble en agua oxidado con un enlazador hidrazida. El enlazador hidrazida puede ser de forma adecuada dihidrazida de ácido adípico.

5 En otra realización adicional de la invención, se proporciona un procedimiento anteriormente mencionado que comprende además la etapa de reducir un enlace hidrazona en la proteína conjugada, incubando, por ejemplo, la proteína conjugada en un tampón que comprende un compuesto reductor seleccionado entre el grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio ( $\text{NaCNBH}_3$ ) y ácido ascórbico (vitamina C). En una realización relacionada, el compuesto reductor es cianoborohidruro de sodio ( $\text{NaCNBH}_3$ ).

10 En otra realización de la invención, se proporciona una glicoproteína conjugada producida por cualquier procedimiento anteriormente mencionado. En otra realización más de la invención, una glicoproteína conjugada diferente de una proteína de coagulación de la sangre comprende (a) la mencionada glicoproteína; y (b) al menos una hidrazida-PSA o -mPSA unida a la glicoproteína de (a), en la que dicha hidrazida-PSA o -mPSA se une a la glicoproteína mediante uno o más restos carbohidrato.

### **Figuras**

15 La Figura 1 muestra la síntesis de los enlazadores de diaminoxi solubles en agua, 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina y 3,6,9-trioxaundecano-1,1-dioxiamina.  
La Figura 2 muestra la preparación de aminoxi-PSA.

### **Descripción detallada de la invención**

20 Las propiedades farmacológicas e inmunitarias de los compuestos que contienen carbohidratos, tales como glicoproteínas diferentes de las proteínas de coagulación de la sangre pueden mejorarse mediante modificación y conjugación química con un polímero soluble en agua, en particular PEG o PSA o mPSA. Las propiedades de los conjugados resultantes generalmente dependen fuertemente de la estructura y el tamaño del polímero. Por tanto, se prefieren usualmente polímeros con una distribución de tamaños definida y estrecha. PSA y mPSA, usados en ejemplos específicos, pueden purificarse de tal manera que den como resultado una preparación de PSA final con una  
25 distribución de tamaños estrecha.

### **GLICOPROTEÍNAS**

30 Como se describe en el presente documento, las glicoproteínas diferentes de las proteínas de coagulación incluyen, citoquinas tales como interleuquinas, alfa-interferones, beta-interferones y gamma-interferones, factores estimuladores de colonias incluyen factores estimuladores de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de plaquetas, proteína activadora de la fosfolipasa (PUP), insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factores de necrosis tumoral, receptores de interleuquinas y formas solubles de receptores de interleuquinas, factores de crecimiento, factores de crecimiento tisular, factores de crecimiento transformante tales como TGF $\alpha$ s o TGF $\beta$ s y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, hormonas pigmentarias,  
35 factores de liberación hipotalámicos, hormonas antidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimuladora del folículo, hormona estimuladora del tiroides, activador del plasminógeno tisular e inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, anticuerpos monoclonales, eritropoyetina (EPO), factores sanguíneos diferentes que las proteínas de coagulación de la sangre, galactosidasas,  $\alpha$ -galactosidasas,  $\beta$ -galactosidasas, ADNasas fetuina, fragmentos de las mismas, y cualesquiera proteínas de fusión que comprenden cualquiera de las proteínas o  
40 fragmentos de las mismas anteriormente mencionadas junto con las glicoproteínas terapéuticas en general están contempladas en la invención. En una realización, la glicoproteína es EPO. En una realización adicional la glicoproteína es galactosidasa. En otra realización adicional la glicoproteína es ADNasa. En otra realización adicional la glicoproteína es fetuina. Finalmente, en otra realización adicional más, la glicoproteína es un factor estimulador de colonias de granulocitos.

45 Como se usa en el presente documento, "derivado biológicamente activo" o "variante biológicamente activa" incluye cualquier derivado o variante de una molécula que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas de dicha molécula, tales como las propiedades de unión, y/o la misma base estructural, tal como la estructura principal peptídica o una unidad polimérica básica.

50 Un "análogo", "variante" o "derivado" es un compuesto sustancialmente similar en estructura y que tiene la misma actividad biológica, aunque en determinados casos, en un grado diferente, de una molécula de origen natural. Por ejemplo, una variante de polipéptido se refiere a un polipéptido que comparte una estructura sustancialmente similar y que tiene la misma actividad biológica que un polipéptido de referencia. Las variantes o los análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos en comparación con el polipéptido de origen natural a partir del cual se deriva el análogo, basado en una o más mutaciones que implican (i) la delección de uno o más restos de aminoácidos  
55 en uno o más extremos del polipéptido y/o una o más regiones internas de la secuencia del polipéptido de origen natural (p. ej., fragmentos), (ii) inserción o adición de uno o más aminoácidos en uno o más extremos (normalmente una "adición" o "fusión") del polipéptido y una o más regiones internas (normalmente una "inserción") de la secuencia del polipéptido de origen natural o (iii) sustitución de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos en la secuencia

del polipéptido de origen natural. A modo de ejemplo, un "derivado" se refiere a un polipéptido que comparte la misma estructura o una estructura sustancialmente similar a la del polipéptido de referencia que se ha modificado, por ejemplo, químicamente.

5 las variantes o análogos de los polipéptidos incluyen variantes de inserción, en el que se añaden uno o más restos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos de la proteína de la invención. Las inserciones pueden estar situadas en cualquiera o en ambos extremos de la proteína, y/o pueden situarse en regiones internas de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Las variantes de inserción, con restos adicionales en cualquiera o en ambos extremos, incluyen por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen etiquetas de aminoácidos y otros marcadores de aminoácidos. En un aspecto, la molécula de proteína contiene opcionalmente una Met en el extremo N, especialmente cuando la molécula se expresa de forma recombinante en una célula bacteriana tal como E. coli.

En variantes de delección, se eliminan uno o más restos de aminoácidos en una proteína o polipéptido como se describe en el presente documento. Las delecciones pueden efectuarse en uno o en ambos extremos de la proteína o polipéptido, y/o con la eliminación de uno o más restos en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Las variantes de delección, por lo tanto, incluyen fragmentos de una secuencia de proteína o polipéptido.

15 En variantes de sustitución, uno o más restos de aminoácidos de una proteína o polipéptido se eliminan y sustituyen por restos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son conservativas en la naturaleza y las sustituciones conservativas de este tipo son bien conocidas en la técnica. Como alternativa, la invención abarca sustituciones que son también no conservativas. Las sustituciones conservativas ilustrativas se describen en Lehninger, [Biochemistry, 2ª Edición; Worth Publishers, Inc., Nueva York (1975), págs.71-77] y se muestran inmediatamente a continuación.

20 SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS

<b>CARACTERÍSTICAS DE LA CADENA SECUNDARIA</b>	<b>AMINOÁCIDOS</b>
No polares (hidrófobos):	
A. Alifáticos	A L I V P
B. Aromáticos	F W
C. Que contienen azufre	M
D. Límite	G
Polares no cargados:	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q
C. Sulfhidrilo	C
D. Límite	G
Cargados positivamente (básicos)	K R H
Cargados negativamente (ácidos)	D E

Como alternativa, Se muestran inmediatamente a continuación las sustituciones conservativas ilustrativas.

SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS II

<b>RESTO ORIGINAL</b>	<b>SUSTITUCIÓN ILUSTRATIVA</b>
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

ADMINISTRACIÓN

En una realización, se puede administrar un compuesto conjugado de la presente invención mediante inyección, tal

como inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal. Las composiciones pueden ser útiles como agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o similares.

5 Para administrar composiciones que comprenden un compuesto conjugado de la presente invención a seres humanos o animales de ensayo, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables. Las expresiones "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades y composiciones moleculares que son estables, inhiben la degradación de las proteínas tales como la agregación y los productos de escisión y, además, no producen reacciones alérgicas, u otras reacciones adversas cuando se administran usando rutas bien conocidas en la técnica, como se describe a continuación. Los "transportadores farmacéuticamente aceptables" incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, 10 agentes antibacterianos y antifúngicos clínicamente útiles, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción y similares, incluyendo aquellos agentes desvelados anteriormente.

