(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 531 934**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2007** **E 07803166 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014** **EP 2059527**

(54) Título: **Glicoproteínas modificadas**

(30) Prioridad:

01.09.2006 EP 06120000
02.02.2007 EP 07101674

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2015

(73) Titular/es:

NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
Thurgauerstrasse 36/38
8050 Zürich , CH

(72) Inventor/es:

BEHRENS, CARSTEN

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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).

ES 2 531 934 T3

DESCRIPCIÓN

Glicoproteínas modificadas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la preparación de fármacos mejorados, especialmente a la preparación de glicoproteínas modificadas que tienen propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas mejoradas.

Antecedentes de la invención

Las proteínas de origen biológico son muy prometedoras como agentes terapéuticos ya que con frecuencia presentan una alta eficacia y alta selectividad hacia sus ligandos naturales. Ser de origen biológico aumenta la probabilidad de que no sean tóxicas y por tanto de que sean más seguras de usar que los fármacos moleculares pequeños convencionales, ya que el organismo ya presenta mecanismos de aclaramiento bien definidos así como rutas metabólicas para su eliminación. Esto, en combinación con el hecho de que ahora pueden producirse proteínas mediante técnicas de ADN recombinante en una variedad de sistemas de expresión diferentes, lo que permite la producción a gran escala, hace que las proteínas sean candidatos a fármacos ideales. Sin embargo, las proteínas terapéuticamente interesantes tales como hormonas, receptores solubles, citocinas, enzimas, etc., con frecuencia tienen una semivida de circulación corta en el organismo, lo que reduce generalmente su utilidad terapéutica.

Las proteínas terapéuticas se eliminan de la circulación por varias vías. Para algunas proteínas farmacológicamente activas, hay receptores específicos que median en la eliminación de la circulación. Las proteínas que están glicosiladas pueden aclararse mediante receptores de tipo lectina en el hígado, que sólo muestran especificidad por la parte de hidrato de carbono de esas moléculas. También se ha documentado el aclaramiento no específico por parte del riñón de proteínas y péptidos (particularmente proteínas y péptidos no glicosilados) de menos de aproximadamente 50 kDa. Se ha indicado que las asialo-glicoproteínas se aclaran más rápidamente por el hígado que las glicoproteínas nativas o las proteínas que carecen de glicosilación (Bocci (1990) Advanced Drug Delivery Reviews 4: 149). Las proteínas terapéuticas también se aclaran de la circulación mediante el sistema inmunitario en caso de que no sean completamente idénticas a las proteínas autólogas, ya que incluso pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos o la estructura tridimensional pueden hacer que una proteína terapéutica sea inmunogénica. La respuesta inmunitaria inducida por una proteína terapéutica puede tener además diversos efectos no deseados aparte de la eliminación acelerada de la circulación: los anticuerpos pueden interferir con, o bloquear, el efecto terapéutico mediante impedimento estérico del acceso a sitios de unión en la proteína terapéutica, los anticuerpos inducidos pueden reaccionar de manera cruzada con proteínas autólogas y de ese modo dar como resultado reacciones autoinmunitarias, etc. También resulta interesante modificar proteínas terapéuticas para dirigirlas a determinadas células, órganos o tejidos. La conjugación o fusión de proteínas a moléculas de ligandos que tienen alta afinidad por moléculas presentes en células o tejidos especializados es una manera conocida de lograr este efecto.

El documento EP 0605963 da a conocer la preparación de glicoproteínas modificadas con polímero, en la que el enlace entre el polímero y la glicoproteína es o bien una hidrazona o bien una oxima, obtenida haciendo reaccionar un aldehído de la glicoproteína con un polímero que tiene un grupo reactivo o bien hidrazina o bien oxiamina.

El documento WO 2005014024 proporciona conjugados que comprenden un polímero y una proteína unidos mediante un enlace oxima.

Por tanto, existe una necesidad general de proporcionar métodos de preparación de proteínas modificadas (terapéuticas) que muestren una semivida en suero prolongada y/o inmunogenicidad reducida y/o propiedades farmacológicas mejoradas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona la prolongación de la semivida en circulación de derivados de glicoproteína solubles, reduciendo así la cantidad de material inyectado y la frecuencia de inyección requerida para mantener niveles terapéuticamente eficaces de glicoproteína circulante para el tratamiento o la profilaxis. La corta semivida en plasma *in vivo* de determinadas glicoproteínas terapéuticamente activas es indeseable debido a la frecuencia y la cantidad de proteína soluble que se requerirá en el tratamiento o la profilaxis. La presente invención proporciona medios para prolongar la semivida en circulación de tales glicoproteínas con un cambio eficaz en la estructura de la glicoproteína y con el mantenimiento sustancial de la actividad biológica.

La presente invención proporciona métodos convenientes de preparación de derivados de glicoproteína, en los que se introduce una oxima de un resto polimérico en un grupo glicosilo en la glicoproteína, en los que dicha glicoproteína modificada tiene propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la glicoproteína de partida.

Por tanto, la invención se refiere a un método para preparar una glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)}$$

en la que M y opcionalmente M' son independientemente un resto polimérico para aumentar el peso molecular de la glicoproteína modificada, y en la que L y L' representan independientemente un grupo de unión bivalente, y en la que P representa una glicoproteína que comprende uno o más extremos terminales de glucano oxidado de dicha glicoproteína, O, N, C y H representan átomos de oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógeno respectivamente, n es 1-10, m es 0-50, comprendiendo el método las etapas de

a) oxidar con iones peryodato al menos un extremo terminal de glicano presente en la glicoproteína P*, en la que P* representa una pluralidad de glicoformas para obtener la glicoproteína $P(CHO)_{n+m}$ que contiene uno o más grupos aldehído, y

b) hacer reaccionar $P(CHO)_{n+m}$ con $M\text{-}L\text{-}O\text{-}NH_2$ para obtener la glicoproteína modificada con la estructura $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CHO)_m$, y

c) hacer reaccionar cualquier grupo aldehído que no ha reaccionado en la glicoproteína con estructura $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CHO)_m$ con $M'\text{-}L'\text{-}O\text{-}NH_2$ para obtener la glicoproteína modificada con la estructura $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m$,

en el que dichos iones peryodato están presentes en una cantidad de 0,1-5 equivalentes con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína, y en el que dicha glicoproteína modificada tiene propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la glicoproteína de partida P* y ha conservado su actividad funcional.

