

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 601**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2009 E 11009919 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2431741**

54 Título: **Métodos para determinar ingredientes activos en conjugados PEG-proteína pro-fármaco con reactivos que pueden liberar PEG (despegilación in vitro)**

30 Prioridad:

21.10.2008 US 10725708 P

15.09.2009 US 24263409 P

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

11.12.2013

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC (33.3%)

**One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US;**

**BAXTER HEALTHCARE SA (33.3%) y
NEKTAR THERAPEUTICS (33.3%)**

72 Inventor/es:

**VARADI, KATALIN;
SCHRENK, GERALD;
ROTTENSTEINER, HANSPETER;
TURECEK, PETER;
WEBER, ALFRED;
ANDERLE, HEINZ;
CULBERTSON, SEAN M.;
FANG, ZHIHAO;
ZAPPE, HAROLD;
ZHANG, PING y
BOSSARD, MARY J.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 433 601 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

Métodos para determinar ingredientes activos en conjugados PEG-proteína pro-fármaco con reactivos que pueden liberar PEG (despegilación *in vitro*).

5 La invención se refiere en general al desarrollo de sistemas de ensayo *in vitro* para forzar la liberación de un polímero soluble en agua, tal como polietilenglicol (PEG) y poli(ácido siálico) (PSA, por sus siglas en inglés), de proteínas modificadas con un polímero soluble en agua ligado de manera reversible. La invención incluye métodos para analizar la liberación del polímero soluble en agua y medir la actividad recuperada de las proteínas. La invención incluye además métodos apropiados para el control de calidad de proteínas modificadas con polímeros solubles en agua que se pueden liberar, incluyendo polímeros como PEG y PSA.

10 La ausencia o disfunción de Factor VIII de la coagulación sanguínea (FVIII) está asociada al trastorno hemorrágico hemofilia A. El tratamiento de elección para la gestión de la hemofilia A es el tratamiento de sustitución con concentrados de FVIII procedentes de plasma o recombinantes (rFVIII). Se acepta en general que los pacientes con hemofilia A grave, es decir con niveles de FVIII por debajo de 1%, se tratan mejor mediante un tratamiento profiláctico con la intención de mantener los niveles de FVIII por encima de 1% entre dosis. Teniendo en cuenta las
15 semividas promedio de los diversos productos de FVIII en la circulación, esta concentración de circulación se puede conseguir normalmente por administración de FVIII dos a tres veces a la semana. Para aumentar la conveniencia del tratamiento profiláctico actual, el desarrollo de un producto de la próxima generación con propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas mejoradas, al tiempo que se mantienen todas las demás características del producto, se prevé permitir la dosificación sobre una base semanal.

20 Los fármacos de polipéptidos terapéuticos no sólo se exponen a enzimas proteolíticas y anticuerpos de neutralización, sino que también son propensos a la eliminación de la circulación mediante absorción celular mediada por receptor. Estos casos están asociados a una reducción en la semivida y tiempo de circulación de las proteínas aplicadas, que limita de ese modo su eficacia terapéutica. La modificación de los fármacos de polipéptidos con polímeros tales como PEG se ha demostrado que los protege de la degradación enzimática y la eliminación en
25 una extensión significativa, mejorando de ese modo sus perfiles farmacodinámico y farmacocinético. Además, la PEGilación puede conducir a inmunogenicidad disminuida, estabilidad física y térmica aumentada, solubilidad aumentada, estabilidad líquida aumentada y aglutinación reducida.

La PEGilación se consigue normalmente por la unión covalente de una o más cadenas de PEG por monómero a un fármaco de polipéptidos. El enlace estable de PEG a proteínas presenta la desventaja de disminuir la función
30 biológica de la proteína de una manera irreversible. Esto se puede evitar por modificación de las proteínas con un PEG ligado de manera reversible, que presenta el potencial para disociarse de la proteína con el tiempo. Este tipo de PEG que se puede liberar debería permitir la liberación de la proteína natural, acompañado por una recuperación completa de la actividad de la proteína natural. La patente de EE.UU. A-2008/234193 describe conjugados de Factor von Willebrand-polímero y conjugados de Factor VIII-polímero, teniendo cada uno un enlace que se puede liberar. F. Bedu-Addo et al., AAPS PharmaSci 2.002, 4 (4), páginas 1-3, describen el desarrollo de la preformulación de Estafilocinasa SY161 pegilada recombinante usando métodos de diseño estadísticos para comprender los efectos de resistencia al tampón, concentración de NaCl y pH sobre la conformación y estabilidad de la proteína. La patente de EE.UU. A-2006/160948 describe una construcción proteínica (también denominada como polímero-VWF-conjugado) que comprende factor von Willebrand (VWF) plasmático y/o recombinante, estando dicho VWF unido a al
40 menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable, así como a un complejo entre dicha construcción proteínica y al menos una proteína de factor VIII (FVIII). La molécula polimérica fisiológicamente aceptable puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o poli(ácido siálico) (PSA). Y. Shechter et al., Europeun Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2.008, 70, 19-28, describen la pegilación reversible de insulina que facilita su acción prolongada *in vivo*. M. Neshet et al., Bioconjugate Chem. 2.008, 19, 342-348, describen que la pegilación reversible prolonga el efecto hipotensor de péptido natriurético atrial. H. Tsubery et al., Journal of Biological Chemistry 2.004, 279, 38.118-38.124, describen la prolongación de la acción de fármacos de proteína y péptido por una propuesta de modificación de polietilenglicol reversible. La patente internacional WO-A-2007/025988 describe una composición farmacéutica que comprende una hormona del crecimiento pegilada, en la que dicha hormona del crecimiento pegilada comprende hormona del crecimiento y un PEG, en la que dicha hormona del crecimiento y dicho PEG están unidos por un enlace oxima y opcionalmente por un ligador, teniendo dicha formulación un pH de 7 o inferior.

La invención se aplica a una o más necesidades en la técnica relativas al desarrollo de sistemas de ensayo *in vitro* para forzar la liberación de un polímero soluble en agua, tal como polietilenglicol (PEG) y poli(ácido siálico) (PSA), de proteínas modificadas con un polímero soluble en agua ligado de manera reversible. La invención incluye
55 métodos para analizar la liberación del polímero soluble en agua y medir la actividad recuperada de las proteínas. La invención además incluye métodos apropiados para el control de calidad de proteínas modificadas con polímeros solubles en agua que se pueden liberar.

En una realización, la invención incluye métodos para liberar un polímero soluble en agua ligado de manera reversible de una proteína modificada mediante el polímero soluble en agua. En otra realización, la invención incluye
60 métodos para aumentar la actividad de una proteína modificada mediante un polímero soluble en agua ligado de

manera reversible. Ambos métodos comprenden la etapa de incubar la proteína en una o más condiciones eficaces para liberar el polímero soluble en agua. Así, la invención incluye una combinación de condiciones eficaces para liberar el polímero soluble en agua. En particular, la presente invención como se definió en las reivindicaciones adjuntas se refiere a un método *in vitro* de liberación de un polímero soluble en agua ligado de manera reversible de una proteína modificada mediante el polímero soluble en agua o aumento de la actividad de una proteína modificada con un polímero soluble en agua ligado de manera reversible que comprende la etapa de incubar la proteína en condiciones eficaces para liberar el polímero soluble en agua, en el que las condiciones eficaces para liberar el polímero soluble en agua comprenden aumentar la concentración de amina libre de un tampón que comprende la proteína por adición de lisina libre, histidina o una combinación de las mismas al tampón en una concentración eficaz para liberar el polímero soluble en agua. En una realización preferida de la presente invención, las condiciones comprenden además aumentar el pH del tampón que comprende la proteína, aumentar la temperatura del tampón que comprende la proteína o prolongar el periodo de tiempo de la etapa de incubación. Según una realización preferida en particular, el pH del tampón se aumenta a aproximadamente pH 8,1. Según una realización preferida en particular más, el pH del tampón se aumenta a aproximadamente pH 9,8. Según otra realización preferida en particular, la temperatura del tampón se aumenta de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C. En otra realización preferida en particular, el periodo de tiempo para incubación se prolonga a aproximadamente 168 horas. En otra realización preferida en particular, el periodo de tiempo para incubación se prolonga a aproximadamente 48 horas. En una realización preferida más de la presente invención, la proteína es factor VIII (FVIII). En otra realización preferida, la proteína es Factor von Willebrand (VWF). Preferiblemente, el polímero soluble en agua está ligado de manera reversible a la proteína con 9H-(f)luoren-9-il(m)et(o)xi(c)arbonilo, dibenzofulveno o un derivado de los mismos. En este contexto, se prefiere en particular que el polímero soluble en agua esté ligado con 9H-(f)luoren-9-il(m)et(o)xi(c)arbonilo o un derivado del mismo. En una realización preferida más de la presente invención, el polímero soluble en agua es polietilenglicol. En otra realización preferida, el polímero soluble en agua es poli(ácido siálico).

Según la presente invención, la condición eficaz para liberar polímero soluble en agua ligado de manera reversible de una proteína modificada mediante el polímero (es decir, polietilenglicol) comprende aumentar la concentración de amina libre del tampón que comprende el conjugado de polímero-proteína. En un aspecto, la concentración de amina libre aumentada del tampón es el resultado de un aumento en la concentración de lisina. En otro aspecto, la concentración de amina libre aumentada del tampón es el resultado de un aumento en la concentración de histidina. En un aspecto más, la concentración de amina libre aumentada del tampón es el resultado de un aumento en una combinación de lisina e histidina. En un aspecto más, la condición eficaz para liberar el polímero soluble en agua comprende adicionalmente aumentar el pH de un tampón que comprende la proteína de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 10. En otro aspecto, la condición comprende aumentar el pH del tampón de aproximadamente pH 6,1 a aproximadamente pH 9,8. En un aspecto más, la condición comprende aumentar el pH del tampón de aproximadamente pH 7,3 a aproximadamente pH 9,8. En otro aspecto más, la condición comprende aumentar el pH del tampón de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,1.

En un aspecto más, la condición eficaz para liberar polímero soluble en agua ligado de manera reversible de una proteína modificada mediante el polímero (es decir, polietilenglicol) comprende adicionalmente aumentar la temperatura del tampón que comprende el conjugado de polímero-proteína de aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 37°C. En un aspecto más, la condición eficaz para liberar el polímero soluble en agua ligado de manera reversible de la proteína comprende adicionalmente aumentar la temperatura del tampón de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C.

En otro aspecto más, la condición eficaz para liberar polímero soluble en agua ligado de manera reversible, tal como polietilenglicol, comprende adicionalmente prolongar el periodo de tiempo para incubar el conjugado de polímero-proteína de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 168 horas. En diversos aspectos, el periodo de tiempo de incubación se extiende de minutos a horas a días a incluso una semana o más. En otro aspecto, el periodo de tiempo de incubación oscila de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 48 horas.

En otra realización (no parte de la invención), se proporcionan métodos para ensayar el control de calidad de proteínas modificadas con polímero soluble en agua que se puede liberar ligado de manera reversible, que comprenden las etapas de incubar las proteínas de aproximadamente 0 horas a aproximadamente 6 horas a 37°C en un tampón de aproximadamente pH 7,3 que comprende aproximadamente histidina 100 mM y lisina aproximadamente 100 mM y analizar la actividad de las proteínas en las primeras 6 horas. Estos métodos, por ejemplo, proporcionan un medio para demostrar consistencia o estabilidad lote a lote en el almacenaje.

En otra realización más (no parte de la invención), se proporcionan métodos para vigilar un aumento o recuperar la actividad de una proteína modificada mediante polímero soluble en agua ligado de manera reversible. Dichos métodos comprenden medir la actividad de las proteínas antes y después de eliminar polímero soluble en agua ligado de manera reversible de la proteína.

En otra realización más (no parte de la invención), se proporcionan métodos para medir la cinética de liberación de polímero de una proteína modificada mediante un polímero soluble en agua ligado de manera reversible. Dichos métodos comprenden medir simultáneamente durante un periodo de tiempo en una mezcla de reacción una cantidad de polímero soluble en agua libre y una cantidad de polímero soluble en agua ligado de manera reversible

- conjugado a una proteína, en los que la cinética se determina a partir de un cambio en la cantidad de polímero soluble en agua libre y un cambio en la cantidad del polímero conjugado a la proteína. En un aspecto, la medición se basa en un espectro de emisión de fluorescencia y la medida simultánea se realiza usando fluorescencia en un pico de emisión de aproximadamente 350-355 nm para conjugados de polietilenglicol - 9H-(f)luoren-9-il(m)et(o)xi(c)arbonilo y en un pico de emisión de aproximadamente 460-560 nm para polietilenglicol-dibenzofulveno.
- 5 En otro aspecto, la medición se basa en cromatografía líquida de alta resolución para polietilenglicol -9H-(f)luoren-9-il(m)et(o)xi(c)arbonilo libre y polietilenglicol-dibenzofulveno. En un aspecto más, la medición se basa de manera inmunoquímica en un ensayo inmunosorbente ligado a enzima para proteína conjugada a polímero, es decir, proteína PEGilada y para proteína libre.
- 10 En diversos aspectos, el polímero soluble en agua incluye, pero no se limita a, poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, polímeros poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroalquilmetacrilamida), poli(hidroalquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfasfaceno, polioxazolina, poli(N-acriloilmorfolina), poli(óxido de alquileo), poli(ácido maleico), poli(DL-alanina), polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa, dextrano, ácido hialurónico y quitina, poli(met)acrilatos, así como poli(ácido siálico) (PSA), hidroxietilalmidón y combinaciones de cualquiera de lo anterior. En un aspecto, el polímero soluble en agua es PEG. En otro aspecto, el polímero soluble en agua es poli(ácido siálico) (PSA).
- 15
- 20 En diversos aspectos, la proteína es factor VIII (FVIII) o Factor von Willebrand (VWF). En un aspecto más de la invención, el polímero soluble en agua está ligado a la proteína N-hidroxisuccinimida (NHS) o química a base de aldehídos, variantes con una unión química diferente entre la cadena polimérica soluble en agua y sitio de conjugación y variantes que difieren en las longitudes. En un aspecto, el polímero soluble en agua está ligado con 9H-(f)luoren-9-il(m)et(o)xi(c)arbonilo, dibenzofulveno o un derivado de los mismos.
- 25 Otras características y ventajas de la invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debería entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, al tiempo que indican realizaciones específicas de la invención, se proporcionan como ilustración sólo, debido a que llegarán a ser evidentes diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención para los expertos en la materia de esta descripción detallada.
- 30 Se proporciona una ilustración más de la invención con referencia a los dibujos que se adjuntan, que se señalan a continuación en la Figuras 1-11.
- 35 La Figura 1 muestra la influencia de la liberación de PEG dependiente del pH sobre la estructura multímera de rVWF PEGilado.
- La Figura 2 muestra la influencia de la liberación de PEG dependiente del pH y la amina sobre la estructura multímera de rVWF PEGilado usando un anticuerpo anti-VWF.
- La Figura 3 muestra la influencia de la liberación de PEG dependiente del pH y la amina sobre la estructura multímera de rVWF PEGilado usando un anticuerpo anti-VWF.
- 35 La Figura 4 muestra una comparación del efecto estabilizador de rFVIII *in vivo* de rVWF natural y desPEGilado en un modelo de ratón deficiente en FVIII x VWF.
- La Figura 5 muestra una comparación de aumento de actividad cromogénica de FVIII en la incubación de PEG-rFVIII en tampón que contiene histidina y/o lisina a diferentes concentraciones.
- 40 La Figura 6 muestra una comparación de aumento de actividad cromogénica de FVIII en la incubación de PEG-rFVIII a pH 9,8 o en un tampón de pH neutro que contiene histidina y lisina.
- La Figura 7 muestra la influencia de la liberación de PEG dependiente del tampón a base de amina sobre la actividad cromogénica de FVIII y capacidad de unión a VWF de PEG-rFVIII.
- 45 La Figura 8 muestra la reproducibilidad del ensayo de liberación *in vitro* y su ensayo para controlar la consistencia lote a lote.
- La Figura 9 muestra el espectro de fluorescencia que ilustra la generación de PEG-dibenzofulveno (460-560 nm) y la correspondiente disminución de la señal de la fluorescencia de conjugado de PEG-FMOC (350-355 nm) en la incubación de PEG-rFVIII a pH = 8,5.
- 50 La Figura 10 muestra el espectro de fluorescencia que ilustra la ligera disminución de la señal de la fluorescencia de conjugado de PEG-FMOC (350-355 nm) sin la formación de fluorescencia de PEG-dibenzofulveno en la incubación de FVIII PEGilado que se puede liberar a pH = 8,5 en presencia de glutatión reducido.
- La Figura 11 muestra el espectro de fluorescencia que ilustra la estabilidad de la señal de la fluorescencia de conjugado de PEG-FMOC (350-355 nm) en la incubación de FVIII PEGilado que se puede liberar a pH = 6,0.