Como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" incluye una dosis adecuada para tratar un mamífero que tiene un trastorno clínicamente definido.

15 Las composiciones se pueden administrar por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, por inhalación mediante pulverización, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inyección intracraneal. El extremo parenteral como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutánea, inyección intravenosa, intramuscular, intracisternal o técnicas de infusión. La administración mediante inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar intrapulmonar y/o implante quirúrgico en un sitio concreto también se contemplan. Generalmente, las composiciones están esencialmente exentas de pirógenos, así como de otras 20 impurezas que podrían ser perjudiciales para el receptor.

Se pueden llevar a cabo administraciones únicas o múltiples de los compuestos con los niveles de dosis y el patrón seleccionados por el médico a cargo del tratamiento. Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, como se ha descrito anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el fármaco se administra con fines preventivos o terapéuticos, tratamiento 25 previo, antecedentes clínicos del paciente y respuesta al fármaco, y el criterio del médico a cargo del tratamiento.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto o proteína conjugada como se define en el presente documento. La composición farmacéutica puede comprender además un transportador, diluyente, sal, tampón o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se puede usar para tratar trastornos clínicamente definidos. La composición farmacéutica de la invención puede ser una solución o un producto liofilizado. Las soluciones de la composición farmacéutica pueden someterse a cualquier procedimiento de liofilización adecuado. 30

Como aspecto adicional, la invención incluye kits que comprenden una composición de la invención envasada de manera que facilite su uso para la administración a sujetos. En una realización, dicho kit incluye un compuesto o composición descrito en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende una proteína conjugada), envasada en un recipiente tal como un frasco o recipiente precintado, con una etiqueta prefijada al 35 recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o composición en la práctica del procedimiento. En una realización, el kit contiene un primer recipiente que tiene una composición que comprende una proteína conjugada y un segundo recipiente que tiene una solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición en el primer recipiente. En un aspecto, el compuesto o composición se envasa en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administrar la composición de acuerdo con una vía de administración específica. Preferentemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la 40 composición de la proteína o péptido terapéutico.

En una realización, el derivado retiene la actividad funcional completa de los compuestos terapéuticos naturales, y proporciona una semivida ampliada *in vivo*, en comparación con los compuestos terapéuticos nativos. En otra 45 realización, el derivado retiene al menos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, o 150 por ciento (%) de la actividad biológica en relación con el compuesto natural.

#### ÁCIDO SIÁLICO Y PSA

50 Como se usa en el presente documento, "restos de ácido siálico" incluye monómeros o polímeros de ácido siálico ("polisacáridos") que son solubles en una solución o suspensión acuosa y tienen poco o ningún impacto negativo, tal como efectos secundarios, en mamíferos tras la administración del conjugado de PSA-proteína en una cantidad farmacéuticamente eficaz. PSA y mPSA se caracterizan, en un aspecto, por tener 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 unidades de ácido siálico. En determinados aspectos, las diferentes unidades de 55 ácido siálico se combinan en una cadena.

En una realización de la invención, la porción de ácido siálico del compuesto de PSA o mPSA es muy hidrófila y, en otra realización, el compuesto completo es muy hidrófilo. La hidrofiliidad se transmite principalmente por los grupos carboxilo colgantes de las unidades de ácido siálico, así como por los grupos hidroxilo. La unidad de sacárido puede

contener otros grupos funcionales, tales como, grupos amina, hidroxilo o sulfato, o combinaciones de los mismos. Estos grupos pueden estar presentes en compuestos sacáridos de origen natural, o introducidos en compuestos derivados de polisacáridos. El PSA y el mPSA usados en los procedimientos y conjugados de la invención pueden caracterizarse adicionalmente como se ha descrito anteriormente en los antecedentes de la invención.

- 5 El polímero PSA de origen natural está disponible como una preparación polidispersa que muestra una amplia distribución de tamaños (p. ej., Sigma C-5762) y una alta polidispersidad (PD). Puesto que los polisacáridos se producen usualmente en bacterias que tienen el riesgo inherente de copurificar endotoxinas, la purificación de largas cadenas poliméricas de ácido siálico puede aumentar la probabilidad de un contenido creciente de endotoxinas. Las moléculas de PSA cortas con 1-4 unidades de ácido siálico también pueden prepararse sintéticamente (Kang SH y col., Chem Commun. 2000;227-8; Ress DK y Linhardt RJ, Current Organic Synthesis. 2004;1:31-46), minimizando así el riesgo de altos niveles de endotoxinas. Sin embargo no se pueden fabricar preparaciones de PSA con una distribución estrecha de tamaños y una baja polidispersidad, que estén también exentas de endotoxinas. Los compuestos polisacáridos de uso particular en la invención son, en un aspecto, aquellos producidos por bacterias. Algunos de estos polisacáridos de origen natural se conocen como glicolípidos. En una realización, los compuestos polisacáridos están sustancialmente exentos de unidades de galactosa en los extremos.

En diversas realizaciones, el compuesto se une o se asocia con el compuesto de PSA o de mPSA en cantidades estequiométricas (p. ej., 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9, o 1:10, etc.). En diversas realizaciones, 1-6, 7-12 o 13-20 unidades de PSA y/o mPSA están unidas al compuesto. En otras realizaciones adicionales, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más unidades de PSA y/o mPSA están unidas al compuesto.

- 20 Opcionalmente, el compuesto se modifica para introducir sitios de glicosilación (es decir, sitios diferentes que los sitios de glicosilación naturales). Dicha modificación puede llevarse a cabo usando técnicas biológicas moleculares convencionales en la materia. Además, el compuesto, antes de la conjugación mediante uno o más restos de carbohidrato, puede glicosilarse *in vivo* o *in vitro*.

#### ENLACE AMINOOXI

- 25 En un aspecto de la divulgación, la reacción de la hidroxilamina o derivados de la hidroxilamina con aldehídos (p. ej., en un resto carbohidrato tras oxidación con peryodato de sodio) para formar un grupo oxima se aplica a la preparación de conjugados del compuesto. Por ejemplo, una glicoproteína se oxida en primer lugar con un agente oxidante tal como peryodato de sodio (NaIO<sub>4</sub>) (Rothfus JA y Smith EL., J Biol Chem 1963, 238, 1402-10; y Van Lenten L y Ashwell G., J Biol Chem 1971, 246, 1889-94). La oxidación con peryodato de, p. ej., glicoproteínas, se basa en la reacción clásica de Malaprade descrita en 1928, la oxidación de los dioles vecinales con peryodato para formar un grupo aldehído activo (Malaprade L., Analytical application, Bull Soc Chim France, 1928, 43, 683-96). Los ejemplos adicionales de dicho agente oxidante son tetraacetato de plomo (Pb(OAc)<sub>4</sub>), acetato de manganeso (MnO(Ac)<sub>3</sub>), acetato de cobalto (Co(OAc)<sub>2</sub>), acetato de talio (TlOAc), sulfato de cerio (Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) (documento US 4.367.309) o perrutenato de potasio (KRuO<sub>4</sub>) (Marko y col., J Am Chem Soc 1997, 119, 12661-2) Por "agente oxidante" se entiende un compuesto oxidante suave que es capaz de oxidar dioles vecinales en carbohidratos, generando por tanto grupos aldehído activos en condiciones de reacción fisiológicas.

- La segunda etapa es el acoplamiento del polímero que contiene un grupo aminooxi al resto carbohidrato oxidado para formar un enlace oxima. En un aspecto de la divulgación, esta etapa se puede llevar a cabo en presencia de cantidades catalíticas del catalizador nucleofílico anilina o derivados de anilina (Dirksen A et Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008; Zeng Y y col., Nature Methods 2009;6:207-9). El catalizador de anilina acelera drásticamente la ligadura de la oxima permitiendo el uso de concentraciones muy bajas de los reactivos. En otro aspecto de la divulgación, el enlace de oxima se estabiliza mediante reducción con NaCNBH<sub>3</sub> para formar un enlace alcoxiamina.

