

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 515 365**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008** **E 11177227 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014** **EP 2416157**

54 Título: **Procedimiento y composiciones para detectar específicamente moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables**

30 Prioridad:

**27.12.2007 US 9327 P**

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

**29.10.2014**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)**  
**One Baxter Parkway**  
**Deerfield, IL 60015, US y**  
**BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TURECEK, PETER;**  
**SIEKMANN, JÜRGEN;**  
**WEBER, ALFRED;**  
**GRITSCH, HERBERT;**  
**VARADI, KATALIN y**  
**VEJDA, SUSANNE**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 515 365 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

Procedimiento y composiciones para detectar específicamente moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la cantidad de una molécula polimérica soluble en agua unida a una proteína.

10 **Antecedentes de la invención**

La función *in vivo* de una proteína se mejora uniéndola a una molécula polimérica fisiológicamente aceptable. En particular, se ha encontrado que la unión de una proteína fisiológicamente activa a una molécula polimérica fisiológicamente aceptable prolonga sustancialmente su semivida *in vivo*. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. 4.970.300 describe que la conjugación de una molécula polimérica fisiológicamente aceptable al factor VIII da como resultado una proteína de factor VIII que puede ser activada por la trombina y que tiene una antigenicidad y una inmunorreactividad sustancialmente disminuidas, y un tiempo de desaparición *in vivo* sustancialmente aumentado en el torrente sanguíneo de un mamífero.

20 La Patente de EE.UU. 4.970.300 describe que la conjugación de una molécula polimérica (dextrano) al Factor VIII (FVIII) da como resultado una proteína de FVIII que puede ser activada por la trombina y que tiene una antigenicidad y una inmunorreactividad sustancialmente disminuidas, y un tiempo de desaparición *in vivo* sustancialmente aumentado en el torrente sanguíneo de un mamífero. La solicitud de patente internacional WO94/15625 describe que la conjugación del factor VIII a una molécula polimérica fisiológicamente aceptable mejora la función *in vivo* del factor VIII (i) aumentando su resistencia a la hidrólisis *in vivo*, y prolongando su actividad después de su administración, (ii) prolongando significativamente su vida circulante *in vivo* con respecto a la proteína no modificada, y (iii) aumentando su tiempo de absorción en el torrente sanguíneo. La Patente de EE.UU. 6.037.452 describe conjugados de FVIII y de Factor IX (FIX) en los que la proteína está unida covalentemente a un óxido de polialquileño a través de grupos carbonilo en la proteína. Además, se ha descrito la mejora de la función *in vivo* del factor IX mediante su unión a moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables, en particular, polietilenglicol ("PEG"), en la solicitud de patente internacional WO94/29370. Se desveló un FVIII PEGilado que conserva su actividad específica en la Publicación de Patente Internacional WO/2007/126808. La conjugación de un polímero fisiológicamente aceptable con un agente activo tal como una proteína se realiza preparando conjugados estables de polímero-proteína o conjugados de polímero-proteína en los que el polímero fisiológicamente aceptable está unido a la proteína a través de conectores covalentes escindibles (concepto de profármaco), es decir, un conector hidrolizable o escindible. Por ejemplo, se ha desarrollado una fracción de PEG escindible usando un sistema de conjugación con 9-flourenometoxicarbonilo (FMOOC) que contiene dos cadenas de PEG (Nektar Inc., Huntsville AL). Además, un grupo éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), que es útil para la modificación química de residuos de lisina de la proteína, puede estar unido al sistema anular de fluoreno a través del grupo metoxicarbonilo para generar la fracción escindible de PEG. La Publicación de Patente Internacional WO2008/082669 (incorporada en este documento como referencia) describe una serie de variantes PEGiladas del FVIII recombinante basadas en el concepto de PEG escindible.

45 Sin embargo, actualmente no hay disponible un procedimiento fiable para la determinación cuantitativa de moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables unidas a proteínas o nanopartículas, aparte de los imprecisos procedimientos colorimétricos (Nag y col. 1997, Anal Biochem 250: 35 - 43), que sólo permiten una estimación del contenido de moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables. Además, se han desvelado anticuerpos monoclonales para la determinación de las concentraciones de PEG (patente de EE.UU. 6.617.118), pero hasta ahora no hay disponible un sistema para la determinación fiable de la cantidad de molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a una proteína.

Por lo tanto, existe la necesidad de un nuevo sistema para determinar la cantidad de una molécula polimérica soluble en agua, en particular de PEG, unida a una proteína, particularmente a una proteína fisiológicamente activa.

55 **Resumen de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la cantidad de una molécula polimérica soluble en agua unida a una proteína. Adicionalmente, se da a conocer un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una molécula polimérica fisiológicamente aceptable en el que, por ejemplo, dicha molécula polimérica está presente unida a una proteína. Además, la presente invención se refiere al uso de dicho anticuerpo para la determinación de la cantidad de una molécula polimérica soluble en agua unida a una proteína.

65 En un aspecto, se da a conocer un procedimiento para la determinación de la cantidad de una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a una proteína, que comprende las etapas de (a) proporcionar al menos una proteína unida a al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable; (b) proporcionar al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a dicha molécula polimérica fisiológicamente aceptable; (c) poner en

contacto el anticuerpo de la etapa (b) con la proteína de la etapa (a) en unas condiciones adecuadas para la unión de dicho anticuerpo a la al menos una molécula polimérica unida a dicha proteína; y (d) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y la molécula polimérica fisiológicamente aceptable.

5 En una forma de realización, en la etapa (a) la proteína unida a la al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable está inmovilizada sobre un sustrato o una matriz portadora.

En una forma de realización adicional, el anticuerpo se elige del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal.

10 En otra forma de realización, la proteína es el factor de von Willebrand (VWF) o un derivado del mismo. En una forma de realización adicional, la proteína es el Factor VIII o un derivado del mismo.

15 En algunas formas de realización, la molécula polimérica fisiológicamente aceptable se elige del grupo que consiste en polialquilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxetilado, alcohol poliolefínico, polivinilpirrolidona, polihidroxialquilmacetamida, polihidroxialquilmacetacrilato, polisacáridos, poli- $\alpha$ -hidroxiácido, alcohol polivinílico, polifosfasfaceno, polioxazolina y poli-N-acriloilmorfolino. En una forma de realización relacionada, la molécula polimérica fisiológicamente aceptable es polietilenglicol (PEG) o un derivado del mismo.

20 En otro aspecto se da a conocer un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a una molécula polimérica fisiológicamente aceptable. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

25 En una forma de realización relacionada, la molécula polimérica fisiológicamente aceptable está unida a una proteína. En una forma de realización adicional, la proteína es el factor de von Willebrand (VWF) o un derivado del mismo. En otra forma de realización, la molécula polimérica fisiológicamente aceptable se elige del grupo que consiste en polialquilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxetilado, alcohol poliolefínico, polivinilpirrolidona, polihidroxialquilmacetamida, polihidroxialquilmacetacrilato, polisacáridos, poli- $\alpha$ -hidroxiácido, alcohol polivinílico, polifosfasfaceno, polioxazolina y poli-N-acriloilmorfolino. En una forma de realización relacionada, la molécula polimérica fisiológicamente aceptable es polietilenglicol (PEG) o un derivado del mismo.

30 En un aspecto adicional se da a conocer un kit para la determinación de la cantidad de una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a una proteína, que comprende un anticuerpo según se describe en este documento.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la determinación del número de moléculas poliméricas solubles en agua unidas a una proteína o a un complejo proteico en un conjugado de polímero-proteína, que comprende las etapas de detectar la unión entre (i) un conjugado de polímero-proteína con uno o más polímeros unidos a la proteína, y (ii) un anticuerpo que se une específicamente a dicho polímero, siendo dicho anticuerpo detectable cuando está unido a dicho conjugado de polímero-proteína, en el que el número de polímeros del conjugado de polímero-proteína se correlaciona con los niveles de anticuerpo detectado unido al conjugado de polímero-proteína cuando se compara con un control conocido.

40 En una forma de realización, el anticuerpo comprende un marcador detectable. En una forma de realización relacionada, el marcador detectable se elige del grupo que consiste en una enzima, un marcador radiactivo, un fluoróforo, un reactivo denso en electrones, biotina, digoxigenina, haptenos y proteínas que se hacen detectables mediante la adición de cualquiera de estos marcadores.

45 En una forma de realización adicional, el conjugado de polímero-proteína está unido a una matriz portadora antes de su unión con el anticuerpo. En ciertas formas de realización, la matriz portadora se elige del grupo que consiste en un microportador, una partícula, una membrana, una tira, un papel, una película, una microesfera o una placa. En una forma de realización relacionada, el conjugado de polímero-proteína se aísla usando una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se transfiere a una membrana antes de la detección. En una forma de realización adicional, el peso molecular del complejo polímero-proteína se correlaciona con la subunidad de proteína que comprende la molécula polimérica.

50 En otra forma de realización, el nivel de anticuerpo detectado se mide como la absorbancia del marcador detectable. En una forma de realización relacionada, el número de polímeros en el conjugado de polímero-proteína se calcula basándose en el peso molecular del conjugado de proteína-polímero en comparación con un control conocido. Algunos procedimientos ejemplares para medir moléculas poliméricas para un control conocido incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas.

55 En una forma de realización de la invención, la proteína o el complejo de proteína es un factor de coagulación sanguíneo o un complejo con un factor de coagulación sanguíneo. En una forma de realización relacionada, el factor

de coagulación sanguíneo o el complejo del factor de coagulación sanguíneo es humano. En otra forma de realización adicional, el factor de coagulación sanguíneo se elige del grupo que consiste en Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor de von Willebrand, proteína C, antitrombina III y las formas activadas de los mismos. En otra forma de realización, el complejo con el factor de coagulación sanguíneo es Factor VIII:VWF.

En ciertas formas de realización, el polímero es escindible. En una forma de realización relacionada, el polímero es hidrolizable. En una forma de realización, la molécula soluble en agua está unida a la proteína o al complejo de proteína a través de un conector.

En una forma de realización, el polímero se elige del grupo que consiste en polialquilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol poliolefínico, polivinilpirrolidona, polihidroxialquilmetacrilamida, polihidroxialquilmetacrilato, polisacáridos, polihidroxiácidos, tales como poli- $\alpha$ -hidroxiácido y poli- $\beta$ -hidroxiácido), alcohol polivinílico, polifosfasfaceno, polioxazolina y poli-N-acriloilmorfolino.

En una forma de realización relacionada, el polímero es polietilenglicol (PEG) o un derivado del mismo. En otra forma de realización, el PEG es desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 200 kDa. En una forma de realización adicional, el PEG tiene un peso molecular en un intervalo desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 60 kDa. En otra forma de realización, el PEG tiene un peso molecular en un intervalo desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 40 kDa. En otra forma de realización más, el PEG tiene un peso molecular en un intervalo desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 15 kDa. Y aún en otra forma de realización más, el PEG tiene un peso molecular en un intervalo desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 10 kDa. Las composiciones de PEG adicionales contempladas para su uso en este documento incluyen, pero no se limitan a, PEG en el intervalo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 150 kDa, aproximadamente 5 hasta aproximadamente 120 kDa, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 kDa, desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50 kDa, y desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25 kDa, así como PEG con un peso molecular de aproximadamente 5 kDa, de aproximadamente 10 kDa, de aproximadamente 15 kDa, de aproximadamente 20 kDa, de aproximadamente 25 kDa, de aproximadamente 30 kDa, de aproximadamente 35 kDa, de aproximadamente 40 kDa, de aproximadamente 45 kDa, de aproximadamente 50 kDa, de aproximadamente 55 kDa, de aproximadamente 60 kDa, de aproximadamente 65 kDa, de aproximadamente 70 kDa, de aproximadamente 75 kDa, de aproximadamente 80 kDa, de aproximadamente 85 kDa, de aproximadamente 90 kDa, de aproximadamente 95 kDa, de aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 110 kDa, de aproximadamente 120 kDa, de aproximadamente 130 kDa, de aproximadamente 140 kDa, de aproximadamente 150 kDa, de aproximadamente 160 kDa, de aproximadamente 170 kDa, de aproximadamente 180 kDa, de aproximadamente 190 kDa o de aproximadamente 200 kDa.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la determinación del número de moléculas poliméricas solubles en agua unidas a una proteína o a un complejo proteico que comprende poner en contacto dicho polímero con un anticuerpo que se une específicamente a dicho polímero, siendo dicho anticuerpo detectable cuando está unido a dicho polímero, en el que el número de polímeros unidos al anticuerpo se correlaciona con los niveles de anticuerpo detectado unido cuando se comparan con un control conocido

En formas de realización relacionadas, el procedimiento de la invención se realiza usando una técnica de ELISA. Se contempla que los reactivos del ELISA se usen como sigue, en el que el primer anticuerpo enumerado es el anticuerpo unido al sustrato, y el segundo anticuerpo unido es el anticuerpo que es detectable. Algunos ensayos ejemplares para detectar el número de polímeros unidos a una proteína o a un complejo de proteína incluyen un procedimiento de detección anti-polímero - anti-proteína, un procedimiento de detección anti-proteína - anti-polímero o un procedimiento de detección anti-polímero - anti-polímero, en los que el anticuerpo anti-polímero es el mismo anticuerpo en cada etapa de unión, o es un anticuerpo específico del polímero diferente para cada etapa. En una forma de realización relacionada, el ensayo se realiza usando únicamente un anticuerpo específico anti-polímero o un anticuerpo específico anti-proteína.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un ensayo de inmunoadsorción (ELISA) del antígeno HSAP-2-SS (albúmina sérica humana (hSA) PEGilada). Se inocularon conejos con preparaciones del antígeno HSAP-2-h-SS con aproximadamente 380  $\mu$ g/ml de proteína y una concentración de PEG de 250  $\mu$ g/ml. Se tomaron muestras de suero de todos los animales antes del inicio y después de 3 y 4 semanas, y subsiguientemente se ensayaron para evaluar la formación de anticuerpos detectables frente al antígeno HSAP-2-h-SS. El antígeno HSAP-2-h-SS está recubierto en una superficie con carbonato 0,1 M a pH 9,6 a 1  $\mu$ g/ml. Las muestras se diluyen en tampón de PBS-gelatina y se incuban con los pocillos y subsiguientemente con anticuerpo IgG-HRP de cabra anti-conejo usando una técnica inmunitaria de incubación individual multicapa (SIMIT). Se muestra la densidad óptica (DO) (eje vertical) para el log de la dilución (eje horizontal) de las respectivas muestras.  $\Delta$  SPF (suero de conejo normal);  $\diamond$  Grupo 0 (4 animales antes);  $\square$ , Grupo 3 semanas (4 animales);  $\bullet$ , Grupo 4 semanas (4 animales).

5 La Figura 2 muestra la inhibición del ELISA directo sobre el antígeno HSAP-2-SS por parte del PEG. Los conejos se inmunizaron con el antígeno HSAP-2-SS y se prepararon muestras de suero según se describe en la Fig. 1. El antígeno HSAP-2-h-SS está recubierto en una superficie con carbonato 0,1 M a pH 9,6 a 1 µg/ml. Las muestras se diluyeron en tampón de PBS-gelatina o en tampón de PBS-gelatina-1% de PEG 5.000 (+ 1% de PEG) y se incubaron con los pocillos, y subsiguientemente con anticuerpo IgG-HRP de cabra anti-conejo (SIMIT). Se muestra la densidad óptica (DO) (eje vertical) para el log de la dilución (eje horizontal) de las respectivas muestras. □, 3 semanas + 1% de PEG; ■, 3 semanas; O, 4 semanas + 1% de PEG; ●, 4 semanas.

10 La Figura 3 muestra el ELISA directo sobre una placa modificada con PEG. Los conejos se inmunizaron con el antígeno HSAP-2-SS y las muestras de suero se prepararon según se describió en la Fig. 1. Se recubre un sustrato (NUNC Maxisorp F96) con mPEG-NPC 5000 a 1 mg/ml en HEPES 15 mM 2 horas a temperatura ambiente y después se bloquea con PBS-gelatina (5 mg/ml). Las muestras se diluyeron en tampón de PBS-gelatina y se incubaron con los pocillos, y subsiguientemente con anticuerpo IgG-HRP de cabra anti-conejo (SIMIT). Se muestra la densidad óptica (DO) (eje vertical) para la dilución log (eje horizontal) de las respectivas muestras. Se muestra la densidad óptica (DO) (eje vertical) para el log de la dilución (eje horizontal) de las respectivas muestras. ●, Grupo 3 semana; □, Grupo SPF (suero de conejo normal).

20 La Figura 4 muestra el ELISA directo sobre VWF y PEG-VWF. Los conejos se inmunizaron con el antígeno HSAP-2-SS y las muestras de suero se prepararon según se describió en la Fig. 1. Se recubre un sustrato con VWF PEGilado (PEG-VWF) en carbonato 0,1 M a pH 9,6, otros sustrato se recubre con VWF recombinante (rVWF-12) en carbonato 0,1 M a pH 9,6. Las muestras se diluyeron en tampón de PBS-gelatina y se incubaron con los pocillos, y subsiguientemente con anticuerpo IgG-HRP de cabra anti-conejo (SIMIT). Se muestra la densidad óptica (DO) (eje vertical) para el log de la dilución (eje horizontal) de las respectivas muestras. ●, Grupo 3 semana (Recubrimiento: PEG-VWF); □, Grupo 3 semana (Recubrimiento: rVWF-12).

25 La Figura 5 muestra el ELISA para la detección de la PEGilación del VWF. Se recubrió un sustrato (NUNC Maxisorp F96) con anticuerpo anti-VWF y se incubó con cantidades de crecientes de VWF PEGilado, seguido de una incubación con un conjugado de peroxidasa anti-PEG. La peroxidasa unida se detectó mediante una reacción colorimétrica con SureBlue, y la intensidad de la señal está correlacionada con la concentración de VWF PEGilado en la dilución. Se muestra la densidad óptica (DO) (eje vertical) para el log de mU de anticuerpo anti-VWF/ml de dilución (eje horizontal) de las respectivas muestras. □, wP-005-1-SS a (A); Δ, wP-005-1-SS e (E); ◇, wP-005-1-SS f (F); O, wP-005-1-SS g (G). La muestra A representa el rVWF natural antes de la modificación, mientras que las preparaciones E, F y G se prepararon usando reactivo de PEGilación PEG-SS-5K en las concentraciones molares de 1 mM, 2,5 mM y 7,5 mM.

35 La Figura 6 muestra la inhibición de la detección del rVWF-PEG cuando se añade PEG 5.000 al cultivo.

La Figura 7 muestra las curvas de dosis-respuesta de un ELISA de PEG-PEG.

40 La Figura 8 ilustra la especificidad de un ELISA de PEG-PEG.

La Figura 9 muestra la fuerte detección de la proteína PEG usando el ELISA de PEG-proteína, mostrada con un rVWF PEGilado estable.

45 La Figura 10 ilustra la fuerte detección de la proteína PEGilada usando el ELISA de PEG-proteína, mostrada con un rVWF PEGilado escindible.

La Figura 11 ilustra la especificidad del ELISA de PEG-proteína para el PEG unido a la proteína, mostrado con el rVWF PEGilado.

50 La Figura 12 muestra la especificidad del ELISA de PEG-rFVIII.

La Figura 13 es una comparación de la detección de diferentes conjugados de peroxidasa anti-FVIII en el ensayo de ELISA de PEG-FVIII.

55 La Figura 14 muestra la detección del ELISA de PEG-rFVIII en el plasma de ratones deficientes en FVIII y en plasma de rata.

60 La Figura 15 es una comparación del ensayo de ELISA en la detección de preparaciones de rFVIII PEGilado con diferentes grados de PEGilación.

La Figura 16 muestra la influencia del PEG libre sobre el ELISA de PEG-rFVIII.

65 La Figura 17 representa la capacidad del ensayo de ELISA de PEG-rFVIII para medir la liberación de PEG desde una preparación de rFVIII PEGilado escindible, y demuestra que el ELISA es capaz de diferenciar las moléculas de FVIII PEGilado con diferentes grados de PEGilación.

La Figura 18 muestra que la proteína PEGilada era detectable usando el sensible procedimiento de ECL en todas las concentraciones aplicadas.

5 La Figura 19 es una comparación de los niveles de detección de proteína PEGilada diluida en tampón (Figura 2 A) o en plasma humano (Figura 2 B).

La Figura 20 ilustra que el procedimiento detecta el cambio en el grado de PEGilación del rFVIIa PEGilado con el tiempo.

10 La Figura 21 muestra que el procedimiento es capaz de diferenciar entre grados de PEGilación (Figura 4 A, GP = 3,7, Figura 4 B, GP = 6), en el que un mayor grado de PEGilación dio como resultado una señal más fuerte.

### 15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para determinar la cantidad de una molécula polimérica soluble en agua unida a una proteína.

20 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado al entendido habitualmente por el experto habitual en la materia al que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan al experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton, y col., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2ª ed. 1994); *THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY* (Walker ed., 1988); *THE GLOSSARY OF GENETICS*, 5ª ED., R. Rieger, y col. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (1991).

Aquí debe mencionarse que, según se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un," "una" y "el/la" incluyen referencias en plural salvo que el contexto dicte claramente otra cosa.

30 Según se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a los mismos, salvo que se especifique de otro modo.

El término "muestra", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra que contiene al menos una proteína unida a al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable, tal como cualquier fluido o disolución procedente de un proceso para preparar productos farmacéuticos.

40 El término "proteína", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína, complejo de proteína o polipéptido, incluyendo proteínas recombinantes, complejos de proteínas y polipéptidos formados por residuos de aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos. Las proteínas pueden obtenerse mediante el aislamiento de una proteína *in vivo*, mediante procedimientos sintéticos u obtenerse mediante la tecnología del ADN recombinante. Los polipéptidos sintéticos se sintetizan, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automático. Una proteína recombinante usada según la presente invención puede producirse mediante cualquier procedimiento conocido en la materia según se describe en este documento, a continuación. En una forma de realización, la proteína es una proteína fisiológicamente activa, incluyendo una proteína terapéutica o un derivado biológicamente activo de la misma. El término "derivado biológicamente activo" se refiere a una modificación de una proteína que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas que la proteína original. El término "proteína" se refiere típicamente a grandes polipéptidos. El término "péptido" se refiere típicamente a polipéptidos cortos. Según se usa en el presente documento, polipéptido, proteína y péptido se usan de forma intercambiable. Un "complejo proteico" se refiere a una molécula que está formada por al menos una proteína unida a al menos otra proteína. Algunos ejemplos de complejos proteicos incluyen, pero no se limitan a, una proteína unida a un cofactor o una proteína chaperona, complejos de ligando-receptor y proteínas con varias subunidades tales como integrinas y otros receptores de la superficie celular formados por múltiples subunidades proteicas.

55 Según se usa en el presente documento, un "fragmento" de un polipéptido se refiere a cualquier porción del polipéptido menor que el polipéptido o el producto de expresión de la proteína completo. Los fragmentos son típicamente análogos por delección del polipéptido completo, en los que se han eliminado uno o más residuos de aminoácidos del amino terminal y/o el carboxi terminal del polipéptido completo. Por consiguiente, los "fragmentos" son un subconjunto de análogos por delección descritos a continuación.

60 Según se usa en el presente documento, un "análogo" o un "derivado" (que pueden usarse de forma intercambiable) se refieren a un polipéptido sustancialmente similar en su estructura y con la misma actividad biológica, aunque en algunos casos en un grado diferente, a una molécula natural. Los análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos en comparación con el polipéptido natural del que deriva el análogo, basado en una o más mutaciones que implican (i) la delección de uno o más residuos de aminoácidos en uno o más términos del polipéptido y/o una o más regiones internas de la secuencia del polipéptido natural, (ii) la inserción o la adición de uno o más aminoácidos en uno o más términos (típicamente un análogo de "adición") del polipéptido y/o de una o

más regiones internas (típicamente un análogo de "inserción") de la secuencia del polipéptido natural, o (iii) la sustitución de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos en la secuencia del polipéptido natural. Las sustituciones son conservativas o no conservativas basándose en el parentesco fisicoquímico o funcional entre el aminoácido que se está sustituyendo y el aminoácido que lo sustituye.

5 En un aspecto, un análogo muestra una similitud de secuencia de aproximadamente el 70% pero una similitud de secuencia menor del 100% con un compuesto dado, por ejemplo, un péptido. Dichos análogos o derivados están formados, en un aspecto, por residuos de aminoácidos no naturales, incluyendo a modo de ejemplo y sin limitación, homoarginina, ornitina, penicilamina y norvalina, así como residuos de aminoácidos naturales. Dichos análogos o derivados están formados, en otro aspecto, por uno o una pluralidad de residuos de D-aminoácidos, o contienen uniones no peptídicas entre dos o más residuos de aminoácidos. El término "derivado de", según se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido o a una secuencia de péptidos que es una modificación (incluyendo una sustitución o una delección de aminoácidos) de un polipéptido o de una secuencia de péptidos natural y tiene una o más sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos, de forma que la secuencia derivada comparte aproximadamente el 70% pero menos del 100% de similitud con la secuencia natural. En una forma de realización, el derivado puede ser un fragmento de un polipéptido, en el que el fragmento es sustancialmente homólogo (es decir, homólogo en al menos un 70%, en al menos un 75%, en al menos un 80%, en al menos un 85%, en al menos un 90% o en al menos un 95%) en una longitud de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 aminoácidos del polipéptido natural.