- La invención se refiere al desarrollo de sistemas de ensayo *in vitro* para investigar la velocidad de recuperación de la actividad de una proteína relativa a la liberación de un polímero soluble en agua, que está unido de manera covalente a la proteína por una unión reversible. El término "recuperación de la actividad" de una proteína se refiere a un aumento en la actividad de las proteínas incluyendo, pero no limitado a, dichas actividades como función biológica, unión del receptor y actividad enzimática después de que se libera el polímero soluble en agua. Este tipo de modificación del polímero soluble en agua de una proteína se consigue por la unión de un polímero soluble en agua que se puede liberar, es decir reactivo PEG-FMOC-NHS, a restos de lisina expuestos de la proteína de interés. El término "FMOC" representa 9H-(f)luoren-9-il(m)et(o)xi(c)arbonilo que describe el grupo protector en una cadena peptídica o polipeptídica.
- El término "proteína" se refiere a cualquier proteína, complejo proteínico o polipéptido, incluyendo proteínas recombinantes, complejos proteínicos y polipéptidos compuestos de restos aminoácido ligados mediante enlaces peptídicos. Las proteínas se obtienen por aislamiento de fuentes *in vivo* (es decir, que se encuentran en la naturaleza), por métodos sintéticos o por tecnología de ADN recombinante. Se sintetizan polipéptidos sintéticos, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado. Se produce una proteína recombinante usada según la invención por cualquier método conocido en la técnica como se describe en la presente memoria a continuación. En una realización, la proteína es una proteína fisiológicamente activa, incluyendo una proteína terapéutica o un derivado biológicamente activo de la misma. El término "proteína" se refiere típicamente a grandes polipéptidos. El término "péptido" se refiere típicamente a polipéptidos cortos. Sin tener en cuenta la distinción, como se usa en la presente memoria, polipéptido, proteína y péptido se usan de manera indistinta.
- Un "fragmento" de un polipéptido se refiere a cualquier porción del polipéptido menor que el producto de expresión del polipéptido de longitud completa o proteína. Los fragmentos son, en un aspecto, análogos de delección del polipéptido de longitud completa en los que uno o más restos aminoácido han sido retirados del amino terminal y/o el carboxi terminal del polipéptido de longitud completa. De acuerdo con esto, "fragmentos" son un subconjunto de análogos de delección descritos a continuación.
- Un "análogo" o "derivado" es un compuesto sustancialmente similar en estructura y que tiene la misma actividad biológica, aunque en algunos casos en un grado diferente, que una molécula que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, un análogo de polipéptido se refiere a un polipéptido que comparte estructura sustancialmente similar y que tiene la misma actividad biológica que un polipéptido de referencia. Los análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos comparado con el polipéptido que se encuentra en la naturaleza del que procede el análogo, basado en una o más mutaciones que implican (i) delección de uno o más restos aminoácido en uno o más extremos del polipéptido y/o una o más regiones internas de la secuencia polipeptídica que se encuentra en la naturaleza, (ii) inserción o adición de uno o más aminoácidos en uno o más extremos (típicamente un análogo de "adición") del polipéptido y/o una o más regiones internas (típicamente un análogo de "inserción") de la secuencia polipeptídica que se encuentra en la naturaleza o (iii) sustitución de uno o más aminoácidos para otros aminoácidos en la secuencia polipeptídica que se encuentra en la naturaleza.
- En una realización, la invención incluye composiciones o composiciones farmacéuticas preparadas por mezcla de un compuesto o conjugado de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. El término "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en individuo animal, incluyendo seres humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un conjugado de polímero-polipéptido y también comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica incluye una composición que comprende el ingrediente o ingredientes activos y el ingrediente o ingredientes inertes que forman el portador farmacéuticamente aceptable, así como cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de combinación, complejación o agregación de dos o más cualesquiera de los ingredientes.
- El término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier y todos los disolventes clínicamente útiles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, tampones y excipientes, tales como una disolución salina tamponada con fosfato, disolución acuosa al 5% de dextrosa y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes. Portadores y formulaciones farmacéuticas adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1.995). Los portadores farmacéuticos útiles para la composición dependen del modo de administración deseado del agente activo. Modos de administración típicos incluyen, pero no se limitan a, inyección enteral (por ej. oral) o parenteral (por ej., subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal o administración tópica, transdérmica o transmucosal). Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal que se puede formular en un compuesto o conjugado para uso farmacéutico incluyendo, por ej., sales de metal (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.
- El término "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" significa un material que no es indeseable de manera biológica o de otro modo, es decir, el material se puede administrar a un individuo sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en que esté contenido o cuando se administra usando vías conocidas en la técnica, como se describe a continuación.

En una realización, la invención incluye proteínas o polipéptidos modificados de manera química, que se han ligado a un resto químico que proporciona efectos ventajosos para la producción, viabilidad de la proteína o del polipéptido. Por ejemplo, la conjugación no específica o específica del sitio (por ej., N-terminal) de polímeros a polipéptidos solubles en agua es conocida en la técnica para mejorar la semivida reduciendo potencialmente la inmunogenicidad, depuración renal y/o mejorando la resistencia a las proteasas. En algunas realizaciones, los polipéptidos para uso en la invención comprenden polímeros solubles en agua ligados de manera reversible al péptido para aumentar la semivida y/o estabilidad de la molécula. En diversos aspectos, los polímeros solubles en agua están ligados al péptido o polipéptido en cualquier sitio que pueda tener cabida para un polímero soluble en agua. En un aspecto, el polímero soluble en agua está ligado al N-terminal. En otro aspecto, el polímero soluble en agua está ligado al C-terminal.

El término "polímero soluble en agua" se refiere a moléculas poliméricas que son sustancialmente solubles en disolución acuosa o están presentes en la forma de una suspensión y no tienen impacto sustancialmente negativo para los mamíferos con la administración de una proteína conjugada a dicho polímero en una cantidad farmacéuticamente eficaz y se pueden considerar como biocompatibles. En una realización, las moléculas fisiológicamente aceptables comprenden de aproximadamente 2 a aproximadamente 300 unidades de repetición. En diversos aspectos, los polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxetilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxialquilmetacrilamida), poli(hidroxialquilmetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfasfaceno, polioxazolina, poli(N-acrilolmorfolina), polímeros de poli(óxido de alquileno), poli(ácido maleico), poli(DL-alanina), polisacáridos, tal como carboximetilcelulosa, dextrano, ácido hialurónico y quitina, poli(met)acrilatos, así como poli(ácido siálico) (PSA), hidroxietilalmidón y combinaciones de cualquiera de lo anterior.

En una realización, la invención incluye el uso de polímeros solubles en agua que varían en tipo, conjugación, unión, geometría y longitud. La molécula polimérica soluble en agua no se limita a una estructura particular y, en algunos aspectos, es lineal, ramificada o multi-ramificada, dendrítica o con uniones degradables. Por otra parte, la estructura interna de la molécula polimérica, en otros aspectos más, se organiza en cualquier número de diferentes patrones y se selecciona del grupo que consiste en, sin limitación, homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatorio, copolímero de bloque, tripolímero alternante, tripolímero aleatorio y tripolímero de bloque.

En algunas realizaciones, los conjugados de polímero-proteína incluyen, pero no se limitan a conjugados de polímero-proteína ligados por química a base de NHS (N-hidroxisuccinimida) o aldehídos, variantes con una unión química diferente entre la cadena polimérica soluble en agua y el sitio de conjugación y variantes que difieren en las longitudes.

En un aspecto, el polímero soluble en agua es poli(etilenglicol) (PEG). PEG, también conocido como poli(óxido de etileno) (PEO) o polioxi-etileno (POE), es un tipo de poliéter. PEG, PEO o POE se refiere a un oligómero o polímero de óxido de etileno. Los tres nombres son sinónimos de manera química, pero históricamente PEG ha tendido a referirse a oligómeros y polímeros con una masa molecular por debajo de 20.000 g/mol, PEO a polímeros con una masa molecular por encima de 20.000 g/mol y POE a un polímero de cualquier masa molecular. Sin embargo, en la presente memoria, los términos se usan de manera indistinta.

Los PEG y los PEO incluyen moléculas con una distribución de pesos moleculares, es decir, polidispersa. La distribución de tamaños se puede caracterizar estadísticamente por su peso molecular medio ponderal (M_p) y su peso molecular medio numérico (M_n), la proporción de los cuales se denomina el índice de polidispersidad (M_p/M_n). M_p y M_n se pueden medir por espectroscopía de masas. La mayoría de los conjugados PEG-proteína, en particular los conjugados a PEG mayores que 1 kDa, presenta una serie de pesos moleculares debido a una naturaleza polidispersa de la molécula de PEG precursora. Por ejemplo, en el caso de mPEG2K (Sunbright ME-020HS, NOF), las masas moleculares reales se distribuyen por una serie de 1,5 ~ 3,0 kDa con un índice de polidispersidad de 1,036. Son excepciones proteínas conjugadas a reactivos a base de MS(PEG) $_n$ (N=4, 8, 12 ó 24, por ej., PEO $_4$, PEO $_{12}$) (Pierce), que se preparan de manera especial como mezclas monodispersas con longitud de cadena discreta y peso molecular definido.

En una realización, cuando el polímero soluble en agua es PEG, el peso molecular medio del PEG oscilará de aproximadamente 3 a 200 kiloDalton ("kDa"), de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 120 kDa, de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 50 kDa, de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 25 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa o de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa.

El término "PEG" significa que incluye cualquiera de las formas de PEG que se discuten en la presente memoria o se han usado en la técnica para derivatizar una proteína. La invención incluye varias longitudes de polímero PEG lineal diferentes incluyendo pero no limitado a 1-100 unidades de repetición (-CH₂-CH₂-O-) o conjugados de polímeros PEG ramificados de dos brazos. En algunos aspectos, las longitudes de polímero PEG incluyen 10-2.000 unidades de repetición (-CH₂-CH₂-O-) o conjugados de polímeros PEG ramificados de dos brazos. Además se incluye en la invención PEG-(CH₂CH₂O) $_n$ basado en NHS o aldehído que tiene de 12 a 50 unidades. En general, para las reacciones de PEGilación incluidas en la presente memoria, el peso molecular medio del resto PEG

añadido es aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 50 kDa (indicando el término "aproximadamente" \pm 1 kDa). En otros aspectos, el peso molecular medio del resto PEG puede ser tan grande como aproximadamente 60 kDa. En algunos aspectos, el peso molecular medio es aproximadamente 0,5-5 kDa.

5 El término "PEGilado" se refiere a una proteína, complejo proteínico o polipéptido unido a uno o más restos PEG. El término "PEGilación" como se usa en la presente memoria se refiere al procedimiento de unión de uno o más PEG a una proteína.

10 En otra realización, la invención incluye conjugados de PEG-proteína seleccionados del grupo que consiste en conjugados de PEG-proteína lineales que son NHS-conjugados y oscilan en longitud de $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n-$, donde $n = 1$ a 100, conjugados de PEG-proteína lineales que son conjugados de aldehído y oscilan en longitud de $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n-$, donde $n = 1$ a 100, conjugados de PEG-proteína ramificados de dos brazos que son conjugados de NHS y oscilan en longitud y conjugados de PEG-proteína ramificados de tres brazos que son conjugados de NHS. En otros aspectos, $n = 10$ a 1.000. La invención también incluye conjugados de PEG-proteína que contienen diferentes uniones químicas $-(\text{CO}(\text{CH}_2)_n-$ y $-(\text{CH}_2)_n-$ donde $n = 1$ a 5) entre su sitio de conjugación y la cadena de PEG. La invención además incluye conjugados de PEG-proteína aniónicos, cargados para reducir la depuración renal, incluyendo pero no limitado a compuestos carboxilados, sulfatados y fosforilados (aniónicos) (Caliceti, Adv. Drug Deliv. Rev. 2.003 55 (10):1.261-77; Perlman, J. Clin. Endo. Metab. 2.003 88 (7): 3.227-35; Pitkin, Antimicrob. Ag. Chemo. 1.986 29 (3): 440-44; Vehaskari, Kidney Intl. 1.982 22 127-135). En una realización más, el péptido está opcionalmente conjugado a un resto incluyendo un bisfosfonato, carbohidratos, ácidos grasos o aminoácidos adicionales.

20 En una realización, la invención proporciona proteínas modificadas, tales como factores sanguíneos con un grado bajo de polímero soluble en agua conjugado a la proteína. En diversos aspectos de la invención, se genera una forma poco PEGilada de la proteína usando un exceso molar disminuido de polímero soluble en agua a proteína en la reacción de conjugación. Por ejemplo, los métodos típicos para PEGilar una proteína usan un exceso de 61,8 M de PEG a proteína de interés. En algunos aspectos, los métodos de PEGilación de una proteína usan un exceso de 50-100 M de PEG a proteína. En diversos aspectos, se generan proteínas poco PEGiladas, como se describe en la presente memoria, usando un exceso molar en la reacción que es menor que el usado en técnicas clásicas.

30 Adicionalmente, se considera que la proteína poco PEGilada descrita en la presente memoria comprende al menos aproximadamente uno y no más que aproximadamente 10 restos de polímero soluble en agua por molécula de factor sanguíneo o por molécula de proteína de coagulación sanguínea. En una realización, la proteína modificada comprende al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 restos de polímero soluble en agua por molécula de proteína. En otra realización, la proteína modificada comprende entre aproximadamente 4 y 8 restos de polímero soluble en agua por molécula de proteína. En algunas realizaciones, la proteína modificada es un factor sanguíneo. En otros aspectos, la proteína modificada es una proteína de coagulación sanguínea. En realizaciones relativas, la invención incluye, pero no se limita a, cualquier factor sanguíneo, tal como Factor II, Factor III, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor von Willebrand y fibrinógeno. En un aspecto, la molécula de factor sanguíneo es Factor VIII. En otro aspecto, la molécula de factor sanguíneo es VWF. En un aspecto más aún, la molécula de factor sanguíneo es humana. En una realización, el factor sanguíneo modificado o la molécula de proteína de coagulación sanguínea comprende al menos uno y menos de 20 restos PEG por molécula. En una realización relacionada, el factor sanguíneo modificado comprende al menos 4 y menos de 10 restos PEG por molécula de factor sanguíneo. En una realización más, el factor sanguíneo modificado comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 restos de polímero soluble en agua por molécula de factor sanguíneo. En una realización relacionada, la molécula de factor sanguíneo modificada comprende entre 1 y 20, entre 2 y 10 o entre 4 y 8 restos PEG por molécula de factor sanguíneo. En un aspecto, 5 restos PEG están unidos a VWF recombinante. En otro aspecto, se unen 12 restos PEG a Factor VIII recombinante (rFVIII).