- 45 En un aspecto de la divulgación, las etapas de la reacción para conjugar PSA o mPSA a una proteína se llevan a cabo por separado y secuencialmente (es decir, materiales de partida (p. ej., proteína, polímero, etc.), reactivos (p. ej., agentes oxidantes, anilina, etc.) y los productos de reacción (p. ej., carbohidrato oxidado en una proteína, polímero de aminooxi activado, etc.) están separados entre etapas de reacción individuales).

- Se puede encontrar información adicional sobre tecnología de aminooxi en las siguientes referencias: documento EP 1681303A1 (eritropoyetina silada con HA); documento WO 2005/014024 (conjugados de un polímero y una proteína unida mediante un grupo de unión a oxima); documento WO96/40662 (compuestos enlazadores que contienen aminooxi y su aplicación en conjugados); documento WO 2008/025856 (Proteínas modificadas); Peri F y col., Tetrahedron 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J y Pozsgay V., J Org Chem 2005, 70, 6887-90; Lees A y col., Vaccine 2006, 24(6), 716-29; y Heredia KL y col., Macromolecules 2007, 40(14), 4772-9.

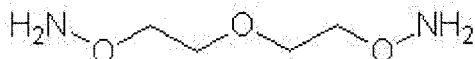
Las ventajas de la invención incluyen una alta recuperación del conjugado, alta retención de la actividad de la glicoproteína conjugada en comparación con la proteína sin conjugar y alta eficacia de la conjugación.

- 55 La invención se ilustra ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Los Ejemplos 21-25 ilustran realizaciones específicas de la invención. Los Ejemplos 1-20, 26 y 27 se incluyen como ejemplos de referencia por su relevancia en la preparación de los correspondientes conjugados de la invención.



**Ejemplos****Ejemplo 1**Preparación del enlazador homobifuncional  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$ 

El enlazador homobifuncional  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_2\text{ONH}_2$



(3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina) que contiene dos grupos aminooxi activos se sintetizó de acuerdo con Boturyn y col. (Tetrahedron 1997;53:5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas empleando una síntesis de aminas primarias modificada por Gabriel. En la primera etapa, una molécula de 2,2-clorodietiléter se hizo reaccionar con dos moléculas de endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en dimetilformamida (DMF). El producto homobifuncional deseado se preparó a partir del intermedio resultante mediante hidrazinolisis en etanol. Excepto cuando se especifique lo contrario, esto se denomina como el enlazador de diaminooxi en los ejemplos siguientes.

**Ejemplo 2**Preparación del enlazador homobifuncional  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$ 

El enlazador homobifuncional  $\text{NH}_2[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_4\text{ONH}_2$



(3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina) que contiene dos grupos aminooxi activos se sintetizó de acuerdo con Boturyn y col. (Tetrahedron 1997;53:5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas empleando una síntesis de aminas primarias modificada por Gabriel. En la primera etapa, una molécula de bis-(2-(2-cloroetoxi)-etil)-éter se hizo reaccionar con dos moléculas de endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en DMF. El producto homobifuncional deseado se preparó a partir del intermedio resultante mediante hidrazinolisis en etanol.

**Ejemplo 3**Preparación de aminooxi-PSA

Se disolvieron 500 mg de PSA oxidado (MW=18,8kD) obtenido del Serum Institute of India (Pune, India)

en 8 ml de tampón acetato de sodio 50 mM, a pH 5,5. A continuación, se añadieron 100 mg de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina. Tras agitar durante 2 h a temperatura ambiente, se añadieron 44 mg de cianoborohidruro de sodio. Tras agitar durante otras 4 h a 4 °C, la mezcla de reacción se cargó en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer (Pierce, Rockford, IL) (membrana de 3,5 kD, celulosa regenerada) y se dializó frente a PBS pH 7,2 durante 4 días. El producto se congeló a -80 °C. En la Figura 2 se ilustra la preparación del aminooxi-PSA de acuerdo con este procedimiento.

**Ejemplo 4**Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFIX y purificación del conjugado

A 12,6 mg de rFIX, disueltos en 6,3 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, se añadieron 289 µl de una solución acuosa de peryodato de sodio (10 mM). La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1 h a 4 °C y se inactivó durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 6,5 µl de glicerol 1 M. Se eliminaron los contaminantes de bajo peso molecular mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) empleando concentradores Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) (membrana de 30 kD, celulosa regenerada). A continuación, se añadieron 43 mg de aminooxi-PSA al retentato UF/DF y se agitó la mezcla durante 18 h a 4 °C. Se eliminó el reactivo PSA en exceso mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). La conductividad de la mezcla de reacción enfriada se aumentó a 180 mS/cm y se cargó en una columna HIC (1,6 x 2,5 cm) HiTrap Butyl FF de 5 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 6,7 mM, Tween 80 al 0,01 %, a pH 6,9. Se eluyó el conjugado en 2,4 volúmenes de columna (VC) con HEPES 50 mM, cloruro de calcio 6,7 mM, Tween 80 al 0,005 %, pH 7,4, a un caudal de 5 ml/min. La preparación se caracterizó analíticamente midiendo la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica FIX. Para el conjugado PSA-rFIX se determinó una actividad específica de 80,2 UI/mg de proteína (56,4 % en comparación con rFIX natural). En la tabla 1 se resumen los resultados.

**Tabla 1**

Artículos	BCA[mg/ml]	FIX:Crom [UI/ml]	Actividad específica [UI FIX:Crom/mg de BCA]	Actividad específica [%]
rFIX	8,58	1221	142,3	100
PSA-rFIX	1,15	92,2	80,2	56,4

**Ejemplo 5**Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFIX en presencia de anilina como catalizador nucleófilo

5 A 3,0 mg de rFIX, disueltos en 1,4 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, se añadieron 14,1 µl de una solución acuosa de peryodato de sodio (10 mM). La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1 h a 4 °C y se inactivó durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 1,5 µl de glicerol 1 M. Se eliminaron los contaminantes de bajo peso molecular por medio de cromatografía de exclusión molecular (SEC) empleando columnas de desalación PD-10 (GE Healthcare, Fairfield, CT). 1,2 mg de rFIX oxidado, disueltos en 1,33 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0 se mezclaron con 70 µl de anilina (solución madre acuosa 200 mM) y se agitaron durante 45 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 4,0 mg de aminooxi-PSA y la mezcla se agitó 2 h a temperatura ambiente y 16 h más a 4 °C. Se retiraron las muestras después de 1 h, después de 2 h al final de la reacción tras 18 h. A continuación, se eliminaron el reactivo PSA en exceso y exento de rFIX por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción enfriada se aumentó a 180 mS/cm y se cargó en una columna HIC (1,6 x 2,5 cm) HiTrap Butyl FF de 5 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 6,7 mM, Tween 80 al 0,01 %, a pH 6,9. Se eluyó el conjugado con un gradiente lineal de HEPES 50 mM, cloruro de calcio 6,7 mM, Tween 80 al 0,005 %, pH 7,4, en 20 VC a un caudal de 5 ml/min.

**Ejemplo 6**Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFIX y reducción con NaCNBH<sub>3</sub>

20 A 10,5 mg de rFIX, disueltos en 5,25 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, se añadieron 53 µl de una solución acuosa de peryodato de sodio (10 mM). La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1 h a 4 °C y se inactivó durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 5,3 µl de glicerol 1 M. Se eliminaron los contaminantes de bajo peso molecular mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) empleando concentradores Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) (membrana de 30 kD, celulosa regenerada). A continuación, se añadieron 35,9 mg de aminooxi-PSA al retentado de UF/DF y se agitó la mezcla de 2 h a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 53 µl de solución acuosa de cianoborohidruro de sodio (5 M) y se dejó proceder la reacción durante otras 16 h. A continuación se eliminó el reactivo PSA en exceso por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción enfriada se aumentó a 180 mS/cm y se cargó en una columna (1,6 x 2,5 cm) HiTrap Butyl HIC FF de 5 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 6,7 mM, Tween 80 al 0,01 %, a pH 6,9. Se eluyó el conjugado en 2,4 VC con HEPES 50 mM, cloruro de calcio 6,7 mM, Tween 80 al 0,005 %, pH 7,4, a un caudal de 5 ml/min.