20 Para comparar la secuencia, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de la secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa diseñado.

30 Se realiza una alineación óptima de las secuencias para su comparación, en ciertas formas de realización, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 2444 (1988), mediante las implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el programa informático Wisconsin Generics, Genetics Computer Groups 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual. Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP, que usa una simplificación del procedimiento de alineación progresiva de Feng & Doolittle, J. Mol. Evo S. 35: 351 - 360 (1987) y es similar al procedimiento descrito por Higgins & Sharp, CABIOS 5: 151 - 153 (1989). Otro algoritmo útil para generar múltiples alineaciones de secuencias es Clustal W (Thompson y col., Nucleic Acids Research 22: 4673 - 4680 (1994)). Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud entre secuencias es el algoritmo BLAST (Altschul y col., J. Mot. Biol. 215: 403 - 410 (1990); Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10915 (1989); Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5873 - 5787 (1993)). El programa para realizar los análisis de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information.

45 Las sustituciones son conservativas o no conservativas basándose en el parentesco fisicoquímico o funcional entre el aminoácido que se está sustituyendo y el aminoácido que lo sustituye. Las sustituciones de este tipo son bien conocidas en la materia. Alternativamente, la invención engloba sustituciones que también son no conservativas. Algunos ejemplos de sustituciones conservativas se describen en Lehninger, [Biochemistry, 2ª Edición; Worth Publishers, Inc., Nueva York (1975), págs.71 - 77], y se establecen a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS

<b>CARACTERÍSTICAS DE LA CADENA LATERAL</b>	<b>AMINOÁCIDO</b>
No polar (hidrófoba):	
A. Alifática	A L I V P
B. Aromática	F W
C. Que contiene azufre	M
D. Límitrofe	G
Polar no cargada:	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q
C. Sulfhidrilo	C
D. Límitrofe	G
Cargada positivamente (básica)	K R H
Cargada negativamente (ácida )	D E

Alternativamente, se establecen algunas sustituciones conservativas ejemplares inmediatamente a continuación.

## SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS II

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

5 Según se usa en el presente documento, una “variante” se refiere a una proteína o a un análogo de la misma que está modificado para comprender fracciones químicas adicionales que normalmente no son parte de la molécula. Dichas fracciones mejoran, en diversos aspectos, la solubilidad, la absorción, la semivida biológica, etc., de la molécula. Las fracciones disminuyen alternativamente la toxicidad de la molécula y eliminan o atenúan cualquier efecto secundario indeseable de la molécula, etc. Las fracciones capaces de mediar en dichos efectos se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980). Los procedimientos para acoplar dichas fracciones a una molécula son bien conocidos en la materia. En ciertos aspectos, sin limitación, las variantes son polipéptidos que están modificados mediante glucosilación, PEGilación, o polisialilación.

15 Según se usa en el presente documento, “natural,” aplicado a una proteína o polipéptido, se refiere a una proteína encontrada en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o una secuencia de polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo virus) que se aísla a partir de una fuente de la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio, es natural.

20 Según se usa en el presente documento, “derivado de plasma”, aplicado a una proteína o a un polipéptido, se refiere a un polipéptido natural o a un fragmento del mismo que se encuentra en el plasma o en el suero sanguíneo de un sujeto.

25 El término “molécula polimérica fisiológicamente aceptable”, según se usa en el presente documento, se refiere a moléculas poliméricas que son sustancialmente solubles en disolución acuosa o que pueden estar presentes en forma de una suspensión, y no tienen un impacto sustancialmente negativo sobre los mamíferos tras la administración de un conjugado de polímero-proteína en una cantidad farmacéuticamente eficaz y se contemplan como biocompatibles. En una forma de realización, las moléculas fisiológicamente aceptables comprenden desde 2 hasta aproximadamente 1.000, o desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 300 unidades repetitivas. Polímeros fisiológicamente aceptables ejemplares incluyen, pero no se limitan a, polialquilenglicoles, tales como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (“PPG”), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poliol polioxietilado, alcohol poliolefínico, polivinilpirrolidona, polihidroxiálquilmetacrilamida, polihidroxiálquilmetacrilato, polisacáridos, poli- $\alpha$ -hidroxiácidos, alcohol polivinílico, polifosfafaceno, polioxazolina y poli-N-acrilóilmorfolino, polímeros de óxido de polialquileo, ácido polimaleico, poli-DL-alanina, polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa, dextrano, ácido hialurónico y quitina, polimetacrilatos y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

35 La molécula polimérica fisiológicamente aceptable no está limitada a una estructura en particular, y en ciertos aspectos, es lineal (por ejemplo, alcoxi PEG o PEG bifuncional), ramificada o con varios brazos (por ejemplo, PEG en tenedor o PEG unido a un núcleo de poliol), dendrítica o con uniones degradables. Además, las estructuras internas de la molécula polimérica están, aún en otros aspectos, organizadas con muchos patrones diferentes, y se eligen del grupo que consiste en, sin limitación, homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatorio, copolímero en bloque, tripolímero alternante, tripolímero aleatorio y tripolímero en bloque.

45 El término “conector” se refiere a un fragmento molecular que une el polímero fisiológicamente aceptable a una molécula biológicamente activa. El fragmento tiene típicamente dos grupos funcionales que pueden acoplarse o activarse para reaccionar con otro conector, o directamente con el nucleófilo biológicamente activo. Como ejemplo, habitualmente se usa un ácido  $\omega$ -aminoalcanoico tal como lisina. En la presente invención, algunos conectores

incluyen conectores estables, escindibles e hidrolizables.

La expresión "proteína unida a al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable", según se usa en este documento, incluye una proteína unida covalentemente o unida no covalentemente mediante interacciones tales como iónicas, hidrófobas, de afinidad, de bioafinidad, a una o más moléculas poliméricas. En diversas formas de realización, la molécula polimérica se acopla a la proteína mediante el uso de reactivos bifuncionales y a través de un brazo separador. Además, la molécula polimérica se acopla a la proteína mediante una interacción de afinidad. Por ejemplo, la proteína, en ciertas formas de realización, está biotinilada, y las moléculas poliméricas conjugadas con avidina o estreptavidina pueden unirse a la proteína. Además, los anticuerpos policlonales o monoclonales, así como fragmentos de los mismos, se unen a la molécula polimérica, y después este complejo puede unirse a la proteína. Las moléculas poliméricas también se unen a la proteína mediante procedimientos enzimáticos tales como, por ejemplo, la transferencia de sacáridos con poliglicosiltransferasa (documento US 6.379.933) o glucopigilación (documento US 2004 0132640). Otra metodología es la unión de las moléculas poliméricas a la proteína sobre la base de su función biológica, como por ejemplo, la unión de colágenos PEGilados o de fragmentos de colágeno a los dominios A1 y A3 de la proteína del VWF. Con este propósito se usan, en algunas formas de realización, colágenos del tipo I y III, por ejemplo, procedentes de placenta humana, que muestran una fuerte interacción con el VWF. En ciertas formas de realización, la unión de la molécula polimérica es irreversible o reversible en condiciones fisiológicas después de una aplicación *in vivo* de la proteína.

El término "PEGilado", según se usa en el presente documento, se refiere a una proteína, a un complejo proteico o a un polipéptido unido a una o más fracciones de PEG. El término "PEGilación", según se usa en el presente documento, se refiere al proceso de unión de uno o más PEGs a una proteína. En una forma de realización, el peso molecular de dicho PEG está en el intervalo de desde 3 hasta 200 kDa, desde 5 hasta 120 kDa, desde 10 hasta 100 kDa, desde 20 hasta 50 kDa, desde 5 hasta 60 kDa, desde 5 hasta 40 kDa, desde 5 hasta 25 kDa, desde 5 hasta 15 kDa o desde 5 hasta 10 kDa.

El término "se une específicamente" o es "específico para" un polímero fisiológicamente aceptable se refiere a la capacidad de un agente de unión de reconocer y unirse a un polímero fisiológicamente aceptable, pero no a otros compuestos (u otros antígenos). Por ejemplo, un anticuerpo "específico para" su antígeno cognado indica que las regiones variables de los anticuerpos reconocen y se unen al compuesto de interés con una preferencia detectable (es decir, son capaces de distinguir el compuesto de interés de otros compuestos conocidos con una estructura o composición similar, en virtud de diferencias medibles en afinidad de unión, a pesar de la posible existencia de identidades u homologías de secuencias localizadas si el anticuerpo es específico para un polipéptido, o de similitud entre compuestos). Se entenderá que los anticuerpos específicos también pueden interactuar con otras proteínas (por ejemplo, proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas de ELISA) a través de interacciones con secuencias exteriores de la región variable de los anticuerpos, y en particular, en la región constante de la molécula. Los ensayos de cribado para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo para su uso en los procedimientos de la invención son bien conocidos y practicados rutinariamente en la materia. Para un análisis comprensivo de dichos ensayos, véase Harlow y col. (Eds), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), capítulo 6. Los anticuerpos para su uso en la invención pueden producirse usando cualquier procedimiento conocido en la materia.

Un "marcador detectable" o una "fracción detectable" es una composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, algunos marcadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, marcadores radioactivos (por ejemplo, <sup>32</sup>P), fluoróforos (por ejemplo, fluoresceína), reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usa habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas que se hacen detectables, por ejemplo, mediante la incorporación de un radiomarcador en el hapteno o en el péptido, o que se usan para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el hapteno o con el péptido.

El término "sustrato" o "matriz portadora" no significa ninguna limitación específica, y se refiere, por ejemplo, a un material polimérico insoluble, que puede ser un polímero orgánico, tal como poliamida o un polímero de vinilo (por ejemplo, polimetacrilato, poliestireno y alcohol polivinílico, o derivados de los mismos), a un polímero natural tal como celulosa, dextrano, agarosa, chitina y poliaminoácidos, o a un polímero inorgánico, tal como vidrio o un hidróxido metálico. En ciertas formas de realización, el sustrato está en forma de un microportador, partículas, membranas, tiras, papel, película, perlas, microesferas o placas, tales como placas de microtitulación. En un aspecto, la proteína unida a al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable está inmovilizada sobre el sustrato directamente mediante un acoplamiento covalente o a través de un portador tal como una molécula conectora o un anticuerpo inmovilizado en el sustrato.

"Composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para su uso farmacéutico en un sujeto animal, incluyendo seres humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un conjugado polímero-polipéptido, y también comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica engloba una composición que comprende el (los) principio(s) activo(s), y el (los) ingrediente(s) inerte(s) que forman el portador, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, la complejación o la agregación de dos o más cualesquiera de

los ingredientes, o de la disociación de uno más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o de interacciones de uno o más de los ingredientes. Consecuentemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención engloban cualquier composición elaborada mezclando un compuesto o un conjugado de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

“Portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquiera de los portadores, tampones y excipientes farmacéuticos estándar, tales como una disolución salina tamponada con fosfato, una disolución acuosa de dextrosa al 5%, y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes y/o coadyuvantes. Algunos portadores y formulaciones farmacéuticas adecuadas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Los portadores farmacéuticos preferidos dependen del modo de administración pretendido del agente activo. Algunos modos de administración típicos incluyen enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal; o administración tópica, transdérmica o transmucosal). Una “sal farmacéuticamente aceptable” es una sal que se formula en un compuesto o en un conjugado para su uso farmacéutico, incluyendo, por ejemplo, sales metálicas (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o de aminas orgánicas.

“Farmacéuticamente aceptable” se refiere a una material que no es biológicamente ni de otro modo indeseable, es decir, el material puede ser administrado a un individuo sin provocar ningún efecto biológico indeseable ni interactuar de una forma perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

Un aspecto se refiere a un procedimiento para la determinación de la cantidad de una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a una proteína, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar al menos una proteína unida a al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable;

(b) proporcionar al menos un anticuerpo capaz de unirse específicamente a dicha molécula polimérica fisiológicamente aceptable;

(c) poner en contacto el anticuerpo de la etapa (b) con la proteína de la etapa (a) en unas condiciones adecuadas para la unión de dicho anticuerpo a al menos una molécula polimérica unida a dicha proteína; y

(d) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y la molécula polimérica fisiológicamente aceptable.

El complejo entre el anticuerpo y la molécula polimérica es detectado mediante procedimientos bien conocidos en la materia. Algunos ejemplos para la detección del anteriormente mencionado complejo incluyen, pero no se limitan a, el uso de un anticuerpo marcado dirigido contra el anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a la molécula polimérica fisiológicamente aceptable, o el anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a una molécula polimérica fisiológicamente aceptable está unido covalentemente a un marcador detectable que es cualquier marcador detectable adecuado conocido en la materia. El procedimiento de detección para la medición del marcador detectable se elige, por ejemplo, y sin limitación, del grupo que consiste en un ensayo enzimático, un ensayo cromogénico, un ensayo luminoso, un ensayo fluorogénico y un radioinmunoensayo. Las condiciones de reacción para realizar la detección del marcador detectable dependerán del procedimiento de detección elegido. Está en el conocimiento de la persona experta en la materia la elección de los parámetros óptimos, tales como el sistema tamponante, la temperatura y el pH, para el respectivo sistema de detección que se va a usar.

La cuantificación del marcador detectable que da como resultado la determinación de la cantidad de moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables unidas a la proteína se realiza mediante procedimientos estándar. Por ejemplo, en un aspecto, el anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a la molécula polimérica fisiológicamente aceptable está conjugado con una enzima (por ejemplo, una peroxidasa), y para su detección se lleva a cabo una reacción enzimática de sustrato. La cantidad de moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables se calcula a partir de la curva de calibración obtenida mediante una proteína de interés unida a cantidades definidas de moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables. Las cantidades de moléculas poliméricas fisiológicamente aceptables unidas a la proteína de interés pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la evaluación de los datos de una electroforesis en gel-SDS y la determinación del incremento de la masa tras la unión del polímero fisiológicamente aceptable.

En un aspecto, el anticuerpo dado a conocer en el presente documento se elige del grupo consistente en un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal derivado mediante técnicas de hibridoma convencionales, y un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo obtenido mediante técnicas recombinantes, por ejemplo, expresión en fagos o expresión en ribosomas. En una forma de realización de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

Según la presente invención, el término “proteína” no sustenta una restricción específica, y puede incluir cualquier proteína, complejo proteico o polipéptido, incluyendo proteínas recombinantes, complejos proteicos y polipéptidos obtenidos mediante la tecnología del ADN recombinante. La proteína recombinante usada en el presente documento puede producirse mediante cualquier procedimiento conocido en la materia. Esto puede incluir cualquier

procedimiento conocido en la materia para (i) la producción de ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo, mediante la transcripción inversa del ARN y/o la amplificación del ADN, (ii) la introducción del ADN recombinante en células procariotas o eucariotas mediante transfección, por ejemplo, mediante electroporación o microinyección, (iii) el cultivo de dichas células transformadas, por ejemplo, de forma continua o semicontinua, (iv) la expresión de la proteína, por ejemplo, constitutiva o tras la inducción, y (v) el aislamiento de la proteína, por ejemplo, a partir del medio de cultivo o recogiendo las células transformadas, con objeto de (vi) obtener una proteína recombinante purificada, por ejemplo, a través de una cromatografía de intercambio aniónico o una cromatografía de afinidad.

10 **Proteínas y complejos proteicos**

Las proteínas contempladas para su uso en las composiciones incluyen proteínas fisiológicamente activas útiles para su administración a un sujeto. En una forma de realización, la proteína fisiológicamente activa es una proteína terapéutica. La proteína fisiológicamente activa es, en un aspecto, una proteína o cualquier fragmento de la misma que aún conserve parte, sustancialmente toda, o toda la actividad terapéutica o biológica de la proteína. En algunas formas de realización, la proteína es aquella que, si no se expresa o no se produce, o si su expresión o su producción están sustancialmente reducidas, provocaría una enfermedad. Preferiblemente, la proteína se deriva o se obtiene a partir de un mamífero.

20 En varias formas de realización de la invención, cuando la proteína fisiológicamente activa conjugada con un polímero fisiológicamente aceptable es una proteína o un fragmento de la misma que posee una actividad biológica de la proteína, la proteína fisiológicamente activa tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de la correspondiente porción de la proteína humana o de mamífero no conjugada. En otras formas de realización, la proteína fisiológicamente activa del conjugado es una proteína natural de la especie humana o animal.  
 25 En otras formas de realización, la proteína o el fragmento de la misma, es sustancialmente homólogo (es decir, es idéntica en al menos un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98% o un 99% en su secuencia de aminoácidos en una longitud de al menos 10, 25, 50, 100, 150 ó 200 aminoácidos, o en la longitud completa del agente activo) a la secuencia natural de la correspondiente proteína humana o de mamífero.

30 Procedimientos para elaborar una proteína

Los procedimientos para elaborar proteínas recombinantes son bien conocidos en la materia. Algunos procedimientos para producir células, incluyendo células de mamífero, que expresan ADN o ARN que codifican para una proteína recombinante, se describen en las patentes de EE.UU. números 6.048.729, 5.994.129 y 6.063.630.

35 En una forma de realización, un constructo de ácido nucleico usado para expresar un polipéptido o un fragmento, o un análogo del mismo, es aquel que es expresado extracromosómicamente (episomáticamente) en la célula de mamífero transfectada, o aquel que se integra, ya sea aleatoriamente o en sitios objetivo preseleccionados, a través de una recombinación homóloga, en el genoma de la célula receptora. Un constructo que se expresa extracromosómicamente comprende, además de las secuencias que codifican para los polipéptidos, secuencias suficientes para la expresión de la proteína en las células, y opcionalmente, para la replicación del constructo. Típicamente incluye un promotor, una secuencia de ADN que codifica para el polipéptido y un sitio de poliadenilación. El ADN que codifica para la proteína está posicionado en el constructo de forma tal que su expresión está bajo el control del promotor. Opcionalmente, el constructo puede contener componentes adicionales tales como uno o más de los siguientes: un sitio de empalme, una secuencia potenciadora, un gen marcador seleccionable bajo el control de un promotor apropiado y un gen marcador amplificable bajo el control de un promotor apropiado.

40 En aquellas formas de realización en las que el constructo de ADN se integra en el genoma de la célula, incluye las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para el polipéptido. Opcionalmente, puede incluir un promotor y una secuencia potenciadora, un sitio o sitios de poliadenilación, un sitio o sitios de empalme, secuencias de ácidos nucleicos que codifican para un marcador o marcadores seleccionables, secuencias de ácidos nucleicos que codifican para un marcador amplificable y/o ADN homólogo del ADN genómico en la célula receptora para la integración en el objetivo del ADN en un sitio seleccionado del genoma (ADN de acceso o secuencias de ADN).

55 Células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir proteínas recombinantes son células bacterianas, de levadura, de insecto, de vertebrado no mamífero o de mamífero; las células de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, de mono, de chimpancé, de perro, de gato, bovinas, porcinas, de ratón, de rata, de conejo, de oveja y humanas. Las células hospedadoras incluyen células inmortalizadas (una línea celular) o células no inmortalizadas (primarias o secundarias), e incluyen cualquiera de una gran variedad de tipos celulares, tales como, pero no limitados a, fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales mamarias, células epiteliales intestinales), células ováricas (por ejemplo, células de ovario de hámster chino o CHO), células endoteliales, células gliales, células neurales, elementos formados de la sangre (por ejemplo, linfocitos, células de médula ósea), células musculares, hepatocitos y precursores de estos tipos celulares somáticos.

Las células hospedadoras usadas habitualmente incluyen células procariotas tales como bacterias gramnegativas o grampositivas, es decir, cualquier cepa de *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Salmonella*, y similares; células eucariotas tales como células CHO (de ovario de hámster chino); células de riñón de hámster joven (BHK); células de riñón humano 293; células COS-7; células de insecto tales como D. Mel-2, Sf4, Sf5, Sf9, y Sf21 y High 5; células vegetales y diversas células de levadura tales como *Saccharomyces* y *Pichia*.

Las células hospedadoras que contienen el ADN o el ARN que codifica para el polipéptido se cultivan en unas condiciones apropiadas para el crecimiento de las células y la expresión del ADN o del ARN. Se identifican aquellas células que expresan el polipéptido, usando procedimientos conocidos, y la proteína recombinante se aísla y se purifica, usando procedimientos conocidos; con o sin la amplificación de la producción de polipéptido. Se lleva a cabo la identificación, por ejemplo y sin limitación, mediante el cribado de células de mamífero modificadas genéticamente que muestran un fenotipo indicativo de la presencia del ADN o del ARN que codifica para la proteína, tal como un cribado mediante PCR, un cribado mediante un análisis por inmunotransferencia Southern o un cribado buscando la expresión de la proteína. La selección de las células que han incorporado el ADN que codifica para la proteína puede realizarse incluyendo un marcador seleccionable en el constructo de ADN y cultivando las células transfectadas o infectadas que contienen un gen marcador seleccionable en unas condiciones apropiadas para la supervivencia únicamente de aquellas células que expresan el gen marcador seleccionable. Se efectúa la amplificación adicional del constructo de ADN introducido, en ciertos aspectos, cultivando las células modificadas genéticamente en unas condiciones apropiadas para la amplificación (por ejemplo, cultivando las células modificadas genéticamente que contienen un gen marcador amplificable en presencia de una concentración de un fármaco a la que únicamente pueden sobrevivir las células que contienen múltiples copias del gen marcador amplificable).

En un ejemplo de la presente invención, la proteína es una proteína fisiológicamente activa, un complejo proteico o un polipéptido, particularmente una proteína terapéutica o un derivado biológicamente activo de la misma. Según se usa en este documento, el término "derivado biológicamente activo" incluye cualquier derivado de una proteína, de un complejo proteico o de un polipéptido que tenga sustancialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas que dicha proteína, complejo proteico o polipéptido, tal como propiedades de unión, y o la misma base estructural, tal como un esqueleto peptídico o una unidad polimérica básica.

Las proteínas recombinantes que son proteínas fisiológicamente activas o proteínas terapéuticas incluyen, pero no se limitan a, citocinas, factores de crecimiento, proteínas de coagulación terapéuticas o factores de coagulación sanguíneos, enzimas, quimiocinas, receptores solubles de la superficie celular, moléculas de adhesión celular, anticuerpos, hormonas, proteínas del citoesqueleto, proteínas de la matriz, proteínas chaperonas, proteínas estructurales, proteínas metabólicas y otras proteínas terapéuticas conocidas por los expertos en la materia. Algunos ejemplos de proteínas recombinantes que se usan como terapéuticas incluyen, pero no se limitan a, Factor VIII, Factor VIII:C, Factor antihemofílico, Factor VII, Factor IX y factor de von Willebrand, eritropoyetina, interferones, insulina, CTLA4-Ig, alfa-glucocerebrosidasa, alfa-glucosidasa, hormona foliculoestimulante, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD52, receptor del TNF y otras conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Physicians Desk Reference, 62ª Edición, 2008, Thomson Healthcare, Montvale, NJ.

En una forma de realización, la proteína es un factor de coagulación terapéutico o un factor sanguíneo (coagulación), incluyendo, pero no limitándose a, Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor de von Willebrand, proteína C, antitrombina III y formas activadas de una cualquiera de estas proteínas. En una forma de realización relacionada, el complejo proteico comprende uno o más factores sanguíneos. Algunos ejemplos de complejos proteicos de factores sanguíneos incluyen un complejo entre el FVIII y el VWF.

#### Factores sanguíneos

En un ejemplo específico de la presente invención, la proteína es derivada de plasma (plasmática) y/o del factor de von Willebrand recombinante (VWF) o un derivado biológicamente activo de la misma. El término "VWF derivado de plasma (pVWF)" incluye el VWF maduro obtenido partir de un mamífero. Un derivado biológicamente activo de dicho pVWF es el pro-VWF, que contiene el propéptido. En un ejemplo de la presente invención, la proteína se elige del grupo que consiste en VWF inmaduro, incluyendo la molécula precursora del VWF (pre-pro-VWF) sintetizada por las células endoteliales y los megacariocitos, el propéptido VWF (pro-VWF) y el VWF maduro derivado de plasma obtenido tras la escisión del péptido de señalización y del propéptido, respectivamente, de la molécula precursora. Algunos ejemplos adicionales de derivados biológicamente activos del VWF plasmático incluyen profármacos que son procesados o convertidos en la forma biológicamente activa, o son biológicamente activos, tales como formas truncadas, formas con deleciones, formas con sustituciones, formas con adiciones distintas a las proformas, fragmentos de la forma madura, formas quiméricas y formas con modificaciones postraduccionales en comparación con la forma natural. El término "VWF recombinante (rVWF)" incluye el VWF obtenido mediante la tecnología del ADN recombinante que tiene opcionalmente un patrón de glucosilación que es farmacológicamente aceptable. Algunos ejemplos específicos del mismo incluyen VWF sin el dominio A2, resistente por tanto a la proteólisis (Lankhof y col., Thromb Haemost., 77: 1008 - 1013, 1997) y el fragmento del VWF desde la Val 449 hasta la Asn 730 incluyendo el dominio de unión a la glucoproteína Ib y los sitios de unión para el colágeno y la heparina (Pietu y col.,

Biochem Biophys Res Commun.; 164: 1339 - 1347, 1989).