45 Para determinar si la semivida terapéutica *in vivo* de un péptido, polipéptido (proteína) se beneficiaría de la PEGilación, se sintetiza una variedad de diferentes conjugados de PEG-proteína, se caracterizan *in vitro* e *in vivo* para la farmacocinética.

50 Los métodos para preparar la proteína PEGilada de la invención comprenden en general las etapas de hacer reaccionar la proteína de interés con PEG en condiciones según lo cual PEG llega a estar unido de manera reversible al N-terminal, al C-terminal o cualquier otro aminoácido de la proteína y obtener el producto o los productos de reacción. Debido a que PEGilar una proteína podría modificar significativamente la actividad intrínseca de la proteína, se exploran diferentes tipos de PEG. La química que se puede usar para PEGilación de proteína incluye la acilación de las aminas primarias de la proteína usando el éster de NHS de metoxi-PEG (O-[(N-Succinimidiloxycarbonil)-metil]-O'-metilpolietilenglicol). La acilación con metoxi-PEG-NHS o metoxi-PEG-SPA da como resultado una unión amida que elimina la carga de la amina primaria original (también, Boc-PEG para C-terminal). A diferencia de la síntesis de proteína ribosómica, la síntesis de péptidos sintéticos tiene lugar desde el C-terminal al N-terminal. Por lo tanto, Boc-PEG es un método (es decir usando la síntesis de terc-(B)util (o)xi (c)arbonilo (Boc, t-Boc)) para unir PEG al C-terminal del péptido (R. B. Merrifield (1.963). "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide". J. Am. Chem. Soc. 85 (14): 2.149-2.154). Alternativamente, la química de (F)luorenil-(m)et(o)xi-(c)arbonilo (Fmoc) (Atherton, E.; Sheppard, R. C. (1.989). Solid Phase peptide synthesis : a practical approach. Oxford, Inglaterra: IRL Press.) se usa debido a que no requiere el uso peligroso de

ácido hidrofúrico para retirar grupos protectores de cadenas laterales. Los métodos para generar péptidos que comprenden un resto PEG son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.824.784.

El término "ligador" se refiere a un fragmento molecular que une el polímero soluble en agua a una molécula biológicamente activa. El fragmento tiene típicamente dos grupos funcionales que se pueden acoplar a o activar para hacer reaccionar con otro ligador o directamente con el nucleófilo biológicamente activo. Como un ejemplo, se usa comúnmente ácido ω -aminoalcanoico tal como lisina. La invención incluye ligadores que se pueden liberar, degradables o hidrolizables usados para la conjugación del polímero soluble en agua al polipéptido.

En un aspecto, la invención incluye PEG ligado de manera que se puede liberar a una proteína. Este tipo de modificación de PEG se consigue por la unión de un reactivo de PEG-FMOC-NHS que se puede liberar a restos de lisina expuestos de la proteína de interés. El conjugado formado se caracteriza por su capacidad para liberar PEG por un mecanismo de eliminación β . La velocidad de eliminación β está catalizada por bases (por ej., grupos amino) y acelerada por un pH básico y temperatura aumentada. La liberación de PEG se puede forzar por lo tanto *in vitro* por altas concentraciones de aminos libres así como por un pH y temperatura aumentados.

En otros diversos aspectos, la invención incluye ligadores estables e hidrolizables que puedan facilitar la conjugación del polímero soluble en agua al polipéptido de interés. Ligadores estables incluyen, pero no se limitan a, uniones amida, amina, éter, carbamato, tiourea, urea, tiocarbamato, tiocarbonato, tioéter, tioéster y ditiocarbamato, tales como ω,ω -aminoalcano, N-carboxialquilmaleimida o ácidos aminoalcanoicos, éster de maleimidobenzilsulfosuccinimida, glutaraldehído o anhídrido succínico, oxalato de N-carboximetilmaleimida N,N'-disuccinimidilo y oxalato de 1,1'-bis[6-(trifluorometil)benzo-triazolilo]. En otros aspectos, el polímero soluble en agua está conjugado al polipéptido usando ligadores hidrolizables. Un ligador hidrolizable une un polímero soluble en agua a un polipéptido mediante un enlace hidrolizable o degradable, que es un enlace relativamente débil que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no sólo del tipo de unión general conectando dos átomos centrales sino también en los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. En aspectos particulares, se usan sistemas ligadores hidrolizables.

En otros aspectos se pueden escindir otros sistemas degradables o que se pueden liberar en condiciones especiales, por ej., por catálisis básica. Los métodos para preparar polímeros solubles en agua que comprenden ligadores hidrolizables, degradables o que se pueden liberar y métodos para preparar conjugados que comprenden polímeros solubles en agua hidrolizables cuando comprenden estos ligadores se describen en la Patente de EE.UU. 7.259.224 (Nektar Therapeutics) y la Patente de EE.UU. 7.267.941 (Nektar Therapeutics and National Institutes of Health), la Patente de EE.UU. 6.515.100 (Shearwater Corporation), la patente internacional WO 2006/138572 (Nektar Therapeutics), la Patente de EE.UU. 2008/0234193 (Nektar Therapeutics and Baxter Healthcare), la patente internacional WO 2004/089280 (Yeda Research and Development Co. LTD), la Patente de EE.UU. 7.122.189 (Enzon Inc.) y sistemas ligadores se describen además por Greenwald et al. (J. Med. Chem. 42: 3.657-3.667, 1.999). Por ejemplo, se puede preparar un PEG con uniones éster en la cadena principal polimérica que se someten a hidrólisis. Esta hidrólisis da como resultado escisión del polímero en fragmentos de peso molecular inferior. Las uniones hidrolíticamente inestables o débiles apropiadas incluyen, pero no se limitan a, éster carboxilato, éster fosfato, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquil éter, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos, tioésteres, tiolésteres y carbonatos. Las uniones hidrolíticamente degradables que pueden estar contenidas en la cadena principal polimérica incluyen uniones carbamato, carbonato, sulfato y aciloxialquil éter; uniones imina, que resultan, por ejemplo, de reacción de una amina y un aldehído (véase, por ej. Ouchi et al., Polymer Preprints, 38 (1): 582-3 (1.997)); uniones carbamato, éster fosfato, hidrazona, acetal, cetal u ortoéster, incluyendo ligadores acetona-bis-(N-maleimidoetil)cetal (MK, por sus siglas en inglés). Otros sistemas degradables y que se pueden liberar incluidos en la invención se basan en la química de FMOC o son sistemas ligadores que se pueden liberar que están basados en derivados de Bicin. En otros aspectos, otros sistemas que se pueden liberar emplean reacciones de eliminación de 1,4- o 1,6-bencilo. En algunos aspectos, los métodos de la invención proporcionan una mezcla sustancialmente homogénea de conjugado de polímero-: proteína. "Sustancialmente homogénea" como se usa en la presente memoria significa que sólo se observan moléculas de conjugado de polímero-proteína. El conjugado de polímero-proteína presenta actividad biológica y las preparaciones de proteínas PEGiladas "sustancialmente homogéneas" son aquellas que son suficientemente homogéneas para mostrar las ventajas de una preparación homogénea, por ej., facilidad de aplicación clínica en la capacidad para predecir la farmacocinética lote a lote.

El conjugado formado se caracteriza por su capacidad para liberar PEG por un mecanismo de eliminación β . La velocidad de eliminación β está catalizada por bases (por ej., grupos amino) y acelerada por un pH básico y temperatura aumentada. La liberación de PEG puede ser forzada por lo tanto *in vitro* por altas concentraciones de aminos libres así como por un pH y temperatura aumentados.

La presente descripción describe diferentes estrategias para forzar la liberación *in vitro* de PEG de proteínas modificadas por PEG ligados de manera reversible, así como el desarrollo de sistemas de ensayo *in vitro* apropiados para vigilar la desPEGilación. Por ejemplo, se usan conjugados de proteína, Factor von Willebrand recombinante PEGilado (rVWF) y factor VIII recombinante (rFVIII).

En diversas realizaciones, se usa rVWF PEGilado o rFVIII PEGilado en los métodos de la invención. Se usó rVWF PEGilado y rFVIII PEGilado en el tratamiento de diversos trastornos de la coagulación sanguínea o trastornos hemorrágicos. El término "trastorno de la coagulación sanguínea" o "trastorno hemorrágico" se refiere a cualquiera

de las diversas deficiencias heredadas o desarrolladas en factores de la coagulación sanguínea que conducen a la incapacidad de la sangre para formar coágulos con eficacia y posterior sangrado anormal en un individuo. Los trastornos de la coagulación sanguínea incluyen, pero no se limitan a, hemofilia A, hemofilia B, síndrome de von Willebrand, deficiencia de Factor X, deficiencia de Factor VII, enfermedad de Alexander, síndrome de Rosenthal (deficiencia de Factor XI o hemofilia C) y deficiencia de Factor XIII. Tratamiento de un trastorno de la coagulación sanguínea se refiere a tratamiento profiláctico o tratamiento terapéutico.

Además, una deficiencia de VWF puede causar una hemofilia A fenotípica debido a que VWF es un componente esencial de FVIII funcional. Además, los pacientes que padecen la enfermedad de von Willebrand (VWD, por sus siglas en inglés) o el síndrome de VWF presentan con frecuencia una deficiencia de FVIII. En estos pacientes, la actividad reducida de FVIII no es la consecuencia de un defecto del gen cromosómico X, sino una consecuencia indirecta del cambio cuantitativo y cualitativo de VWF en el plasma. La diferenciación entre hemofilia A y VWD se puede efectuar normalmente midiendo el antígeno de VWF o determinando la actividad del cofactor de la ristocetina. La actividad del cofactor de la ristocetina se mide por adición de la ristocetina y un sustrato plaquetario al plasma del paciente. La ristocetina mejora la unión de VWF al receptor plaquetario de la glicoproteína Ib, que da como resultado aglutinación. El VWF del paciente soportará la aglutinación plaquetaria inducida por la ristocetina cuando se mide por un cambio en la transmisión de la luz. Por lo tanto, esta es una medición *in vitro* de la actividad funcional del VWF del paciente y es el ensayo más sensible para diagnosticar VWD. Tanto el contenido en antígeno del VWF como la actividad del cofactor de la ristocetina están disminuidos en la mayoría de los pacientes de VWD, mientras que son normales en pacientes de hemofilia A. La invención discute métodos que implican VWF y FVIII PEGilados de manera reversible pero incluye, sin embargo, todas las demás proteínas que pueden estar unidas de manera covalente a PEG por una unión reversible. En diversos aspectos, la invención incluía métodos de liberación de PEG de otras proteínas del factor de coagulación sanguínea incluyendo, pero no limitado a, Factor II (trombina), Factor III, Factor V, Factor VII (proconvertina), Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX (FIX, Factor Christmas), Factor XI y subunidad A y subunidad B del Factor XIII.

La liberación de PEG de proteínas se determina midiendo un aumento en PEG libre, recuperación de actividad de las proteínas, y, en el caso de rVWF, por ejemplo, también, por la recuperación *in vivo* de sus parámetros farmacocinéticos. La vigilancia de las posibilidades de distintas especies de PEG sin el requerimiento de separación se proporciona basándose en las propiedades espectrales de la estructura de anillos condensados de los cromóforos fluoreno sustituido (como está presente en el conjugado de PEG) y dibenzofulveno (PEG libre), que tienen diferentes espectros de emisión de absorción ultravioleta y de fluorescencia.

Una realización de la presente descripción es el desarrollo de un sistema de ensayo que permite vigilar la recuperación *in vitro* de actividad biológica de la proteína modificada. El polímero soluble en agua que se puede liberar, tal como PEG, se puede separar de la proteína aumentando el pH, incluyendo, pero no limitado a, aumentar el pH a valores de aproximadamente 8,1, aproximadamente 9,5 y aproximadamente 9,8. Este tipo de ensayo para recuperar la proteína natural es apropiado para proteínas que son estables a pH alto. En diversos aspectos de los métodos proporcionados, el pH se aumenta de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,5, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,1, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5, de aproximadamente 7,3 a aproximadamente 9,8 y de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,8. En otros aspectos, la invención incluye aumentar el pH a aproximadamente 10. En otros aspectos más, los métodos proporcionados incluyen aumentar y ensayar valores de pH a aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,4, aproximadamente 8,5, aproximadamente 8,6, aproximadamente 8,7, aproximadamente 8,8, aproximadamente 8,9, aproximadamente 9,0, aproximadamente 9,1, aproximadamente 9,2, aproximadamente 9,3, aproximadamente 9,4, aproximadamente 9,5, aproximadamente 9,6, aproximadamente 9,7, aproximadamente 9,8, aproximadamente 9,9, aproximadamente 10,0, aproximadamente 10,1, aproximadamente 10,2, aproximadamente 10,3, aproximadamente 10,4, aproximadamente 10,5, aproximadamente 10,6, aproximadamente 10,7, aproximadamente 10,8, aproximadamente 10,9, aproximadamente 11,0, aproximadamente 11,5 y hasta mayor que aproximadamente pH 12,0.

Según la presente invención, la adición de aminos libres se usa como el método para forzar la liberación del polímero soluble en agua a pH neutro, en el que las aminos libres incluyen histidina, lisina o una combinación de las mismas. Este método es por lo tanto adecuado para proteínas sensibles al pH. Una combinación de estas dos propuestas es parte también de la invención. Estas propuestas se ilustran con rVWF PEGilado y con RFVIII PEGilado (véanse los Ejemplos 1 a 5).

En otra realización, aumentar la temperatura del tampón se usa adicionalmente como uno o más medios adicionales para forzar la liberación del polímero soluble en agua de la proteína. En diversos aspectos, la temperatura se aumenta de aproximadamente 4°C a aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 37°C. En otros aspectos más, los métodos proporcionados incluyen aumentar la temperatura del tampón de aproximadamente 4°C a aproximadamente 5°C, a aproximadamente 6°C, a aproximadamente 7°C, a aproximadamente 8°C, a aproximadamente 9°C, a aproximadamente 10°C, a aproximadamente 11°C, a aproximadamente 12°C, a

aproximadamente 13°C, a aproximadamente 14°C, a aproximadamente 15°C, a aproximadamente 16°C, a aproximadamente 17°C, a aproximadamente 18°C, a aproximadamente 19°C, a aproximadamente 20°C, a aproximadamente 21°C, a aproximadamente 22°C, a aproximadamente 23°C, a aproximadamente 24°C, a aproximadamente 25°C, a aproximadamente 26°C, a aproximadamente 27°C, a aproximadamente 28°C, a 5 aproximadamente 29°C, a aproximadamente 30°C, a aproximadamente 31°C, a aproximadamente 32°C, a aproximadamente 33°C, a aproximadamente 34°C, a aproximadamente 35°C, a aproximadamente 36°C, a aproximadamente 37°C, a aproximadamente 38°C, a aproximadamente 39°C, a aproximadamente 40°C, a aproximadamente 41 °C, a aproximadamente 42°C, a aproximadamente 43°C, a aproximadamente 44°C, a aproximadamente 45°C, a aproximadamente 46°C, a aproximadamente 47°C, a aproximadamente 48°C, a 10 aproximadamente 49°C, a aproximadamente 50°C, a aproximadamente 55°C, a aproximadamente 60°C, a aproximadamente 65°C, a aproximadamente 70°C, a aproximadamente 75°C, a aproximadamente 80°C, a aproximadamente 85°C, a aproximadamente 90°C, a aproximadamente 95°C y a aproximadamente 100°C.