Debe entenderse que el grupo o los grupos aldehído en $P\text{-}(CHO)_{n+m}$ pueden existir de manera transitoria en su(s) forma(s) de diol geminal, o como hemiacetal(es).

También tiene que entenderse mediante P- y -P- que la glicoproteína comprende uno o más extremos terminales de glucano oxidado de dicha glicoproteína, en la que los enlaces químicos son con dichos uno o más extremos terminales de glucano.

Descripción detallada de la invención

Por "una pluralidad de glicoproteínas modificadas" debe entenderse que moléculas de glicoproteína modificada individuales dentro de una preparación pueden no tener exactamente la misma estructura química, que puede variar considerablemente dentro de moléculas de glicoproteína individuales. La glicoproteína de partida P* existe normalmente en diferentes glicoformas. Por "glicoformas" quiere decirse isoformas proteicas de la misma proteína que tienen diferente polisacáridos unidos a las mismas, mediante modificaciones o bien postraduccionales o bien cotraduccionales. Además, algunas moléculas con una preparación pueden no estar modificadas en absoluto, y algunas moléculas pueden estar modificadas con más de un resto polimérico, que de nuevo puede modificarse en extremos terminales de glicano diferentes de cada glicoproteína individual. Por tanto, P* debe considerarse como una pluralidad de glicoformas de proteína P.

Los términos "extremo terminal de glicano no reductor" o "extremos terminales de glicano no reductores" se refieren al extremo o los extremos terminales de un oligosacárido que no se reduce usando, por ejemplo, disolución de Fehling o reactivos de Tollens, al contrario que el extremo reductor de un oligosacárido, que se oxidan con estos reactivos. En glicoproteínas, los oligosacáridos están habitualmente unidos a la proteína en su extremo terminal reductor por medio de un enlace glicósido o glicosamino. Los extremos no reductores del oligosacárido incluyen, como ilustración y no como limitación, residuos de ácidos siálicos terminales en N y O-glicanos complejos; residuos de ácidos siálicos terminales en N-glicanos híbridos; residuos de manosa terminales en N-glicanos con alto contenido en manosa; residuos de galactosa terminales en N y O-glicanos complejos; residuos de galactosa terminales en N-glicanos híbridos; residuos de N-acetilgalactosa terminales en N y O-glicanos complejos; residuos de N-acetilgalactosa terminales en N-glicanos híbridos; residuos de N-acetilglucosamina terminales en N y O-glicanos complejos; residuos de N-acetilglucosamina terminales en N-glicanos híbridos; residuos de manosa terminales en residuos de núcleo de trimanosa completa o parcialmente expuestos; residuos de fucosa terminales, incluyendo residuos de fucosa de núcleo; residuos de glucosa y xilosa terminales.

La glicoproteína de partida P* puede recortarse opcionalmente con sialidasas, galactosidasas, N-acetilglucosaminidasas, manosidasas o fucosidasas, si se prefiere un resto de glicano terminal particular para la reacción con peryodato. Alternativamente puede remodelarse el resto de glicano usando por ejemplo sialiltransferasa, galactosiltransferasas, N-acetilglucosaminosiltransferasas; N-acetilgalactosaminosiltransferasas; manosiltransferasas y donadores de azúcares respectivos tales como CMP-Sia; UDP-Gal; GDP-Fuc, etc.

El uso de peryodato para oxidar extremos terminales de glicano de glicoproteínas está bien documentado y se ha usado como método general para preparar conjugados de proteína. La solicitud de patente internacional con número de publicación WO 06/071801 describe la oxidación de extremos terminales de glicano en factor de von Willebrand y su aplicación para preparar versiones pegiladas de la proteína. La solicitud de patente internacional con número de publicación WO 00/23114 describe una metodología para preparar versiones pegiladas de interferón beta-1a, y la solicitud de patente internacional con número de publicación WO 92/16555 describe varios métodos para conjugar restos de PEG a proteínas, en los que se menciona la formación de funciones aldehído en extremos terminales de glicano usando peryodato.

Además de escindir dioles en restos de azúcar, también se sabe que el peryodato oxida cadenas laterales de aminoácidos tales como metionina, y escinde aminoácidos N-terminales que contienen restos de aminoalcoholes tales como serina y treonina. En algunos cases, la oxidación de la cadena lateral de metionina puede conducir a cambios en el perfil biológico de la proteína y en particular a cambios en la actividad biológica. Tal como se menciona en Kornfelt, T; Persson, E. y Palm, L.; Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 363, n.º 1, págs. 43-54 (1999), la forma activada de factor de coagulación FVII recombinante (por ejemplo FVIIa) ha demostrado ser altamente sensible hacia la oxidación de metionina. Tras la oxidación de metionina 298 y 306 con peróxido de hidrógeno, la unión de FVIIa a factor tisular soluble (TF) es más débil, tal como se demuestra por un aumento de tres veces en la constante de disociación. Además, la actividad amidolítica en el FVIIa oxidado en metionina en complejo con TF soluble es de tan sólo el 80% en comparación con la del complejo FVIIa-TF nativo.

De manera no sorprendente, y en línea con estas observaciones, se ha encontrado que cuando se usan métodos de conjugación mediada por peryodato como los descritos generalmente en la bibliografía y mencionados anteriormente, se observa una pérdida significativa, y en algunos casos completa, en la actividad peptidolítica de FVIIa, según se mide mediante su capacidad para escindir sustratos peptídicos conocidos. Por tanto los métodos conocidos para la conjugación mediada por peryodato de, por ejemplo, restos de PEG tiene un uso muy limitado cuando se trabaja con glicoproteínas que son altamente sensibles a la oxidación. La presente invención describe métodos generales para sortear este problema y así da a conocer por primera vez time métodos que permiten la preparación de glicoproteínas conjugadas con oxima con actividad funcionales conservadas.