El Factor de von Willebrand existe en el plasma en una serie de formas multímeras con un peso molecular de desde  $1 \times 10^6$  hasta  $20 \times 10^6$  Dalton. El VWF (número de acceso del Genbank NP\_000543) es una glucoproteína formada principalmente en las células endoteliales de mamíferos y secretada subsiguientemente a la circulación. A este respecto, partiendo de una cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 220 kD, se produce en las células un dímero de VWF con un peso molecular de 550 kD mediante la formación de varios puentes de azufre. Se forman polímeros adicionales del VWF con pesos moleculares crecientes, de hasta 20 millones de Dalton, mediante la unión de los dímeros de VWF. Se cree que particularmente los multímeros de VWF de alto peso molecular tienen una importancia esencial en la coagulación sanguínea.

El síndrome del VWF se manifiesta clínicamente cuando hay una subproducción o una superproducción del VWF. La superproducción del VWF provoca un aumento en la trombosis (formación de un coágulo o un trombo dentro de un vaso sanguíneo, obstruyendo el flujo de sangre), mientras que unos niveles reducidos, o la ausencia de, formas moleculares superiores del VWF, provoca un aumento en las hemorragias y un aumento en el tiempo de sangrado debido a la inhibición de la agregación plaquetar y del cierre de heridas.

Una deficiencia en el VWF también puede causar una hemofilia fenotípica A, dado que el VWF es un componente esencial del Factor VIII funcional. En estos casos, la semivida del Factor VIII se reduce hasta tal punto que su función en la cascada de coagulación sanguínea se deteriora. Los pacientes que padecen la enfermedad de von Willebrand (VWD) o el síndrome del VWF muestran frecuentemente una deficiencia en el Factor VIII. En estos pacientes, la reducida actividad del Factor VIII no es consecuencia de un defecto en el gen del cromosoma X, sino una consecuencia indirecta del cambio cuantitativo y cualitativo del VWF en el plasma. La diferenciación entre la hemofilia A y la vWD puede efectuarse normalmente midiendo el antígeno de VWF o mediante la determinación de la actividad del cofactor de la ristocetina. Tanto el contenido en antígeno de VWF como la actividad del cofactor de la ristocetina están disminuidos en la mayoría de los pacientes con vWD, mientras que son normales en los pacientes con hemofilia A. Los productos de VWF para el tratamiento del síndrome de VWF incluyen, pero no se limitan a: HUMATE-P; y, IMMUNATE®, INNOBRAND® y 8Y®, terapias que comprenden un concentrado de FVIII/VWF procedente de plasma.

En una forma de realización relacionada, la proteína es el Factor VIII. El Factor VIII (FVHI) es una glucoproteína del plasma sanguíneo de aproximadamente 260 kDa de masa molecular producida en el hígado de los mamíferos (número de acceso del Genbank NP\_000123). Es un componente crítico de la cascada de reacciones de coagulación que conducen a la coagulación sanguínea. Dentro de la cascada, es una etapa en la que el Factor IXa, junto con el FVIII, convierte el Factor X (número de acceso del Genbank NP\_000495) en una forma activada, el Factor Xa. El FVIII actúa como un cofactor en esta etapa, siendo requerido con iones calcio y fosfolípidos para la actividad del Factor IXa. Las dos alteraciones hemofílicas más comunes están provocadas por una deficiencia en el FVIII funcional (Hemofilia A, aproximadamente el 80% de todos los casos) o en el Factor IXa funcional (Hemofilia B o enfermedad del Factor de Christmas). El FVIII circula, en el plasma, a una concentración muy baja, y está unido no covalentemente al Factor de von Willebrand (VWF). Durante la hemostasia, el FVIII se separa del VWF y actúa como un cofactor para la activación del Factor X (FX) mediada por el Factor IX activado (FIXa) mediante el aumento de la tasa de activación en presencia de calcio y de fosfolípidos o de membranas celulares.

El FVIII es sintetizado como un precursor de cadena única de aproximadamente 270 - 330 kD con la estructura de dominio A1-A2-B-A3-C1-C2. Cuando se purifica a partir de plasma, el FVIII está formado por una cadena pesada (A1-A2-B) y una cadena ligera (A3-C1-C2). La masa molecular de la cadena ligera es de 80 kD, mientras que, debido a la proteólisis dentro del dominio B, la cadena pesada está en el intervalo de 90 - 220 kD.

El FVIII también se sintetiza como una proteína recombinante para uso terapéutico en alteraciones hemorrágicas. Se han diseñado varios ensayos *in vitro* para determinar la potencial eficacia del FVIII recombinante (rFVIII) como medicina terapéutica. Estos ensayos simulan los efectos *in vivo* del FVIII endógeno. El tratamiento *in vitro* con trombina del FVIII da como resultado un rápido aumento y la subsiguiente disminución de su actividad procoagulante, según se mide mediante el ensayo *in vitro*. Esta activación e inactivación coincide con una proteólisis limitada específica tanto en la cadena pesada como en la ligera, que altera la disponibilidad de los diferentes epítomos de unión del FVIII, por ejemplo, permitiendo que el FVIII se disocie del VWF y se una a la superficie de un fosfolípido, o alterando la capacidad de unión a ciertos anticuerpos monoclonales.

Hasta hace poco, el tratamiento estándar de la Hemofilia A implicaba la infusión frecuente de preparaciones de concentrados de FVIII derivados de plasma de donantes humanos. Aunque esta terapia de sustitución es generalmente eficaz, dichos tratamientos ponen en riesgo a los pacientes frente a enfermedades transmisibles por virus tales como la hepatitis y el SIDA. Aunque el riesgo se ha reducido mediante una purificación adicional del FVIII procedente de plasma mediante inmunopurificación usando anticuerpos monoclonales, y mediante la inactivación de los virus mediante un tratamiento con un disolvente orgánico o con calor, dichas preparaciones han incrementado en gran medida el coste del tratamiento y no están exentas de riesgo. Por estas razones, los pacientes se han tratado episódicamente en lugar de profilácticamente. Una complicación adicional es que aproximadamente el 15% de los pacientes desarrollan anticuerpos inhibidores frente al FVIII derivado del plasma. Los pacientes con una Hemofilia A

grave, con unos niveles de FVIII por debajo del 1%, están generalmente bajo una terapia profiláctica que aspira a mantener el FVIII por encima del 1% entre las dosis. Teniendo en cuenta las semividas medias de los diversos productos del FVIII en la circulación, esto puede conseguirse habitualmente proporcionando FVIII entre dos y tres veces por semana.

5 Un importante avance en el tratamiento de la Hemofilia A fue el aislamiento de clones de ADNc que codifican para la secuencia completa de 2.351 aminoácidos del FVIII humano (véase, Wood y col., Nature, 312: 330 (1984) y la patente de EE.UU. N° 4.757.006), y la provisión de la secuencia de ADN del gen del FVIII humano y procedimientos recombinantes para su producción. Los productos del FVIII para el tratamiento de la hemofilia incluyen, pero no se limitan a: ADVATE® (Factor Antihemofílico (Recombinante), método del Plasma/Albúmina libre, rAHF-PFM), Factor Antihemofílico recombinante (BIOCLATE™, GENARC®, HELIXATE FS®, KOATE®, KOGENATE FS®, RECOMBIMATE®); MONOCLATE-P®, preparación purificada de Factor VIII:C, complejo de Factor Antihemofílico/Factor de von Willebrand (Humano) HUMATE-P® y ALPHANATE®, complejo de Factor Antihemofílico/Factor de von Willebrand (Humano); e HYATE C®, Factor VIII porcino purificado. ADVATE®, es producida en células CHO y elaborado por Baxter Healthcare Corporation. No se añaden proteínas plasmáticas ni albúmina humana o animal en el proceso de cultivo celular, la purificación o la formulación final de ADVATE®.

20 El Factor VII (proconvertina), una enzima proteasa de serina, es una de las proteínas centrales en la cascada de coagulación sanguínea (número de acceso del Genbank NP\_000122). El papel principal del Factor VII (FVII) es iniciar el proceso de coagulación junto con el factor tisular (TF). Tras una lesión en un vaso, se expone el TF a la sangre y al Factor VII circulante. Una vez unido al TF, el FVII es activado a FVIIa mediante diferentes proteasas, entre las que están la trombina (Factor IIa), el Factor X activado y el propio complejo de FVIIa-TF. Se ha introducido el Factor VIIa recombinante humano (NOVOSEVEN®) para su uso en hemorragias incontrolables en pacientes hemofílicos que han desarrollado inhibidores frente al factor de coagulación de sustitución.

25 El Factor IX (FIX, Factor de Christmas) (número de acceso del Genbank NP\_000124) es una proteasa de serina que es inactiva, salvo que sea activada por el Factor XIa o el Factor VIIa (de la vía del factor tisular). Cuando se activa en el Factor IXa, actúa hidrolizado un conector de arginina-isoleucina en el Factor X para formar el Factor Xa. El Factor VIII es un cofactor requerido para la actividad de proteasa del FIX (Lowe GD, Br. j. Haematol. 115: 507 - 13, 2002).  
30 Una deficiencia en el Factor IX provoca la hemofilia B o enfermedad de Christmas.

Algunos factores sanguíneos adicionales incluyen el Factor II (trombina) (número de acceso del Genbank NP\_000497), cuyas deficiencias provocan trombosis y disprotrombinemia; el Factor V, (número de acceso del Genbank NPJ300121), cuyas deficiencias provocan diátesis hemorrágica o una forma de trombofilia, que se conoce como una resistencia a la proteína C activada, el Factor XI (número de acceso del Genbank NP\_000119), cuyas deficiencias provocan el síndrome de Rosenthal (hemofilia C), y la subunidad A del Factor XIII (número de acceso del Genbank NP\_000120) y la subunidad B (número de acceso del Genbank NP\_001985), cuyas deficiencias se caracterizan como una deficiencia de tipo I (deficiencia en ambas subunidades A y B) y deficiencia de tipo II (deficiencia sólo en la subunidad A), cualquiera de las dos pueden dar como resultado una tendencia hemorrágica para toda la vida, una curación defectuosa de las heridas y abortos habituales; el Factor XII (número de acceso del Genbank NPJ30Q496); la proteína C (número de acceso del Genbank NP\_000303); la antitrombina III (número de acceso del Genbank NP\_000479), y formas activadas de las mismas.

#### 45 Variantes polipeptídicas y análogos

Los procedimientos de la invención son útiles para detectar rápidamente proteínas recombinantes en una muestra, así como fragmentos, análogos o variantes de la proteína recombinante, y además pueden ser útiles para detectar proteínas naturales que puedan existir como fragmentos o variantes alélicas *in vivo* en las que se detectan diferencias en la glucosilación.

50 Los procedimientos para preparar fragmentos, análogos o variantes de polipéptidos son bien conocidos en la materia. Los fragmentos de un polipéptido se preparan usando procedimientos bien conocidos en la materia, incluyendo la escisión enzimática (por ejemplo, tripsina, quimotripsina) y también usando un medio recombinante para generar un fragmento polipeptídico con una secuencia de aminoácidos específica. Los fragmentos pueden generarse para que comprendan un dominio de unión a ligando, un dominio de unión a receptor, un dominio de dimerización o de multimerización, o cualquier otro dominio identificable conocido en la materia.

60 Los procedimientos para elaborar análogos de polipéptidos también son bien conocidos. En algunos aspectos, los análogos son sustancialmente homólogos o sustancialmente idénticos al polipéptido natural del que deriva el análogo, y los análogos contemplados por la invención son aquellos que conservan al menos alguna actividad biológica del polipéptido natural.

65 Los análogos de sustitución intercambian típicamente un aminoácido natural por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y en ciertos aspectos están diseñados para modular una o más propiedades del polipéptido, tales como la estabilidad frente a la escisión proteolítica, sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones de este tipo son generalmente conservativas. Por "sustitución conservativa de aminoácidos" se entiende una sustitución

de un aminoácido por un aminoácido con una cadena lateral con un carácter químico similar. Los aminoácidos similares para realizar sustituciones conservativas incluyen aquellos con una cadena lateral ácida (ácido glutámico, ácido aspártico); una cadena lateral básica (arginina, lisina, histidina); una cadena lateral amida polar (glutamina, asparragina); una cadena lateral hidrófoba alifática (leucina, isoleucina, valina, alanina, glicina); una cadena lateral aromática (fenilalanina, triptófano, tirosina); una cadena lateral pequeña (glicina, alanina, serina, treonina, metionina); o una cadena lateral alifática con hidroxilo (serina, treonina).

Los análogos y los fragmentos de polinucleótidos pueden ser generados fácilmente por un trabajador experto para que codifiquen fragmentos, variantes o mutantes biológicamente activas de la molécula natural que posean la misma actividad biológica, o similar, a la de la molécula natural. Algunos procedimientos realizados rutinariamente incluyen técnicas de PCR, digestión enzimática del ADN que codifica para la molécula proteica y la ligación de secuencias polinucleotídicas heterólogas, y similares. Por ejemplo, puede emplearse mutagénesis puntual, usando PCR y otras técnicas bien conocidas en la materia, para identificar particularmente qué residuos de aminoácidos son importantes en actividades en particular asociadas con la actividad de la proteína. Por lo tanto, el experto en la materia será capaz de generar cambios de bases individuales en la hebra de ADN que darán como resultado un codón alterado y una mutación de aminoácido.

Adicionalmente se contempla que la proteína o el polipéptido sea modificado para elaborar un análogo que sea una proteína de fusión que comprenda un segundo agente, que es un polipéptido. En una forma de realización, el segundo agente, que es un polipéptido, es una enzima, un factor de crecimiento, una citocina, una quimiocina, un receptor de superficie celular, el dominio extracelular de un receptor de superficie celular, una molécula de adhesión celular o un fragmento o dominio activo de una proteína descrita anteriormente o de cualquier otro tipo de proteína conocida en la materia. En una forma de realización relacionada, el segundo agente es un factor de coagulación sanguíneo tal como Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor de von Willebrand, proteína C, antitrombina III, y formas activadas de los mismos. La proteína de fusión contemplada se crea mediante técnicas químicas o recombinantes bien conocidas en la materia.

Las variantes de proteínas contempladas incluyen polipéptidos modificados químicamente mediante técnicas tales como ubiquitinación, glucosilación, conjugación con agentes terapéuticos o diagnósticos, marcaje (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), unión covalente a polímeros tal como PEGilación (derivatización con polietilenglicol), introducción de enlaces no hidrolizables de inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que normalmente no aparecen en las proteínas humanas. Las variantes conservan las propiedades de unión de las moléculas no modificadas.

Algunas variantes polipeptídicas adicionales útiles en los procedimientos de la presente invención incluyen polipéptidos que comprenden fracciones de polisialilato (PSA). Algunos procedimientos para preparar polipéptidos polisialilados se describen en la publicación de patente de EE.UU. 20060160948 y en Saenko y col., Haemophilia 12: 42 - 51, 2006.

#### Polímeros fisiológicamente aceptables

Se dan a conocer proteínas o polipéptidos modificados químicamente, que se han unido a una fracción química que proporciona efectos ventajosos para la producción, la viabilidad de la proteína o del polipéptido. Por ejemplo, en la materia se conoce la conjugación no específica, o específica de sitio, de polímeros fisiológicamente aceptables con polipéptidos, para mejorar la semivida mediante la potencial reducción de la inmunogenicidad, del aclaramiento renal y/o la mejora de la resistencia a proteasa.

Una molécula polimérica fisiológicamente aceptable incluye moléculas poliméricas que, por ejemplo, son sustancialmente solubles en una disolución acuosa o pueden estar presentes en forma de una suspensión, y no tienen sustancialmente un impacto negativo, tal como efectos secundarios, en los mamíferos tras la administración de un conjugado de molécula polimérica-proteína en una cantidad farmacéuticamente eficaz, y se contemplan como biocompatibles. No hay ninguna limitación particular en la molécula polimérica fisiológicamente aceptable usada.

Las moléculas de polímero se caracterizan típicamente por tener, por ejemplo, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 1.000, o desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 300 unidades repetitivas. Algunos ejemplos de tales moléculas poliméricas incluyen, pero no se limitan a, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poliol polioxietilado, alcohol poliolefinico, polivinilpirrolidona, polihidroxiacrilmetacrilamida, polihidroxiacrilmetacrilato, polisacáridos, poli- $\alpha$ -hidroxiácido, alcohol polivinílico, polifosfaceno, polioxazolina, poli-N-acrililmorfolino, polímeros de óxido de polialquilenos, ácido polimaleico, poli-DL-alanina, polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa, dextrano, ácido hialurónico y quitina, poli(met)acrilatos, y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

Por ejemplo, los polímeros solubles en agua, incluyendo, pero no limitándose a, polietilenglicol (PEG), óxido de polietileno (PEO), polioxietileno (POE), alcoholes polivinílicos, hidroxietil celulosas o dextranos, se conjugan habitualmente con proteínas o péptidos para aumentar la estabilidad o el tamaño, etc., de una proteína o de un péptido.

PEG, PEO o POE se refiere a un oligómero o un polímero de óxido de etileno. Los PEGs y los PEOs incluyen moléculas con una distribución de pesos moleculares, es decir, polidispersas. La distribución de tamaños se caracteriza estadísticamente por su peso molecular promedio en peso (Mw) y su peso molecular medio en número (Mn), cuya proporción se denomina índice de polidispersidad (Mw/Mn). Mw y Mn se miden, en ciertos aspectos, mediante espectroscopía de masas. La mayoría de los conjugados de PEG-proteína, particularmente aquellos conjugados con un PEG mayor de 1 kD, muestran un intervalo de pesos moleculares debido a la naturaleza polidispersa de la molécula de PEG original. Por ejemplo, en el caso de mPEG2K (Sunbright ME-020HS, NOF), las masas moleculares reales se distribuyen en un intervalo de 1,5 ~ 3,0 kD con un índice de polidispersidad de 1,036. Las excepciones son los reactivos basados en proteínas conjugadas con MS(PEG)<sub>n</sub> (N = 4, 8, 12 ó 24, por ejemplo, PEO4, PEO12) (Pierce), que se preparan especialmente como mezclas monodispersas con cadenas de longitudes cortas y un peso molecular definido.

La molécula polimérica fisiológicamente aceptable no está limitada a una estructura en particular, y es en varios aspectos lineal (por ejemplo, alcoxi PEG o PEG bifuncional), ramificada o con varios brazos (por ejemplo, PEG en tenedor o PEG unido a un núcleo de poliol), dendrítica o con uniones degradables. Además, la estructura interna de la molécula polimérica está organizada en cualquier número de patrones diferentes, y se elige del grupo que consiste en homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatorio, copolímero en bloque, tripolímero alternante, tripolímero aleatorio y tripolímero en bloque.

En un ejemplo específico, la molécula polimérica fisiológicamente aceptable es PEG y derivados del mismo. No hay una limitación específica para el PEG usado. Por ejemplo, algunos conjugados de PEG-proteína incluyen, pero no se limitan a, conjugados lineales o ramificados, conjugados de polímero:proteínas mediante una química basada en NHS (N-hidroxisuccinimida) o en aldehído, variantes con un enlace químico diferente entre la cadena de PEG y el sitio de conjugación, y variantes de diferentes longitudes. El peso molecular medio del PEG variará desde aproximadamente 3 kiloDalton ("kDa") hasta aproximadamente 200 kDa, desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 120 kDa, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 kDa, desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50 kDa, desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 60 kDa, desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 40 kDa, desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 30 kDa, desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 25 kDa, desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 15 kDa, o desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 10 kDa. En ciertas formas de realización, el PEG es de aproximadamente 5 kDa, de aproximadamente 10 kDa, de aproximadamente 15 kDa, de aproximadamente 20 kDa, de aproximadamente 25 kDa, es de aproximadamente 30 kDa, de aproximadamente 35 kDa, de aproximadamente 40 kDa, de aproximadamente 45 kDa, de aproximadamente 50 kDa, de aproximadamente 55 kDa, de aproximadamente 60 kDa, de aproximadamente 65 kDa, de aproximadamente 70 kDa, de aproximadamente 75 kDa, de aproximadamente 80 kDa, de aproximadamente 85 kDa, de aproximadamente 90 kDa, de aproximadamente 95 kDa, de aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 110 kDa, de aproximadamente 120 kDa, de aproximadamente 130 kDa, de aproximadamente 140 kDa, de aproximadamente 150 kDa, de aproximadamente 160 kDa, de aproximadamente 170 kDa, de aproximadamente 180 kDa, de aproximadamente 190 kDa o de aproximadamente 200 kDa.

La invención contempla conjugados de PEG-proteína elegidos del grupo que consiste en conjugados lineales de PEG-proteína que están conjugados con NHS y cuya longitud varía desde -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-, en la que n = desde 1 hasta 2.000, conjugados lineales de PEG-proteína que están conjugados con aldehído y cuya longitud varía desde -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-, en la que n = desde 1 hasta 2.000, conjugados ramificados en dos brazos de PEG-proteína que están conjugados con NHS y cuya longitud varía desde 3 hasta 100 kDa en masa, y conjugados ramificados en tres brazos de PEG-proteína que están conjugados con NHS. La invención también contempla conjugados de PEG-proteína que contienen diferentes conectores químicos (-CO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- y -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- en las que n = desde 1 hasta 5) entre su sitio de conjugación y la cadena de PEG. La invención contempla adicionalmente conjugados de PEG-proteína aniónicos cargados para reducir el aclaramiento renal, que incluyen, pero no se limitan a, compuestos carboxilados, sulfatados y fosforilados (aniónicos) (Caliceti & Veronese, Adv Drug Deliv Rev 2003, 55 (10): 1261 - 77; Perlman y col., J Clin Endo Metab 2003, 88 (7): 3227 - 35; Pitkin y col., Antimicrob Agents Chemother 1986, 29 (3): 440 - 44; Vehaskari y col., Kidney Intl 1982, 22, 127 - 135). En una forma de realización adicional, el péptido está opcionalmente conjugado con una fracción que incluye un bisfosfonato, un polímero soluble en agua tal como PEG o PEO, carbohidratos, ácidos grasos o aminoácidos adicionales.

La modificación química de las macromoléculas se realiza, en un aspecto, de una forma no específica (dando lugar a mezclas de especies modificadas) o de una forma específica de sitio (basado en una modificación dirigida a la reactividad de la macromoléculas natural y/o una modificación selectiva de sitio usando una combinación de mutagénesis dirigida y modificación química) o, alternativamente, usando procedimientos de ligación de proteínas expresadas (Curr Opin Biotechnol. 13 (4): 297 - 303 (2002)).

Para descubrir si la semivida terapéutica *in vivo* de un péptido se beneficiaría de una PEGilación, se sintetizan varios conjugados de PEG-5 proteína diferentes, se caracteriza su farmacocinética *in vitro* e *in vivo*. Con objeto de optimizar los efectos potenciales de una PEGilación, se emplea una estrategia diseñada en la que se varía la longitud, la conformación y la carga del polímero de PEG.

Los procedimientos para preparar la proteína PEGilada comprenden generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar la proteína de interés con polietilenglicol en unas condiciones en las que el PEG quede unido al N-terminal/C-terminal de la proteína, y (b) obtener el (los) producto(s) de la reacción. Debido a que la PEGilación de una proteína podría alterar significativamente la actividad intrínseca de la proteína, se exploran diferentes tipos de PEG. La química usada para la PEGilación de la proteína incluye, pero no se limita a, 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 un enlace amida que elimina la carga de la amina primaria original (también, Boc-PEG para el C-terminal). Al contrario que la síntesis ribosómica de proteínas, la síntesis sintética de péptidos se produce desde el C-terminal hacia el N-terminal. Por lo tanto, el Boc-PEG es un procedimiento (es decir, usando la síntesis del terc-(B)util (o)xi (c)arbonil (Boc, t-Boc)) para unir el PEG al C-terminal del péptido (R. B. Merrifield (1963). "Solid Phase Peptide Synthesis, I. The Synthesis of a Tetrapeptide". J. Am. Chem. Soc. 85 (14): 2149 - 2154). La química del (F)luorenil-(m)et(o)xi-(c)arbonil (FMOC) (Atherton, E.; Sheppard, R. C. (1989), *Solid Phase peptide synthesis: a practical approach*. Oxford, Inglaterra: IRL Press.) está favorecida porque no requiere el peligroso uso de ácido fluorhídrico para eliminar los grupos protectores de la cadena lateral. Los presentes procedimientos proporcionan una mezcla sustancialmente homogénea de conjugado de polímero:proteína. "Sustancialmente homogénea", según se usa en este documento, significa que sólo se observan moléculas de conjugado de polímero:proteína. El conjugado de polímero:proteína tiene actividad biológica, y las presentes preparaciones de proteína PEGilada "sustancialmente homogéneas" son aquellas que son lo suficientemente homogéneas como para mostrar las ventajas de una preparación homogénea, por ejemplo, facilidad en su aplicación clínica para predecir la farmacocinética interlote.