El polímero soluble en agua, por lo tanto, puede estar ligado de manera reversible a un polipéptido y liberado del polipéptido aumentando la concentración de amina libre del tampón, aumentando el pH del tampón, aumentando la 15 temperatura del tampón o por una combinación de cualquiera de lo anterior. Por otra parte, en una realización más incluso, los métodos de la invención incluyen prolongar adicionalmente el periodo de tiempo para incubar la proteína en el tampón como uno o más medios para liberar polímero soluble en agua de la proteína. En diversos aspectos, el periodo de tiempo de incubación se aumenta de aproximadamente 5 minutos (min), a aproximadamente 10 min, a aproximadamente 20 min, a aproximadamente 30 min, a aproximadamente 40 min, a aproximadamente 50 min, a 20 aproximadamente 1 hora (h), a aproximadamente 2 h, a aproximadamente 3 h, a aproximadamente 4 h, a aproximadamente 5 h, a aproximadamente 6 h, a aproximadamente 7 h, a aproximadamente 8 h, a aproximadamente 9 h, a aproximadamente 10 h, a aproximadamente 11 h, a aproximadamente 12 h, a aproximadamente 13 h, a aproximadamente 14 h, a aproximadamente 15 h, a aproximadamente 16 h, a aproximadamente 17 h, a aproximadamente 18 h, a aproximadamente 19 h, a aproximadamente 20 h, a 25 aproximadamente 21 h, a aproximadamente 22 h, a aproximadamente 23 h, a aproximadamente 24 h, a aproximadamente 36 h, a aproximadamente 48 h, a aproximadamente 60 h, a aproximadamente 72 h, a aproximadamente 84 h, a aproximadamente 96 h, a aproximadamente 108 h, a aproximadamente 120 h, a aproximadamente 132 h, a aproximadamente 144 h, a aproximadamente 146 h, a aproximadamente 168 h, a aproximadamente 180 h, a aproximadamente 192 h, a aproximadamente 204 h, a aproximadamente 228 h, a 30 aproximadamente 252 h, a aproximadamente 276 h y a aproximadamente 300 h. Por consiguiente, el polímero soluble en agua se libera en diversos aspectos del polipéptido aumentando el tiempo de incubación, aumentando la concentración de amina o el pH del tampón, aumentando la temperatura del tampón o por una combinación de uno o más de cualquiera de estos medios referidos.

En otra realización (no parte de la invención), la presente descripción describe el desarrollo de un sistema de ensayo 35 que se puede utilizar para el control de calidad de proteínas modificadas con PEG que se puede liberar u otros polímeros solubles en agua que se pueden liberar (véase el Ejemplo 6).

La presente descripción también proporciona un ejemplo de un método basado en separación usado como un método de referencia para la medición de polímero soluble en agua liberado por cromatografía de exclusión por tamaño y la detección/medición de polímero soluble en agua libre, es decir PEG (véanse los Ejemplos 7, 8 y 9). 40 Basado en el tipo de ligador polimérico soluble en agua usado, se puede conseguir el fraccionamiento y la cuantificación del polímero soluble en agua por medida del índice de refracción, la densidad óptica y/o la fluorescencia del efluente de la columna.

La presente descripción describe además la caracterización de la cinética de la liberación de polímero soluble en agua por medición de las cantidades de polímero soluble en agua liberado y conjugados de polímero - proteína 45 solubles en agua en la mezcla de reacción (véanse los Ejemplos 7, 8 y 9), es decir sin la necesidad de separar las especies generadas.

En un aspecto, se usan mediciones de la fluorescencia si las especies de moléculas fluorescentes usadas difieren lo suficiente en sus propiedades espectrales. La medición simultánea de tanto el polímero -flúor o dibenzofulveno como las especies conjugadas de flúor-(FMOC)-polímero o polímero soluble en agua libre (es decir, PEG) y las especies 50 conjugadas de PEG está permitida por mediciones de la fluorescencia a longitudes de onda de excitación apropiadas debido a diferentes sistemas de anillos condensados con distintos espectros de emisión, tal como el pico de emisión a 350-355 nm del fluoreno sustituido y la región de emisión a 460-560 nm del dibenzofulveno. Además, la selección cuidadosa de la longitud de onda de excitación también evita la excitación de la fluorescencia del triptófano y tirosina de la proteína con una sensibilidad máxima a aproximadamente 280 nm. Para dicha medición, se prefiere 55 una rendija del espectrómetro estrecha para separar las señales de excitación y emisión con un desplazamiento de Stokes de aproximadamente 20 nm.

En otro aspecto, se usa un inmunoensayo específico que permite la medición de polímero soluble en agua unido a conjugado (es decir PEG). Este método, como se desvela en USSN 61/009.327, permite la medición por el uso de una combinación de anticuerpos emparejados que se unen específicamente a PEG y la proteína no conjugada. La 60 desPEGilación del conjugado de PEG se detecta después por una disminución relativa de reactividad en ELISA de PEG proteína expresado respecto a la respuesta medida por el conjugado antes de la DesPEGilación (véanse los

Ejemplos 7, 8 y 9). Un ELISA de este tipo no detecta PEG libre, sino que detecta específicamente sólo PEG unido a conjugado.

Con el desarrollo de estos sistemas de ensayo *in vitro*, es posible aumentar la velocidad conducida por eliminación β de liberación de PEG de proteínas PEGiladas de manera reversible de una manera sustancial y recuperar actividad de la proteína no modificada.

Ejemplos

Son evidentes aspectos y detalles adicionales de la invención a partir de los siguientes ejemplos, que se destinan a ser ilustrativos más bien que limitantes. El Ejemplo 1 describe desPEGilación *in vitro* de PEG-rVWF que se puede liberar a pH aumentado; el Ejemplo 2 describe desPEGilación *in vitro* de PEG-rVWF que se puede liberar en presencia de aminos primarias y alto pH; el Ejemplo 3 describe la recuperación *in vitro* de la actividad de las proteínas de PEG-RFVIII que se puede liberar en presencia de aminos libres seleccionadas; el Ejemplo 4 describe desPEGilación *in vitro* de PEG-rFVIII que se puede liberar en presencia de una combinación de aminos libres; el Ejemplo 5 describe desPEGilación *in vitro* de PEG-rFVIII que se puede liberar en presencia de Hepes/Tris; el Ejemplo 6 describe la recuperación *in vitro* de la actividad de las proteínas de PEG-rFVIII que se puede liberar en presencia de aminos libres seleccionadas; el Ejemplo 7 describe la detección de liberación de PEG de PEG-rFVIII por la medición de la fluorescencia sin separación de especies; el Ejemplo 8 describe la eliminación de PEG-dibenzofulveno mediante glutatión; el Ejemplo 9 demuestra el efecto del pH sobre la generación de PEG-dibenzofulveno; el Ejemplo 10 discute despolimerización *in vitro* de PSA-rVWF que se puede liberar a pH aumentado; el Ejemplo 11 describe despolimerización *in vitro* de PSA-rVWF que se puede liberar en presencia de aminos primarias y alto pH; el Ejemplo 12 describe la recuperación *in vitro* de la actividad de las proteínas de PSA-RFVIII que se puede liberar en presencia de aminos libres seleccionadas; el Ejemplo 13 describe la despolimerización *in vitro* de PSA-rFVIII que se puede liberar en presencia de una combinación de aminos libres y el Ejemplo 14 describe la despolimerización *in vitro* de PSA-rFVIII que se puede liberar en presencia de Hepes/Tris.

Ejemplo 1 (Ejemplo Comparativo):

Despegilación *in vitro* de PEG-rVWF que se puede liberar a pH aumentado.

Se llevó a cabo desPEGilación de un conjugado de PEG rVWF que se puede liberar (conjugado con un PEG ramificado de 20 K) por incubación de la proteína a dos valores de pH diferentes, pH 6,5 y pH 8,1. Se disolvió PEG-rVWF purificado en Na-Citrato 0,02 M, NaCl 0,15 M con un valor de pH de 6,5. Para la muestra alcalina, se ajustó el mismo tampón a pH 8,1 por la adición de NaOH 0,1 M. Se extrajeron sub-muestras en instantes del tiempo definidos y se analizaron teniendo en cuenta su contenido en antígeno del VWF (VWF:Ag), PEG libre, PEG total y composición de VWF de multímeros.

El contenido en VWF:Ag se determinó con un ELISA sándwich usando anticuerpos comercialmente disponibles (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se determinaron PEG libre y PEG total por un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) proporcionado por Nektar Therapeutics (Huntsville, AL). Los términos "cromatografía líquida de alta resolución," "cromatografía líquida de alta presión," y HPLC se usan de manera indistinta en la presente memoria. Se realizó análisis de multímero de VWF por electroforesis en gel de agarosa SDS horizontal de alta densidad e inmunocoloración usando un anticuerpo anti-VWF humano policlonal (Dako). Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 1 y la Figura 1.

Los datos en la Tabla 1 muestran los resultados para la relación determinada de VWF:Ag a proteína (IU/mg) y el porcentaje de PEG libre, liberado, sobre el contenido en PEG total durante las incubaciones a pH 6,5 y pH 8,1, respectivamente. El valor de base refleja las propiedades iniciales del conjugado, es decir antes de que se haya iniciado la liberación de PEG forzada. La proporción de VWF: Ag a proteína se disminuyó enormemente para PEG-rVWF (39 IU/mg) comparado con 100-160 IU/mg para un rVWF no modificado, natural. El porcentaje de PEG libre fue tan bajo como 5%. En la incubación a 37°C la proporción de VWF:Ag a proteína aumentó gradualmente con el tiempo en ambas condiciones, pero con valores ligeramente mayores a pH 8,1. La cantidad de PEG liberada del conjugado de PEG-rVWF se aceleró significativamente a pH superior. Después de 1 h a pH 8,1, el porcentaje de PEG libre liberado fue 53%; mientras que al pH 6,5 inferior, se había liberado el 23% de PEG libre. La diferencia vista en el porcentaje de PEG liberado disminuyó con tiempos de incubación más prolongados y después de 29 días, cuando se liberó el 60% del PEG a pH 6,5 y se liberó el 68% de PEG total a pH 8,1.

Tabla 1. Cambios en los valores VWF:Ag y aparición de PEG libre en la incubación de rVWF PEGilado de manera reversible a pH elevado.

Tiempo de incubación (días)	PEG-rVWF			
	Relación VWF:Ag/proteína (IU/mg)		PEG libre (% de PEG total)	
	pH 6,5	pH 8,1	pH 6,5	pH 8,1
Base	39	39	5	5
5 min	42	56	3	29
1	58	78	23	53
4	64	71	41	58
15	77	86	54	63
29	79	92	60	68

5 El análisis de multímeros de estas muestras (Figura 1) muestra el desplazamiento típico de cada multímero de VWF después de PEGilación (cuando se comparan las líneas denominadas 'rVWF natural' y 'original'). Durante la incubación a tanto pH 6,5 como 8,1, el peso molecular de los multímeros de rVWF PEGilado disminuyó gradualmente, discernible por el desplazamiento de vuelta a pesos moleculares inferiores, que indica la liberación de PEG con el tiempo. La restauración completa de la estructura original de rVWF no modificado no se consiguió, sin embargo, en ninguna de las dos condiciones de pH. Los datos muestran sin embargo que la incubación tanto a pH 10 6,5 como pH 8,1 a 37°C dieron como resultado liberación sustancial de PEG a partir de rVWF PEGilado.

Ejemplo 2:

Despegilación *in vitro* de PEG-RVWF que se puede liberar en presencia de aminas primarias y pH alto.

15 Se diluyó un conjugado de PEG-rVWF que se puede liberar (PEG ramificado de 20 k) en un citrato de sodio 0,02 M, tampón de NaCl 0,15 M a un pH de 9,8, que contenía lisina 100 mM y se incubó a 37°C. Se retiraron sub-muestras en instantes de tiempo definidos y se analizó su contenido en antígeno del VWF (VWF:Ag), PEG libre, PEG total y composición multimérica. Se realizó análisis multimérico por electroforesis en gel de agarosa SDS horizontal de alta densidad e inmunocoloración usando anticuerpos dirigidos contra VWF humano (Dako, Glostrup, Dinamarca) o PEG 20 (anticuerpo anti-PEG de conejo policlonal desarrollado interno). Los resultados se resumen en la Tabla 2, Figura 2 y Figura 3.

Tabla 2. Cambios en los valores de VWF:Ag y aparición de PEG libre en la incubación de rVWF PEGilado de manera reversible a pH elevado y en presencia de aminas libres.

Tiempo de incubación (h)	PEG-rVWF pH 9,8 lisina 100 mM	
	Relación VWF:Ag/proteína (IU/mg)	PEG libre (% de PEG total)
Base	26	3
5 min	33	5
0,5	53	33
4	80	63
10	87	75
20	96	79
48	105	81

25 Los datos en la Tabla 2 muestran que en la incubación de PEG-rVWF en presencia de la amina lisina a pH 9,8, tuvo lugar un claro aumento en la proporción de VWF:Ag a proteína con el tiempo. Además, se liberó el 81% del PEG

- total después de 48 h de incubación en el tampón referido. El gel de multímero en la Figura 2 muestra que después de 10-20 h de incubación, los multímeros de VWF se desplazaron de vuelta a pesos moleculares inferiores y la estructura llegó a ser similar a la de un rVWF no modificado. El tiempo de incubación más prolongado (48 h) dio como resultado una degradación de la estructura proteínica del rVWF. La desPEGilación de rVWF se demostró directamente usando un anticuerpo anti-PEG policlonal para la coloración del gel de multímero en la Figura 3. Después de 20 h de incubación, sólo quedaron unidas cantidades minoritarias de PEG a los multímeros de VWF solos. Los datos demuestran que la incubación en presencia de lisina a pH 9,8 dio como resultado una clara liberación de PEG en un periodo de tiempo más corto comparado con el Ejemplo 1 y la estructura del rVWF restablecida. El método descrito por el Ejemplo 2 es así adecuado para proteínas que son estables a pH alto.
- 5
- 10 La farmacocinética del PEG-rVWF desPEGilado se determinó en un modelo de ratón doblemente invalidado de VWFx FVIII. A los ratones se les administró una inyección intravenosa rápida (10 ml/kg) por la vena de la cola de FVIII (200 IU/kg), sola o junto con 1,6 mg/kg de rVWF natural, PEG-rVWF que se puede liberar (ramificado de 20 K) o rVWF desPEGilado (incubado durante 10 h a +37°C en disolución de lisina a pH 9,8).