Cuando se aplican bajas concentraciones, y en términos de equivalentes, una cantidad casi estequiométrica de peryodato con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína, puede conservarse la actividad biológica. Sorprendentemente, la oxidación con una cantidad estequiométrica de iones peryodato y la posterior química de conjugación avanzaron dentro de intervalos de tiempo aceptables, y proporcionan conjugados de proteína funcionales biológicos con una alta pureza y con rendimientos de moderados a buenos.

En una realización la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada, en el que dicha glicoproteína está N-glicosilada y/u O-glicosilada y/o contiene restos de ácido siálico.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada, método que comprende la etapa adicional de confirmar que la glicoproteína modificada tiene propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la glicoproteína de partida.

En una realización la propiedad farmacológica mejorada se selecciona del grupo que consiste en biodisponibilidad aumentada, semivida *in vivo* funcional aumentada, semivida en plasma *in vivo* aumentada, inmunogenicidad reducida, resistencia a proteasa aumentada, afinidad por albúmina aumentada, afinidad por un receptor mejorada, estabilidad en almacenamiento aumentada, semivida *in vivo* funcional reducida, semivida en plasma *in vivo* reducida.

En una realización la semivida aumentada se obtiene al ser M y/o M' un grupo que aumenta el peso molecular de modo que se reduce o se suprime el aclaramiento renal y/o al ser M y/o M' un grupo que enmascara parejas de unión para receptores hepáticos.

En una realización la inmunogenicidad reducida se obtiene al ser M y/o M' un grupo que bloquea la unión de anticuerpos a sitios inmunogénicos.

En una realización la afinidad por albúmina mejorada se obtiene al ser M y/o M' un grupo que tiene alta afinidad por albúmina.

En una realización la afinidad por un receptor mejorada se obtiene al ser M y/o M' un grupo que se une específicamente a un receptor de superficie en una célula diana.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en la que M y/o M' se seleccionan del grupo que consiste en: un radical cargado orgánico de bajo peso molecular, que puede contener uno o más ácidos carboxílicos, aminas, ácidos sulfónicos, ácidos fosfónicos, o combinaciones de los mismos; una molécula hidrófila neutra de bajo peso molecular, tal como ciclodextrina u opcionalmente una cadena de polietileno ramificada; una molécula hidrófoba de bajo peso molecular tal como un ácido graso o ácido cólico o derivados de los mismos; un polietilenglicol con un peso molecular promedio de 2-40 kDa; un polímero de precisión bien definido tal como un dendrímero con una masa molecular exacta que oscila entre 700 Da y 20 kDa; un polipéptido sustancialmente no inmunogénico tal como albúmina, un anticuerpo o una parte de un anticuerpo que contiene opcionalmente un domino Fc; y un polímero orgánico de alto peso molecular.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en la que M y/o M' se seleccionan del grupo que consiste en un dendrímero, poli(óxido de alquileno) (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificado, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, poli(etileno-co-anhídrido de ácido maleico), poli(estireno-co-anhídrido de ácido maleico), dextrano, carboximetil-dextrano.

En una realización adicional, M y/o M' se seleccionan de hidroxialquil-almidón (HAS) e hidroxietil-almidón (HES) tal como los compuestos descritos en Clin Pharmacokinet 2005; 44 (7): 681-699, y dados a conocer en el documento WO 2006094810A2. En el documento WO 2005092369A2 se dan a conocer formas activadas adecuadas de HES.

En una realización adicional, M y/o M' son poli(1-hidroximetiletileno-hidroximetilformal) (PHF) o dextranos degradados similares tales como los descritos en el documento WO 2006094810A2, en el que también se dan a conocer formas activadas adecuadas de los polímeros.

En una realización adicional, M y/o M' se seleccionan de polímeros iónicos zwitteriónicos tales como los dados a conocer en el documento WO 03062290A1. En una realización específica, el polímero es la sal interna de fosfato de 2-metacriloiloxi-2'-etiltrimetilamonio (MPC).

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en la que M y/o M' se seleccionan del grupo que consiste en un ligando de unión a proteína sérica y una molécula orgánica pequeña que contiene restos que en condiciones fisiológicas altera las propiedades de carga, una estructura que inhibe la unión de glicanos a receptores, y un sustituyente neutro que impide el reconocimiento específico de glicanos.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en la que P se selecciona de FVII, FVIII, FIX, FX, FII, FV, proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular, FXI, FXII, FXIII, así como variantes de secuencia de los mismos; inmunoglobulinas, citocinas tales como interleucinas, interferones alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias incluyendo factores estimulantes de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de las plaquetas, proteína activante de fosfolipasa (PUP), insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factor de necrosis tumoral, receptores de interleucina y formas solubles de receptores de interleucina, factores de crecimiento tales como factores de crecimiento tisular, tales como TGFa o TGFp y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, eritropoyetina, hormonas pigmentarias, factores de liberación del hipotálamo, hormonas antidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del folículo, hormona estimulante del tiroides, activador de plasminógeno tisular e inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, y fragmentos de las mismas, o cualquier proteína de fusión que comprende cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente o fragmentos de las mismas.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en el que la glicoproteína es un polipéptido de factor VII.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en el que la glicoproteína tiene la secuencia de aminoácidos de factor VII humano de tipo natural.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en el que la glicoproteína es un polipéptido de factor VIII.