**Ejemplo 7**Acoplamiento de aminooxi-PSA (enlazador: NH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>4</sub>ONH<sub>2</sub>) a rFIX y purificación del conjugado

35 A 5,6 mg de rFIX, disueltos en 2,8 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, se añadieron 102 µl de una solución acuosa de peryodato de sodio (10 mM). La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1 h a 4 °C y se inactivó durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de 2,9 µl de glicerol 1 M. Se eliminaron los contaminantes de bajo peso molecular mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) empleando concentradores Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) (membrana de 30 kD, celulosa regenerada). A continuación, se añadieron 19 mg de aminooxi-PSA al retentado de UF/DF y se agitó la mezcla durante 18 h a 4 °C. Se eliminó el reactivo PSA en exceso mediante HIC. La conductividad de la mezcla de reacción enfriada se aumentó a 180 mS/cm y se cargó en una columna HIC (1,6 x 2,5 cm) HiTrap Butyl FF de 5 ml (GE Healthcare, Fairfield, CT), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 6,7 mM, Tween 80 al 0,01 %, a pH 6,9. Se eluyó el conjugado en 2,4 VC con HEPES 50 mM, cloruro de calcio 6,7 mM, Tween 80 al 0,005 %, pH 7,4, a un caudal de 5 ml/min.

**Ejemplo 8**Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFVIII

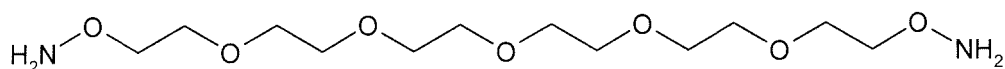
45 A 11 mg de rFVIII, disueltos en 11 ml de tampón Hepes pH 6 (Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 150 mM, Tween al 0,01 %) se añadieron 57 µl de peryodato de sodio 10 mM. La mezcla se agitó en la oscuridad durante 30 min a 4 °C y se inactivó durante 30 min a 4 °C mediante la adición de 107 µl de una solución acuosa de glicerol 1 M. A continuación se añadieron 19,8 mg de aminooxi-PSA (18,8 kD) y se agitó la mezcla durante la noche a 4 °C. Se aumentó la fuerza iónica añadiendo un tampón que contenía acetato de amonio 8 M (acetato de amonio 8 M, Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 350 mM, Tween 80 al 0,01 %, pH 6,9) hasta llegar a una concentración final de acetato de amonio 2,5 M. A continuación, la mezcla de reacción se cargó en una columna HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) que se equilibró con tampón de equilibrio (acetato de amonio 2,5 M, Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 350 mM, Tween 80 al

0,01 %, pH 6,9). Se eluyó el producto con tampón de elución (Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Tween 80 al 0,01 %, pH 7,4), y se concentró el eluato mediante filtración centrífuga utilizando dispositivos Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) con 30.000 MWCO.

### Ejemplo 9

#### 5 Preparación del enlazador homobifuncional NH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>6</sub>ONH<sub>2</sub>

El enlazador homobifuncional NH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>6</sub>ONH<sub>2</sub>



(3,6,9,12,15-pentaoxa-heptadecano-1,17-dioxiamina) que contenía dos grupos aminooxi activos se sintetizó de acuerdo con Boturny y col. (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) en una reacción orgánica en dos etapas que emplea la síntesis de aminas primarias modificada por Gabriel. En la primera etapa, una molécula de dicloruro de hexaetilenglicol se hizo reaccionar con dos moléculas de endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en DMF. El producto homobifuncional deseado se preparó a partir del intermedio resultante mediante hidrazinolisis en etanol.

### Ejemplo 10

#### Polisialilación de rFIX empleando un sistema enlazador de maleimido/aminooxi

#### 15 A. Preparación del reactivo de modificación

Se preparó un reactivo de Aminooxi-PSA mediante el uso de un sistema enlazador de maleimido/aminooxi (Toyokuni y col., Bioconjugate Chem 2003; 14, 1253-9). PSA-SH (20 kD) que contenía un grupo SH libre en el extremo usando un procedimiento en dos etapas: a) Preparación de PSA-NH<sub>2</sub> mediante aminación reductora de PSA oxidado con NH<sub>4</sub>Cl de acuerdo con el documento WO05016973A1 y b) introducción de un grupo sulfhidrilo mediante reacción del grupo amino primario en el extremo con 2-iminotiolano (reactivo de Traut/Pierce, Rockford, IL) como se describe en el documento US7645860. PSA-SH se acopló al grupo maleimido del enlazador a pH 7,5 en tampón PBS usando un exceso molar de 10 veces del enlazador y una concentración de PSA-SH de 50 mg/ml. La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas con agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el reactivo enlazador en exceso y el aminooxi-PSA se somete a intercambio de tampón en tampón de oxidación (fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0) mediante diafiltración. El tampón se intercambiaba 25 veces empleando una membrana de celulosa Pellicon XL de 5 kD regenerada (Millipore, Billerica, MA).

#### B. Modificación de rFIX tras una oxidación previa con NaIO<sub>4</sub>

rFIX se oxidó en tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0 empleando peryodato de sodio 100 µM en el tampón. La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1 h a 4 °C y se inactivó durante 15 min a temperatura ambiente mediante la adición de glicerol hasta una concentración final de 5 mM. Se eliminaron los contaminantes de bajo peso molecular por medio de cromatografía de exclusión molecular (SEC) empleando columnas de desalación PD-10 (GE Healthcare, Fairfield, CT). rFIX oxidado se enriqueció a continuación con anilina hasta obtener una concentración final de 10 mM y se mezcló con el reactivo aminooxi-PSA hasta conseguir un exceso molar de 5 veces de PSA. Se incubó la mezcla de reacción durante 2 horas con agitación suave en la oscuridad a temperatura ambiente.

#### 35 C. Purificación de los conjugados

Se eliminó el reactivo PSA en exceso y se eliminó el rFIX libre por medio de HIC. Se aumentó la conductividad de la mezcla de reacción a 180 mS/cm y se cargó en una columna rellena con 48 ml de Butil-Sefarosa FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 6,7 mM, Tween 80 al 0,01 %, a pH 6,9. Posteriormente, se eluyó el conjugado con un gradiente lineal de tampón de elución al 60 % (Hepes 50 mM, cloruro de calcio 6,7 mM, pH 7,4) en 40 VC. Finalmente, se recogieron las fracciones que contenían PSA-rFIX y se sometieron a UF/DF mediante el uso de una membrana de 30 kD fabricada de celulosa regenerada (Millipore). La preparación se caracterizó analíticamente midiendo la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica FIX. Para los conjugados de PSA-rFIX preparados con ambas variantes, se determinó una actividad específica de > 50 % en comparación con rFIX nativa.

### 45 Ejemplo 11

#### Preparación de reactivo de aminooxi-PSA

Se preparó un reactivo de aminooxi - PSA de acuerdo con el Ejemplo 3. El producto final se diafiltró frente al tampón, pH 7,2 (Hepes 50 mM) usando una membrana de 5 kD (celulosa regenerada, Millipore), congelada a -80 °C y liofilizada. Tras la liofilización, el reactivo se disolvió en el volumen adecuado de agua y se usó para la preparación de conjugados de PSA-proteína mediante la modificación de los carbohidratos.

### Ejemplo 12

Síntesis detallada del reactivo de aminooxi-PSA

Se sintetizó 3-oxa-pentano-1,5 dioxiamina de acuerdo con Botyryn y col (Tetrahedron 1997; 53:5485-92) en una síntesis orgánica en dos etapas como se indicó en el Ejemplo 1.