- Se extrajeron muestras sanguíneas (anti-coaguladas con citrato de sodio) por punción cardíaca después de anestesia de los grupos respectivos después de 5 min y a 3 h, 6 h, 9 h y 24 h después de inyección. Se preparó plasma por centrifugación y se determinó la función estabilizadora de FVIII *in vivo* de VWF por medición de la actividad de FVIII con un ensayo cromogénico. Los resultados de este experimento se resumen en la Figura 4, que muestra que el rVWF PEGilado protegía el FVIII en una mayor extensión que el rVWF no modificado. El rVWF desPEGilado retuvo la misma capacidad estabilizadora de FVIII que el rVWF no modificado, que indica que se liberó rVWF activo durante la liberación *in vitro* forzada.
- 15
- 20

Ejemplo 3

Recuperación *in vitro* de la actividad de las proteínas de PEG-RFVIII que se puede liberar en presencia de aminas libres seleccionadas.

- Se diluyó un conjugado de PEG-rFVIII que se puede liberar (PEG ramificado de 20 K) a actividad cromogénica de FVIII de 5 IU/ml en un tampón con un pH de 7,3 (histidina 10 mM, NaCl 90 mM, CaCl₂ 1,7 mM, Tris 10 mM, glutatión 0,26 mM, manitol 176 mM, trehalosa 23,5 mM y Tween 80 de 0,1 g/l); el tampón contenía adicionalmente lisina, histidina o una combinación de ambos aminoácidos y se incubó el tampón a 37°C para forzar la liberación *in vitro* de PEG del conjugado de proteína. Se extrajeron sub-muestras en instantes de tiempo definidos (24 h, 48 h y 72 h) y se determinó la actividad cromogénica de FVIII online usando un ensayo cromogénico de FVIII. Los resultados se resumen en la Figura 5.
- 25
- 30

- En un tampón que carece de aminas, la actividad aumentó de 5,0 a 11,5 IU/ml de FVIII:C después de 72 h. En el instante 72 h, la presencia de histidina 100 mM aumentó la actividad de FVIII a 17,8 IU/ml, lisina 100 mM a 20,4 IU/ml, histidina 200 mM a 24,9 IU/ml y la combinación de histidina 100 mM y lisina 100 mM a 34,7 IU/ml. Así, la liberación de PEG forzada fue claramente dependiente de la concentración de amina y posiblemente de la composición de amina. El método descrito en la presente memoria mediante este ejemplo es adecuado para recuperación *in vitro* de la actividad de las proteínas de proteínas PEGiladas de manera reversible que son sensibles al entorno de pH.
- 35

Ejemplo 4

Despegilación *in vitro* de PEG-RFVIII que se puede liberar en presencia de una combinación de aminas libres.

- Un conjugado de PEG-rFVIII que se puede liberar (PEG ramificado de 20 K) se incubó en un tampón (citrato Na₃ 20 mM, CaCl₂ 1,7 mM, manitol 176 mM, sacarosa 36 mM y Tween 80 de 0,1 g/l) con un pH de 7,3; el tampón contenía adicionalmente histidina 100 mM y lisina 100 mM y se incubó a +37°C. Se retiraron sub-muestras en instantes del tiempo definidos hasta 168 h y se determinó la actividad funcional de PEG-rFVIII online usando el ensayo cromogénico de FVIII. Además, la liberación de PEG se confirmó midiendo PEG libre y PEG total por un método HPLC proporcionado por Nektar Therapeutics (Huntsville, AL) de sub-muestras congeladas. Los resultados se resumen en la Figura 6 y la Tabla 3.
- 40
- 45

- La Figura 6 muestra el aumento de la actividad cromogénica de FVIII de PEG-rFVIII durante la fase de incubación. El aumento en la actividad de las proteínas siguió un ciclo de dos fases: se observó un rápido aumento en la actividad de FVIII en las primeras 6 h seguido por una fase con un aumento lento de la actividad alcanzando un máximo después de 24 h de incubación, con un aumento en la actividad cromogénica de FVIII a 21,9 IU/ml comparado con la actividad de partida de 6,0 IU/ml, que corresponde a un aumento de la actividad de 366%. La incubación adicional hasta 144 h dio como resultado una disminución gradual, lenta, de la actividad de FVIII. Como se indica en líneas generales en los Ejemplos 1 y 2, la incubación de proteínas PEGiladas a pH alto (por ej., 9,8) es otra opción para provocar una liberación de PEG *in vitro*. El mismo conjugado de PEG-rFVIII se incubó por lo tanto a pH 9,8 a 37°C y se comparó el aumento en actividad con el conseguido en presencia de histidina / lisina a pH 7,3. La Figura 6 muestra que a pH 9,8, se recuperaba menos actividad cromogénica del FVIII, con un aumento en la actividad cromogénica de FVIII a 14,8 IU/ml en el instante de tiempo de 24 h comparado con 4,4 IU/ml de actividad de partida. Esto se debió probablemente a inactivación del FVIII aumentada a este alto valor de pH. Esta conclusión
- 50
- 55

5 fue soportada por velocidades similares de liberación de PEG en ambas condiciones (Tabla 3). La cantidad de PEG liberada se expresó como el porcentaje de PEG libre en relación con la cantidad total de PEG. El bajo contenido inicial de PEG libre (8 a 13% = valores de base) aumentó en la incubación en ambos tampones de una manera dependiente del tiempo, alcanzado un máximo de 64% del PEG total después de 144 h en el caso del tampón de histidina / lisina y de 74% después de 168 h para el tampón alcalino (pH 9,8). Estos datos confirman que ambas condiciones son apropiadas para provocar la liberación de PEG.

Tabla 3. Cambios en contenido en PEG libre de PEG-rFVIII en presencia de aminas libres a pH neutro y a pH 9,8.

Tiempo de incubación (h)	PEG-rFVIII	
	PEG libre (% de PEG total)	
	His/Lis pH 7,3	pH 9,8
base	8	13
5 min	18	Nd
2	24	Nd
10	37	Nd
24	45	37
48	51	Nd
72	55	49
96	59	Nd
120	62	Nd
144	64	Nd
168	Nd	74

10 Los datos en el Ejemplo 6 también sugieren que para proteínas sensibles al pH se tienen que favorecer aminas libres combinadas a pH neutro para la liberación forzada de PEG *in vitro* ya que la recuperación de la actividad de las proteínas es mayor en dichas condiciones comparado con una liberación alcalina.

Ejemplo 5 (Ejemplo Comparativo):

Despegilación *in vitro* de PEG-RFVIII que se puede liberar en presencia de hepes/tris.

15 Se incubó PEG-rFVIII que se puede liberar (PEG ramificado de 20 K) a 37°C en una combinación de sustancias tampón que contienen amina típicas a pH 7,4, es decir HEPES 200 mM y Tris 200 mM. Se extrajeron sub-muestras en instantes de tiempo definidos, se vigiló la recuperación de actividad del FVIII mediante un ensayo cromogénico y se determinó su capacidad para interactuar con VWF. La unión del VWF, que determina de manera crítica la supervivencia de FVIII en la circulación, se vigiló usando tecnología de resonancia plasmónica de superficie. Usando equipo Biacore, se inyectaron las diversas muestras de PEG-rFVIII en la fase móvil y se ensayó la interacción con VWF inmovilizado. Mientras sólo se unieron niveles bajos de PEG-rFVIII al rVWF, la unión de la muestra aumentó con la liberación de PEG. La Figura 7 muestra la creciente actividad cromogénica del FVIII con el tiempo que va acompañada por un aumento en la unión del rFVIII a VWF, que es una señal de desPEGilación. Los datos del Ejemplo 5 indican que se puede usar un amplio espectro de aminas para forzar la liberación de PEG a partir de dichos conjugados. La recuperación de tanto la actividad cromogénica como la unión a VWF muestra además que se genera proteína funcional con el tiempo.

Ejemplo 6:

Velocidad inicial de aumento de actividad del FVIII en la incubación de PEG-RFVIII en presencia de aminas libres.

La rápida fase inicial de liberación de PEG de PEG-rFVIII, que se definió en el Ejemplo 4 como el intervalo de tiempo de 0 a 6 h de incubación a 37°C, fue analizada por su idoneidad como un parámetro para investigar la consistencia

lote a lote. La Figura 8 muestra el aumento en la actividad del FVIII en la incubación en un tampón de histidina 100 mM / lisina 100 mM de pH 7,3 a 37°C en las primeras 6 h.

5 En el panel izquierdo, se muestran seis mediciones repetidas del mismo lote de PEG-rFVIII, mientras que en el panel derecho, se muestran los valores medios de actividad de dos lotes distintos del conjugado. El aumento en la actividad del FVIII (IU/ml) por hora se calcula ajustando las curvas por regresión lineal y se expresó como la pendiente (k'). Los valores numéricos de la pendiente para las seis unidades de ensayo y los dos lotes se resumen en la Tabla 4. En ambos casos, se obtuvieron pendientes similares, que demuestra de ese modo que el sistema de ensayo proporciona resultados reproducibles. Por otra parte, determinar la velocidad inicial de aumento de actividad del FVIII permite una comparación de diferentes lotes de un conjugado de PEG que se puede liberar.

10 Tabla 4. Velocidad inicial de aumento de la actividad cromogénica del FVIII en una reacción de liberación de PEG forzada.

Unidad de ensayo	Pendiente (k')
1	1,48
2	1,58
3	1,42
4	1,65
5	1,19
6	2,01
1	1,43
2	1,31

Ejemplo 7:

Detección de liberación de PEG de PEG-RFVIII por medición de la fluorescencia sin separación de especies.

15 El PEG que se puede liberar aumentó en actividad cromogénica de FVIII de 21,9 IU/ml comparado con rFVIII de 6,0 IU/ml de actividad de partida (PEG ramificado de 20 K), formulado en tampón de citrato 20 mM, pH = 6,0, que contenía 32 g de manitol, 12 g de sacarosa, 2,5 g de CaCl₂•2H₂O y 100 mg de polisorbato 80 por litro y se liofilizó, se reconstituyó a una disolución que contenía 360 mg de proteína (ensayo de ácido bicínico) y 345 mg de PEG

20 total. Esta disolución se diluyó 1:5 en una disolución de bicarbonato de sodio 100 mM, pH = 8,5, que contenía 32 g de manitol, 12 g de sacarosa, 2,5 g de CaCl₂•2H₂O, AEDT 10 mM y 100 mg de polisorbato 80 por litro (99% de ácido oleico, Nippon Oils and Fats) y los espectros de fluorescencia, que muestran los PEG-FMOC-compuestos en un pico estrecho entre 350-355 nm y el PEG-dibenzofulveno liberado (PEG-DBF) en un pico amplio entre 460-560 nm, medido en un espectrofluorímetro de Perkin Elmer LS50B (1,25 ml en una cubeta de cuarzo detenida con PTFE de 0,4 (excitación) x 1 (emisión) cm, longitud de onda de 330 nm de excitación/340-600 nm de emisión, ancho de

25 rendija de 5/5 nm, velocidad de barrido de 180 nm/min, voltaje de fotomultiplicador de 800 V) en la incubación a 20-25°C a intervalos de tiempo definidos (Figura 9).

Tabla 5. Resumen de análisis cuantitativo de PEG-FVIII y derivados de PEG en la incubación de PEG-rFVIII a pH 8,5.

PH 8,5	FMOGPEG		DBF-PEG		DBF-PEG		FMOC-PEG		PEG-FVIII		FVIII:Ag	
	HPLC	% inicio	HPLC	% inicio	330 nm/E460-560 nm	% inicio	330 nm/E350-355 nm	% inicio	% ref	% inicio	U/ml	% inicio
h	µg/ml		µg/ml		Intensidad		S350-355					
0,0	15,5	100,0	3,7	100,0	457	100,0	727	100,0	112,1	100,0	28,1	100,0
1,7	20,9	134,8	5,6	151,4	468	102,4	624	85,8	80,2	71,5	47,1	167,6
3,4	24,1	155,5	7,8	210,8	514	112,6	583	80,2	81,1	72,3	53,4	190,0
5,2	25,7	165,8	9,5	256,8	561	122,7	558	76,7	71,9	64,1	59	210,0
7,1	27,3	176,1	11,0	297,3	611	133,8	540	74,2	60,8	54,2	69,3	246,6
22,8	33,1	213,5	16,8	454,1	845	185,0	496	68,2	54,7	48,8	86,9	309,3
31,0	35,9	231,6	20,2	545,9	850	186,1	419	57,7	45,9	40,9	96,1	342,0
47,2	40,1	258,7	24,7	667,6	994	217,5	351	48,3	39,7	35,4	116,8	415,7
53,9	41,8	269,7	27,2	735,1	1039	227,5	325	44,7	37,1	33,1	111,9	398,2
71,3	43,7	281,9	29,6	800,0	1201	262,8	322	44,2	31,4	28,0	131,5	468,0
78,4	45,1	291,0	30,7	829,7	1182	258,6	280	38,5	28,0	25,0	146,9	522,8
94,8	54,5	351,6	38,6	1043,2	1288	281,9	286	39,4	30,1	26,9	150,6	535,9

5 En las muestras extraídas en estos intervalos designados de un depósito separado se analizó por HPLC en un columna de 5 μ de proteínas Shodex (KW-803 300A, 300 x 8 mm (Showa Denko America, Inc. (Nueva York, NY)) que actúa con fosfato de sodio 20 mM, sulfato de sodio 50 mM, a pH 6,1, Fmoc-PEG libre y dibenzofulveno-PEG y se analizó de manera inmunoquímica por ELISA PEG-FVIII y antígeno del FVIII libre. Los resultados del ELISA de PEG-FVIII se proporcionan como la unión medida en el ensayo referido a la de una preparación clásica recién disuelta. Se integraron señales de fluorescencia de 350-355 nm y de 460-560 nm (en etapas de 0,5 nm) para conjugados PEG-Fmoc y PEG-dibenzofulveno, respectivamente. Los datos se resumen en la Tabla 5.

10 Los datos presentados en la Tabla 5, mostrados como un porcentaje de las concentraciones medidas inicialmente, demuestran la liberación de benzofulveno-PEG libre, como se demuestra por el aumento en la señal de fluorescencia a 460-560 nm y de antígeno del FVIII libre, cuando se mide por ELISA y por la correspondiente disminución del conjugado de proteína de PEG-Fmoc, como se demuestra por la señal de fluorescencia 350-355 nm y los niveles disminuidos de PEG unido a FVIII cuando se mide por el ELISA de PEG-FVIII.