“Factor VIII” o “polipéptido de FVIII”, tal como se usan en el presente documento, incluyen FVIII:C, versiones de FVIII con deleción del dominio B, variantes de aminoácidos y combinaciones de los mismos.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en el que la glicoproteína modificada muestra al menos aproximadamente el 10%, tal como al menos aproximadamente el 20%, tal como al menos aproximadamente el 40%, tal como al menos aproximadamente el 60%, tal como al menos aproximadamente el 80%, tal como al menos aproximadamente el 100% de la actividad específica de polipéptido de factor VII no modificado cuando se somete a prueba en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis o ensayo de unión a TF tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en el que la glicoproteína modificada muestra una biodisponibilidad que es de al menos aproximadamente el 110% de la biodisponibilidad de la glicoproteína no modificada, tal como al menos aproximadamente el 120%, aproximadamente el 130% o al menos aproximadamente el 140% de la biodisponibilidad de la glicoproteína no modificada.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en el que la glicoproteína modificada muestra una semivida en suero que es de al menos aproximadamente el 125% de la semivida de la glicoproteína no modificada, tal como aproximadamente el 150%, aproximadamente el 200% o al menos aproximadamente el 250% de la semivida de la glicoproteína no modificada.

En una realización adicional la presente invención se refiere a un método para preparar glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en el que dichos iones peryodato están presentes en una cantidad de menos de 20 equivalentes, tal como menos de 10 equivalentes, tal como menos de 5 equivalentes, tal como menos de 1 equivalente con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína, tal como en el intervalo de 0,1-20 equivalentes, tal como en el intervalo de 0,1-10 equivalentes, tal como en el intervalo de 0,1-5 equivalentes, tal como en el intervalo de 0,1-1 equivalentes, con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína.

Por tanto, en una realización, el número de iones peryodato están presentes en una cantidad de 10-20 equivalentes con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína. En otra realización, el número de iones peryodato están presentes en una cantidad de 5-10 equivalentes con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína. En otra realización, el número de iones peryodato están presentes en una cantidad de 2-5 equivalentes con respecto al número de

extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína. En otra realización, el número de iones peryodato están presentes en una cantidad de equivalentes que es sustancialmente igual al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína. En otra realización, el número de iones peryodato están presentes en una cantidad de 0,1-0,9 equivalentes con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína.

En otra realización, se usa una cantidad de peryodato inferior a la estequiométrica con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentados sobre la glicoproteína. En la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "polipéptido" es una molécula de una única cadena, lineal, que consiste en residuos de aminoácido unidos con enlaces peptídicos. Por tanto, el término abarca péptidos (2-10 residuos de aminoácido), oligopéptidos (11-100 residuos de aminoácido) y polipéptidos propiamente dichos (más de 100 residuos de aminoácido). Por tanto, un polipéptido es una unidad estructural, que puede ser biológicamente activa, pero también puede carecer de cualquier función. Una "proteína" es, en el presente contexto, una molécula funcional o no funcional o un complejo que comprende al menos un polipéptido, por tanto aparte de los monómeros, el término también incluye moléculas poliméricas tales como homo y heteromultímeros. Una proteína puede incluir grupos protésicos, y puede incluir diversos patrones de glicoslilación y lipidación. Una "glicoproteína", tal como se usa en el presente documento, es una proteína que está glicosilada de alguna manera. En algunas realizaciones de la invención, la glicoproteína está N-glicosilada y/u O-glicosilada y/o está modificada con restos de ácido siálico.

En otra realización, el método para producir la molécula glicosilada modificada comprende la etapa adicional de confirmar que la glicoproteína modificada tiene propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la molécula de partida glicosilada.

Normalmente, la propiedad farmacológica mejorada se selecciona del grupo que consiste en biodisponibilidad aumentada, semivida *in vivo* funcional aumentada, semivida en plasma *in vivo* aumentada, inmunogenicidad reducida, resistencia a proteasa aumentada, afinidad por albúmina aumentada, afinidad por un receptor mejorada, estabilidad en almacenamiento aumentada.

El término "semivida *in vivo* funcional" se usa con su significado normal, es decir, el tiempo al cual todavía está presente el 50% de la actividad biológica de la glicoproteína modificada o una molécula de referencia en el cuerpo/órgano diana, o el tiempo que tarda la actividad de la glicoproteína modificada o molécula de referencia en disminuir hasta el 50% de su valor máximo. Como alternativa a determinar la semivida *in vivo* funcional, puede determinarse la "semivida en plasma *in vivo*", es decir, el tiempo al cual el 50% de las glicoproteínas modificadas o moléculas de referencias circulan en el plasma o torrente sanguíneo antes de aclararse. La determinación de la semivida en plasma es con frecuencia más sencilla que la determinación de la semivida funcional y la magnitud de la semivida en plasma es habitualmente una buena indicación de la magnitud de la semivida *in vivo* funcional. Los términos alternativos a la semivida en plasma incluyen semivida en suero, semivida en circulación, semivida circulatoria, aclaramiento sérico, aclaramiento plasmático y semivida de aclaramiento. La funcionalidad que va a conservare se selecciona normalmente de actividad procoagulante, proteolítica, de unión a co-factor, de unión a receptor u otro tipo de actividad biológica asociada con la proteína particular.

El término "aumentado" tal como se usa con respecto a la semivida *in vivo* funcional o semivida en plasma indica que la semivida relevante de la glicoproteína modificada está aumentada de manera estadísticamente significativa con respecto a la de una molécula de referencia, tal como una glicoproteína por lo demás idéntica que, sin embargo, no se ha sometido al método de la invención. Por tanto, la semivida se determina en condiciones comparables. Por ejemplo, la semivida relevante puede estar aumentada en al menos aproximadamente el 25%, tal como en al menos aproximadamente el 50%, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 100%, el 150%, el 200%, el 250% o el 500%. En algunas realizaciones, las glicoproteínas modificadas de la presente invención muestran un aumento de la semivida de al menos aproximadamente 0,25 h, preferiblemente al menos aproximadamente 0,5 h, más preferiblemente al menos aproximadamente 1 h y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 2 h, con respecto a la semivida de la glicoproteína no modificada.