Etapas 1:

- 5 A una solución de endo-N-hidroxi-5-norboneno-2,3-dicarboxiimida (59,0 g; 1,00 eq) en 700 ml de N,N-dimetilformamida anhidra, se añadieron  $K_2CO_3$  anhidro (45,51 g; 1,00 eq) y 2,2-diclorodietileter (15,84 ml; 0,41 eq). La mezcla de reacción se agitó durante 22 horas a 50 °C. La mezcla se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se suspendió en 2 l de diclorometano y se extrajo dos veces con solución acuosa saturada de NaCl (cada 1 l). La capa de diclorometano se secó con  $Na_2SO_4$  y a continuación se evaporó hasta sequedad a presión reducida y se secó a alto vacío para dar 64,5 g de 3-oxapentano-1,5-dioxi-endo-2',3'-dicarboxidiimidánorborneno Como un sólido de color blanco amarillento (intermedio 1).

Etapas 2:

- 15 A una solución del intermedio 1 (64,25 g; 1,00 eq) en 800 ml de etanol anhidro, Se añadieron 31,0 ml de hidrato de hidrazina (4,26 eq). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2 horas. La mezcla se concentró hasta la mitad del volumen de partida evaporando el disolvente a presión reducida. El precipitado producido se eliminó mediante filtración. La capa de etanol restante se evaporó hasta sequedad a presión reducida. El residuo que contenía el producto bruto de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina se secó al vacío para dar como resultado 46,3 g. El producto bruto se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna (Silicagel 60; elución isocrática con una mezcla de diclorometano/metanol, 9+1) para dar como resultado 11,7 g del producto final puro 3-oxa-pentano -1,5-dioxiamina.

**Ejemplo 13**Preparación de un polímero de aminooxi-PSA

- 25 Se disolvieron 1,3 g ácido colomínico oxidado (23 kDa) en 18 ml de acetato de sodio 50 mM pH 5,5±0,02. Se disolvió un exceso molar de 20 veces de 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecano (denominado también 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina) en una cantidad mínima de acetato de sodio 50 mM (pH 5,5±0,02) y se añadieron a la solución de PSA. La concentración final de ácido colomínico era de 62,5 mg/ml. Esta mezcla de reacción se incubó durante 2±0,1h a 22±1,0 °C en un mezclador a baja velocidad (22 oscilaciones por minuto). Tras esto, se añadieron 0,65 ml de 160 mg/ml de una solución de  $NaCNBH_3$  a la mezcla de reacción anterior para preparar la concentración final de 5,00 mg/ml. Esta se incubó durante 3,0±0,20 horas a 4,0±1,0 °C en un agitador (22 oscilaciones por minuto) en un recipiente hermético al aire exento de endotoxinas con suficiente espacio superior para la mezcla. Para la purificación, se diluyó la muestra con trietanolamina 2 mM, pH 8,0±0,02 para preparar la concentración final de ácido colomínico de 20 mg/ml. La mezcla de reacción se desaló para eliminar el exceso de 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundecano,  $NaCNBH_3$  y los subproductos de la reacción. Esto fue seguido por la desalación en una columna Sephadex G25 usando un tampón de trietanolamina 20 mM (pH 8,0±0,02). El pH de la muestra desalada se ajustó a pH 7,8-8,0 y se ultrafiltró/diafiltró con TEA 20 mM pH 8,0 una vez y trietanolamina 2 mM (TEA) pH 8,0 dos veces. La muestra se criodesecó y se almacenó a -80 °C.

Como alternativa, se llevó a cabo la purificación en presencia de una elevada concentración de sal durante la desalación y etapas de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF). Se usó también la cromatografía de intercambio aniónico con una alta concentración de sal para preparar aminooxi-PSA muy puro. Por analogía, se sintetizaron aminooxi-PSA de diferentes pesos moleculares.

**Ejemplo 14**Acoplamiento de diaminooxi (3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina)-PSA a  $\beta$ -galactosidasa

- 45 Para la oxidación de la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal), se usaron diferentes concentraciones de  $NaIO_4$  (comprendidas de 0,157 mM a 2 mM). Se oxidaron 0,5 mg de  $\beta$ -Gal a un pH ácido de 5,75 a 4 °C durante 30 minutos en la oscuridad. Se detuvo la oxidación mediante la adición de  $NaHSO_3$  a una concentración final de 5 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la  $\beta$ -Gal oxidada con un polímero de diaminooxi PSA (22 kDa). La concentración final del polímero en la mezcla de reacción era 1,25 mM mientras que la concentración de  $\beta$ -Gal varió de 0,125 mg/ml a 0,76 mg/ml. Todas las reacciones se llevaron a cabo a pH 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. Se llevó a cabo la reacción a 4 °C y se recogieron las muestras a intervalos de tiempo de 1, 2 y 24 horas. Se caracterizaron los conjugados usando SDS PAGE y la transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se confirmó esto también mediante la transferencia western.

- 55 Basándose en las mejores condiciones de reacción, se oxidaron 1,9 mg de  $\beta$ -Gal con 1,5 mM de  $NaIO_4$  durante 30 minutos a 4 °C y a continuación se detuvo la oxidación añadiendo  $NaHSO_3$  hasta una concentración final de 5 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la  $\beta$ -Gal oxidada con polímero de diaminooxi PSA. Las concentraciones finales de polímero y de proteína en la mezcla de reacción fueron 1,25 mM y 0,76 mg/ml

respectivamente. El pH final de la mezcla de reacción fue de alrededor de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante 2 horas. Se caracterizaron los conjugados purificados y sin purificar usando SDS PAGE y transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y esto se confirmó mediante transferencia western usando un anticuerpo anti-PSA. La actividad *in vitro* de los conjugados PSA-βGal fue comparable a la de la proteína nativa usando un kit de ensayo de βGal All in one (Pierce). Se observó menos de un 50 % de actividad en conjugados comparables usando la química de enlazadores de aldehído. Además, se escaló hasta 3 veces el procedimiento global.

### Ejemplo 15

#### 10 Acoplamiento de diaminooxi-PSA a fetuína

Se oxidó la fetuína con NaIO<sub>4</sub> 10 mM durante 60 minutos a 4 °C en la oscuridad y se detuvo la oxidación añadiendo NaHSO<sub>3</sub> hasta una concentración final de 10 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la fetuína oxidada con un polímero de diaminooxi PSA (23 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue de 2,5 mM a pH 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. La concentración final de la proteína en la reacción fue de 0,714 mg/ml y se llevó a cabo la reacción a 4 °C durante 2 horas. Estos conjugados se caracterizaron usando SDS PAGE y la transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para los conjugados en SDS PAGE y se confirmó esto también mediante la transferencia western.

Para la reacción de escalado, se oxidaron 5 mg de fetuína con 10 mM de NaIO<sub>4</sub> durante 60 minutos a 4 °C en la oscuridad y a continuación se detuvo la oxidación añadiendo NaHSO<sub>3</sub> a una concentración final de 10 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la fetuína oxidada con un polímero de diaminooxi PSA (23 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue de 2,5 mM a pH de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. Se llevó a cabo la reacción a 4 °C y se recogieron las muestras después de 2 horas. Se caracterizaron los conjugados purificados y sin purificar usando SDS PAGE y transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se confirmó esto también mediante la transferencia western.

### Ejemplo 16

#### Acoplamiento de diaminooxi-PSA a fetuína con anilina para actuar como un catalizador nucleofílico

Se oxidaron 0,2 mg de fetuína con NaIO<sub>4</sub> 10 mM durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad y a continuación se detuvo la oxidación añadiendo NaHSO<sub>3</sub> hasta una concentración final de 5 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la fetuína oxidada con un polímero de diaminooxi PSA (23 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue de 1,25 mM. El pH final de la mezcla de reacción fue de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. La concentración final de proteína en la reacción fue de 0,125 mg/ml. Se añadieron 84,21 µl de una solución de anilina 200 mM a los 1,6 ml de la mezcla de reacción. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante la noche.