Ejemplo 8:

15 Eliminación de PEG-dibenzofulveno mediante glutatión.

A la disolución de bicarbonato del Ejemplo 7, se añadió glutatión reducido 10 mM (GSH) y se llevó a cabo dilución, incubación, medición, muestreo y análisis como se indica en el Ejemplo 8. Se muestran espectros en la Figura 10. Después de aproximadamente 24 h, pareció que se había agotado el glutatión en el depósito de muestreo, pero no en la cubeta de fluorescencia, por oxidación (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de análisis cuantitativo de PEG-FVIII y derivados de PEG en la incubación de PEG-rFVIII a pH 8,5 en presencia de glutatión.

pH 8,5 + GSH	FMOC-PEG		DBF-PEG		DBF-PEG		FMOC-PEG		PEG-FVIII		FVIII:Ag	
	HPLC		HPLC		330 nm/0460-560 nm		330 nm/0350-355 nm		ELISA		ELISA	
H	$\mu\text{g/ml}$	% inicio	$\mu\text{g/ml}$	% inicio	Intensidad	% inicio	Intensidad	% inicio	ng/ml	% inicio	U/ml	% inicio
0,0	15,3	100,0	2,3	100,0	423	100,0	702	100,0	108,1	100,0	23,7	100,0
1,7	20,0	130,7	2,8	121,7	436	103,2	649	92,5	110,8	102,5	34,7	146,4
3,4	22,8	149,0	3,1	134,8	440	104,1	602	85,8	84,6	78,3	42,8	180,6
5,2	24,8	162,1	3,1	134,8	458	108,2	594	84,7	73,3	67,8	45,7	192,8
7,1	26,0	169,9	3,1	134,8	465	109,9	578	82,4	69,8	64,6	51,1	215,6
22,8	31,4	205,2	3,6	156,5	495	117,0	614	87,4	58,8	54,4	72,9	307,6
31,0	33,5	219,0	5,7	247,8	430	101,6	543	77,3	54,3	50,2	80,1	338,0
47,2	38,4	251,0	11,4	495,7	431	101,9	519	73,9	43,0	39,8	97,4	411,0
53,9	40,1	262,1	13,6	591,3	433	102,4	504	71,8	42,2	39,0	105,1	443,5
71,3	40,3	263,4	14,8	643,5	527	124,6	538	76,7	38,4	35,5	115,8	488,6
78,4	42,0	274,5	16,0	695,7	516	122,0	474	67,5	33,3	30,8	130,5	550,6
94,8	45,5	297,4	18,2	791,3	618	146,2	509	72,5	33,0	30,5	133,3	562,4

5 Los datos en la Tabla 6, mostrados como un porcentaje de las concentraciones medidas inicialmente, demuestran la eliminación de dibenzofulveno-PEG libre por glutatión reducido, como se demuestra por el aumento moderado en la señal de fluorescencia específica a 460-560 nm (en comparación con el Ejemplo 5) y la correspondiente disminución moderada de los compuestos de PEG-FMOC conjugados, como se demuestra por la señal de fluorescencia de 350-355 nm. Se genera antígeno del FVIII libre y disminuyen los niveles de PEG unido a FVIII a una velocidad similar como en el Ejemplo 5.

Ejemplo 9 (Ejemplo Comparativo):

Demostración del efecto del pH sobre la generación de PEG-dibenzofulveno.

10 La disolución de FVIII en el Ejemplo 8 se diluyó 1:5 con tampón de citrato 20 mM, pH = 6,0, que contenía 32 g de manitol, 12 g de sacarosa, 2,5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 100 mg de polisorbato 80 (ácido oleico al 99%) por litro. Se llevaron a cabo incubación, medición, muestreo y análisis como se indica en el Ejemplo 7. Los espectros se muestran en la Figura 11. A pH 6,0, la liberación de PEG-dibenzofulveno fue menor que a pH = 8,5 (Compare la Tabla 7 a la Tabla 5). Los datos sugieren que el mecanismo de eliminación β se realiza mediante un ataque de nucleófilos básicos, tales como el anión hidróxido.

Tabla 7. Resumen de análisis cuantitativo de PEG-FVIII y derivados de PEG en la incubación de PEG-FVIII a pH 8,5.

pH 6,0	FMOC-PEG		DBF-PEG		DBF-PEG		Fmoc-PEG		PEG-FVIII		FVIII:Ag	
	µg/ml	% inicio	HPLC	Intensidad	330 nm/0460-560 nm	% inicio	Intensidad	330 nm/0350-355 nm	µg/ml	% inicio	µg/ml	% inicio
0,0	6,1	100,0	1,7	440	100,0	692	100,0	172,8	100,0	13,4	100,0	
1,7	6,3	103,3	1,8	408	92,7	674	97,4	155,1	89,8	12,5	93,3	
3,4	6,7	109,8	1,9	417	94,9	663	95,7	149,0	86,2	12,6	94,0	
5,2	6,9	113,1	2,0	417	94,7	653	94,3	142,9	82,7	13,6	101,5	
7,1	7,5	123,0	2,1	425	96,7	652	94,2	165,0	95,5	12,8	95,5	
22,8	9,0	147,5	2,7	491	111,6	682	98,6	155,8	90,2	15,1	112,7	
31,0	10,6	173,8	3,2	469	106,7	643	92,9	153,6	88,9	14,8	110,4	
47,2	12,7	208,2	4,0	461	104,8	618	89,2	171,2	99,1	15,4	114,9	
53,9	13,3	218,0	4,4	480	109,1	625	90,2	207,5	120,1	14,6	109,0	
71,3	14,7	241,0	4,8	552	125,6	661	95,4	193,3	111,9	15,2	113,4	
78,4	15,3	250,8	5,1	528	120,1	614	88,7	219,1	126,8	14,7	109,7	
94,8	18,6	304,9	6,4	595	135,2	697	100,7	209,0	120,9	17	126,9	

Ejemplo 10 (Ejemplo Comparativo):

Despolimerización *in vitro* de PSA-RVWF que se puede liberar a pH aumentado.

5 La despolimerización de un polímero-conjugado soluble en agua que se puede liberar, tal como un poli(ácido siálico) (PSA)-rVWF conjugado, se realiza aumentando el pH del conjugado de proteína. La despolimerización se mide incubando el conjugado de proteína a diferentes valores de pH, por ejemplo a un pH de aproximadamente 6 y a un

pH de aproximadamente 8 o aproximadamente 10. Se disolvió PSA-rVWF purificado en Citrato de sodio 0,02 M, NaCl 0,15 M con un valor de pH de aproximadamente 6. Para la muestra alcalina, se ajusta el mismo tampón a pH aumentado de aproximadamente 8 o aproximadamente 10 por la adición de NaOH 0,1 M. Se retiraron sub-muestras en instantes de tiempo definidos y se analizaron teniendo en cuenta su contenido en antígeno del VWF (VWF:Ag), PSA libre, PSA total y composición de VWF de multímeros.

El contenido en VWF:Ag se determinó con un ELISA sándwich usando anticuerpos comercialmente disponibles (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se determinó PSA libre y PSA total mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se realizó análisis de multímeros de VWF mediante electroforesis en gel de agarosa SDS horizontal de alta densidad e inmunocoloración usando un anticuerpo anti-VWF humano policlonal (Dako). Se espera que la despolimerización de PSA-rVWF aumente con pH creciente.

Ejemplo 11:

Despolimerización *in vitro* de PSA-RVWF que se puede liberar en presencia de aminas primarias y pH alto.

La despolimerización de un polímero-conjugado soluble en agua que se puede liberar, tal como un conjugado de poli(ácido siálico) (PSA)-rVWF, se realiza en otro aspecto aumentando la concentración de amina del tampón de conjugado de proteína. Se diluye un conjugado de PSA-rVWF que se puede liberar en citrato de sodio 0,02 M, tampón de NaCl 0,15 M a un pH de aproximadamente 9,8, que contenía lisina 100 mM y se incubó a 37°C. Se extrajeron sub-muestras en instantes de tiempo definidos y se analizó su contenido en antígeno del VWF (VWF:Ag), PSA libre, PSA total y composición multimérica. Se realizó análisis de multímeros con electroforesis en gel de agarosa SDS horizontal de alta densidad e inmunocoloración usando anticuerpos dirigidos contra VWF humano (Dako, Glostrup, Dinamarca) o PSA (Millipore, Temecula, CA, USA).

En la incubación de PSA-rVWF en presencia de la amina lisina a pH 9,8, se espera un aumento en la proporción de VWF: Ag a proteína con el tiempo. Además, se espera que se libere una mayoría del PSA total después de incubación en el tampón referido. Después de incubación, se espera que sólo pequeñas cantidades de PSA permanezcan unidas a los multímeros de VWF solos.

Ejemplo 12:

Recuperación *in vitro* de la actividad de las proteínas de PSA-RFVIII que se puede liberar en presencia de aminas libres seleccionadas.

Se espera que la actividad de las proteínas de un polímero soluble en agua conjugado a una proteína aumente en presencia de aminas libres, que indica la liberación del polímero a medida que aumenta la concentración de amina. En este experimento, se diluye un conjugado de PSA-rFVIII que se puede liberar a 5 IU/ml de actividad cromogénica de FVIII en un tampón con un pH de aproximadamente 7,3 (histidina 10 mM, NaCl 90 mM, CaCl₂ 1,7 mM, Tris 10 mM, glutatión 0,26 mM, manitol 176 mM, trehalosa 23,5 mM y 0,1 g/l de Tween 80); el tampón contiene adicionalmente lisina, histidina o una combinación de ambos aminoácidos y se incubó el tampón a 37°C para forzar la liberación *in vitro* de PSA del conjugado de la proteína. Se extraen sub-muestras en instantes de tiempo definidos (24 h, 48 h y 72 h) y se determina la actividad cromogénica de FVIII online usando un ensayo cromogénico de FVIII. Se espera que la actividad de FVIII aumente con el tiempo en un tampón con concentración creciente de lisina, histidina o una combinación de ambas aminas.

Ejemplo 13:

Despolimerización *in vitro* de PSA-RFVIII que se puede liberar en presencia de una combinación de aminas libres.

Se incubó un conjugado de PSA-rFVIII que se puede liberar en un tampón (citrato Na₃ 20 mM, CaCl₂ 1,7 mM, manitol 176 mM, sacarosa 36 mM y 0,1 g/l de Tween 80) con un pH de 7,3; el tampón contiene adicionalmente histidina 100 mM y lisina 100 mM y se incubó a +37°C. Alternativamente, el tampón se aumenta a un pH alto (por ej., 9,8) sin la adición de histidina y lisina. Se extrajeron sub-muestras en intervalos de tiempo definidos hasta 168 h y se determinó la actividad funcional de PSA-rFVIII usando un ensayo cromogénico de FVIII (como se describió previamente). Además, la liberación de PSA se confirma midiendo PSA libre y PSA total por HPLC de sub-muestras congeladas. Se espera que dichas condiciones provoquen la liberación de PSA de la proteína del rFVIII *in vitro*.

Ejemplo 14 (Ejemplo Comparativo):

Despolimerización *in vitro* de PSA-RFVIII que se puede liberar en presencia de Hepes/Tris.

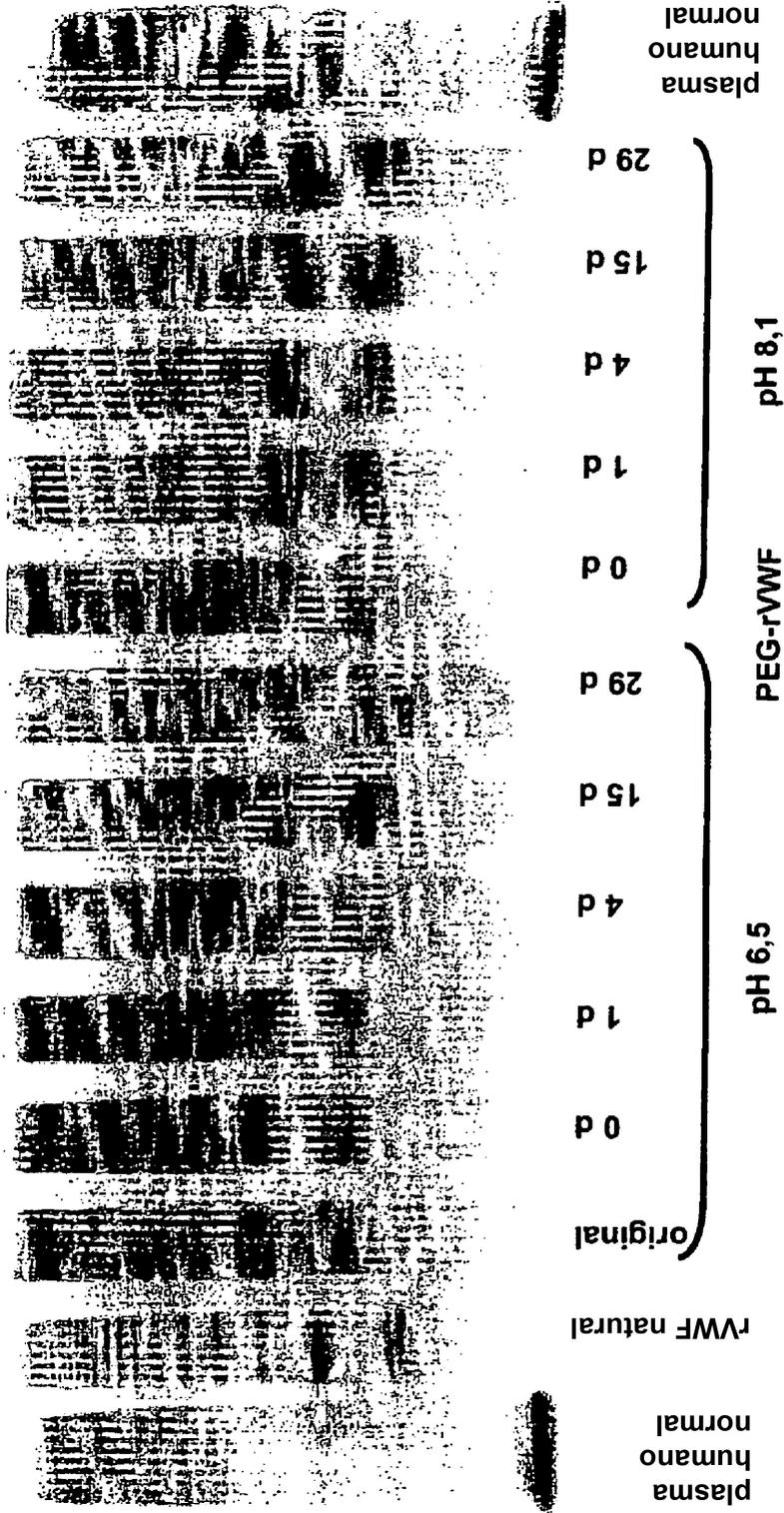
Experimentos previos indican que aumentar la concentración de amina de un tampón fuerza la liberación de un polímero soluble en agua que se puede liberar de un conjugado de proteína. En este experimento, se incubó PSA-rFVIII que se puede liberar a 37°C en una combinación de sustancias tampón que contienen amina típicas, es decir, HEPES 200 mM y Tris 200 mM, a un pH de aproximadamente 7,4. Se extrajeron sub-muestras en instantes de tiempo definidos. La recuperación de actividad del FVIII se vigila mediante un ensayo cromogénico y se determina su capacidad para interactuar con VWF. La unión de VWF, que determina de manera crítica la supervivencia de

- 5 FVIII en la circulación, se vigila usando tecnología de resonancia plasmónica de superficie. Usando un sistema Biacore, se inyectan diversas muestras de PSA-rFVIII en la fase móvil y se ensaya la interacción con VWF inmovilizado. Se espera que aumente la unión de VWF con la liberación de PSA. Por lo tanto, aumentar la actividad cromogénica de FVIII con el tiempo debería ir acompañado de un aumento en la unión de rFVIII a VWF, que es una señal de despolimerización (eliminación de PSA). Como se indica en los ejemplos previos, se espera que se pueda usar un amplio espectro de aminos para forzar la liberación de PSA de dichos conjugados. Los aumentos en la actividad cromogénica y unión a VWF indican que se genera proteína funcional con el tiempo.