La medición de la semivida biológica *in vivo* puede llevarse a cabo de varias maneras tal como se describe en la bibliografía. En el número de referencia 96-0597 de la FDA se describe un ejemplo usando FVIIa modificado (factor de coagulación VIIa) de un ensayo para la medición de la semivida *in vivo* de rFVIIa y variantes del mismo. En resumen, la actividad de coagulación de FVIIa se mide en plasma extraído antes de, y durante un periodo de 24 horas tras, la administración de la glicoproteína modificada. Se mide la mediana del volumen aparente de distribución en estado estacionario y se determina la mediana del aclaramiento.

"Biodisponibilidad" se refiere a la proporción de una dosis administrada de un glicoconjugado que puede detectarse en plasma en momentos predeterminados tras la administración. Normalmente, la biodisponibilidad se mide en animales de prueba administrando una dosis de entre aproximadamente 25-250 μg/kg de la preparación; obteniendo muestras de plasma en momentos predeterminados tras la administración; y determinando el contenido de glicoproteína en la muestras usando un bioensayo adecuado, o inmunoensayo, o un ensayo equivalente. Normalmente se presentan los datos gráficamente como [glicoproteína] frente al tiempo y se expresa la biodisponibilidad como el área bajo la curva (AUC). La biodisponibilidad relativa de una preparación de prueba se

refiere a la razón entre el AUC de la preparación de prueba y la de la glicoproteína no modificada.

En algunas realizaciones, las preparaciones de la presente invención muestran una biodisponibilidad relativa de al menos aproximadamente el 110%, preferiblemente al menos aproximadamente el 120%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 130% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 140% de la biodisponibilidad de la glicoproteína no modificada correspondiente. La biodisponibilidad puede medirse en cualquier especie de mamífero, preferiblemente perros, y los momentos predeterminados usados para calcular el AUC pueden abarcar diferentes incrementos de desde 10 min - 8 h. La biodisponibilidad puede medirse, por ejemplo, en un modelo de perro de la siguiente manera: Se realiza el experimento como un estudio cruzado de cuatro ramas en 12 perros Beagle divididos en cuatro grupos. Todos los animales reciben una preparación de prueba A y una preparación de referencia B a una dosis de aproximadamente 90 μg/kg en un tampón adecuado tal como tampón glicilglicina (pH 5,5) que contiene cloruro de sodio (2,92 mg/ml), cloruro de calcio dihidratado (1,47 mg/ml), manitol (30 mg/ml) y polisorbato 80. Se extraen muestras de sangre a los 10, 30 y 60 minutos y a las 2, 3, 4, 6 y 8 horas tras la administración inicial. Se obtiene plasma de las muestras y se cuantifica la glicoproteína mediante ELISA.

El término “inmunogenicidad” de una preparación se refiere a la capacidad de la preparación, cuando se administra a un ser humano, para provocar una respuesta inmunitaria perjudicial, ya sea humoral, celular o ambas. En cualquier subpoblación de seres humanos pueden existir individuos que muestran sensibilidad a proteínas administradas particulares. La inmunogenicidad puede medirse cuantificando la presencia de anticuerpos anti-glicoproteína y/o células T que responden a glicoproteína en un individuo sensible, usando métodos convencionales conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las glicoproteínas modificadas de la presente invención muestran una disminución de la inmunogenicidad en un individuo sensible de al menos aproximadamente el 10%, preferiblemente al menos aproximadamente el 25%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 40% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, con respecto a la inmunogenicidad para ese individuo de la glicoproteína no modificada.

La inmunogenicidad de un fármaco también se refiere al hecho de que los fármacos proteicos pueden ser inmunogénicos en sujetos no sensibles, lo que significa que administraciones repetidas del fármaco conducen a un refuerzo continuo de una respuesta inmunitaria frente al fármaco. En lo mayoría de los casos esto es indeseable porque la respuesta inmunitaria interferirá con la actividad del fármaco, mediante lo cual se vuelve necesario administrar dosificaciones crecientes del fármaco a lo largo del tiempo con el fin de proporcionar un efecto terapéutico. En algunas realizaciones, las glicoproteínas modificadas de la presente invención muestran una disminución de la inmunogenicidad en sujetos no sensibles de al menos aproximadamente el 10%, preferiblemente al menos aproximadamente el 25%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 40% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, con respecto a la inmunogenicidad para ese individuo de la glicoproteína no modificada.

El término “protegido frente a proteasa” tal como se usa en el presente documento haciendo referencia a una glicoproteína significa una glicoproteína que se ha modificado químicamente con el fin de hacer que dicho compuesto sea resistente a las peptidasas o proteasas plasmáticas. Se sabe que las proteasas en plasma están implicadas en la degradación de varias hormonas peptídicas y también desempeñan un papel en la degradación de proteínas más grandes.

La resistencia de una glicoproteína frente a la degradación mediante, por ejemplo, dipeptidil aminopeptidasa IV (DPPIV) se determina mediante el siguiente ensayo de degradación: Se incuban alícuotas de la glicoproteína (5 nmol) a 37ºC con 1 μl de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada correspondiente a una actividad enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos en 100 μl de tampón trietilamina-HCl 0,1 M, pH 7,4. Se terminan las reacciones enzimáticas mediante la adición de 5 μl de ácido trifluoroacético al 10%, y se separan los productos de degradación de péptidos y se cuantifican usando análisis mediante HPLC. Un método para realizar el análisis es: Se aplican las mezclas sobre una columna Vydac C18 de poros anchos (poros de 30 nm, partículas de 5 μm) de 250 x 4,6 mm y se eluye a una velocidad de flujo de 1 ml/min con gradientes graduales lineales de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1% (el 0% de acetonitrilo durante 3 min, el 0-24% de acetonitrilo durante 17 min, el 24-48% de acetonitrilo durante 1 min) según Siegel *et al.*, Regul. Pept. 1999; 79:93-102 y Mentlein *et al.* Eur. J. Biochem. 1993; 214:829-35. Pueden monitorizarse los péptidos y sus productos de degradación mediante su absorbancia a 220 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican mediante integración de sus áreas de pico con respecto a las de los patrones. Se estima la velocidad de hidrólisis de un péptido mediante dipeptidil aminopeptidasa IV a tiempos de incubación que dan como resultado que se hidrolice menos del 10% del péptido.