### Ejemplo 17

#### Acoplamiento de diaminooxi-PSA a eritropoyetina (EPO)

Se oxidaron 0,2 mg de EPO con 10 mM de NaIO<sub>4</sub> durante 30 minutos a 4 °C. se detuvo la oxidación añadiendo NaHSO<sub>3</sub> hasta una concentración final de 5 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la EPO oxidada con un polímero de diaminooxi de 23 kDa. La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue de 1,25 mM. La concentración final de EPO en la mezcla de reacción fue de 0,125 mg/ml. El pH final de la mezcla de reacción fue de alrededor de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante 24 horas. Se caracterizó el conjugado sin purificar usando SDS PAGE. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE.

### 45 Ejemplo 18

#### Acoplamiento de diaminooxi-PSA a EPO con anilina para actuar como un catalizador nucleofílico

Se oxidaron 0,2 mg de EPO con 10 mM de NaIO<sub>4</sub> durante 30 minutos a 4 °C. Se detuvo la oxidación añadiendo NaHSO<sub>3</sub> hasta una concentración final de 5 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la EPO oxidada con un polímero de diaminooxi PSA (22 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue de 1,25 mM. El pH final de la mezcla de reacción fue de alrededor de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. La concentración final de proteína en la reacción fue de 0,125 mg/ml. Se añadieron 84,21 µl de una solución de anilina 200 mM a los 1,6 ml de la mezcla de reacción. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante la noche. Se caracterizaron los conjugados usando SDS PAGE. Se observó un desplazamiento en la banda en los conjugados. No se observaron efectos adversos de la anilina sobre la actividad de los conjugados.

**Ejemplo 19**Acoplamiento de diaminoxi-PSA a ADNasa

Para la glicopolisialilación de la ADNasa, la ADNasa de páncreas de bovino se usó para la reacción de conjugación. Esta fuente de ADNasa se suministró como un polvo liofilizado, que se almacenó a -20 °C. Antes de la reacción, este polvo liofilizado se disolvió en tampón acetato de sodio (pH 5,75). El polímero usado para la glicopolisialilación tenía un peso en el intervalo de 10 kDa a 22 kDa. Para la oxidación del resto glicón de la ADNasa, NaIO<sub>4</sub> se usó como agente oxidante hasta una concentración final de 1 mM. La ADNasa se oxidó a pH ácido de 5,75 a 4 °C durante 30 minutos. Se detuvo la oxidación mediante la adición de NaHSO<sub>3</sub> a una concentración final de 2 mM. Tras completarse la oxidación, se llevó a cabo la reacción de conjugación mediante la adición de polímero de diaminoxi PSA hasta una concentración final de 1,25 mM. Se añadió NaCNBH<sub>3</sub> a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 50 mM o 3,17 mg/ml y se realizó la polisialilación de la ADNasa a 4,0±1,0 °C durante al menos 2 horas. Se detuvieron las reacciones con un exceso 25 molar de Tris sobre el polímero. Se caracterizaron los conjugados usando SDS PAGE y la transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se obtuvo un resultado positivo a partir de la transferencia western. Se midió la actividad como un 95 % (en comparación con el menos del 50 % observado en conjugados comparables preparados usando la química del enlazador de aldehídos).

**Ejemplo 20**Acoplamiento de Diaminoxi (enlazador de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina)-PSA a β-Galactosidasa

Para la oxidación de la β-Galactosidasa, NaIO<sub>4</sub> se usó a una concentración de 2 mM. Se oxidaron 3 mg de β-galactosidasa a pH ácido de 5,75 a 4 °C durante 30 minutos, a continuación se detuvo la oxidación añadiendo NaHSO<sub>3</sub> hasta una concentración final de 2 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la β-galactosidasa oxidada con un polímero de diaminoxi PSA (23 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue de 1,5 mM. La concentración final de β-galactosidasa en la mezcla de reacción fue de 0,867 mg/ml. El pH final de la mezcla de reacción estuvo alrededor de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante 2 horas. Se caracterizaron los conjugados usando SDS PAGE y la transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se obtuvo un resultado positivo a partir de la transferencia western.

**Ejemplo 21**Preparación de hidrazida-ácido colomínico

Los inventores utilizaron el siguiente protocolo para preparar una PSA-hidrazida (ácido colomínico-hidrazida) usando dihidrazida de ácido adípico. Se usaron procedimientos análogos para preparar otras PSA-hidrazidas.

- 1 Disolver 1 g de ácido colomínico activado en ~10 ml de acetato de sodio 20 mM pH 5,5±0,02. La concentración final de ácido colomínico debe ser 62,5 mg/ml
- 2 Disolver un exceso molar de 25 veces (sobre el ácido colomínico oxidado "CAO") de dihidrazida de ácido adípico (MW= 174,2 g) en una mínima cantidad de acetato de sodio 20 mM (pH 5,5 ±0,02) y añadir a la solución de 1.
- 3 Cantidad de dihidrazida de ácido adípico que se va a añadir  

$$= \text{Peso de CAO en gramos} \times 25 \times \text{MW de dihidrazida de ácido adípico en g MW de CAO en Daltons}$$

$$= 1 \times 25 \times 174,2$$

$$15 \times 10^3$$

$$= 0,290 \text{ g}$$
- 4 Tras añadir una solución de dihidrazida de ácido adípico, completar el volumen de ácido colomínico con acetato de sodio hasta una concentración final de 62,5 mg/ml. Por tanto, el volumen total de reacción es 16 ml.
- 5 Incubar la mezcla de reacción durante 2±0,1 h a 22,0± 1,0 °C en un agitador (22 oscilaciones por minuto).
- 6 Preparar la solución concentrada de NaCNBH<sub>3</sub> (165 mg/ml) y añadir 0,5 ml a una solución de 1 de tal manera que la concentración final de esta llegue a 5,0 mg/ml en la mezcla de reacción final. Incubar la mezcla de reacción durante 3,0±0,20 horas a 4,0±1,0 °C en un agitador (22 oscilaciones por minuto).
- 7 Mantener la mezcla de reacción en un recipiente hermético al aire, exento de endotoxinas, con un exceso de 50 ml de espacio superior para la mezcla adecuada (debe haber suficiente espacio para que la mezcla de reacción no deba tocar la tapa del recipiente).
- 8 Después de 3 horas de reacción a 4°C, Diluir la muestra con trietanolamina 2 mM (completar el volumen hasta 50 ml) a pH 8,0±0.02 completar la concentración final de ácido colomínico hasta 20 mg/ml.
- 9 Desalar la mezcla de reacción para eliminar el exceso de dihidrazida de ácido adípico sin tratar, NaCNBH<sub>3</sub> etc., del polímero. Esto se puede llevar a cabo mediante GPC (usando una matriz de medios XK 50 Sephadex G-25; ≤1,8 mg de matriz CA/ml; 35 cm de altura de lecho; Volumen de columna= 687 ml) observando UV 224nm y conductividad. Se llevó a cabo la desalación con tampón de trietanolamina 20 mM (pH 8,0±0,02).
- 10 Tras la desalación, la hidrazida del ácido colomínico se sometió a 1 ciclo de ultrafiltración, 1 ciclo de diafiltración usando TEA 20 mM, pH 8,0±0,02 y al menos 3 ciclos de diafiltración usar TEA 2 mM, pH 8,0±0,02. Esto se puede

llevar a cabo usando casetes vivaflow de 3 kDa.

11 Ajustar el pH de la muestra desalada a pH 7,8-8,0. Opcionalmente, Criodesecar la muestra y mantener esta consecutivamente durante el secado secundario para eliminar el exceso de humedad.

### Ejemplo 22

#### 5 Acoplamiento de hidrazida-PSA a Eritropoyetina

Para la oxidación de la eritropoyetina (EPO), se usó  $\text{NaIO}_4$  a una concentración de 10 mM. Se oxidó EPO (1 mg) a pH 5,75 a 4 °C durante 30 minutos, a continuación se detuvo la oxidación añadiendo  $\text{NaHSO}_3$  hasta una concentración final de 5 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando EPO oxidada con un polímero de hidrazida-PSA. El peso molecular de la hidrazida-PSA usada para la conjugación fue de 24,34 kDa. La concentración final de hidrazida-PSA en la mezcla de reacción fue de 1,25 mM. La concentración final de EPO en la mezcla de reacción fue de 0,125 mg/ml. El pH final de la mezcla de reacción fue de alrededor de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante 24 horas. Se caracterizaron los conjugados usando SDS PAGE y la transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se obtuvo un resultado positivo a partir de la transferencia western.