Algunos conectores estables ejemplares que pueden facilitar la conjugación del polímero fisiológicamente aceptable al polipéptido de interés incluyen, pero no se limitan a, conectores de amida, amina, éter, carbamato, tiourea, urea, tiocarbamato, tiocarbonato, tioéter, tioéster y ditiocarbamato, tales como  $\omega,\omega$ -aminoalcano, N-carboxialquilmaleimida, o ácidos aminoalcanoicos, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida, glutaraldehído o anhídrido succínico, N,N'-disuccinimidiloxalato de N-carboximetilmaleimida y oxalato de 1,1'-bis[6-(trifluorometil)benzo-triazolilo].

En otras formas de realización, el polímero fisiológicamente aceptable se conjuga con el polipéptido usando un conector escindible. En una forma de realización, el conector escindible es un conector hidrolizable. Un enlace hidrolizable o degradable 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 general de conector entre dos átomos centrales, sino también de los sustituyentes unidos a esos átomos centrales. Los procedimientos para elaborar conjugados que comprenden polímeros solubles en agua con conectores hidrolizables se describen en la patente de EE.UU. 7.259.224 (Nektar Therapeutics) y en la patente de EE.UU. 7.267.941 (Nektar Therapeutics y National Institutes of Health). Por ejemplo, puede prepararse un PEG con uniones éster en el esqueleto del polímero que se somete a hidrólisis. Esta hidrólisis da como resultado la escisión del polímero en fragmentos de menor peso molecular. Algunas uniones hidrolíticamente inestables o débiles apropiadas incluyen, pero no se limitan a, éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídridos, acetales, cetales, aciloxialquil éter, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos, tioésteres, tiolésteres y carbonatos. Las uniones degradables hidrolíticamente que pueden estar contenidas en el esqueleto del polímero incluyen carbamato, carbonato, sulfato y uniones aciloxialquil éter; uniones imina, resultantes, por ejemplo, de la reacción entre una amina y un aldehído (véase, por ejemplo, Ouchi y col., *Polymer Preprints*, 38 (1): 582 - 3 (1997)); uniones carbamato, éster de fosfato, hidrazona, acetal, cetal u ortoéster, incluyendo conectores de acetona-bis-(N-maleimidoetil) cetal (MK).

En una forma de realización adicional, las moléculas poliméricas contempladas para su uso en las metodologías de PEGilación descritas en este documento se eligen de entre polímeros solubles en agua o una mezcla de los mismos. El polímero puede tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación o un aldehído para alquilación, de forma que pueda controlarse el grado de polimerización. El polímero soluble en agua, o la mezcla del mismo si se desea, puede elegirse del grupo que consiste en, por ejemplo, PEG, monometoxi-PEG, PEO, dextrano, poli-(N-vinilpirrolidona), homopolímeros de propilenglicol, ácidos grasos, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), HPMA, FLEXIMAR™, y alcohol polivinílico, mono-(C1-C10)alcoxi-PEG, ariloxi-PEG, tresil monometoxi PEG, PEG propionaldehído, bis-succinimidilcarbonato de PEG, celulosa, otros polímeros basados en carbohidrato o mezclas de los mismos. En algunos ejemplos, el polímero elegido es soluble en agua de forma que la proteína a la cual está unido no precipite en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. El polímero está, en varios aspectos, ramificado o no ramificado. En una forma de realización, para el uso terapéutico de la preparación final del producto, el polímero es farmacéuticamente aceptable. Algunos procedimientos para generar péptidos que comprenden una fracción de PEG son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.824.784.

En una forma de realización, el aldehído reactivo es PEG-propionaldehído, que es estable en agua, o derivados mono-C1-C10 alcoxi o ariloxi del mismo (véase la patente de EE.UU. N° 5.252.714). Según se usa en el presente documento, se entiende que PEG engloba cualquiera de las formas del PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono-(C1-C10) alcoxi o ariloxi polietilenglicol. En algunas formas de realización, el polímero está ramificado o no ramificado. En una forma de realización, para el uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero es farmacéuticamente aceptable.

Una proteína unida a al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable incluye una proteína unida covalentemente o unida no covalentemente mediante interacciones tales como interacciones iónicas, hidrófobas, de afinidad, de bioafinidad, a una o más moléculas poliméricas. En una forma de realización, la molécula polimérica se acopla a la proteína mediante el uso de reactivos bifuncionales y a través de un brazo separador. En una forma de realización relacionada, la molécula polimérica se acopla a la proteína mediante una interacción de afinidad. Por ejemplo, la proteína está biotinilada y se unen a la proteína moléculas poliméricas conjugadas con avidina o estreptavidina. Además, a la molécula polimérica se unen anticuerpos policlonales o monoclonales, así como fragmentos de los mismos, y después este complejo se une a la proteína. Las moléculas poliméricas también se unen a la proteína mediante procedimientos enzimáticos tales como, por ejemplo, la transferencia de sacáridos con la poliglucosiltransferasa (documento US 6.379.933) o glucopegilación (documento US 2004 0132640). Otra metodología es la unión de las moléculas poliméricas a la proteína sobre la base de su función biológica, como por ejemplo, la unión de colágenos PEGilados o fragmentos de colágeno a los dominios A1 y A3 de la proteína del VWF. Para este propósito se usan, en ciertos aspectos, colágenos de los tipos I y III, por ejemplo, procedentes de placenta humana, que muestran una fuerte interacción con el VWF. La unión de la molécula polimérica es irreversible o reversible en condiciones fisiológicas después de la aplicación *in vivo* de la proteína.

En un ejemplo de la invención, en la etapa (a) la proteína unida a al menos una molécula polimérica soluble en agua está inmovilizada sobre un sustrato o matriz portadora, por ejemplo, mediante un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a dicha proteína.

Un sustrato o matriz portadora no tiene ninguna limitación específica, y se refiere, por ejemplo, a un material polimérico insoluble, que puede ser un polímero orgánico, tal como poliamida o un polímero de vinilo (por ejemplo, polimetacrilato, poliestireno y alcohol polivinílico, o derivados de los mismos), un polímero natural tal como celulosa, dextrano, agarosa, chitina y poliaminoácidos, o un polímero inorgánico tal como vidrio o un hidróxido metálico. En ciertas formas de realización, el sustrato está en forma de un microportador, partículas, membranas, tiras, papel, película, perlas, microesferas o placas, tales como placas de microtitulación. En un aspecto, la proteína unida a al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable está inmovilizada sobre el sustrato directamente mediante el acoplamiento covalente o a través de un portador tal como una molécula conectora o un anticuerpo inmovilizado sobre el sustrato.

#### Marcadores detectables

En algunas formas de realización, la proteína o el polímero útil en el procedimiento de la invención se marca para facilitar su detección. Un "marcador" o una "fracción detectable" es una composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos.

Dependiendo del ensayo de cribado empleado, se marca la proteína o el fragmento de la misma, o el polímero o una porción del mismo. El marcador particular o grupo detectable usado no es un aspecto crítico de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la actividad biológica del conjugado. El grupo detectable es cualquier material con una propiedad física o química detectable. Por lo tanto, un marcador es cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

Algunos ejemplos de marcadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, pigmentos fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo de Texas, rodamina, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>32</sup>P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas habitualmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o vidrio coloreado o microesferas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador puede acoplarse directa o indirectamente al componente deseado del ensayo según procedimientos bien conocidos en la materia. Preferiblemente, el marcador, en una forma de realización, está unido covalentemente al biopolímero usando un reactivo de isocianato para conjugar un agente activo según la invención. En un aspecto de la invención, se usan los reactivos bifuncionales de isocianato de la invención para conjugar un marcador a un biopolímero para formar un biopolímero marcado conjugado sin un agente activo unido al mismo. El biopolímero marcado conjugado puede usarse como intermedio en la síntesis de un conjugado marcado según la invención, o puede usarse para detectar el conjugado de biopolímero. Como se indicó anteriormente, se usa una amplia variedad de marcadores, dependiendo de la elección del marcador de la sensibilidad preferida, de la facilidad de conjugación con el componente deseado del ensayo, de requisitos de estabilidad, de la instrumentación disponible y de la previsión de eliminación. A menudo se unen marcadores no radioactivos mediante medios indirectos. Generalmente, se une covalentemente una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) a la molécula. El ligando se une a otras moléculas (por ejemplo, estreptavidina), que son inherentemente detectables o están unidas covalentemente a un sistema de señalización, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente.

En ciertos aspectos, los conjugados se conjugan directamente con compuestos generadores de señales, por ejemplo, mediante la conjugación con una enzima o un fluoróforo. Las enzimas adecuadas para su uso como

5 marcadores incluyen, pero no se limitan a, hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glucosidasas, u  
oxidotasas, particularmente peroxidatasas. Los compuestos fluorescentes, es decir, los fluoróforos, adecuados para su  
uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados,  
dansilo, umbeliferona, etc. Algunos ejemplos adicionales de fluoróforos adecuados incluyen, pero no se limitan a,  
10 eosina, TRITC-amina, quinina, fluoresceína W, amarillo de acridina, lisamina rodamina, B cloruro de sulfonilo  
eritrosceína, rutenio (tris, bipyridinio), rojo de Texas, dinucleótido de nicotinamida adenina, dinucleótido de flavina  
adenina, etc. Algunos compuestos quimioluminiscentes adecuados para su uso como marcadores incluyen, pero no  
se limitan a, luciferina y 2,3-dihidroftalacindionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de los diversos marcadores  
o sistemas de producción de señales que se usan en los procedimientos de la presente invención, véase la patente  
de EE.UU. N° 4.391.904.

15 Los medios para detectar los marcadores son bien conocidos por los expertos en la materia. Por lo tanto, por  
ejemplo, cuando el marcador es radioactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo (por  
ejemplo, radioinmunoensayo, ensayo de centelleo por proximidad) (Pitas y col., Drug Metab Dispos. 34: 906 - 12,  
2006) o una película fotográfica, tal como en una autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente,  
puede ser detectado excitando el fluorocromo con la longitud de onda apropiada de luz y detectando la fluorescencia  
resultante (por ejemplo, ELISA, inmunotransferencia, citometría de flujo u otros procedimientos conocidos en la  
materia). La fluorescencia puede ser detectada visualmente, mediante el uso de detectores electrónicos tales como  
20 dispositivos de carga acoplada (CCDs) o fotomultiplicadores y similares. De forma análoga, los marcadores  
enzimáticos pueden ser detectados proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el  
producto de la reacción resultante. Los marcadores colorimétricos o quimioluminiscentes pueden ser detectados  
simplemente observando el color asociado con el marcador. Otros sistemas de marcaje y detección adecuados para  
su uso en los procedimientos de la presente invención serán fácilmente apreciables por los expertos en la materia.

25 En una forma de realización, el marcador, el conjugado de proteína:polímero o el complejo conjugado de  
polímero:proteína contemplado para su uso en el procedimiento, están unidos a un soporte sólido, tal como un  
sustrato o una matriz portadora, incluyendo, pero no limitándose a, un filtro, un microportador, una partícula, una  
membrana, una tira, un papel, una película, una microesfera o una placa, o cualquier otra matriz portadora conocida  
en la materia.

30 Adicionalmente se contempla que los compuestos marcados pueden ser marcados e interactuar en disolución. Por  
ejemplo, el anticuerpo de captura puede marcarse con una molécula donante de transferencia de energía de  
resonancia fluorescente (FRET), y la molécula objetivo se marca con una molécula aceptora de FRET, de forma que  
las moléculas están próximas cuando se produce la unión. Alternativamente, la molécula objetivo puede marcarse  
35 con un donante de FRET y la molécula de anticuerpo con un aceptor de FRET. Otra posibilidad es separar una  
molécula amortiguadora y fluorescente, presentes ambas en el anticuerpo o el objetivo, cuando hibridan el objetivo y  
el anticuerpo. La molécula objetivo sólo está lo suficientemente cerca de su marcador para que emita si está  
interactuando con el reactivo. Esto produce un sistema en el que la molécula sólo emite cuando interactúa con un  
reactivo (monitorización directa). En una forma de realización, se usó un filtro de paso estrecho de banda para  
40 bloquear todas las longitudes de onda excepto la del marcador de la molécula. Los pares de moléculas de FRET  
están disponibles en el mercado en la materia (por ejemplo, en Invitrogen, Carlsbad, CA), y pueden usarse según el  
protocolo del fabricante. Las emisiones de FRET se detectan usando técnicas de imagen óptica, tales como una  
cámara de CCD.

45 Otro procedimiento de detección de las interacciones anticuerpo-antígeno es marcarlo con un donante de  
electrones. Este donante de electrones aportaría electrones a un contacto eléctrico al que está unido el reactivo.  
Véase, por ejemplo, Ghindilis, A. (Biochem Soc Trans. 28: 84 - 9,2000) y Dai y col. (Cancer Detect Prev. 29: 233 -  
40, 2005) que describen enzimas útiles en, y procedimientos de, electroinmunoensayos. El contacto de los  
electrones sería entonces leído por un convertidor de A a D (de analógico a digital) y cuantificado. Cuanto mayor sea  
50 el recuento de electrones, más interacciones han tenido lugar.

Una forma de realización de un marcador capaz de una detección molecular individual es el uso de partículas de  
resonancia plasmónica (PRPs) como indicadores ópticos, según se describe en Schultz y col., *Proc. Nat'l. Acad.  
Sci.*, 97: 996 - 1001 (2000). Las PRPs son nanopartículas metálicas, típicamente de 40 - 100 nm de diámetro, que  
55 dispersan la luz elásticamente con una eficiencia notable debido a la resonancia colectiva de la conducción de  
electrones en el metal (es decir, la resonancia plasmónica de superficie). La magnitud, la longitud de onda del pico y  
el ancho de banda espectral de la resonancia plasmónica asociada con una nanopartícula depende del tamaño, de  
la forma y de la composición del material de la nanopartícula, así como del entorno local. Modificando estos  
parámetros durante la preparación se forman PRPs que tienen un pico de dispersión en cualquier zona del intervalo  
60 visible del espectro. Para las PRPs esféricas, tanto la longitud de onda del pico de dispersión como la eficacia de  
dispersión aumentan con radios mayores, proporcionando un medio para producir diferentes marcadores  
coloreados. Se preparan de forma reproducible poblaciones de esferas de plata, por ejemplo, para las que la  
longitud de onda del pico de dispersión está dentro de unos pocos nanómetros de la longitud de onda objetivo,  
mediante el ajuste del radio final de las esferas durante su preparación. Debido a que las PRPs son brillantes, una  
65 vez nanoparticuladas, se usan como indicadores para la detección molecular individual; es decir, la presencia de una  
PRP unida en un campo visual puede indicar un único evento de unión.

5 Se contempla que el ensayo y la detección sean útiles para determinar el número de polímeros unidos a una proteína o a un complejo proteico, o para determinar el grado de polímero libre en una disolución, tal como suero o plasma. La señal detectable observada en el procedimiento se correlaciona con el número de polímeros unidos a la proteína o al complejo proteico, o libres en disolución, cuando se compara con un estándar con una cantidad conocida de polímero.

10 Por lo tanto, en una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para la determinación del número de moléculas poliméricas solubles en agua unidas a una proteína o a un complejo proteico o libres en disolución, que comprende poner en contacto dicho polímero con un anticuerpo que se une específicamente a dicho polímero, en el que el número de polímeros unidos al anticuerpo se correlaciona con los niveles de anticuerpo detectados unidos cuando se comparan con un control conocido.

15 En formas de realización relacionadas, el procedimiento de la invención se lleva a cabo usando otros regímenes de detección, por ejemplo, en los que se usan anticuerpos específicos para la proteína y el polímero en cualquier orden como sigue, en el que el primer anticuerpo enumerado es el anticuerpo unido a la matriz portadora, y el segundo anticuerpo unido es el anticuerpo que es detectable. Algunos ejemplos de ensayos útiles para detectar el número de polímeros unidos a una proteína o a un complejo proteico incluyen un procedimiento de detección anti-polímero - anti-proteína, un procedimiento de detección anti-proteína - anti-polímero, o un procedimiento de detección anti-polímero - anti-polímero, en los que el anticuerpo anti-polímero es el mismo anticuerpo para cada etapa de unión, o es un anticuerpo diferente específico del polímero para cada etapa. En una forma de realización relacionada, el ensayo se lleva a cabo usando sólo un anticuerpo específico anti-polímero o un anticuerpo específico anti-proteína.

25 Kits

Como un aspecto adicional, se dan a conocer kits que comprenden uno o más compuestos o composiciones envasados de una forma que facilite su uso en la práctica de los procedimientos dados a conocer en el presente documento. En un ejemplo, dicho kit incluye una composición que comprende una proteína o un complejo proteico conjugado con un polímero fisiológicamente aceptable, tal como Factor VIII PEGilado, y un anticuerpo u otra molécula que detecta específicamente el polímero soluble en agua en la proteína, envasada en un recipiente tal como un frasco o un bote, con una etiqueta fijada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o de la composición en la realización del procedimiento. En ejemplos relacionados, el agente de unión es un receptor soluble, un ligando, un cofactor u otro agente que se une específicamente a la proteína, al complejo proteico o al polímero. El kit puede incluir opcionalmente reactivos y tampones para la preparación de las muestras para la detección del complejo polímero-proteína. Preferiblemente, el compuesto o la composición está envasado en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir adicionalmente un dispositivo adecuado para la administración de la composición según una vía de administración específica. Preferiblemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la composición del factor sanguíneo modificado.

40 En una forma de realización de la presente invención, el procedimiento incluye un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) que comprende las siguientes etapas:

45 (i) inmovilizar un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una proteína unida a al menos una molécula polimérica fisiológicamente aceptable en una placa de ELISA;

(ii) unir la proteína de interés al anticuerpo inmovilizado; y

50 (iii) detectar la cantidad de molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a la proteína mediante un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a una molécula polimérica fisiológicamente aceptable unida a dicha proteína de interés.

La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin ninguna limitación a los mismos.

55 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) directo sobre el antígeno HSAP-2-SS (albúmina sérica humana PEGilada (hSA))

60 Para determinar si los anticuerpos policlonales hacia los PEG generados usando un antígeno PEGilado inyectado en animales, se unió albúmina sérica humana (hSA) a PEG y se inyectó el conjugado proteico en conejos. Entonces se midió la cantidad de anticuerpo anti-PEG.

65 En resumen, se genera un anticuerpo policlonal mediante la inmunización de conejos (Richter AW y col., 1983; Int Arch Allergy Appl Immunol 70: 124 - 31) con PEG unido covalentemente a albúmina sérica humana (HSA). Los

5 conejos fueron inoculados con preparaciones del antígeno HSAP-2-h-SS con aproximadamente 380 µg/ml de proteína y una concentración de PEG de 250 µg/ml. Las muestras séricas de todos los animales se toman antes del inicio y después de 3 y 4 semanas, y subsiguientemente se ensayan para comprobar la formación de anticuerpo detectable contra el antígeno HSAP-2-h-SS. El antígeno HSAP-2-h-SS (hSA PEGilada) está recubierto con carbonato 0,1 M a pH 9,6 a 1 µg/ml. Las muestras se diluyen con tampón de PBS-gelatina y se incuban con los pocillos, y subsiguientemente con un anticuerpo IgG-HRP de cabra anti-conejo usando una técnica inmunitaria de incubación individual multicapa (SIMIT) (Naser, W., J Immunol Methods. 129: 151 - 7, 1990). En la SIMIT, el ligando (por ejemplo, el anticuerpo) y el agente de unión al ligando (por ejemplo, el anti-anticuerpo) se incuban conjuntamente con objeto de que durante una única etapa de incubación se formen múltiples capas de inmunorreactivos, dando así como resultado un aumento en la sensibilidad del ensayo. La formación del anticuerpo contra el antígeno HSAP-2-h-SS es detectable. El antígeno puede ser recubierto directamente en una placa, y hay un aumento del título con el tiempo de inmunización Figura 1 A).

15 Más específicamente, se preparó hSA PEGilada según Abuchowski y col (J Biol Chem 252: 3578 - 81, 1977). La hSA PEGilada tenía un peso molecular mayor, según se muestra mediante una cromatografía de exclusión por tamaños de alta resolución y SDS-PAGE. Las muestras séricas de todos los animales se toman antes del inicio y después de 3 y 4 semanas y se agrupan. Estas muestras agrupadas se ensayaron subsiguientemente para comprobar la formación anticuerpos contra el antígeno de inmunización mediante un ELISA directo. En resumen, se recubrió la hSA PEGilada en tampón de carbonato sódico 0,1 M, pH 9,6 a una concentración de 1 µg/ml, en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc Maxisorp F96). Las muestras séricas de conejo agrupadas se diluyeron en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 1 mg/ml de gelatina, y se incubaron con los pocillos y subsiguientemente con un anticuerpo IgG-HRP de cabra anti-conejo. Era detectable la formación de anticuerpos contra el antígeno de inmunización. Además, hubo un aumento del título con el tiempo de inmunización (Figura 1 B). Se usó el mismo procedimiento para medir los títulos de anticuerpo en muestras obtenidas en otro estudio de inmunización. La Tabla 1 muestra las densidades ópticas corregidas en blanco (DO) de las muestras tomadas al inicio y después de 36 y de 50 días. También, en este caso los resultados para las diluciones de muestra 1/50 y 1/100 demuestran la formación de IgG contra el antígeno de inmunización, que aumentaba con el tiempo.

30 **Tabla 1.**

**Títulos de IgG anti-PEG tras la inmunización con hSA PEGilada**

Conejo	Dilución 1/50			Dilución 1/100		
	d0	d36	d50	d0	d36	d50
1	0,000	0,699	0,651	0,000	0,480	0,260
2	0,000	0,420	0,329	0,000	0,233	0,116
3	0,000	0,162	0,084	0,000	0,098	0,022
4	0,000	0,440	0,343	0,000	0,212	0,116
5	0,000	0,423	0,408	0,000	0,196	0,115
6	0,003	0,152	0,115	0,002	0,114	0,079
Media	0,001	0,383	0,322	0,000	0,222	0,118

35 Estos resultados muestran que una proteína hSA conjugada con PEG induce la producción de anticuerpos policlonales a partir de sujetos animales.

**Ejemplo 2**

**Inhibición del ELISA directo sobre el antígeno HSAP-2-SS mediante PEG**

40 Para determinar si la unión del anticuerpo anti-PEG era específica para el PEG, se evaluó la habilidad del PEG libre para interferir con la unión del anticuerpo.

45 En resumen, se inmunizaron conejos con el antígeno HSAP-2-SS y se prepararon muestras séricas según se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). El antígeno HSAP-2-h-SS está recubierto en una superficie en carbonato 0,1 M a pH 9,6 a 1 µg/ml. Las muestras se diluyen en tampón de PBS-gelatina o en tampón de PBS-gelatina-1% de PEG 5.000 (+ 1% de PEG) y se incuban con los pocillos, y subsiguientemente con un anticuerpo IgG-HRP de cabra anti-conejo (SIMIT). La unión del anticuerpo al antígeno (= hSA PEGilada) obtenida mediante la inmunización de los conejos puede inhibirse mediante la adición de PEG 5.000 al tampón de dilución de la muestra (Figura 2 A).

50 Más específicamente, la especificidad anti-PEG de los antiseros obtenidos mediante la inmunización con la hSA PEGilada se comprobó con un estudio de inhibición. Se recubrieron placas (Ejemplo 1) con el antígeno de inmunización hSA PEGilada a una concentración de 10 µg/ml. Las muestras séricas de conejo agrupadas tomadas 3 y 4 semanas después del inicio de la inmunización se diluyeron en PBS-gelatina para obtener una serie de diluciones que variaban desde 1/100 hasta 1/100.000. Se añadió PEG 5.000 a una concentración de 10 mg/ml para inhibir la unión a la hSA PEGilada. Se detectó la IgG de conejo unida mediante el uso de un conjugado de IgG de

cabra anti-conejo-peroxidasa y el sustrato de peroxidasa Sureblue. El polietilenglicol (PEG) 5.000 disminuyó la unión de la IgG de conejo a la hSA PEGilada inmovilizada sobre la placa (Figura 2 B).

Estos resultados demuestran que la IgG contenida en el suero de conejo reconoce y se une específicamente al PEG. La unión residual de la IgG de conejo en presencia de PEG fue provocada por los anticuerpos dirigidos contra la hSA. Estas IgGs no específicas de PEG fueron adsorbidas mediante cromatografía de afinidad sobre hSA inmovilizada.