REIVINDICACIONES

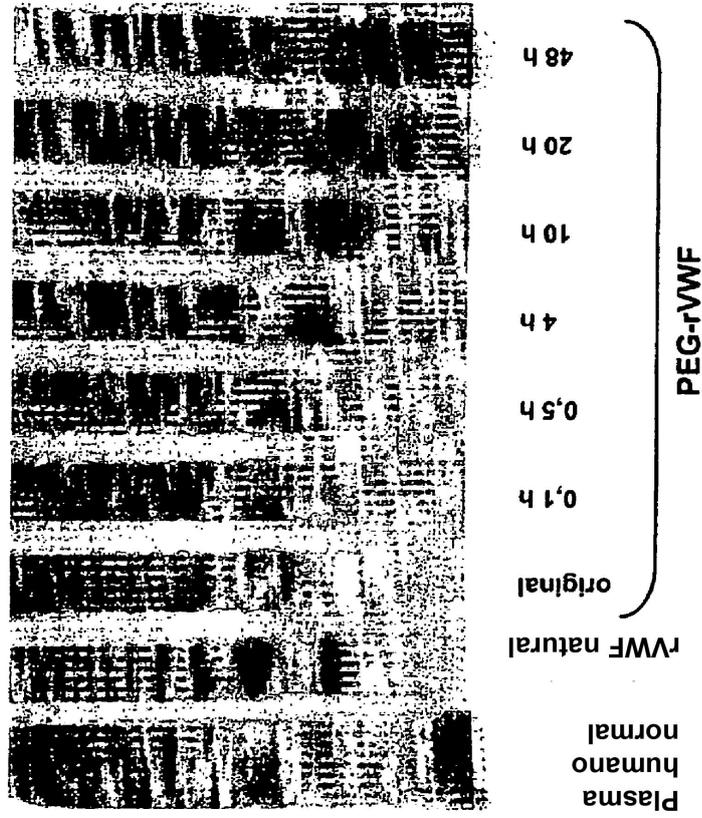
- 5 1. Un método *in vitro* de liberación de un polímero soluble en agua ligado de manera reversible de una proteína modificada mediante el polímero soluble en agua o aumento de la actividad de una proteína modificada con un polímero soluble en agua ligado de manera reversible que comprende la etapa de incubar la proteína en condiciones eficaces para liberar el polímero soluble en agua, en el que las condiciones eficaces para liberar el polímero soluble en agua comprenden aumentar la concentración de amina libre de un tampón que comprende la proteína por adición de lisina libre, histidina o una combinación de las mismas al tampón en una concentración eficaz para liberar el polímero soluble en agua.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que las condiciones comprenden además aumentar el pH del tampón que comprende la proteína, aumentar la temperatura del tampón que comprende la proteína o prolongar el periodo de tiempo de la etapa de incubación.
3. El método según la reivindicación 2, en el que el pH del tampón se aumenta a aproximadamente pH 8,1.
4. El método según la reivindicación 2, en el que el pH del tampón se aumenta a aproximadamente pH 9,8.
- 15 5. El método según la reivindicación 2, en el que la temperatura del tampón se aumenta de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C.
6. El método según la reivindicación 2, en el que el periodo de tiempo para incubación se prolonga a aproximadamente 168 horas.
- 20 7. El método según la reivindicación 2, en el que el periodo de tiempo para incubación se prolonga a aproximadamente 48 horas.
8. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína es factor VIII (FVIII).
9. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína es Factor von Willebrand (VWF).
10. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el polímero soluble en agua está ligado de manera reversible a la proteína con $^9\text{H}-(\text{f})\text{luoren-}^9\text{-il (m)et(o)xi(c)arbonilo}$, dibenzofulveno o un derivado de los mismos.
- 25 11. El método según la reivindicación 10, en el que el polímero soluble en agua está ligado con $^9\text{H}-(\text{f})\text{luoren-}^9\text{-il(m)et(o)xi(c)arbonilo}$ o un derivado del mismo.
12. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el polímero soluble en agua es polietilenglicol.
13. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el polímero soluble en agua es poli(ácido siálico).

Figura 1: Influencia de liberación de PEG dependiente del pH sobre la estructura multimérica de rVWF PEGilado.



Se incubó rVWF PEGilado a pH 6,5 u 8,1 para los instantes de tiempo indicados. Se ajustaron las muestras a antígeno de VWF igual y se cargaron sobre un gel de agarosa de alta resolución. Se visualizaron las estructuras multiméricas de rVWF y su derivado PEGilado por inmunocoloración del gel con un antisuero anti-VWF humano policlonal.
 rVWF natural: VWF recombinante no modificado.
 Original: rVWF PEGilado previo a su exposición en las condiciones de liberación.

Figura 2: Influencia de la liberación de PEG dependiente del pH y la amina sobre la estructura multimérica de rVWF PEGilado.

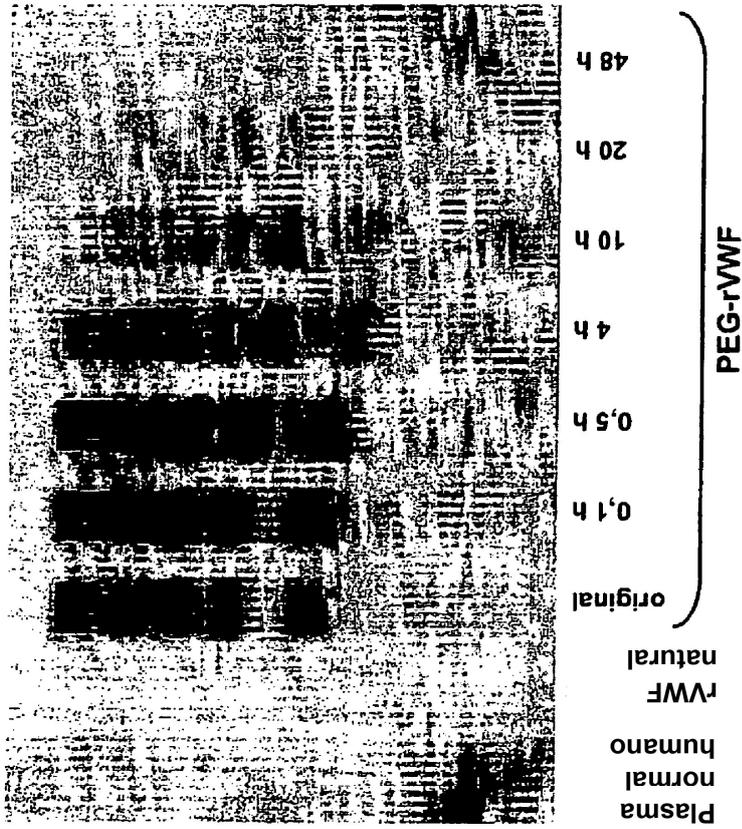


Se incubó rVWF PEGilado a pH 9,8 en presencia de lisina 100 mM para los instantes de tiempo indicados. Las muestras se ajustaron a igual antígeno de VWF y se cargaron sobre un gel de agarosa de alta resolución. Se visualizaron las estructuras multiméricas de rVWF y PEG-rVWF por inmunocoloración del gel con un anticuerpo anti-VWF humano policlonal.

rVWF natural: VWF recombinante no modificado.

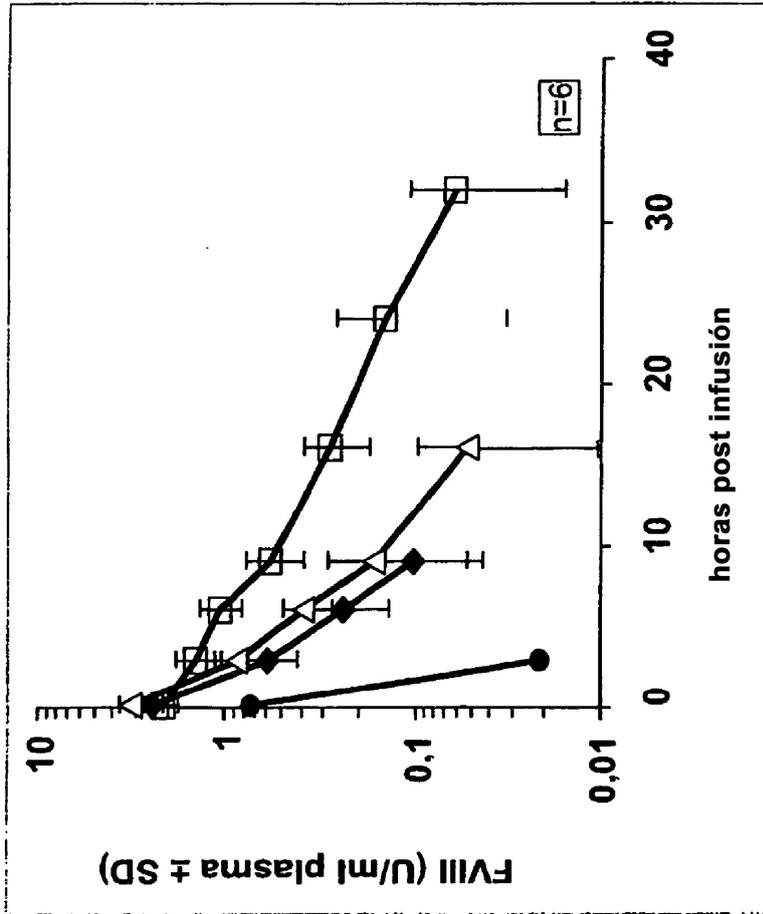
Original: rVWF PEGilado previo a su exposición en las condiciones de liberación.

Figura 3: Influencia de la liberación de PEG dependiente del pH y amina sobre la estructura multimérica de rVWF PEGilado.



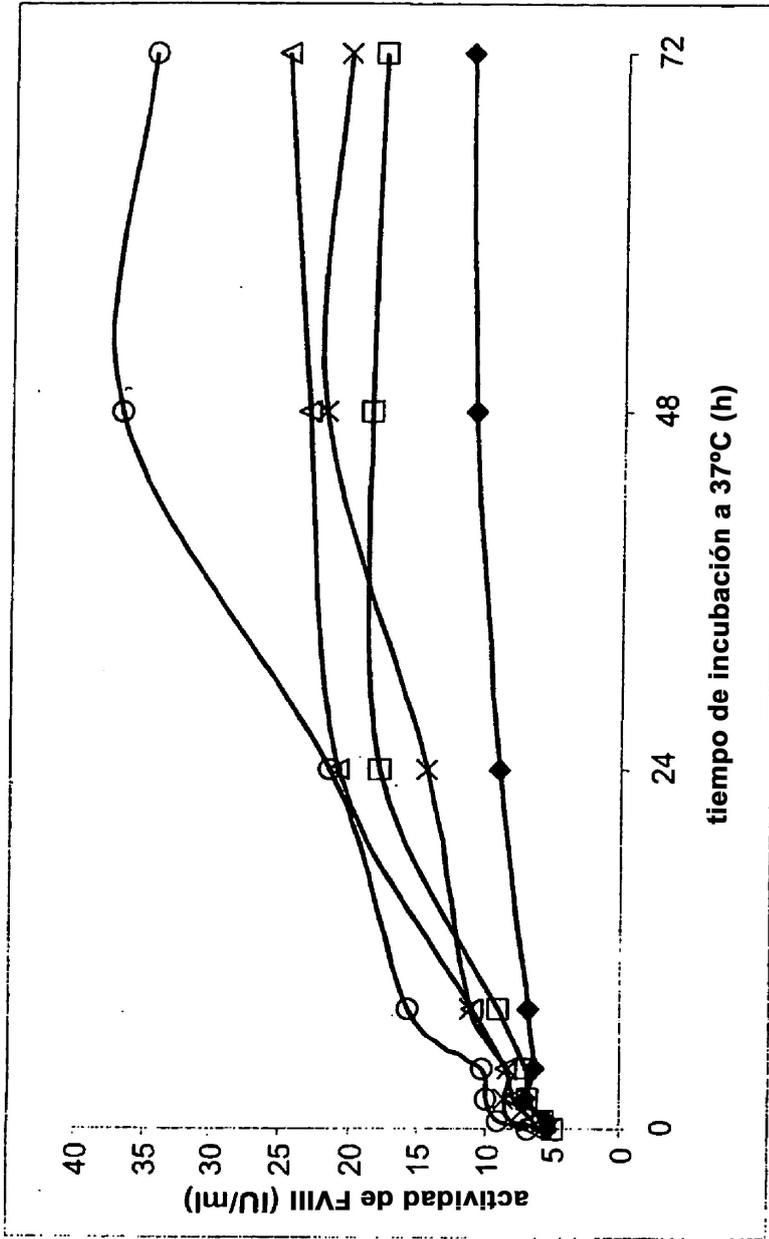
Se incubó rVWF PEGilado a pH 9,8 en presencia de lisina 100 mM para los instantes de tiempo indicados. Se ajustaron las muestras a igual proteína, se aplicaron sobre un gel de agarosa de alta resolución y se sometieron a inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-PEG policonal. La disminución gradual en multímeros PEGilados es claramente visible.
 rVWF natural: VWF recombinante no modificado.
 Original: rVWF PEGilado previo a su exposición en las condiciones de liberación.

Figura 4: Comparación del efecto estabilizante de rFVIII *in vivo* de rVWF natural y desPEGilado en un modelo de ratón deficiente de FVIII x VWF.



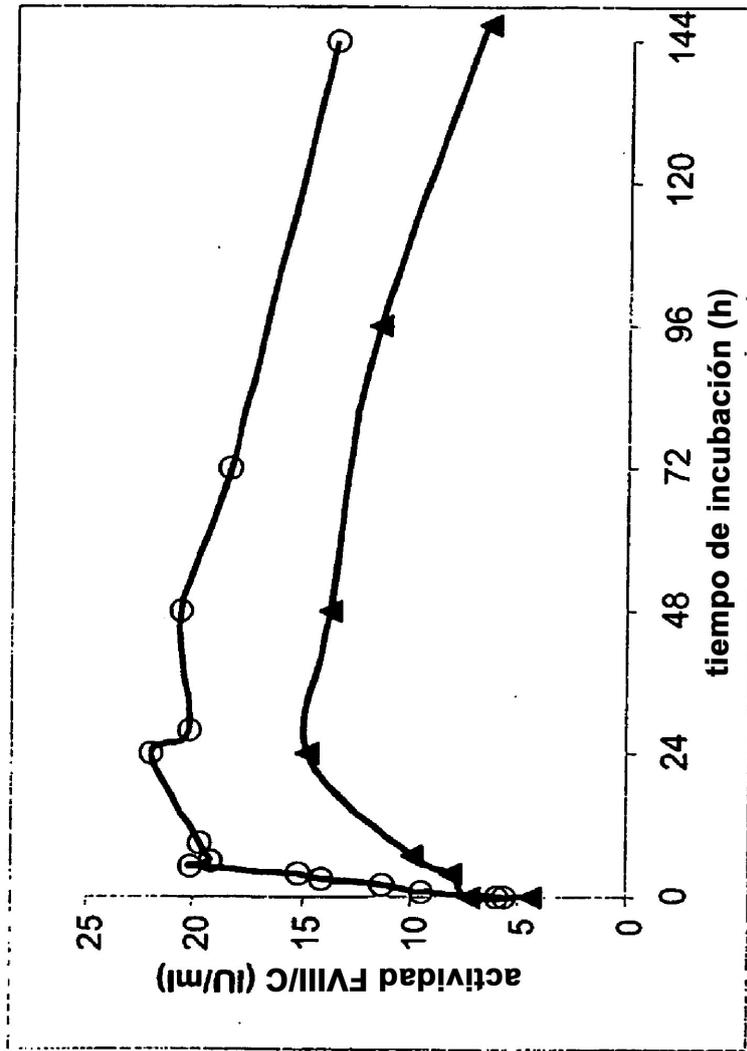
círculos rellenos: 200 IU/kg de rVWF sin rVWF.
 diamantes rellenos: 200 IU/kg de rVWF y 1,6 mg/ml de rVWF no modificado.
 cuadrados vacíos: 200 IU/kg de rVWF y 1,6 mg/ml de rVWF PEGilado que se puede liberar.
 triángulos vacíos: 200 IU/kg de rVWF y 1,6 mg/ml de rVWF desPEGilado *in vitro*.