### 15 Ejemplo 23

#### Acoplamiento de hidrazida-PSA a $\beta$ -Galactosidasa

Se oxidó  $\beta$ -galactosidasa (0,5 a 4,5 mg) con  $\text{NaIO}_4$  de 0,625 a 2 mM durante 30 minutos a 4 °C. Se detuvo la oxidación añadiendo  $\text{NaHSO}_3$  hasta una concentración final de 5 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la  $\beta$ -Galactosidasa oxidada con un hidrazida-PSA de 24,34 a 27,9 kDa. La concentración final de hidrazida-PSA en la mezcla de reacción fue de 1,25 mM. La concentración final de  $\beta$ -galactosidasa en la mezcla de reacción estuvo en el intervalo de 0,125 mg/ml a 0,76 mg/ml. El pH final de la mezcla de reacción debe estar alrededor de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. Se llevó a cabo la reacción a 4 °C y se recogieron las muestras a intervalos 1, 2 y 24 horas. Se caracterizaron los conjugados purificados y sin purificar usando SDS PAGE y la transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se obtuvo un resultado positivo a partir de la transferencia western. Se midió la actividad como el 84 %. Se observó menos de un 50 % de actividad en conjugados comparables usando la química de enlazadores de aldehído.

### Ejemplo 24

#### Acoplamiento de hidrazida-PSA a fetuína

30 Se oxidó la fetuína (0,25 mg) con  $\text{NaIO}_4$  (5 o 10 mM) durante 30 o 60 minutos a 4 °C. Se detuvo la oxidación añadiendo  $\text{NaHSO}_3$  a una concentración final de 5 o 10 mM según sea adecuado para que la concentración de  $\text{NaIO}_4$  corresponda con la usada para la oxidación. Se llevaron a cabo las reacciones de conjugación usando la fetuína oxidada con un polímero de dihidrazida del ácido adípico-PSA. La concentración final del polímero en la mezcla de reacción fue entre 1,25 y 2,5 mM. El pH final de la mezcla de reacción estuvo alrededor de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante 1 a 4 horas. Se caracterizaron los conjugados usando SDS PAGE y la transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE para cada conjunto de condiciones de reacción y se obtuvo un resultado positivo a partir de la transferencia western.

40 Se llevó a cabo una reacción escalada para 5 mg de fetuína seguida por purificación del conjugado resultante. se oxidaron 5 mg de fetuína con 10 mM de  $\text{NaIO}_4$  durante 60 minutos a 4 °C y a continuación se detuvo la oxidación añadiendo  $\text{NaHSO}_3$  a una concentración final de 10 mM. Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la fetuína oxidada con un polímero de dihidrazida del ácido adípico-PSA. La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue de 2,5 mM. El pH final de la mezcla de reacción estuvo alrededor de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. Se llevó a cabo la reacción a 4 °C y se recogieron las muestras a las 2 horas. Se caracterizaron los conjugados purificados y sin purificar usando SDS PAGE y la transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE y se obtuvo un resultado positivo a partir de la transferencia western.

### Ejemplo 25

#### Acoplamiento de hidrazida-PSA a ADNasa

50 Se oxidó la ADNasa con  $\text{NaIO}_4$  hasta una concentración final que variaba de 0,2 mM a 2 mM durante 30 minutos a 4 °C. Se detuvo la reacción de oxidación añadiendo  $\text{NaHSO}_3$  hasta una concentración final de entre 2 y 5 mM dependiendo de la concentración de  $\text{NaIO}_4$  usada para la oxidación. Se llevó a cabo la glicopolisialilación de la ADNasa oxidada mediante la adición de polímero de hidrazida-PSA hasta una concentración final de 1,25 mM a la ADNasa oxidada. se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 50 mM o 3,17 mg/ml y se realizó la glicopolisialilación de la ADNasa a 4 °C durante un periodo de tiempo que variaba de 1 hora

a 2 horas. Se detuvieron las reacciones con un exceso molar de 25 veces de Tris sobre el polímero. Se caracterizaron los conjugados usando SDS PAGE y la transferencia western. Se observó un desplazamiento en la banda para los conjugados en SDS PAGE y se obtuvo un resultado positivo a partir de la transferencia western. Se midió la actividad como el 49 %.

5 **Ejemplo 26**

PEGilación de la  $\beta$ -Galactosidasa usando un enlazador de aminooxi (3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina)

Se oxidó la  $\beta$ -galactosidasa (1 mg) con 1,5 mM de  $\text{NaIO}_4$  durante 30 minutos a 4 °C. Se detuvo la oxidación añadiendo  $\text{NaHSO}_3$  hasta una concentración final de 1,5 mM.

10 Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la  $\beta$ -galactosidasa oxidada con un polímero de diaminooxi-PEG (20 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue de 1,25 mM. La concentración final de  $\beta$ -galactosidasa en la mezcla de reacción fue de 1 mg/ml. El pH final de la mezcla de reacción debe estar alrededor de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante 2 horas. Se caracterizó el conjugado sin purificar usando SDS PAGE y se observó un desplazamiento en la banda para el conjugado en SDS PAGE. Se midió la actividad como el 59 %.

15 **Ejemplo 27**

PEGilación de eritropoyetina usando un enlazador de aminooxi

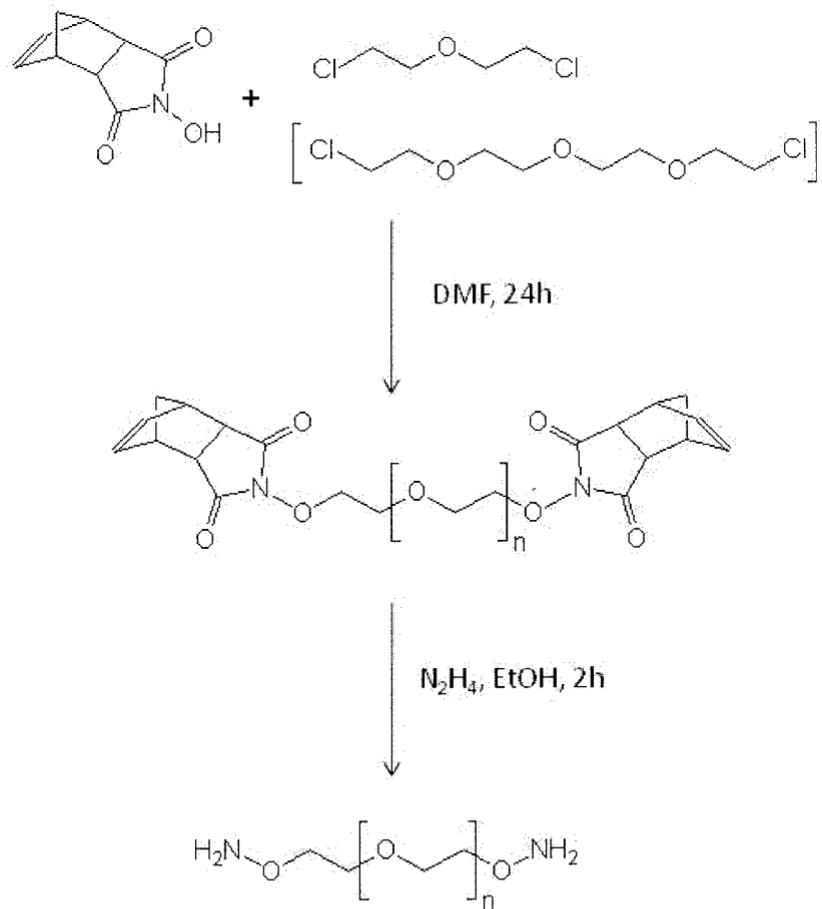
20 Se oxidó eritropoyetina (EPO; 0,2 mg) con 5 o 10 mM de  $\text{NaIO}_4$  en acetato de sodio 50 mM a pH 5,75 durante 45 minutos a 4 °C y a continuación se detuvo la oxidación añadiendo  $\text{NaHSO}_3$  hasta una concentración final de 5 o 10 mM (para hacer corresponder la concentración de  $\text{NaIO}_4$  usada para la oxidación). Se llevó a cabo la reacción de conjugación usando la EPO oxidada con un polímero de diaminooxi PEG (20 kDa). La concentración final de polímero en la mezcla de reacción fue de 1,5 mM. El pH final de la mezcla de reacción debe estar alrededor de 5,75. Se añadió cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción a una concentración de 50 mM o 3,17 mg/ml. La concentración final de proteína en la reacción fue de 0,4 mg/ml. Se llevó a cabo la reacción de conjugación durante la noche a 4 °C.