### Ejemplo 3

#### ELISA directo sobre una placa modificada con PEG

Para determinar si el anticuerpo anti-PEG se uniría al PEG unido directamente al plástico, se desarrolló un ELISA directo de PEG.

En resumen, se inmunizaron conejos con el antígeno HSAP-2-SS y se prepararon muestras séricas según se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). Se recubre un sustrato (NUNC Maxisorp F96) con mPEG-NPC 5000 a 1 mg/ml en HEPES 15 mM 2 horas a temperatura ambiente y después se bloquea con PBS-gelatina (5 mg/ml). Las muestras se diluyen en tampón de PBS-gelatina y se incuban con los pocillos, y subsiguientemente con un anticuerpo IgG-HRP de cabra anti-conejo (SIMIT). Se detecta la unión de los anticuerpos presentes en las muestras séricas a una placa modificada con PEG (NUNC Maxisorp F96) (Figura 3).

Más específicamente, se inmunizaron conejos con hSA PEGilada y se prepararon muestras séricas según se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). Se recubrieron placas (Ejemplo 1) con carbonato de mPEG-p-nitrofenilo (NPC; SunBio, Korea) 5.000 a 1 mg/ml en HEPES 15 mM a temperatura ambiente durante 2 horas y después se bloquearon con PBS-gelatina (5 mg/ml). Las muestras séricas se diluyeron con tampón de PBS-gelatina, se incubaron con los pocillos y subsiguientemente con una IgG-peroxidasa de cabra anti-conejo. Se detectó una clara unión de la IgG presente en las muestras séricas de conejo a la placa modificada con PEG (Figura 3). Cuando se realizó el mismo procedimiento con placas activadas con polilisina y  $\text{NH}_2$  (Costar), no pudo observarse reacción.

Estos resultados demuestran que la IgG anti-PEG contenida en las muestras séricas de conejo reconoció y se unió al PEG.

### Ejemplo 4

#### ELISA directo sobre VWF y PEG-VWF

Para determinar si el anticuerpo anti-PEG se unirá a las proteínas PEGiladas distintas al antígeno de inmunización, se usaron los anticuerpos anti-PEG en un ELISA con Factor de von Willebrand PEGilado.

En resumen, se inmunizaron conejos con el antígeno HSAP-2-SS y se prepararon muestras séricas según se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1). Se recubre un sustrato con VWF PEGilado (PEG-VWF) en carbonato 0,1 M a pH 9,6, se recubre otro sustrato con VWF recombinante (rVWF-12) en carbonato 0,1 M a pH 9,6. Las muestras se diluyen en tampón de PBS-gelatina incubadas con los pocillos y subsiguientemente con un anticuerpo de IgG-HRP de cabra anti-conejo (SIMIT). La PEGilación del VWF se determina como un aumento del peso molecular confirmado mediante SDS-PAGE. Se detectó la unión de los anticuerpos presentes en las muestras séricas al VWF PEGilado recombinante (rVWF). No se observa unión de los anticuerpos presentes en las muestras séricas al rVWF (Figura 4 A).

Más específicamente, se dejaron reaccionar muestras séricas de conejo (véase el Ejemplo 1) con rVWF y rVWF PEGilado inmovilizados sobre placa. El rVWF PEGilado se preparó mediante el uso de un reactivo de PEGilación según se describe en Kozlowski y col (BioDrug 5: 419 - 29, 2001). Ambas proteínas se recubrieron en placas de poliestireno (Ejemplo 1). Las muestras séricas de conejo, tomadas antes de la inmunización y después de 3 semanas, se diluyeron en tampón de PBS-gelatina, se incubaron con los pocillos y subsiguientemente con un anticuerpo de IgG-HRP de cabra anti-conejo. Se detectó la unión de la IgG presente en las muestras séricas de conejo al rVWF PEGilado, aunque los conejos fueron inmunizados con hSA PEGilada. No se observó unión de la IgG presente en las muestras séricas de conejo al rVWF (Figura 4 B).

Estos experimentos demuestran que los anticuerpos anti-PEG no se unen inespecíficamente a una proteína no PEGilada.

### Ejemplo 5

#### ELISA para la detección de la PEGilación del VWF

Para determinar la capacidad del anticuerpo anti-PEG para detectar la proteína PEGilada, tal como VWF PEGilado,

se desarrolló un ELISA del VWF-PEG.

En resumen, se recubre un sustrato (NUNC Maxisorp F96) con anticuerpo anti-VWF y se incuba con cantidades decrecientes de VWF PEGilado, seguido de una incubación con un conjugado de peroxidasa anti-PEG. La peroxidasa unida es detectada mediante una reacción colorimétrica con SureBlue, y la intensidad de la señal se correlaciona con la concentración de VWF PEGilado en la dilución (Figura 5).

Más específicamente, el siguiente ejemplo describe un ELISA de proteína-PEG que usa un anticuerpo específico para la proteína, derivado preferiblemente de conejo, en combinación con una IgG anti-PEG conjugada con una enzima, preferiblemente derivada de conejos, para la detección y la medición de una proteína PEGilada. Básicamente, la proteína PEGilada es capturada por el anticuerpo anti-proteína inmovilizado sobre la placa, y después se deja reaccionar con un conjugado de IgG-peroxidasa anti-PEG. Se diluyó VWF de conejo anti-humano (DakoCytomation A-0082) a 1/500 en tampón de carbonato sódico, pH 9,6, y se recubrió en una placa de poliestireno (Ejemplo 1). Alternativamente, puede usarse cualquier anticuerpo monoclonal en una dilución apropiada. El lavado se realizó con PBS, el tampón de dilución contenía gelatina a 5 mg/ml. Se diluyeron rVWF (muestra A) y varias preparaciones de rVWF PEGilado (muestras E, F, G) con tampón de dilución hasta una concentración de VWF:Ag de 0,85 mU/ml. La muestra A representa el rVWF natural antes de la modificación, mientras que las preparaciones E, F y G se prepararon usando el reactivo de PEGilación PEG-SS-5K en las concentraciones molares de 1 mM, 2,5 mM y 7,5 mM. Se prepararon cinco diluciones adicionales de 1 + 1 y se incubaron con la IgG anti-VWF inmovilizada sobre la placa. El rVWF PEGilado unido se detectó mediante reacción con el conjugado de IgG peroxidasa anti-PEG y el sustrato de la peroxidasa SureBlue. La Tabla 2 muestra las pendientes y los coeficientes de regresión para las curvas de dosis-respuesta de las diferentes preparaciones medidas. Obviamente, el rVWF no PEGilado (muestra A) no mostró respuesta, mientras que las curvas de dosis-respuesta lineales de las tres muestras de rVWF PEGilado E, F y G tenían claramente pendientes diferentes.

**Tabla 2.**

**Pendiente y coeficientes de correlación de las curvas de dosis-respuesta del ELISA del rVWF-PEG**

	Muestra A	Muestra E	Muestra F	Muestra G
Pendiente	0,000	0,4771	2,0523	4,6259
Coefficiente de correlación	n. a.	1,000	0,992	0,995

Las tres preparaciones de rVWF PEGilado mostraron un aumento en el peso molecular en una SDS PAGE (Figura 5) en comparación con los rVWF no PEGilados. Además, unas mayores proporciones entre el PEG y el rVWF aplicadas a la PEGilación dieron como resultado unos mayores pesos moleculares de las preparaciones de rVWF PEGilados y unas curvas de dosis-respuesta más inclinadas. Por lo tanto, el diseño descrito no sólo detecta específicamente el PEG unido a proteína, sino que también permite la diferenciación de las preparaciones con diferentes grados de PEGilación.

**Ejemplo 6**

**Especificidad del ELISA del rVWF-PEG mostrada mediante la inhibición con PEG**

Con objeto de evaluar la especificidad del ensayo de PEG, se realizó un estudio de inhibición.

El ensayo se realizó según se describió anteriormente (véase el Ejemplo 5) usando la preparación G de rVWF PEGilado con el mayor grado de PEGilación. La muestra diluida de rVWF PEGilado (0,85 mU/ml) se incubó con el anticuerpo anti-VWF inmovilizado sobre la placa y después con el conjugado de IgG-peroxidasa anti-PEG en presencia de PEG 5.000 (de 50 mg/ml a 0,024 mg/ml). El PEG 5.000 provoca una clara inhibición dependiente de la dosis (Figura 6) con una CI50 de 0,18 µg/ml.

**Ejemplo 7**

**Descripción de un ELISA de PEG-PEG**

Este ejemplo describe un ELISA de PEG-PEG que usa la IgG policlonal anti-PEG de conejo para capturar y detectar proteínas PEGiladas o PEG libre.

Se recubrió IgG de conejo anti-PEG empobrecida en anti-albúmina en carbonato sódico 0,1 M, pH 9,6, durante una noche en placas de poliestireno (Ejemplo 1). El bloqueo de las placas se realizó con PBS, pH 6,1, que contenía un 2% de leche desnatada en polvo y benzamidina 2 mM, a 37°C durante 3 horas. No se usó Tween 20 ni otros detergentes que contienen polietoxi en todo el ensayo. Se usó tampón de bloqueo para preparar diluciones sucesivas para las siguientes muestras: mPEG2-20K-NHS (reactivo estable de 20K PEGilación según se describe en Kozlowski y col [Biodrug 2001; 5: 419 - 29]) y rVWF estable PEGilado (9,8 µg de PEG unido por UI de VWF:Ag),

preparado mediante el uso de este reactivo; 20K-PEG2-FMOC-NHS (reactivo ramificado “escindible” 20K PEG, según se describe en el documento US2008/0234193) y rVWF 20K-PEGilado escindible (8,2 µg de PEG unido por UI de VWF:Ag) preparado mediante el uso de este reactivo. Los reactivos de PEG se disolvieron en agua destilada a una concentración de 10 mg/ml y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una noche para hidrolizar el grupo N-hidroxisuccinimida (NHS) activo. Las diluciones de las muestras se dejaron unir al anticuerpo anti-PEG inmovilizado sobre la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Después las placas se lavaron y se aplicó IgG peroxidasa anti-PEG. Finalmente, se midió la actividad de la peroxidasa unida. Todas las muestras mostraron unas curvas de dosis-respuesta lineales (Figura 7), aunque con diferentes sensibilidades. Las preparaciones de rVWF PEGilado pudieron medirse en el bajo intervalo de ng de PEG unido. Los reactivos de PEG libres no conjugados después de la hidrólisis también pudieron medirse con este diseño de ensayo, pero se requirieron mayores concentraciones de PEG para la relación lineal de dosis-respuesta.

Estos hallazgos demostraron que la IgG anti-PEG obtenida mediante la inmunización de conejos con hSA 5K PEGilada (i) no sólo se une al 5 k PEG usado para la inmunización, sino que (ii) se une al epítipo repetitivo presentado en la cadena de PEG o a la región de unión de proteína-PEG. Mediante el empleo de un pretratamiento para la eliminación del PEG unido a la proteína, este diseño de ensayo es útil para la medición del PEG libre, no conjugado tal como permanece, por ejemplo, en la mezcla de reacción después de la PEGilación. Además, este ensayo también es útil para medir la cantidad de PEG no unido en el conjugado de PEG-proteína purificado.

#### Ejemplo 8

##### Especificidad del ELISA de PEG-PEG

La especificidad del ELISA de PEG-PEG descrito anteriormente se mostró usando las condiciones de ensayo descritas anteriormente (Ejemplo 7). Además, se analizó una muestra de rVWF no PEGilado usando el ensayo de PEG-PEG y no mostró respuesta, incluso a una concentración mayor de 100 veces de VWF:Ag (Figura 8). Estos resultados demuestran la especificidad del anticuerpo anti-PEG y del ensayo PEG-PEG.

#### Ejemplo 9

##### Descripción de un ELISA de PEG-proteína para la medición de rVWF PEGilado estable

Para determinar si un ELISA específico de PEG sería un procedimiento de detección sensible cuando se usa el anticuerpo anti-PEG como anticuerpo de captura, se desarrolló un ELISA de PEG-proteína que usa un anticuerpo anti-PEG para capturar la proteína PEGilada y un anticuerpo específico de la proteína para detectar la proteína PEGilada unida.

Se diluyó IgG anti-PEG empobrecida en albúmina a aproximadamente 50 µg/ml con tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,6, y recubrió en los pocillos de una microplaca de poliestireno de 96 pocillos (Nunc Maxisorp F96). Entonces los pocillos se bloquearon con tampón de dilución (leche desnatada en polvo al 3% en PBS, benzamidina 2 mM; pH 6,1) a 37°C durante dos horas. Entonces se cargaron diluciones sucesivas de las muestras y se incubaron con los pocillos a temperatura ambiente durante 60 min. Después de lavar se añadió, VWF-peroxidasa anti-humano de conejo (DakoCytomation) y se midió la actividad de la peroxidasa unida con SureBlue. Alternativamente, se añadió el conjugado de peroxidasa a las muestras y se incubó sin una etapa de lavado precedente usando la técnica inmunitaria de incubación individual multicapa (SIMIT). Se usó una preparación estable de rVWF 20K-PEGilado (véase el Ejemplo 7). La solidez del ensayo ELISA de PEG-VWF se demostró diluyendo esta preparación en plasma de ratón deficiente en Von Willebrand (VWD) (la concentración final de VWF en plasma era del 90%) y mediante la adición de reactivo de PEG (concentración final del reactivo de PEG: 1 mg/ml a 0,5 UI de VWF PEGilado) según se describió en el Ejemplo 7, y rVWF (concentración final del rVWF: de 7 UI a 5 UI de rVWF PEGilado). Se obtuvieron unas curvas de dosis-respuesta lineales para todas las muestras en el intervalo de 27 a 1,7 ng/ml de PEG unido (Figura 9) cuando se usó el formato de ensayo secuencial, pero también para el formato de SIMIT.

Ni la presencia de reactivo de PEG no conjugado ni un exceso de rVWF no PEGilado dificultaron el ensayo. Tampoco interfirió la matriz de VWD de plasma de ratón. Por lo tanto, el ensayo demuestra la detección sólida y sensible de los conjugados de PEG-proteína.

#### Ejemplo 10

##### Descripción de un ELISA de PEG-proteína para la medición de rVWF PEGilado escindible

La solidez del estudio descrito anteriormente (véase el Ejemplo 9) también se realizó con una preparación de rVWF 20K PEGilado escindible (véase el Ejemplo 7). Se obtuvieron unos resultados similares para la preparación de rVWF 20K PEGilado escindible con un intervalo lineal de 21 a 1,3 ng/ml (Figura 10) y no se detectó interferencia con ninguno de los compuestos. Estos datos demuestran que el conector usado para unir la fracción de PEG a la proteína no tenía impacto sobre la detección/medición del conjugado de PEG-proteína.

Ejemplo 11

Especificidad del ELISA de PEG-proteína para el PEG unido a proteína

5 La especificidad del ELISA de PEG-proteína fue mostrada mediante la medición directa de los reactivos de PEG no conjugados y las preparaciones de rVWF PEGilado según se ha descrito anteriormente.

10 En ambos casos se usaron reactivos y conjugados estables y escindibles. Ambas preparaciones de rVWF PEGilado mostraron unas respuestas similares dependientes de la dosis, mientras que ambos reactivos, medidos a unas concentraciones 10 veces mayores, no mostraron señales de dependencia de la dosis (Figura 11). Estos datos demuestran que el ELISA de PEG-proteína detecta y mide específicamente conjugados de PEG-proteína.

Ejemplo 12

15 Especificidad de un ELISA de PEG-rFVIII

Para determinar si el ELISA de PEG descrito en este documento podría usarse para factores de coagulación sanguíneos adicionales, se demostró el principio general aplicable del ELISA del PEG-proteína mediante el análisis de una preparación de rFVIII PEGilado usando las condiciones de ensayo según se ha descrito anteriormente (Ejemplo 9).

20 Se usó una peroxidasa anti-FVIII humano (Cedarlane) en lugar de una peroxidasa anti-VWF humano para detectar el rFVIII PEGilado unido a la placa. Los resultados demostraron que el ELISA del PEG-rFVIII era específico porque el rFVIII no PEGilado no mostró ninguna señal incluso cuando se analizó a unas concentraciones 1.000 veces mayores de FVIIh:Ag (Figura 12).

Ejemplo 13

ELISA del PEG-rFVIII con rFVIII PEGilado estable y escindible

30 La especificidad del ELISA de PEG también se midió para preparaciones estables y escindibles de PEG-FVIII.

35 Se diluyó IgG anti-PEG empobrecida en albúmina a aproximadamente 50 µg/ml con tampón de carbonato 0,1 M, pH 9,6, y recubrió en los pocillos de una microplaca de poliestireno de 96 pocillos. Entonces los pocillos se bloquearon con tampón de dilución (leche desnatada en polvo al 3% en PBS, benzamidina 2 mM; pH 6,1) a temperatura ambiente durante dos horas. Entonces se cargaron diluciones sucesivas de las muestras y se incubaron con los pocillos a temperatura ambiente durante 60 min. Después de lavar se añadió anti-FVIII humano-peroxidasa de oveja (Cedarlane) y se midió la actividad de la peroxidasa unida con SureBlue. Se usaron preparaciones estables y escindibles de rFVIII 20K-PEGilado. Estas preparaciones tenían unas concentraciones de PEG unido de 115 µg/ml y 40 301 µg/ml, respectivamente. La Tabla 3 muestra los datos de las mediciones obtenidos sobre el análisis de estas muestras, y proporciona las características de las curvas de regresión.

Tabla 3 ELISA de PEG-rFVIII con rFVIII PEGilado estable y escindible						
rFVIII PEGilado estable		rFVIII PEGilado escindible				
		Día 1			Día 2	
ng de PEG/ml	DO	ng de PEG/ml	placa 1	placa 2	placa 1	placa 2
57,6	1,181	75,2	0,698	0,674	0,761	0,883
28,8	0,732	57,6	0,363	0,351	0,382	0,527
14,4	0,432	18,8	0,182	0,175	0,200	0,250
7,2	0,237	9,4	0,097	0,087	0,104	0,125
3,6	0,149	4,7	0,046	0,045	0,049	0,062
pendiente	0,7600	pendiente	0,9751	0,9822	0,9791	0,9740
r	0,9992	r	0,9997	0,9999	0,9996	0,9985

45 El análisis de ambas preparaciones de rFVIII PEGilado estable y PEGilado escindible dio como resultado unas curvas de dosis-respuesta lineales en el intervalo de nanogramos de PEG unido. Además, el ensayo tuvo una buena reproducibilidad según se muestra para la preparación de rFVIII PEGilado escindible, que permite una medición precisa del FVIII PEGilado.

Ejemplo 14

50 Influencia de los diferentes conjugados de peroxidasa anti-FVIII sobre el rendimiento del ensayo

Se investigó la influencia de diferentes conjugados de peroxidasa anti-FVIII sobre el rendimiento del ensayo.

Se realizó el ELISA de PEG-rFVIII según se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 13). Se comparó la detección de los conjugados de peroxidasa anti-FVIII humano de Asserachrom y Cedarlane en el mismo ensayo (Figura 13). En ambos casos se obtuvieron unas relaciones de dosis-respuesta lineales entre la señal y los niveles de FVIII:Ag de las muestras, confirmando que ambos conjugados podrían usarse de forma intercambiable.

Estos resultados sugieren que el ELISA de PEG es útil con cualquier preparación de conjugado de anticuerpo anti-proteína disponible con una selectividad apropiada.

#### Ejemplo 15

##### Rendimiento del ELISA del PEG-FVIII en plasma de ratones deficientes en FVIII y en plasma de rata

Se investigó la eficacia y la sensibilidad del ELISA del PEG-rFVIII en plasma de ratones deficientes en FVIII y en plasma de rata.

Se añadió una preparación de rFVIII PEGilado escindible a una concentración equivalente a 0,5  $\mu\text{g}$  de PEG unido/ml en el plasma de los animales o en tampón de dilución. Las curvas de dosis respuesta resultantes de estas muestras (Figura 14) eran muy similares en el tampón y en el plasma animal. Además, se añadió rFVIII PEGilado estable a plasma de ratón deficiente en FVIII, diluido a 1/10 y 1/20, a unos niveles de unión de PEG de ng/ml. Se midieron unas recuperaciones del 99,8% y del 97,9% de las concentraciones añadidas. Esto demuestra que el ELISA del PEG-rFVIII es útil para monitorizar la farmacocinética del rFVIII PEGilado escindible con una elevada sensibilidad y especificidad sin requerir ningún pretratamiento específico de la muestra distinto a la dilución apropiada de la muestra. Se obtuvieron datos similares cuando se analizaron muestras con rVWF PEGilado.

#### Ejemplo 16

##### Medición de preparaciones de rFVIII PEGilado escindible con diferentes grados de PEGilación

Se analizaron preparaciones de rFVIII PEGilado escindible con diferentes grados de PEGilación con el ELISA del PEG-FVIII.

El ELISA se realizó según se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 13). Además, los niveles de FVIII:Ag de estas preparaciones se midieron usando un kit de ELISA de FVIII disponible comercialmente. El grado de PEGilación de estas preparaciones se midió con un procedimiento basado en HPLC y se expresó como moles de PEG unido por mol de FVIII. La preparación de FVIII PEGilado se añadió a un tampón de dilución o a un plasma de ratón deficiente en FVIII, y estas muestras se midieron con el ELISA del PEG-FVIII. Entonces las concentraciones del PEG unido medido con el ELISA del PEG rFVIII se normalizaron a las concentraciones de FVIII:Ag de estas muestras y se expresaron como  $\mu\text{g}$  de PEG unido por U de FVIII:Ag. Estas concentraciones de PEG normalizadas a FVIII:Ag se correlacionaron bien en tampón y en el plasma de ratones deficientes en FVIII con el grado de PEGilación medido para las diferentes preparaciones con el procedimiento basado en HPLC (Figura 15).

Estos resultados muestran que el ELISA del PEG-rFVIII podía discriminar entre preparaciones de rFVIII PEGilado en función de su grado de PEGilación, y la comparación de la observancia de las muestras con un estándar conocido implica el grado de PEGilación de la muestra de proteína. Además, estos resultados se consiguen en tampón y también en la matriz de plasma de ratón deficiente en FVIII, ya que el ensayo no requiere ningún pretratamiento específico de la muestra excepto una dilución apropiada de las muestras de prueba. Esto proporciona un procedimiento para medir la proteína PEGilada u otros niveles de PEG en el suero de un paciente que recibe una proteína terapéutica PEGilada.

#### Ejemplo 17

##### Influencia del PEG libre sobre el ELISA del PEG-FVIII

Se investigó la posible interferencia del PEG libre sobre el ensayo de ELISA del PEG en un intervalo de concentración de PEG de hasta 1.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Se mezcló una preparación de rFVIII PEGilado escindible con 20K-PEG2-FMOC-NHS para producir unas concentraciones finales de 20, 100, 200, 500 y 1.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El reactivo de PEG se disolvió en agua destilada y se mantuvo durante una noche para destruir la reactividad del NHS antes de que se añadiera a la preparación de rFVIII PEGilado. Las curvas de dosis-respuesta obtenidas para estas muestras eran muy similares (Figura 16) y sus pendientes diferían en menos del 10%.

Estos ensayos muestran que incluso elevados niveles de PEG libre no influirán sobre los niveles de detección del ELISA del PEG-rFVIII.

## Ejemplo 18

## Medición de la liberación de PEG desde un rFVIII PEGilado escindible

- 5 Como se mostró anteriormente, el ELISA del PEG mide la liberación del polímero de PEG desde el conjugado de proteína-PEG. Para determinar si el ensayo puede medir la tasa de liberación, se usó una preparación de rFVIII PEGilado escindible mantenida a unas condiciones que desencadenan la liberación del PEG unido a la proteína, para medir la liberación de PEG con el tiempo.
- 10 Los niveles de PEG libre se midieron mediante cromatografía de exclusión por tamaños. Los niveles de PEG unido a proteína se midieron mediante el ELISA del PEG-FVIII y se relacionaron con las concentraciones de FVIII:Ag de estas muestras. Los niveles de PEG unido a FVIII normalizados con FVIII:Ag se correlacionaron bien con los niveles de PEG libre (véase la Figura 17).
- 15 Estos experimentos demostraron que el ELISA del PEG-FVIII era capaz de monitorizar la liberación de PEG desde una preparación de rFVIII PEGilado escindible. Este ensayo es útil para medir la cinética de liberación de una proteína PEGilada *in vivo* en pacientes que reciben FVIII PEGilado u otra proteína terapéutica PEGilada.

## Ejemplo 19

- 20 Detección de rFVIIa PEGilado en plasma de rata agrupado normal

Algunos procedimientos alternativos para determinar los niveles de PEGilación de una proteína o de un complejo proteico incluyen la detección del complejo de proteína-polímero basándose en el peso molecular del propio complejo. Este tipo de ensayo se realiza usando un aislamiento mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) de la proteína y la detección de las moléculas de PEG en la proteína usando un procedimiento de detección por inmunotransferencia Western del anti-PEG.