El componente de proteína más abundante en sangre circulante de especies de mamíferos es la albúmina sérica, que normalmente está presente a una concentración de aproximadamente 3 a 4,5 gramos por 100 mililitros de sangre completa. La albúmina sérica es una proteína sanguínea de aproximadamente 70.000 Dalton que proporciona varias funciones importantes en el sistema circulatorio. Por ejemplo, funciona como transportador de una variedad de moléculas orgánicas encontradas en la sangre, como transportador principal de diversos metabolitos tales como ácidos grasos y bilirrubina a través de la sangre, y, debido a su abundancia, como regulador osmótico de la sangre circulante. La albúmina sérica tiene una semivida de más de una semana, y un enfoque para

aumentar la semivida en plasma de péptidos ha sido derivatizar los péptidos con una entidad química que se une a albúmina sérica. El término “agente de unión a albúmina” se refiere a tales entidades químicas que se sabe que se unen a proteínas plasmáticas, tales como albúmina. La propiedad de unión a albúmina puede determinarse tal como se describe en J. Med. Chem, 43, 2000, 1986-1992. Los restos de unión a albúmina pueden incluir derivados de ácidos grasos, compuestos poliaromáticos sulfatados orgánicos tales como Cibacron, así como péptidos que comprenden menos de 40 residuos de aminoácido tales como restos dados a conocer en J. Biol. Chem. 277, 38 (2002) 35035-35043.

Las glicoproteínas modificadas preparadas según la presente invención muestran propiedades funcionales mejoradas con respecto a la glicoproteína no modificada. Las propiedades funcionales mejoradas pueden incluir, sin limitación, a) propiedades físicas tales como, por ejemplo, estabilidad en almacenamiento aumentada; b) propiedades farmacocinéticas mejoradas tales como, por ejemplo, biodisponibilidad y semivida aumentadas; y c) inmunogenicidad reducida en seres humanos. La estabilidad en almacenamiento de una glicoproteína puede evaluarse midiendo (a) el tiempo requerido para que disminuya el 20% de la bioactividad de una preparación cuando se almacena como un polvo seco a 25ºC y/o (b) el tiempo requerido para duplicar la proporción de productos de degradación predeterminados, tales como, por ejemplo, agregados, en la preparación.

En algunas realizaciones, las glicoproteínas modificadas de la invención muestran un aumento de al menos aproximadamente el 30%, preferiblemente al menos aproximadamente el 60% y más preferiblemente al menos aproximadamente el 100% en el tiempo requerido para que disminuya el 20% de la bioactividad con respecto al tiempo requerido para la glicoproteína no modificada, cuando se almacena una preparación que comprende la glicoproteína como polvos secos a 25ºC.

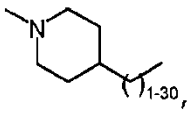
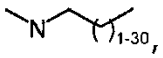
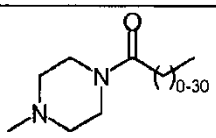
Pueden realizarse mediciones de la bioactividad según la clase de bioactividad asociada con la proteína particular; en caso, por ejemplo, de factores de coagulación, puede medirse la bioactividad usando cualquiera de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis, ensayo de unión a TF, o ensayo de generación de trombina independiente de TF.

En algunas realizaciones, las preparaciones de la invención muestran un aumento de al menos aproximadamente el 30%, preferiblemente al menos aproximadamente el 60% y más preferiblemente al menos aproximadamente el 100% en el tiempo requerido para duplicar productos de degradación predeterminados, tales como, por ejemplo, agregados, con respecto a una preparación de referencia, cuando ambas preparaciones se almacenan como polvos secos a 25ºC. El contenido de agregados puede determinarse, por ejemplo, mediante HPLC de permeación en gel, u otro tipo de métodos de cromatografía bien conocidos. En el caso de factores de coagulación, pueden determinarse agregados mediante HPLC de permeación en gel en una columna Protein Pak 300 SW (7,5 x 300 mm) (Waters, 80013) de la siguiente manera. Se equilibra la columna con eluyente A (sulfato de amonio 0,2 M, isopropanol al 5%, pH ajustado a 2,5 con ácido fosfórico, y posteriormente se ajusta el pH a 7,0 con trietilamina), tras lo cual se aplican 25 μg de muestra a la columna. La elución se realiza con eluyente A a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min durante 30 min, y se logra la detección midiendo la absorbancia a 215 nm. Se calcula el contenido de agregados como el área de pico de los agregados de factores de coagulación/área total de picos de factor de coagulación (monómero y agregados).

<u>El grupo de unión bivalente L y L’:</u>

L y L’ representan un grupo de unión químico bivalente, que pueden ser idénticos o pueden ser diferentes.

En una realización L y L’ representan independientemente un enlace o

<u>Los sustituyentes M y M’</u>

A continuación se comentarán los sustituyentes M y/o M’. En una realización de la invención, se obtiene una semivida aumentada al ser M y/o M’ un grupo que aumenta el peso molecular de modo que se reduce o se suprime el aclaramiento renal y/o al ser M y/o M’ un grupo que enmascara parejas de unión para receptores hepáticos. En una realización alternativa, la inmunogenicidad reducida se obtiene al ser M y/o M’ un grupo que bloquea la unión de