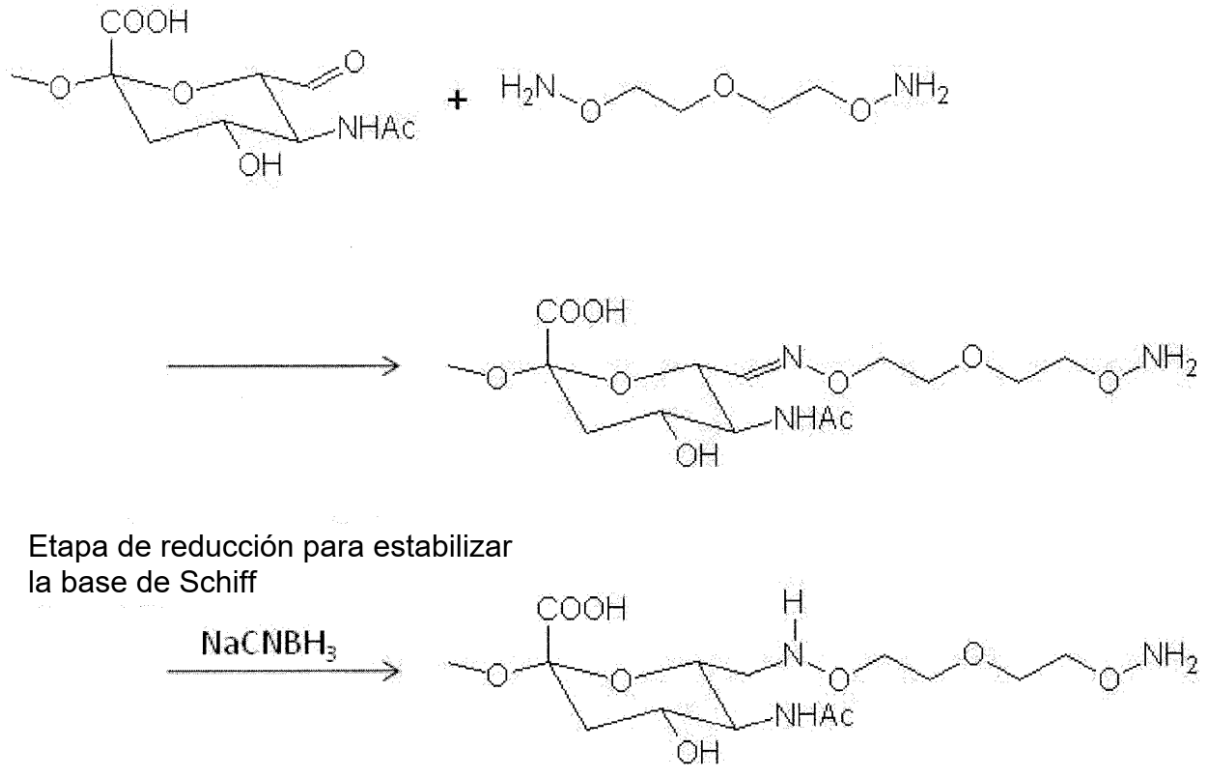
25 La invención proporciona por tanto conjugados de compuestos diferentes de las proteínas de coagulación de la sangre con polímeros solubles en agua, en particular PSA y mPSA.



## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para conjugar ácido polisiálico (PSA) o un PSA modificado (mPSA) a un resto carbohidrato oxidado de una glicoproteína diferente de una proteína de coagulación de la sangre que comprende un grupo carbohidrato, que comprende poner en contacto el resto carbohidrato oxidado con el PSA o el mPSA en condiciones que permitan la conjugación,  
5 en el que dicho PSA o mPSA contiene un grupo hidrazida y se forma un enlace hidrazona entre el resto carbohidrato oxidado y el grupo hidrazida del PSA o mPSA, en el que el PSA modificado es PSA que comprende un resto derivado de un resto de ácido N-acetilneuramínico en el extremo mediante oxidación o reducción.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el PSA o el mPSA es ácido colomínico o ácido colomínico modificado.  
10
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que el PSA o el mPSA comprende 2 - 500 unidades de ácido siálico.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación previa en el que la glicoproteína se selecciona entre citoquinas tales como interleuquinas, alfa-interferones, beta-interferones y gamma-interferones, factores estimuladores de colonias incluyen factores estimuladores de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de plaquetas, proteína activadora de la fosfolipasa (PUP), insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factores de necrosis tumoral, receptores de interleuquinas y formas solubles de receptores de interleuquinas, factores de crecimiento, factores de crecimiento tisular, factores de crecimiento transformante tales como TGF $\alpha$ s o TGF $\beta$  y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, hormonas pigmentarias, factores de liberación hipotalámicos, hormonas antidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimuladora del folículo, hormona estimuladora del tiroides, activador del plasminógeno tisular, inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, anticuerpos monoclonales, eritropoyetina (EPO), factores sanguíneos diferentes que las proteínas de coagulación de la sangre, galactosidasas,  $\alpha$ -galactosidasas,  $\beta$ -galactosidasas, ADNasas, fetuína, fragmentos de las mismas y proteínas de fusión que comprende cualquiera de las proteínas anteriormente mencionadas o fragmentos de las mismas.  
15  
20  
25
5. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 en el que la glicoproteína se selecciona entre factores de necrosis tumoral y los alelos relacionados, formas solubles de receptores de factores de necrosis tumoral, inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, anticuerpos monoclonales, eritropoyetina (EPO), ADNasas, fetuína, fragmentos de las mismas y proteínas de fusión que comprende cualquiera de las proteínas anteriormente mencionadas o fragmentos de las mismas.  
30
6. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende oxidar el resto carbohidrato incubando la glicoproteína con peryodato de sodio (NaIO $_4$ ).
7. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende oxidar el PSA o el mPSA para formar un grupo aldehído en una unidad en el extremo del PSA o el mPSA, y hacer reaccionar el PSA o el mPSA oxidado con un enlazador hidrazida.  
35
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende oxidar el PSA o el mPSA usando NaIO $_4$ .
9. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende poner en contacto el resto carbohidrato oxidado con PSA o mPSA en un tampón que comprende un catalizador nucleofílico seleccionado entre anilina y derivados de anilina.  
40
10. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que el grupo hidrazida se forma haciendo reaccionar PSA o mPSA oxidado con un enlazador hidrazida que es dihidrazida de ácido adípico.
11. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende reducir un enlace hidrazona en la glicoproteína conjugada mediante incubación en presencia de un compuesto reductor.
- 45 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el compuesto reductor es cianoborohidruro de sodio (NaCNBH $_3$ ) o ácido ascórbico (vitamina C).
13. Una glicoproteína conjugada obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
14. Una glicoproteína conjugada diferente de una proteína de coagulación de la sangre que comprende:  
50 (a) la glicoproteína; y  
(b) al menos una hidrazida-PSA o -mPSA unida a la glicoproteína de (a), en la que dicha hidrazida-PSA o -mPSA se une a la glicoproteína mediante uno o más restos carbohidrato, en el que el PSA modificado es PSA que comprende un resto derivado de un resto de ácido N-acetilneuramínico en el extremo mediante oxidación o reducción.

**Fig.1**



**Fig.2**