30 Para determinar la detección de la proteína PEGilada en plasma usando esta técnica se diluyeron muestras de FVIII PEGilado en plasma de rata y se midieron los niveles de proteína PEGilada.

Se diluyeron muestras de PEG-FVIIa de 20 kDa y PEG-FVIIa de 40 kDa a 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml y 6,3 µg/ml en plasma de rata (Sprague Dawley), y se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y a una inmunotransferencia Western. Se añadió tampón de muestra (tampón de muestra NuPAGE LDS, Invitrogen) a 1 µl del producto diluido en plasma y se cargó en un gradiente de geles de SDS tris-acetato poliacrilamida (3 - 8%) (NuPage Novex, 1,0 mm; Invitrogen). La electroforesis se realizó en tampón de ejecución de SDS tris-acetato en unas condiciones no reductoras. Las proteínas se inmunotransfirieron durante 16 horas con 1,25 W a +4°C en membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, 0,2 µm) (membrana Sequi-Blot PVDF, BIO-RAD, Richmond, CA, EE.UU.). A continuación las membranas se bloquearon con disolución de caseína-TBS (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) durante 1 hora a +37°C.

A continuación, los inmunotransferidos se incubaron con el anticuerpo monoclonal de conejo anti-PEG (Epitomics, CA, EE.UU.), diluido a 1/1.000 durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo se diluyó en TBS + 0,05% de Tween20 (TBST) + 10% de caseína-TBS. Después de 5 etapas de lavado con TBST, cada una durante 10 minutos, se aplicó el anticuerpo secundario de conjugado de IgG de cabra anti-conejo (H+L)-peroxidasa de rábano picante (MRP) (DAKO Cytomation, Glostrup, Dinamarca), diluido a 1/1.000 en TBST/10% de caseína-TBS, durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Después de 5 etapas de lavado con TBST, los inmunotransferidos se desarrollaron usando el kit Plus Detection de quimioluminiscencia mejorada (ECL) según el manual del fabricante (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

50 Para la detección se usó un reactivo de inmunotransferencia Western de ECL menos sensible para visualizar las proteínas PEGiladas. Incluso con esta técnica, la proteína PEGilada era detectable en todas las concentraciones aplicadas. El anticuerpo secundario mostró una reacción cruzada con las inmunoglobulinas de rata (banda marcada con \* en la Figura 18). Esta reacción cruzada podía evitarse mediante el inmunoempobrecimiento del plasma de rata para la inmunoglobulina antes de la aplicación del gel.

## Ejemplo 20

- 60 Detección de rFVIIa PEGilado en plasma humano normal

Para determinar la detección de proteína PEGilada en plasma humano, se diluyeron muestras de FVIII PEGilado y se midieron los niveles de proteína PEGilada.

65 Se diluyeron muestras de PEG-FVIIa de 20 kDa a 5 µg/ml y 2,5 µg/ml en plasma humano normal agrupado (George King Bio-Medical) o en tampón de HSA/HNa al 5% (HEPES 25 mM, NaCl 175 mM, pH 7,35). Se usó el sistema de

detección ECL plus y la película se expuso durante un tiempo muy corto (30 segundos) (Figura 2 B). Para estas muestras, la SDS-PAGE usando un gel de gradiente de tris-acetato del 3 - 8% estuvo seguida de un análisis mediante inmunotransferencia Western. Se usó el sistema Plus Detection System de ECL para visualizar las bandas.

Para comparar, SDS-PAGE usando geles de gradiente del bis-tris al 4 - 12% seguido de un análisis mediante inmunotransferencia Western de 100 y 50 ng de PEG-FVIIa de 20 kDa detectado con anticuerpo anti-PEG (diluido a 1/300 en TBS/0,05% de leche desnatada en polvo (BIO-RAD)) y un anticuerpo policlonal de oveja anti-FVII humano (Affinity Biologicals, ON, Canadá), diluido a 1/2.000 en TBST/0,1% de leche desnatada en polvo. Se aplicó un sistema de fosfatasa alcalina (ALP) para visualizar las proteínas (Figura 19 A).

No había una diferencia detectable tanto si el rFVIIa PEGilado se diluyó en tampón como en plasma, y sólo se observó una débil reacción cruzada con el plasma humano (Figura 19 B). Estos resultados demuestran que el procedimiento es apropiadamente sensible para detectar bajos niveles de proteína conjugada en una muestra que comprende muchas proteínas diferentes, tales como plasma humano, y es por lo tanto útil para detectar proteínas conjugadas con polímeros en una muestra tomada de un paciente que recibe un factor de coagulación sanguíneo para tratar una alteración de la coagulación.

#### Ejemplo 21

##### Detección de la liberación *in vitro* de PEG desde PEG-rFVIIa de 20 kDa en plasma humano normal

La PEGilación habitualmente disminuye la función biológica de la proteína. Sin embargo, la modificación de las proteínas con un PEG unido reversiblemente, que tiene el potencial de disociarse de la proteína con el tiempo, debería permitir la liberación de la proteína natural, acompañada con una restauración completa de su actividad. Este proceso se monitoriza midiendo el aumento en la actividad en el plasma con el tiempo. Sin embargo, la actividad medida depende de la tasa de la reacción de liberación y de la inactivación/eliminación de la proteína. Esta invención también es adecuada para medir los cambios estructurales, incluyendo la desPEGilación de dicha proteína en una matriz de plasma.

El conjugado escindible de PEG-rFVIIa de 20 kDa se diluyó a 0,023 µg/ml en plasma humano normal y se incubó durante 24 horas a 37°C. La liberación de la molécula de PEG se determinó mediante SDS-PAGE y un análisis por inmunotransferencia Western usando el anticuerpo específico anti-PEG, según se describió en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Figura 20, la cantidad de rFVIIa di-PEGilado disminuye ligeramente con el tiempo y desaparece completamente después de 24 horas de incubación. Por el contrario, la especie de mono-PEG muestra un ligero aumento inicial y todavía sigue presente después de 24 horas. Por lo tanto, los procedimientos detectan la desPEGilación secuencial de la molécula proteica.

Estos resultados ilustran que el presente procedimiento permite la determinación del grado de polímero soluble en agua de la superficie de una proteína o de un complejo proteico, y también permite la determinación del mecanismo de liberación de un polímero soluble en agua escindible desde la proteína.

#### Ejemplo 22

##### Detección de FVIII PEGilado en plasma humano normal

Para determinar la capacidad del presente ensayo de detectar un cambio en el grado de PEGilación, se diluyeron en plasma humano dos muestras de FVIII conjugado con diferentes reactivos de PEG que mostraban diferentes grados de PEGilación, y se midió la detección de las moléculas.

Las muestras se diluyeron en el intervalo de 5 a 1 µg/ml y se cargaron en gradiente de geles de tris-acetato de SDS-poliacrilamida al 3 - 8% seguido de un análisis por inmunotransferencia Western. El grado de PEGilación (GP) del conjugado estable de PEG-FVIII de 20 kDa es de 3,7 (Figura 21 A), el del escindible con el mismo tipo de PEG es de 6 (Figura 21 B).

Como se muestra en la Figura 21, un mayor grado de PEGilación dio como resultado una señal más fuerte usando las mismas condiciones de desarrollo.

Estos resultados muestran que el nuevo procedimiento para rastrear proteínas PEGiladas en estudios farmacocinéticos descrito en este documento puede detectar cambios en su estructura de dominio y en el grado de PEGilación.

Se espera que a los expertos en la materia se les ocurran numerosas modificaciones y variaciones de la invención según se establece en los anteriores ejemplos ilustrativos. Consecuentemente, sólo deberían aplicarse a la invención las limitaciones que aparecen en las reivindicaciones anexas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la determinación del número de moléculas poliméricas solubles en agua unidas a una proteína o a un complejo proteico en un conjugado de polímero-proteína, que comprende las etapas de detectar la unión entre
- (i) un conjugado de polímero-proteína con uno o más polímeros unidos a la proteína, y
- 10 (ii) un anticuerpo que se une específicamente a dicho polímero, siendo dicho anticuerpo detectable cuando está unido a dicho conjugado de polímero-proteína,
- en el que el número de polímeros del conjugado de polímero-proteína se correlaciona con los niveles de anticuerpo detectado unido al conjugado de polímero-proteína cuando se compara con un control conocido.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende un marcador detectable.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el marcador detectable se elige del grupo que consiste en una enzima, un marcador radiactivo, un fluoróforo, un reactivo denso en electrones, biotina, digoxigenina, haptenos y proteínas que se hacen detectables mediante la adición de cualquiera de estos marcadores.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el conjugado de polímero-proteína está unido a una matriz portadora antes de su unión al anticuerpo.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la matriz se elige del grupo que consiste en un microportador, una partícula, una membrana, una tira, un papel, una película, una microesfera o una placa.
6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el nivel de anticuerpo detectado se mide como la absorbancia del marcador detectable.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el conjugado de polímero-proteína se aísla usando una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se transfiere a una membrana antes de la detección.
- 35 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el número de polímeros en el conjugado de polímero-proteína se calcula basándose en el peso molecular del conjugado de polímero-proteína en comparación con un control conocido.
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el peso molecular del complejo de polímero-proteína se correlaciona con la subunidad de proteína que comprende la molécula polimérica.
- 40 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la proteína o el complejo proteico es un factor de coagulación sanguíneo o un complejo con un factor de coagulación sanguíneo.
- 45 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el factor de coagulación sanguíneo o el complejo con un factor de coagulación sanguíneo es humano.
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el factor de coagulación sanguíneo se elige del grupo que consiste en Factor II, Factor III, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, Factor de von Willebrand, proteína C y antitrombina III.
- 50 13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el complejo con el factor de coagulación sanguíneo es Factor VIII:VWF.
- 55 14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el polímero soluble en agua es escindible.
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el polímero soluble en agua es hidrolizable.
- 60 16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el polímero soluble en agua se elige del grupo que consiste en polialquilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol poliolefinico, polivinilpirrolidona, polihidroxialquilmetacrilamida, polihidroxialquilmetacrilato, polisacáridos, poli- $\alpha$ -hidroxiácido, alcohol polivinílico, polifosfasfaceno, polioxazolina y poli-N-acriloilmorfolino.
- 65

17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG) o un derivado del mismo.
- 5 18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el PEG es desde 3 hasta 100 kDa.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el PEG tiene un peso molecular en un intervalo desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 60 kDa.
- 10 20. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el PEG tiene un peso molecular en un intervalo desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 40 kDa.
21. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el PEG tiene un peso molecular en un intervalo desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 15 kDa.
- 15 22. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el PEG tiene un peso molecular en un intervalo desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 10 kDa.
- 20 23. Un procedimiento para la determinación del número de moléculas poliméricas solubles en agua unidas a una proteína o a un complejo proteico que comprende  
poner en contacto dicho polímero con un anticuerpo que se une específicamente a dicho polímero, siendo dicho anticuerpo detectable cuando está unido a dicho polímero,  
25 en el que el número de polímeros unidos al anticuerpo se correlaciona con los niveles de anticuerpo detectado unido cuando se compara con un control conocido.
24. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
- 30 25. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Fig. 1A

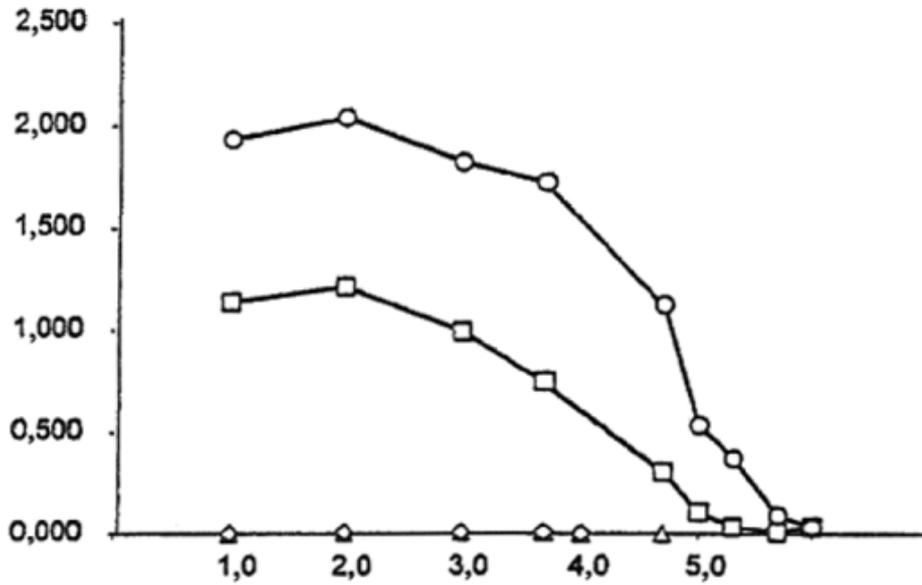


Fig. 1B

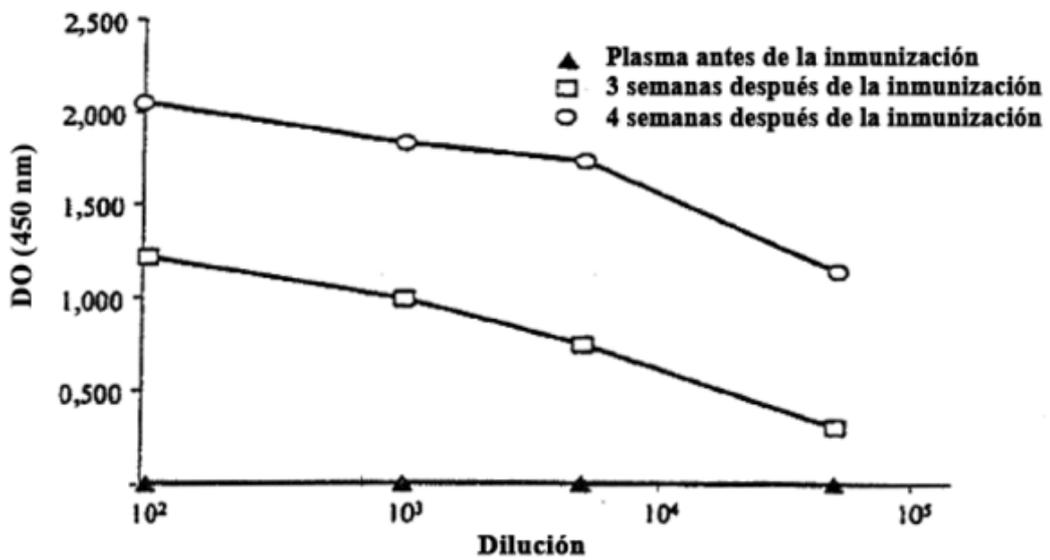


Figura 2A

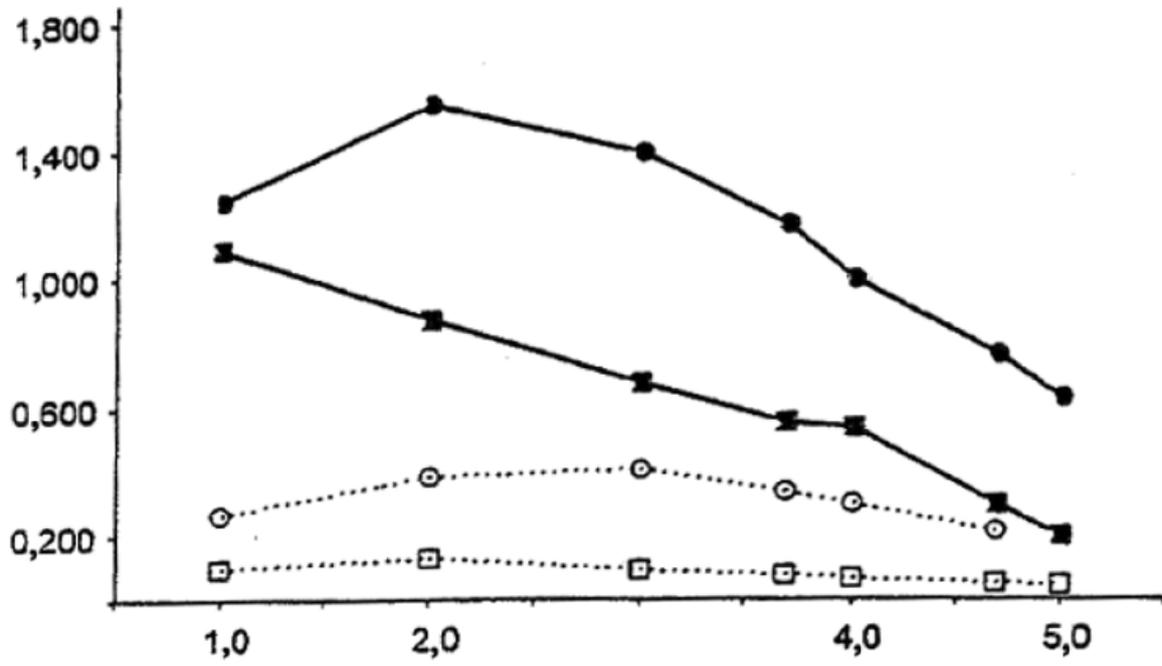


Fig. 2B

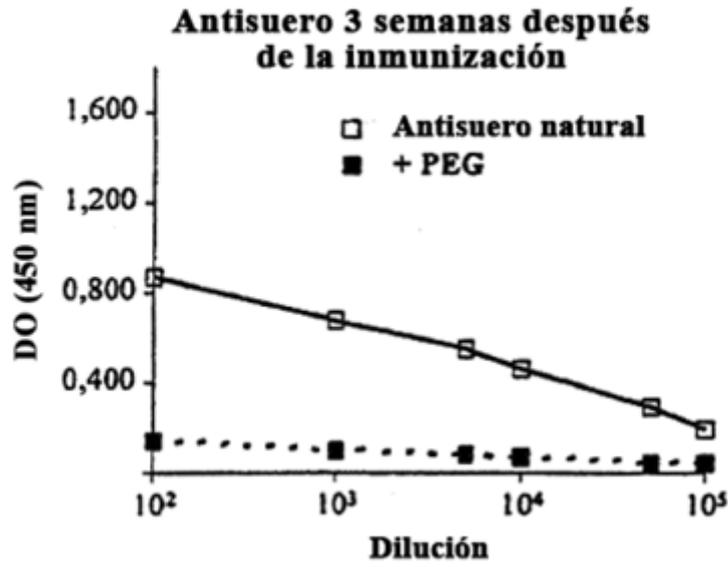
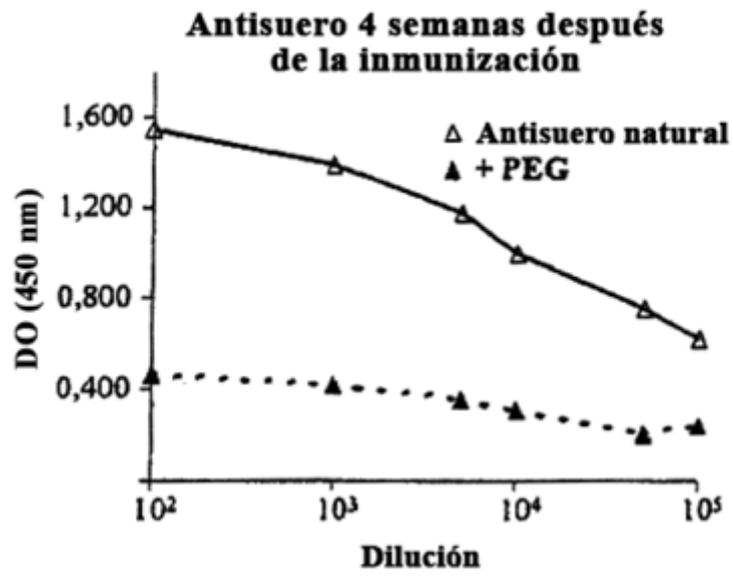


Fig. 2C



**Figura 3**

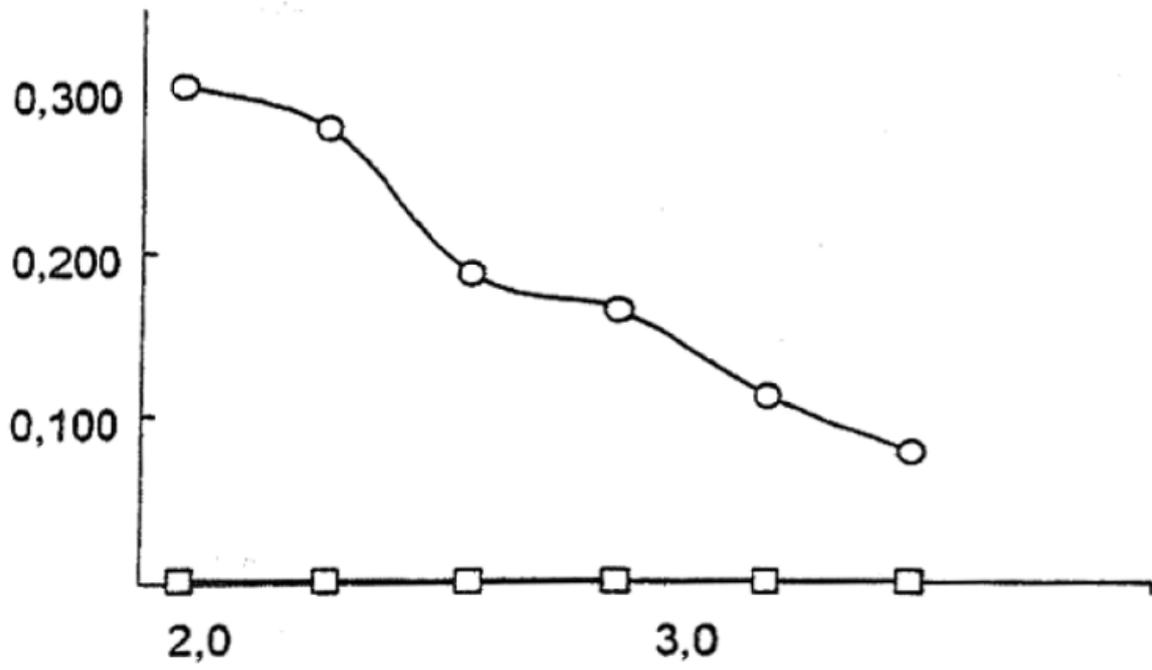


Figura 4A

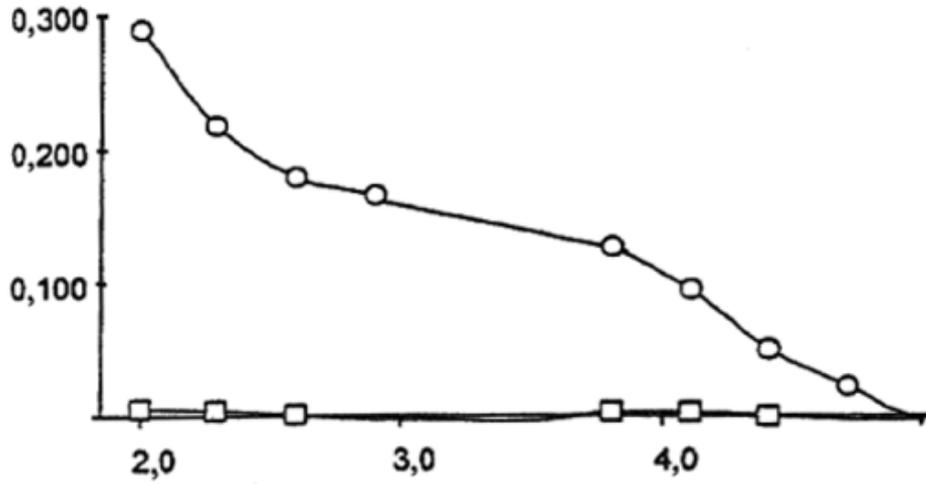
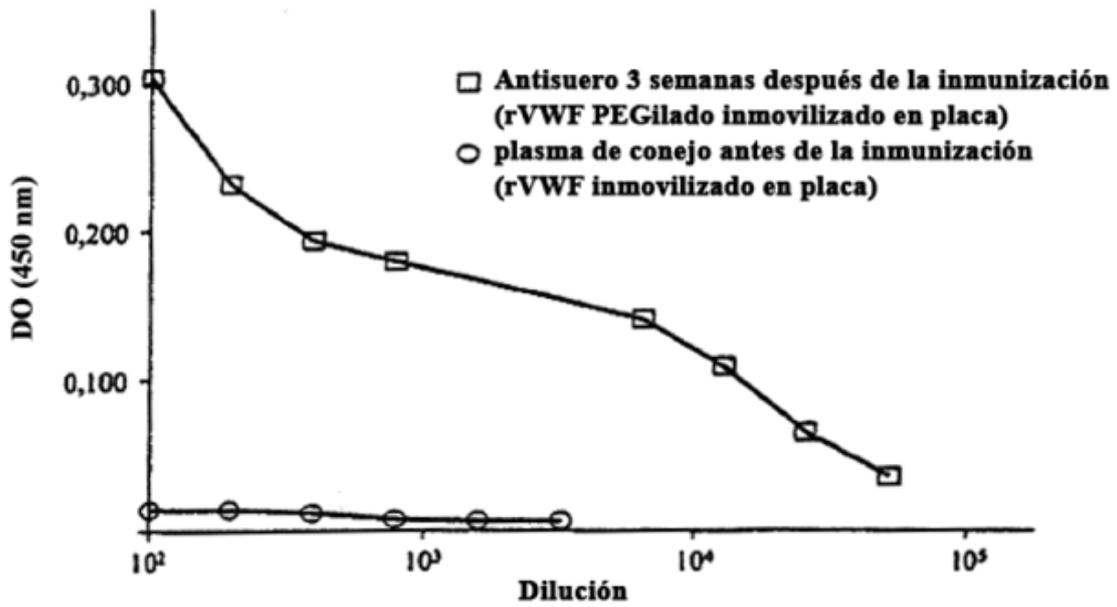