anticuerpos a sitios inmunogénicos. En aún otra realización, se obtiene una afinidad por albúmina mejorada al ser M y/o M' un grupo que tiene alta afinidad por albúmina. Y en aún otra realización, se obtiene una afinidad por un receptor mejorada al ser M y/o M' un grupo que se une específicamente a un receptor de superficie en una célula diana. Los sustituyentes M y/o M' pueden ser cualquier grupo de mejora de la funcionalidad, por ejemplo un "grupo de prolongación". Tal como se usa en el presente documento esto significa un grupo que, tras la conjugación con una proteína o péptido, aumenta la semivida en circulación de dicha proteína o péptido, en comparación con la proteína o péptido sin modificar. El principio específico tras el efecto de prolongación puede estar provocado por un tamaño aumentado, protección de secuencias peptídicas que pueden reconocerse por peptidasas o anticuerpos, o enmascaramiento de glicanos de tal manera que no se reconocen por receptores específicos de glicano presentes, por ejemplo, en el hígado o en macrófagos, impidiendo o reduciendo el aclaramiento. El efecto de prolongación del grupo de prolongación también puede estar provocado, por ejemplo, mediante unión a componentes de la sangre tales como albúmina, o mediante adhesión específica o no específica a tejido vascular. La glicoproteína conjugada debe conservar sustancialmente la actividad biológica de la glicoproteína no modificada.

Otras posibilidades incluyen aquellas en las que M y/o M' son un grupo que dirige la glicoproteína modificada a un determinado tipo de célula o tejido, tal como resulta por ejemplo interesante si la glicoproteína tiene que ejercer su efecto a una concentración local muy alta. Posibilidades aún adicionales incluyen aquellas en las que M y/o M' son en sí mismos un principio activo, por ejemplo, un radionúclido o una sustancia tóxica, esto puede ser conveniente por ejemplo en casos en los que la glicoproteína no modificada tiene alta afinidad por un receptor en tejido maligno y por tanto funciona como resto de direccionamiento en la molécula modificada.

En una realización de la invención M y/o M' se seleccionan del grupo que consiste en:

- un radical cargado orgánico de bajo peso molecular (15-1000 Da), que puede contener uno o más ácidos carboxílicos, aminas, ácidos sulfónicos, ácidos fosfónicos, o combinación de los mismos,

- una molécula hidrófila neutra de bajo peso molecular (15-1000 Da), tal como ciclodextrina, o una cadena de polietileno que puede estar opcionalmente ramificada,

- una molécula hidrófoba de bajo peso molecular (15-1000 Da) tal como un ácido graso o ácido cólico o derivados de los mismos,

- polietilenglicol con un peso molecular promedio de 2-40 KDa,

- un polímero de precisión bien definido tal como un dendrímero con una masa molecular exacta que oscila entre 700 y 20.000 Da, o más preferiblemente entre 700-10.000 Da,

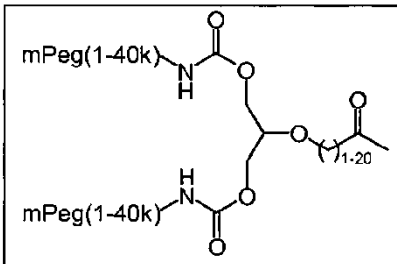
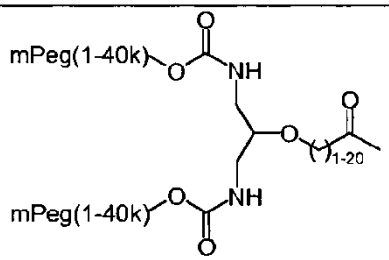
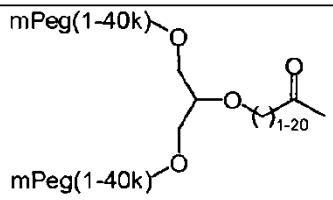
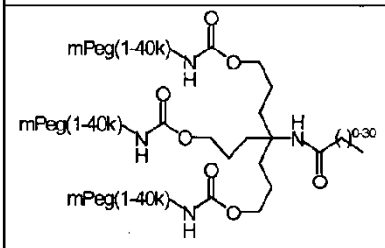
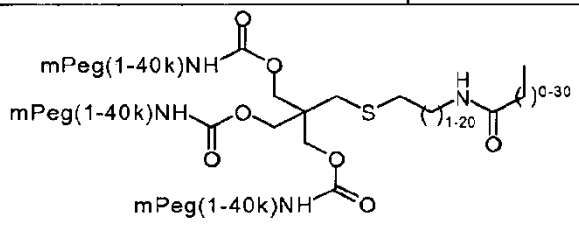
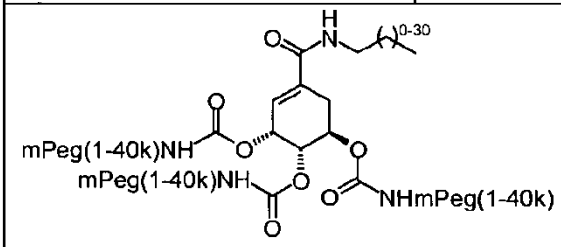
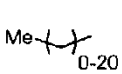
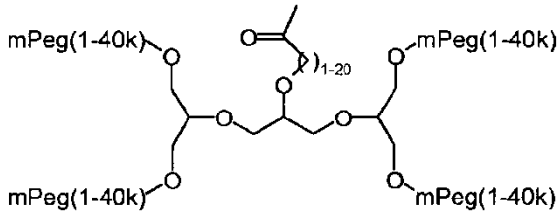
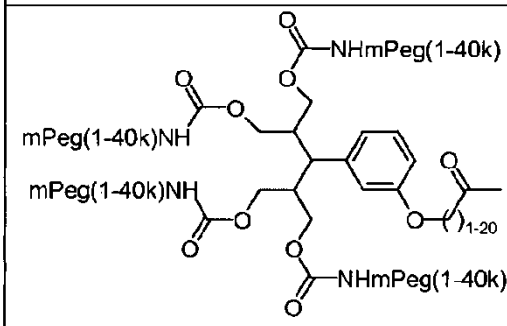
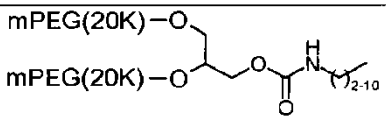
- una glicoproteína sustancialmente no inmunogénica tal como albúmina o un anticuerpo o una parte de un anticuerpo que contiene opcionalmente un dominio Fc, y