Figura 5: Comparación de aumento de actividad cromogénica de FVIII con incubación de PEG-rFVIII en tampón que contiene histidina y/o lisina a diferentes concentraciones.



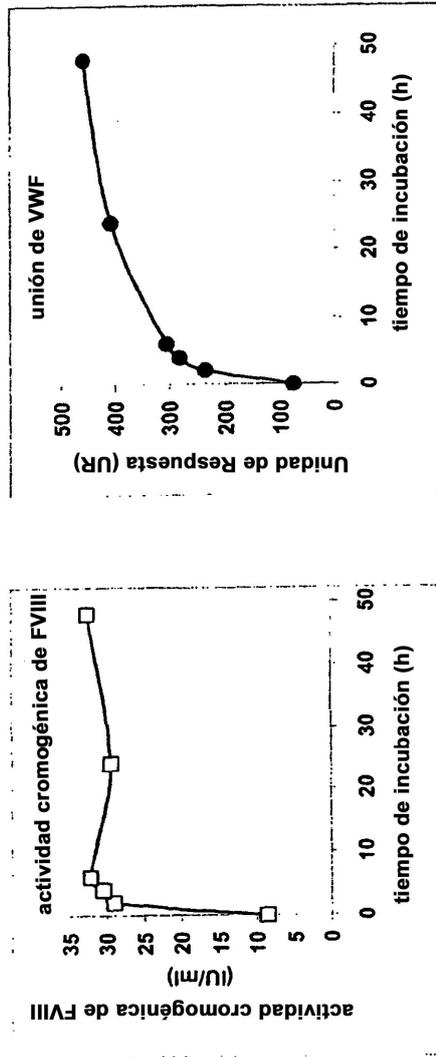
diamantes rellenos: PEG-rFVIII incubado en tampón sin histidina/lisina pH 7,3.
 cuadrados vacíos: PEG-rFVIII incubado en presencia de histidina 100 mM pH 7,3.
 triángulos vacíos: PEG-rFVIII incubado en presencia de histidina 200 mM pH 7,3.
 estrellas vacías: PEG-rFVIII incubado en presencia de lisina 100 mM pH 7,3.
 círculos vacíos: PEG-rFVIII incubado en presencia de lisina 100 mM e histidina 100 mM pH 7,3.

Figura 6: Comparación de aumento de actividad cromogénica de FVIII con incubación de PEG-rFVIII a pH 9,8 o en un tampón de pH neutro que contiene histidina y lisina.



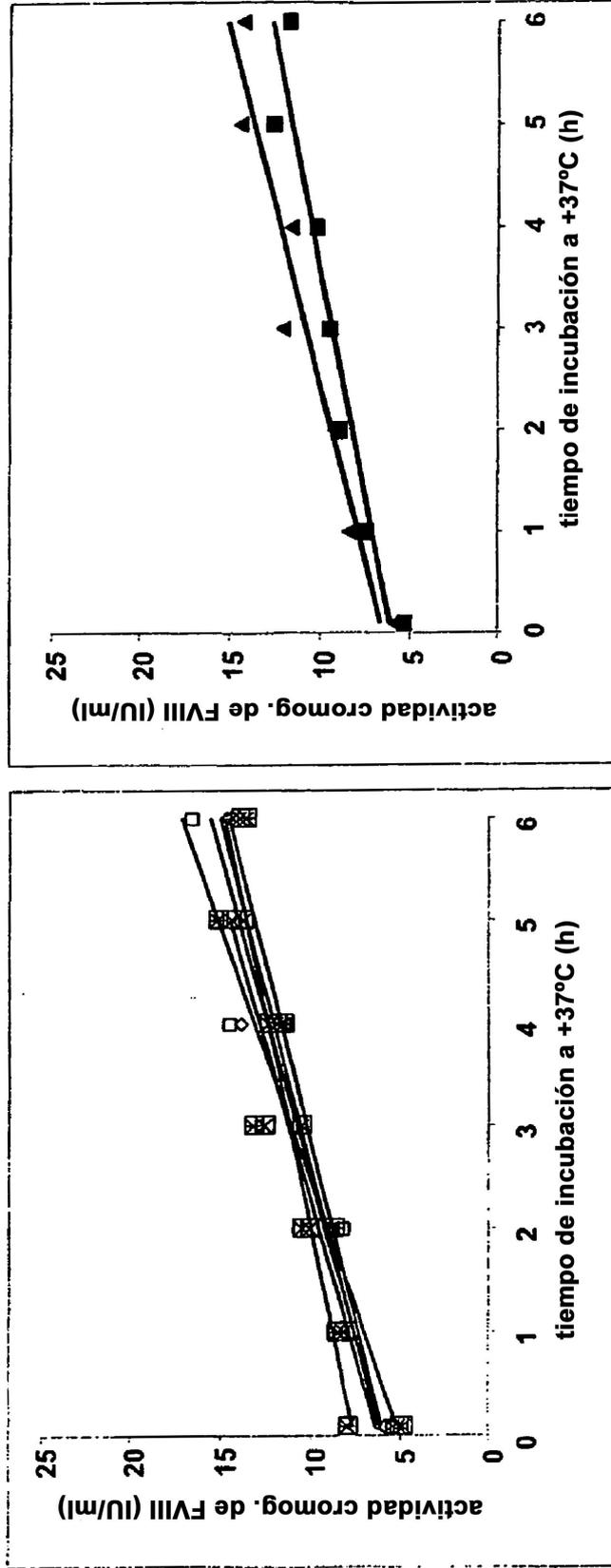
triángulos rellenos: PEG-rFVIII incubado a pH 9,8.
 círculos vacíos: PEG-rFVIII incubado en presencia de lisina 100 mM e histidina 100 mM a pH 7,3.

Figura 7: Influencia de la liberación de PEG dependiente del tampón a base de amina sobre la actividad cromogénica del FVIII y capacidad de unión a VWF de PEG-rFVIII.



Panel izquierdo: cuadrados vacíos: cambios en actividad cromogénica de FVIII durante la incubación en tampón HEPES/Tris a pH neutro pH (7,4).
 Panel derecho: círculos rellenos: Unión aumentada de rFVIII a rVWF inmovilizado durante la incubación en tampón HEPES/Tris a pH neutro pH (7,4).

Figura 8: Reproducibilidad del ensayo de liberación in vitro y su prueba para controlar la consistencia lote a lote.



Se ilustra la velocidad inicial en el aumento de la actividad cromogénica de FVIII en la incubación de PEG-rFVIII en presencia de His 100 mM/Lis 100 mM a pH 7,4.

Panel izquierdo: los diferentes símbolos 6 representan 6 mediciones repetidas de un único lote de PEG-rFVIII.

Panel derecho: los símbolos 2 representan dos lotes distintos de PEG-rFVIII.

Figura 9: Espectro de fluorescencia que muestra la generación de PEG-dibenzofulveno (460-560 nm) y la correspondiente disminución de la señal de fluorescencia del conjugado PEG-FMOC (350-355 nm) en la incubación de PEG-rFVIII a pH = 8,5.

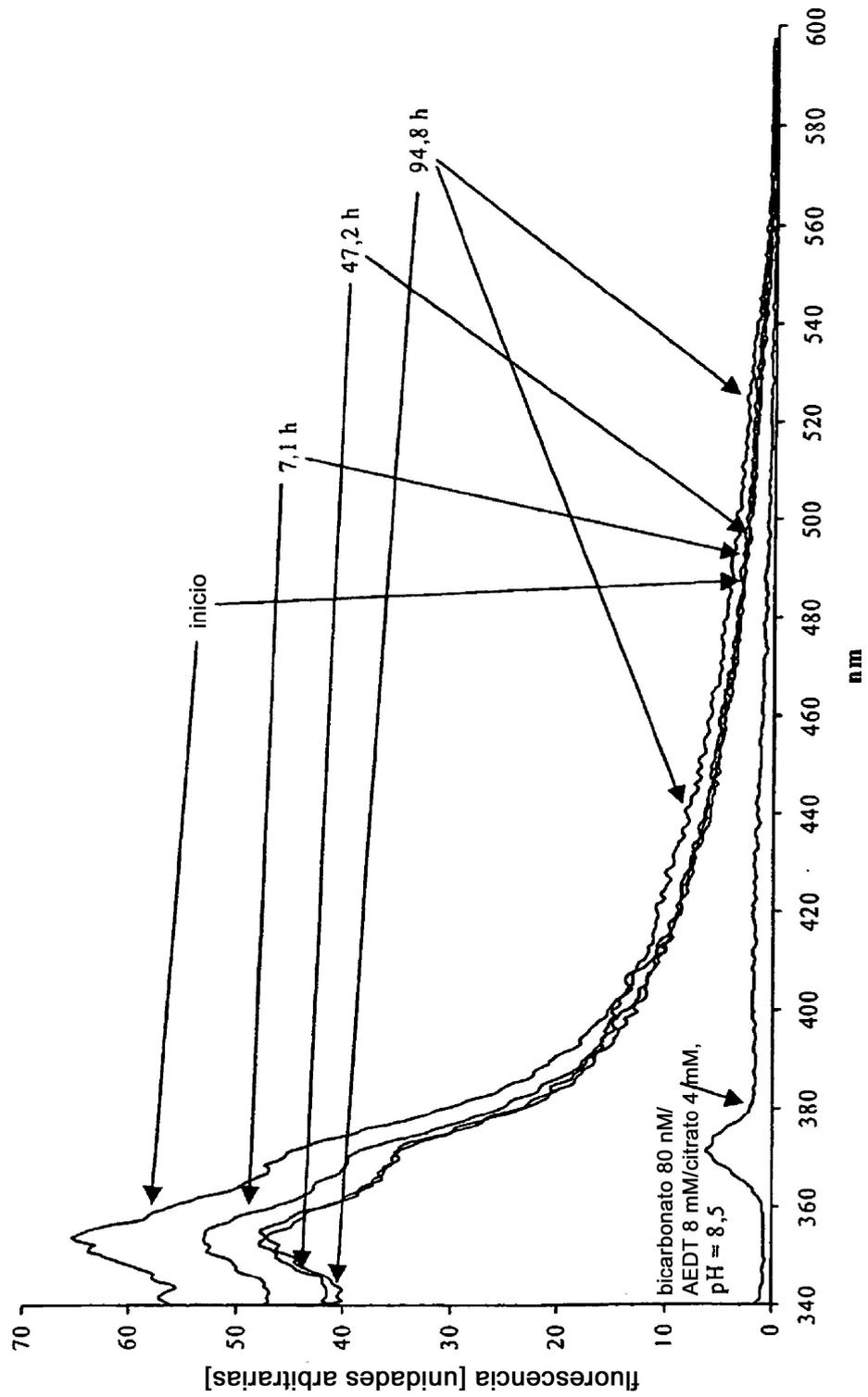


Figura 10: Espectro de fluorescencia que muestra la ligera disminución de la señal de fluorescencia del conjugado PEG-FMOC (350-355 nm) sin la formación de fluorescencia de PEG-dibenzofulveno en la incubación de FVIII pegilado de que se puede liberar a pH 8,5 en presencia de glutatión reducido.

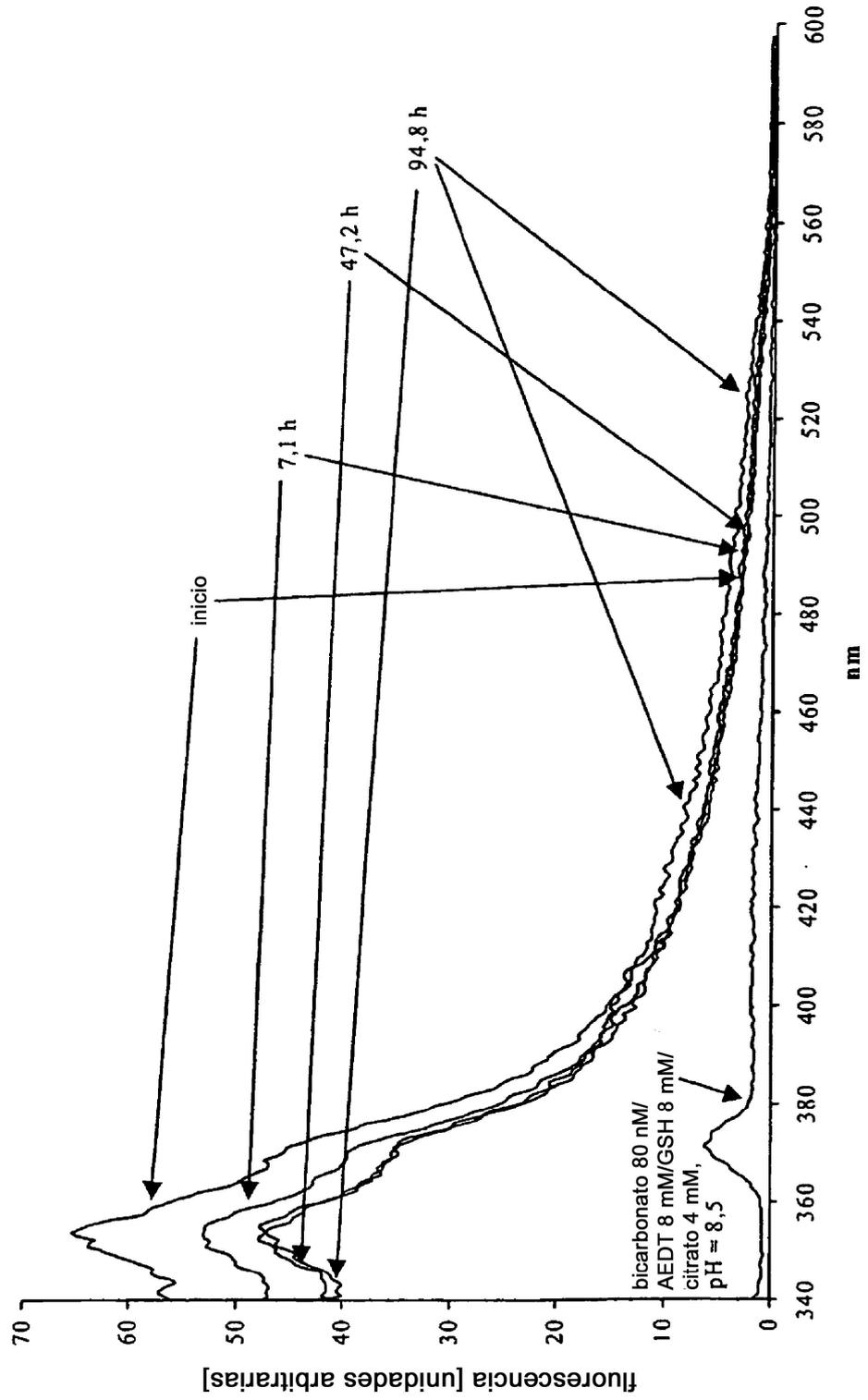


Figura 11: Espectro de fluorescencia que muestra la estabilidad de la señal de fluorescencia del conjugado PEG-FMOC (350-355 nm) en la incubación de FVIII pegilado que se puede liberar a pH 6,0.