Figura 4B



**Figura 5A**

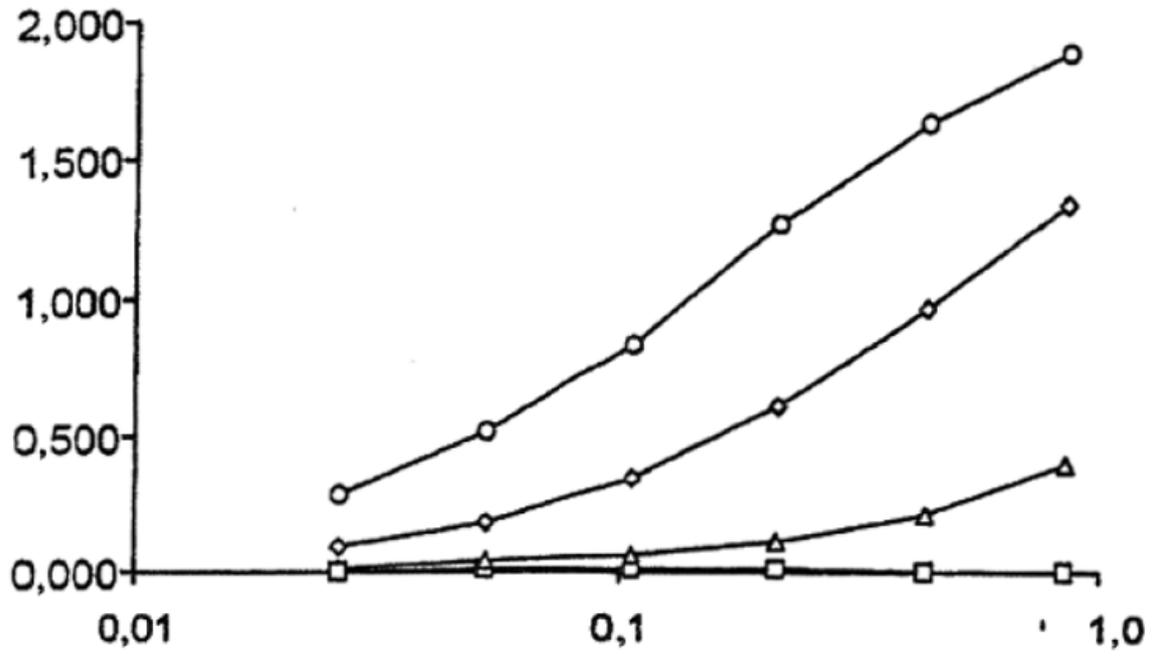
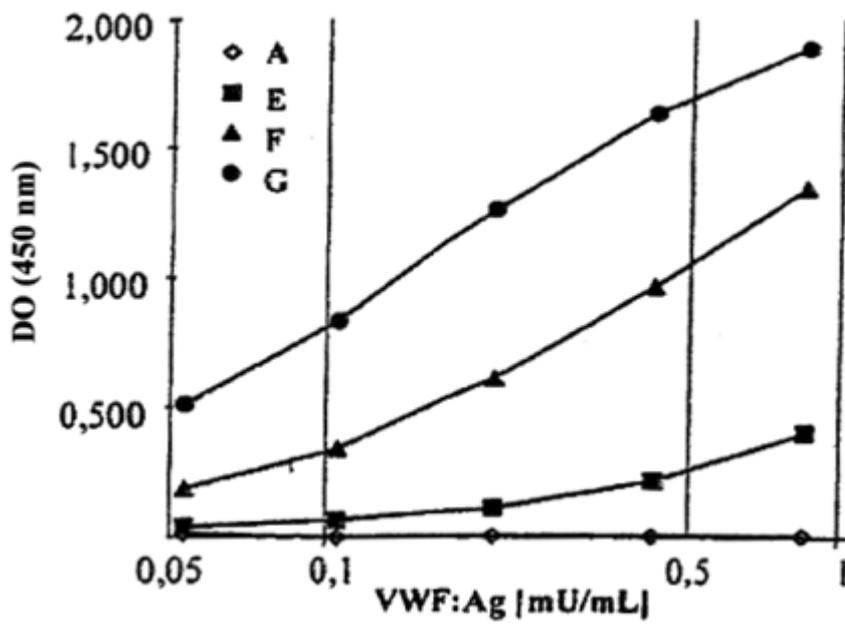


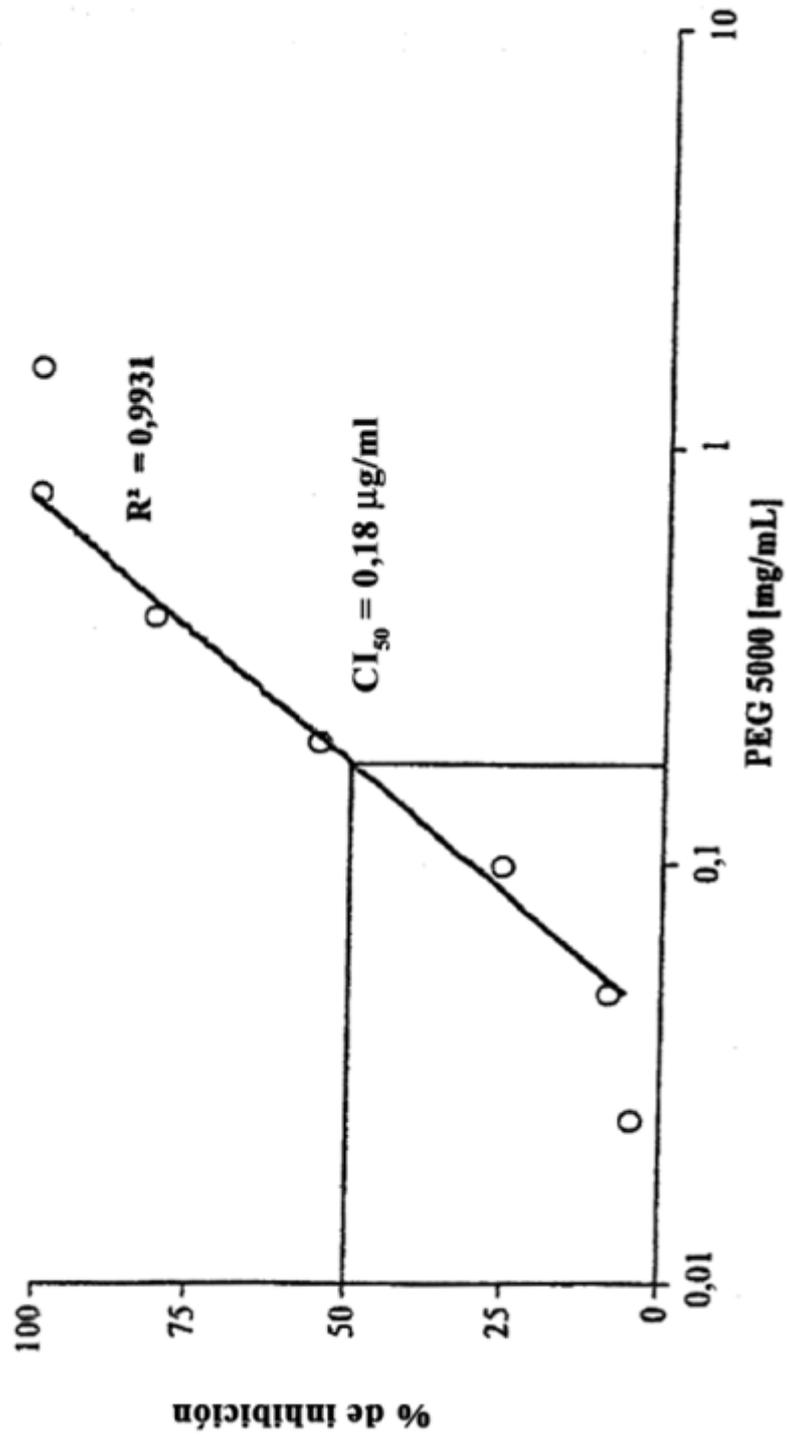
Fig. 5B



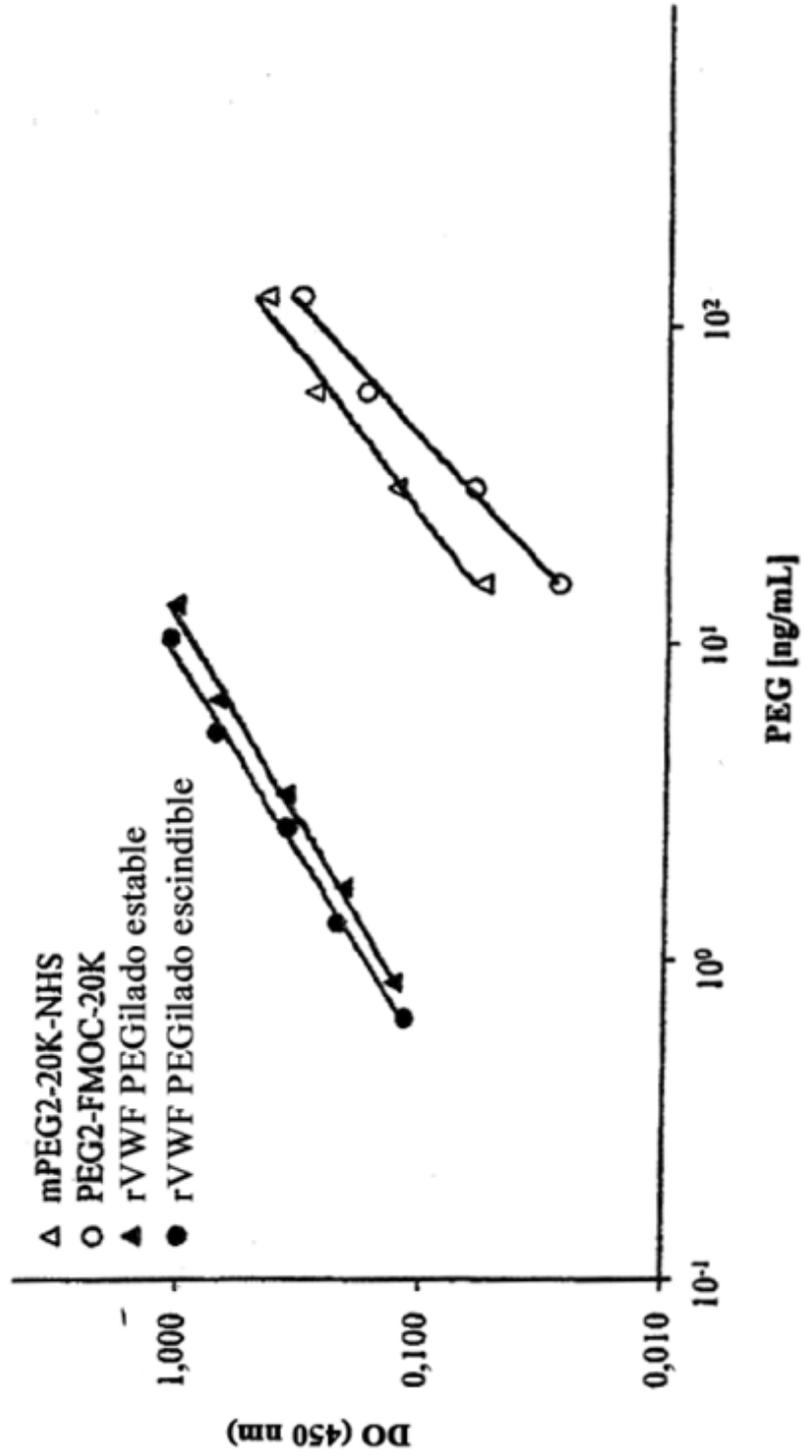
Fig. 5C



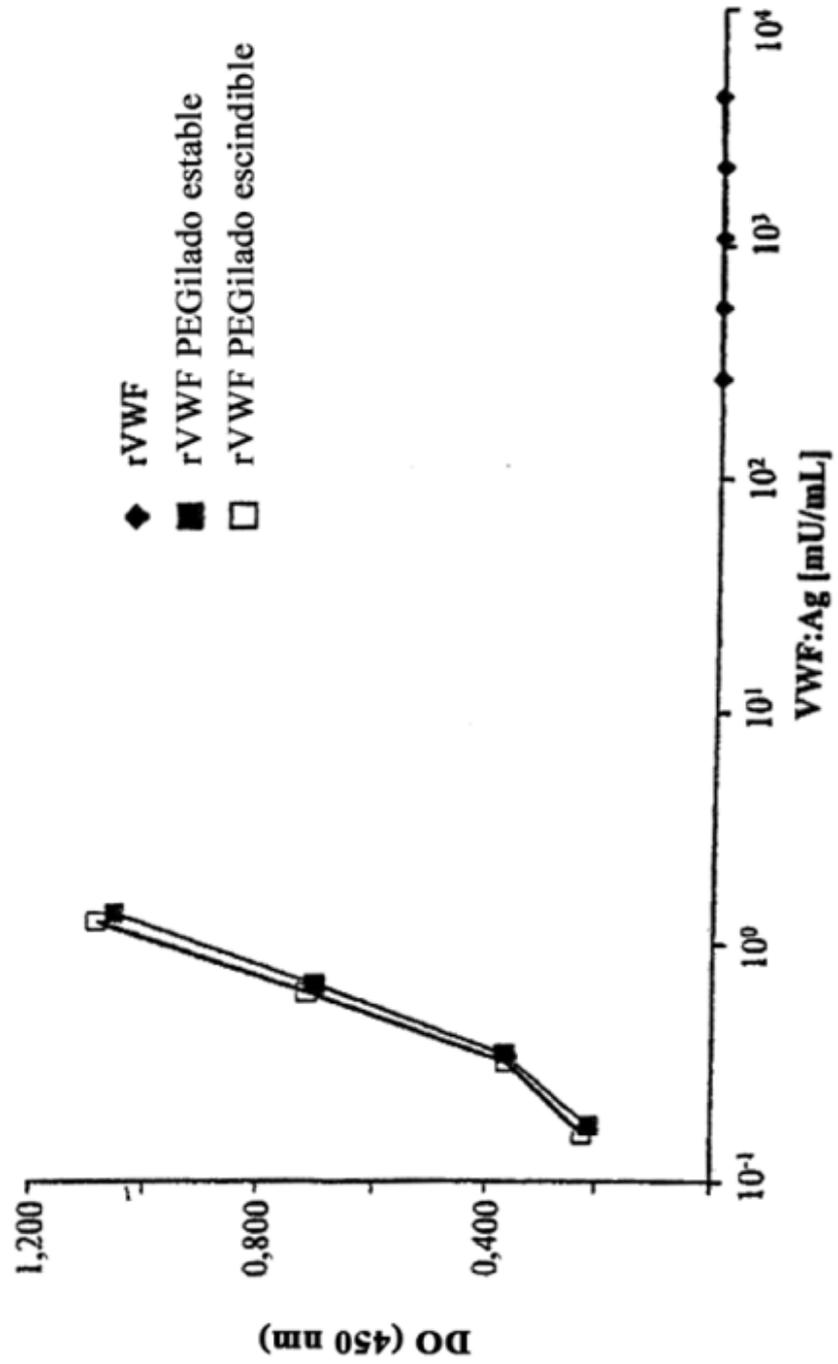
**Figura 6.**  
**Inhibición del ELISA del rVWF-PEG con PEG 5.000**



**Figura 7.**  
**Curvas de dosis respuesta del ELISA de PEG-PEG**



**Figura 8.**  
**Especificidad del ELISA de PEG-PEG**



**Figura 9.**  
**Solidez del ELISA del PEG-proteína según se muestra con rVWF PEGilado estable**

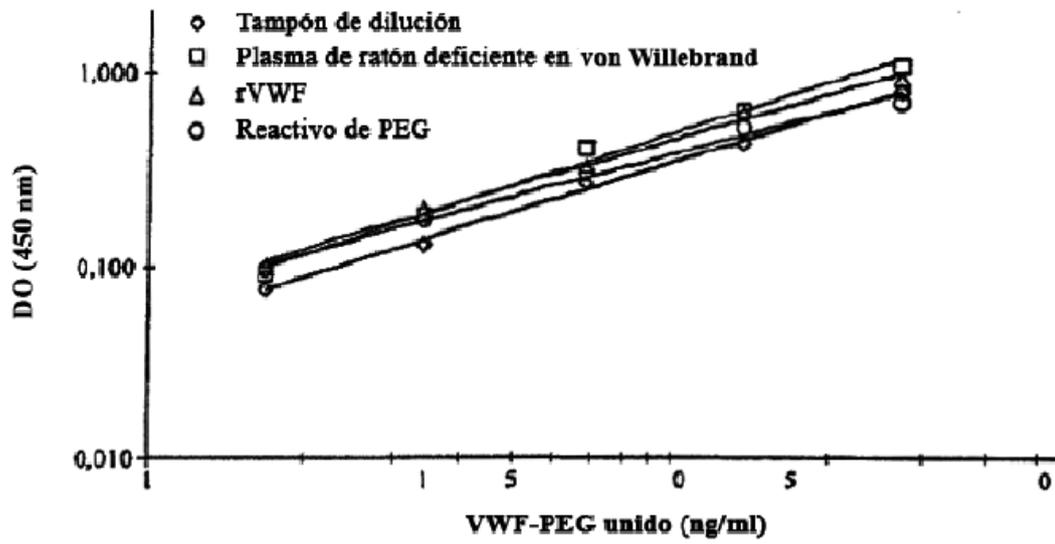
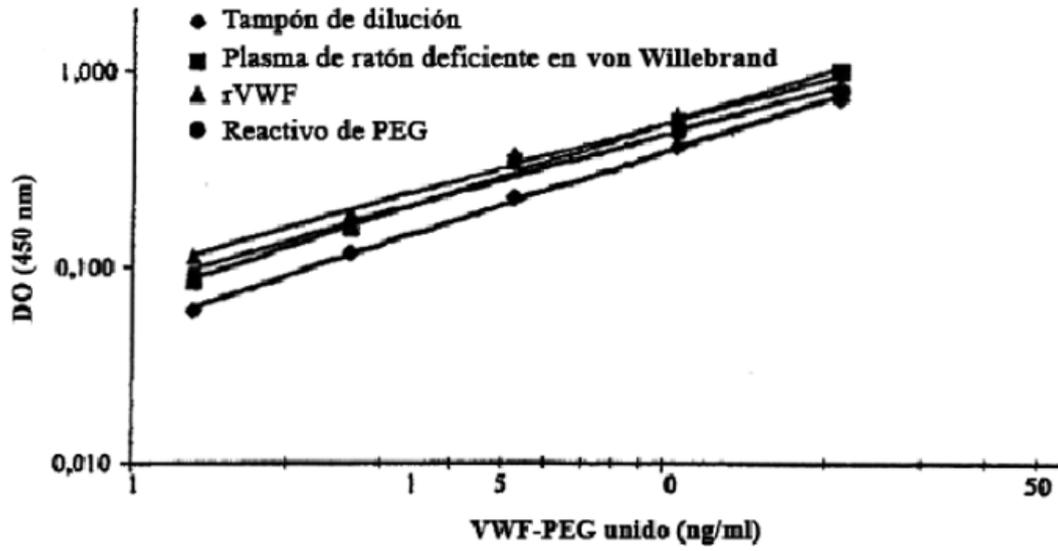
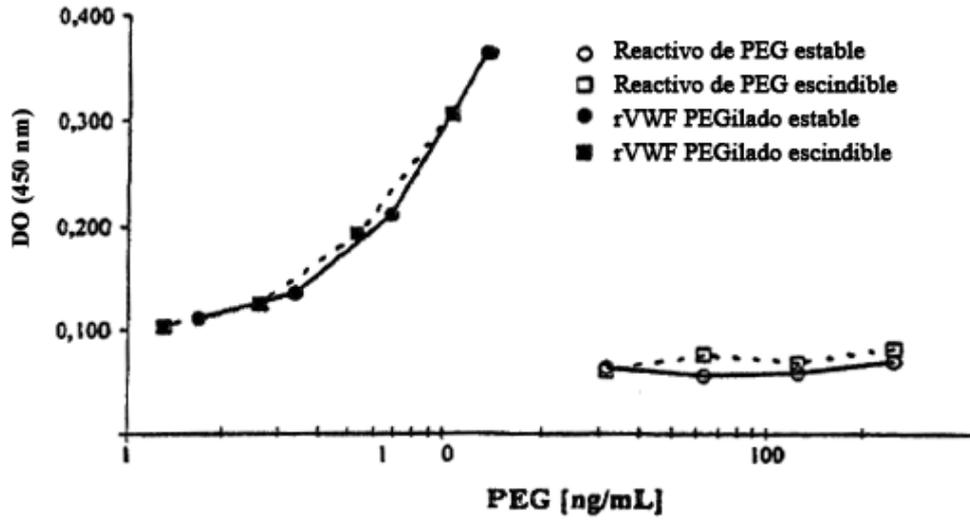


Figura 10.

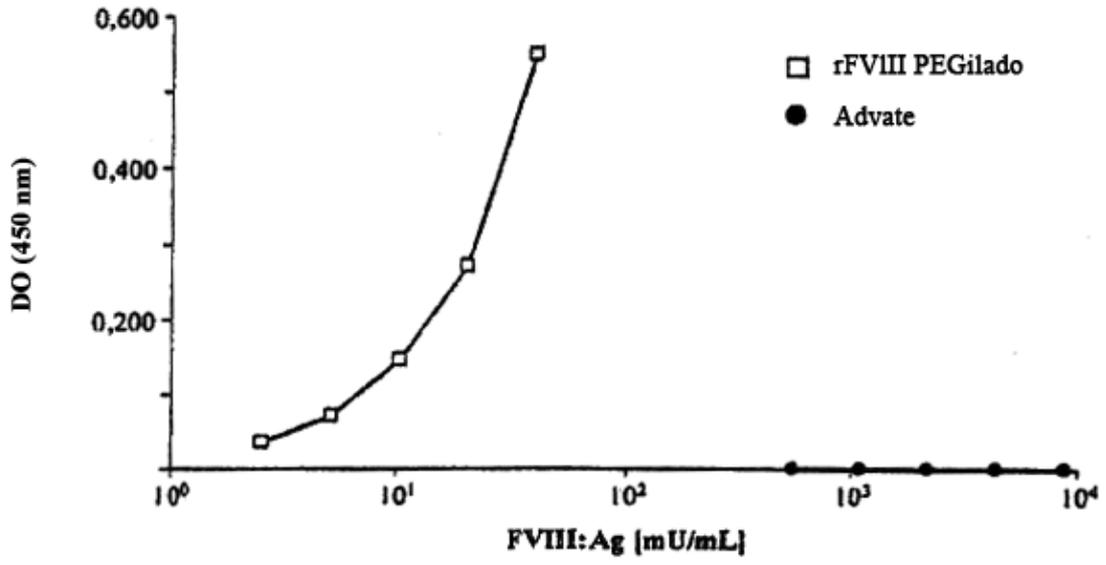
Solidez del ELISA del PEG-proteína según se muestra con rVWF PEGilado escindible



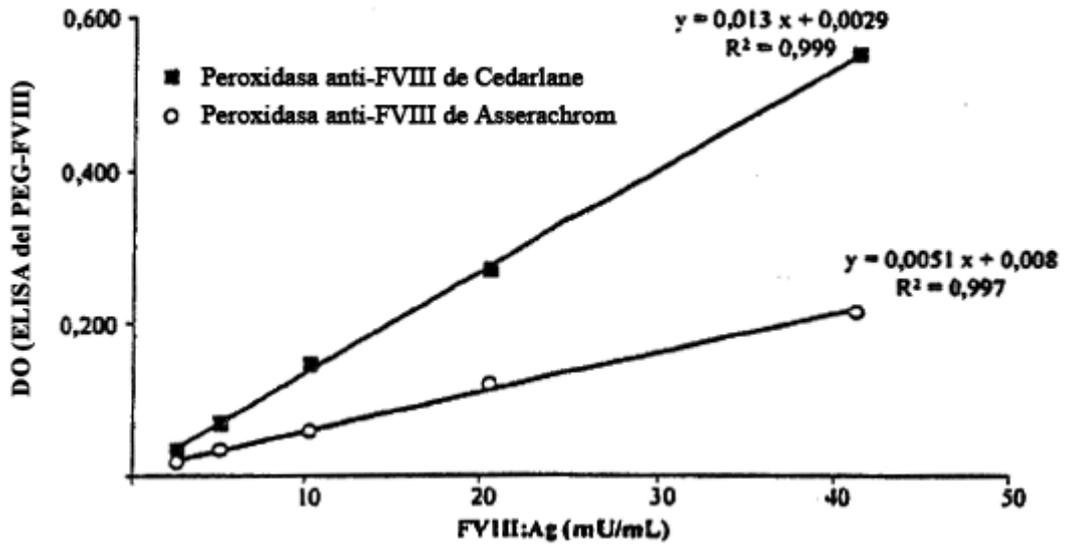
**Figura 11.**  
**Especificidad del ELISA del PEG-proteína para el PEG unido a proteína según se muestra con rVWF PEGilado**



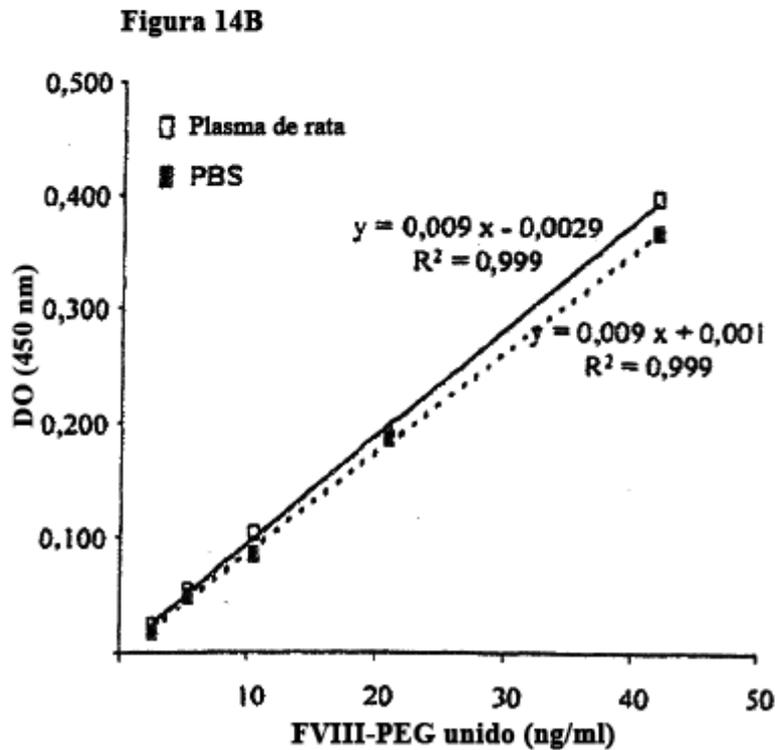
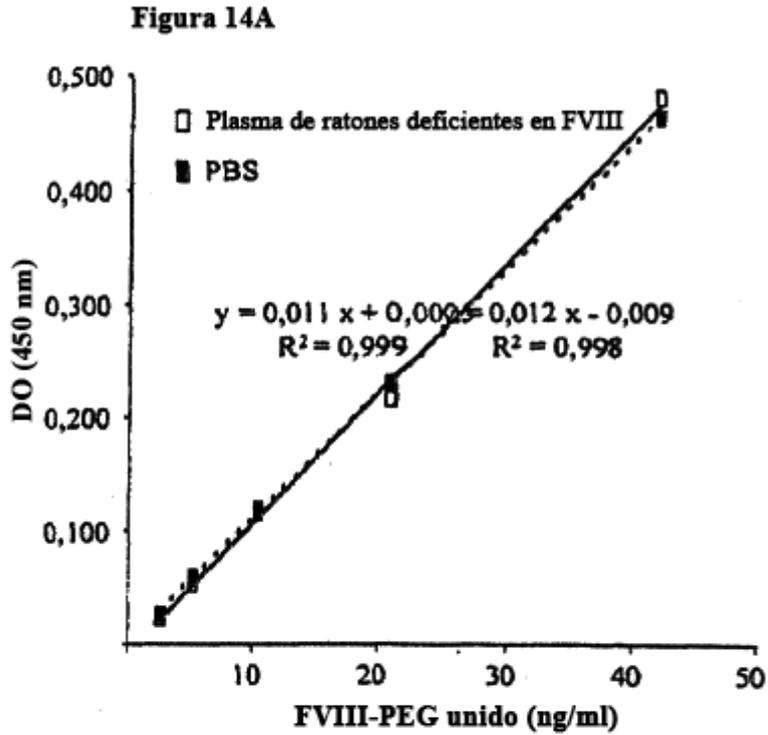
**Figura 12.**  
**Especificidad del ELISA del PEG-rFVIII**



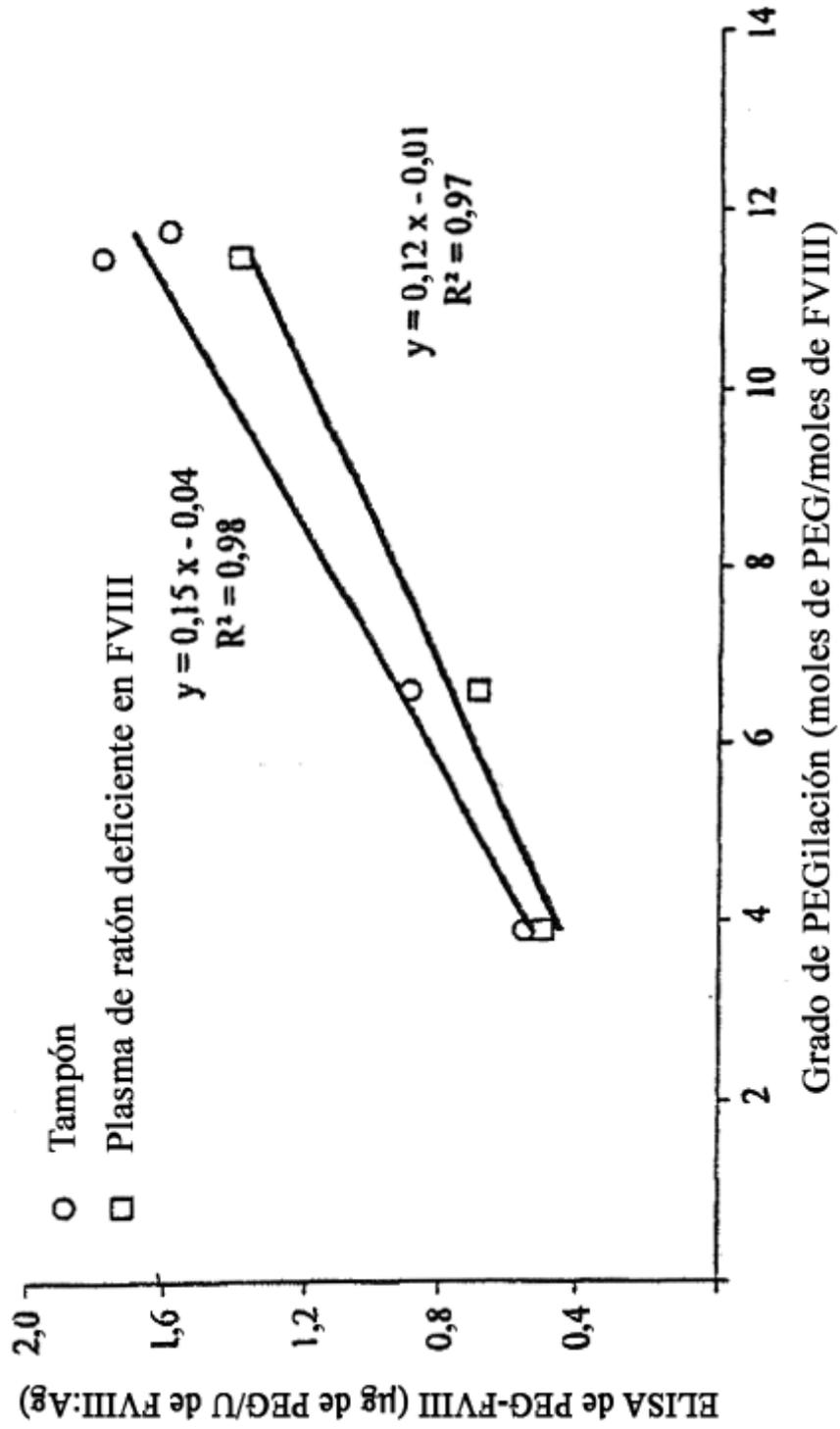
**Figura 13.**  
**Influencia de los diferentes conjugados de peroxidasa anti-FVIII en el rendimiento del ensayo**



**Figura 14.**  
**ELISA del PEG-rFVIII en el plasma de ratones deficientes en FVIII y en plasma de rata**



**Figura 15.**  
**Medición de preparaciones de rFVIII PEGilado con diferentes grados de PEGilación**



**Figura 16.**  
**Influencia del PEG libre sobre el ELISA de PEG-rFVIII**

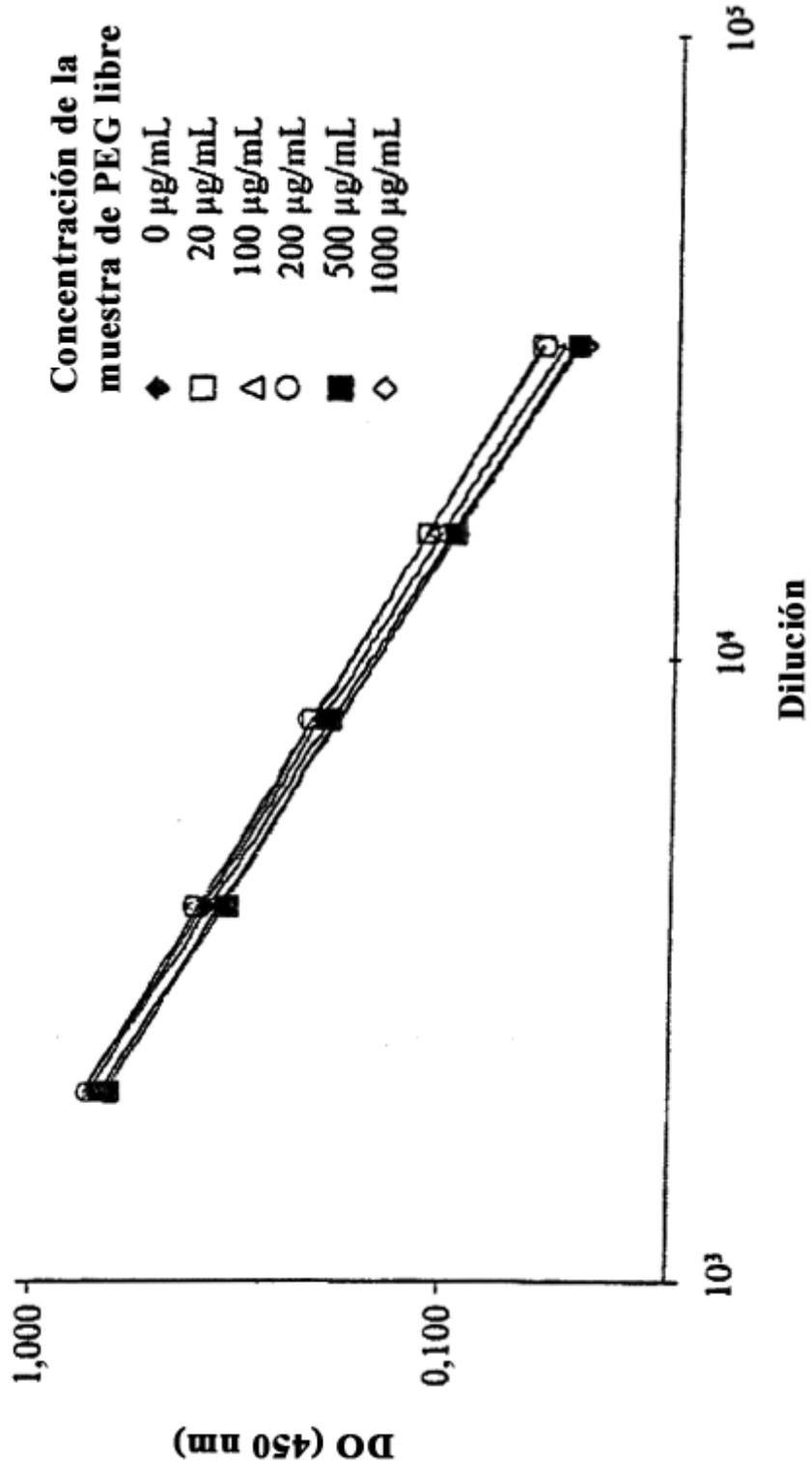


Figura 17.

Medición de la liberación de PEG desde una preparación de rFVIII PEGilado escindible

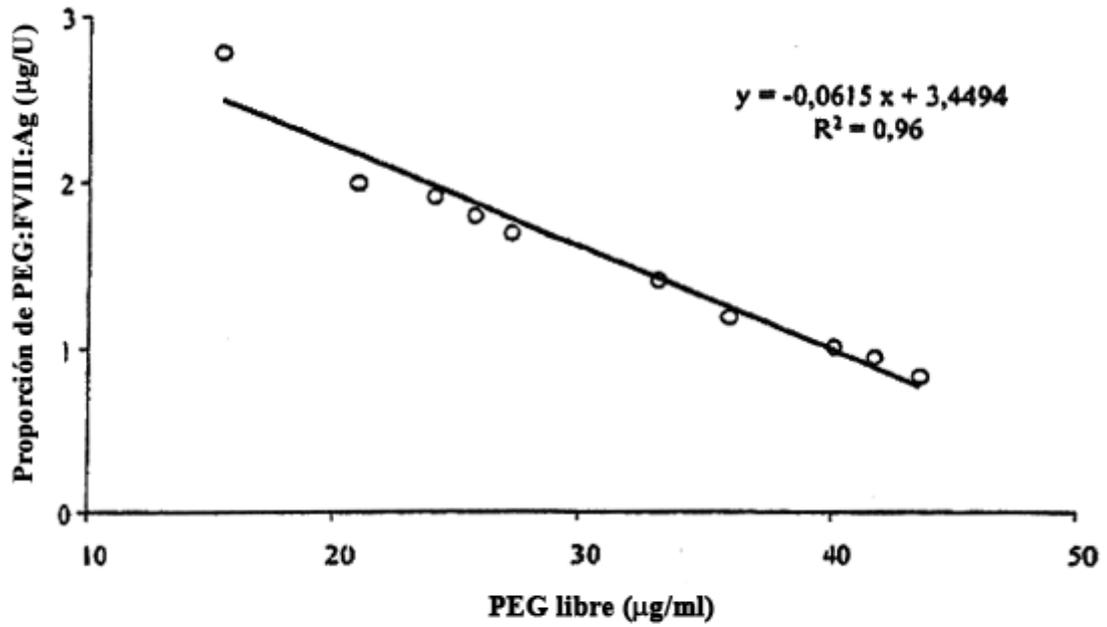


Figura 18

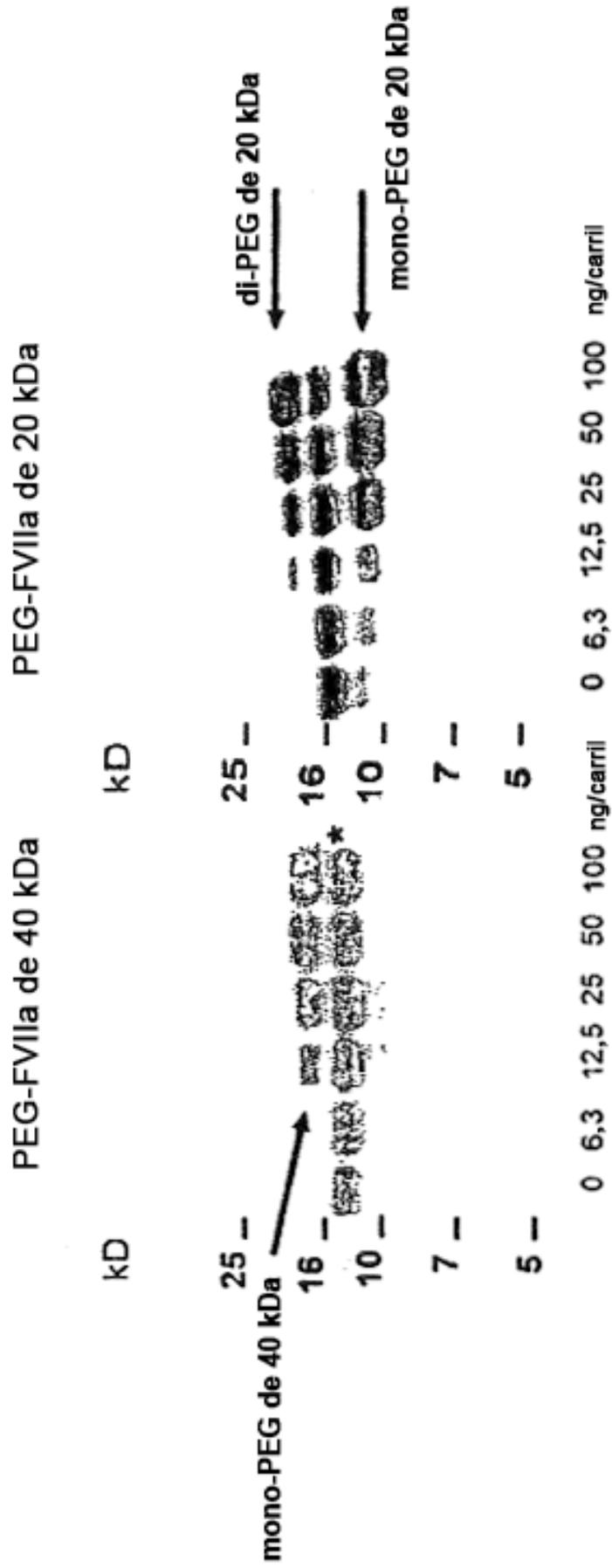


Figura 19A

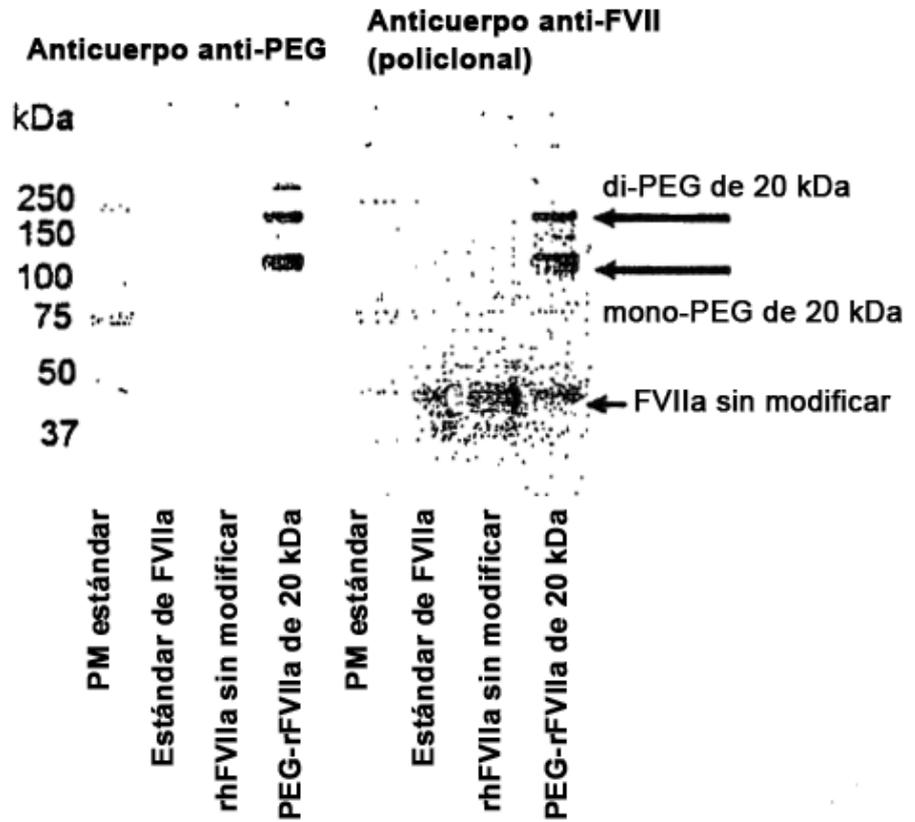
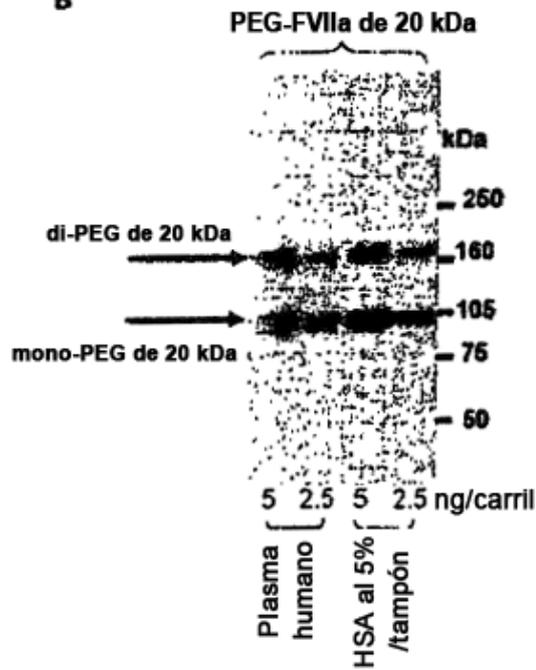
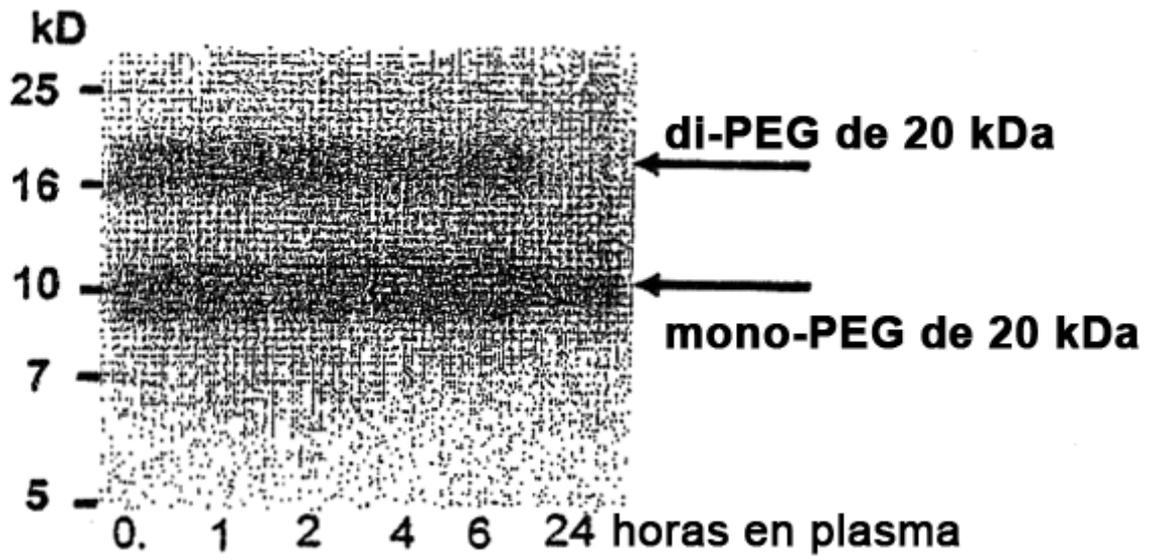


Figura 19B

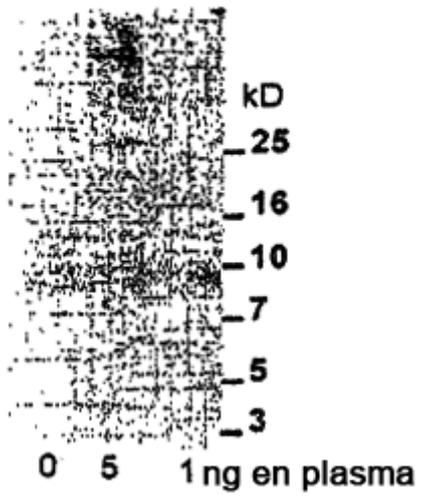


**Figura 20**



**Figura 21A**

**PEG-FVIII estable, GP = 3,7**



**Figura 21B**

**PEG-FVIII escindible, GP = 6**