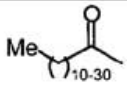
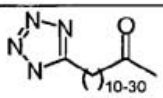
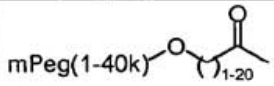
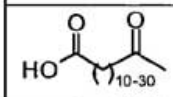
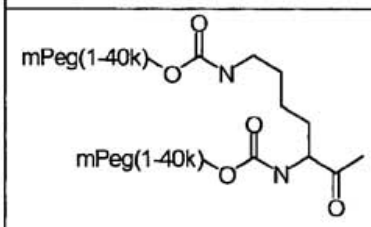
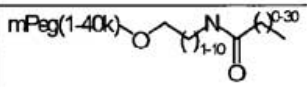
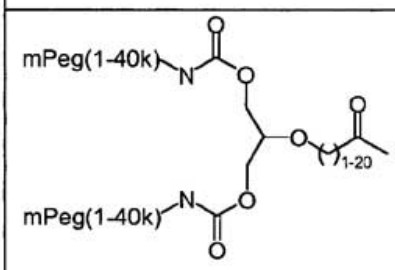
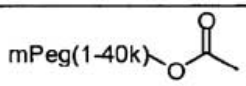
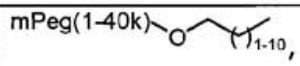
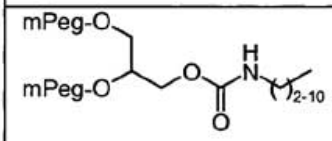
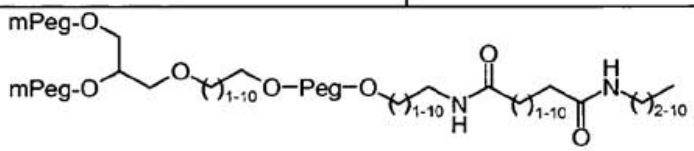
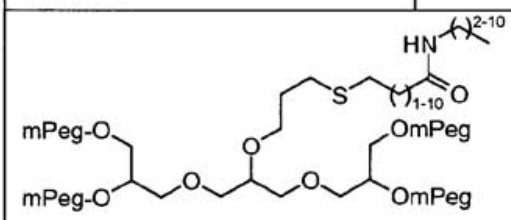
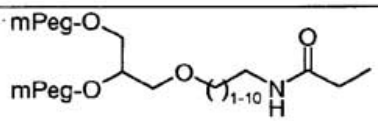
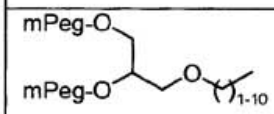
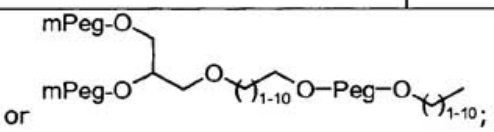
- un polímero orgánico de alto peso molecular tal como dextrano.

En una realización de la invención la molécula polimérica se selecciona del grupo que consiste en dendrímeros (por ejemplo con un peso molecular en el intervalo de 700-10.000 Da o dendrímeros tal como se dan a conocer en la solicitud de patente internacional WO 2005014049), poli(óxido de alquileno) (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificados, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, poli(etileno-co-anhídrido de ácido maleico), poli(estireno-co-anhídrido de ácido maleico) y dextrano, incluyendo carboximetil-dextrano, HES, PHF o MPC. En una realización de la invención, la molécula polimérica es un grupo PEG. En una realización de la invención, la molécula polimérica es un dendrímero.

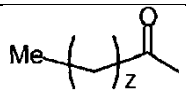
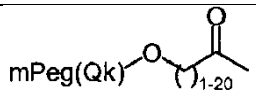
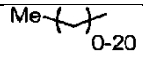
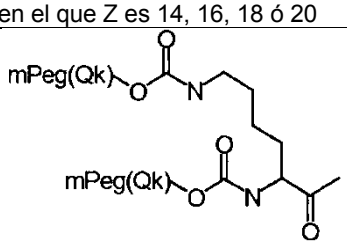
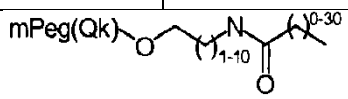
En una realización de la invención, M y/o M' son un grupo de prolongación seleccionado del grupo que consiste en ligandos de unión a proteínas sérica, tales como ligandos de unión a proteínas sérica, tales como compuestos que se unen a albúmina, tales como ácidos grasos, ácido graso C5-C24, diácido alifático (por ejemplo C5-C24), una estructura (por ejemplo derivados o miméticos de ácido siálico) que inhibe la unión de los glicanos a receptores (por ejemplo receptor de asialoglicoproteína y receptor de manosa), una molécula orgánica pequeña que contiene restos que en condiciones fisiológicas altera las propiedades de carga, tal como ácidos carboxílicos o aminas, o sustituyentes neutros que impiden el reconocimiento específico de glicano tales como sustituyentes alquilo más pequeños (por ejemplo, alquilo C1-C5), un radical cargado orgánico de bajo peso molecular (por ejemplo C1-C25), que puede contener uno o más ácidos carboxílicos, aminas, ácidos sulfónicos, fosfónicos, o combinación de los mismos; una molécula hidrófila neutra de bajo peso molecular (por ejemplo C1-C25), tal como ciclodextrina, o una cadena de polietileno que puede estar opcionalmente ramificada; polietilenglicol con un peso molecular promedio de 2-40 KDa; un polímero de precisión bien definido tal como un dendrímero con una masa molecular exacta que oscila entre 700 y 20.000 Da, o más preferiblemente entre 700-10.000 Da; y una glicoproteína sustancialmente no inmunogénica tal como albúmina o un anticuerpo o parte de un anticuerpo que contiene opcionalmente un dominio Fc.

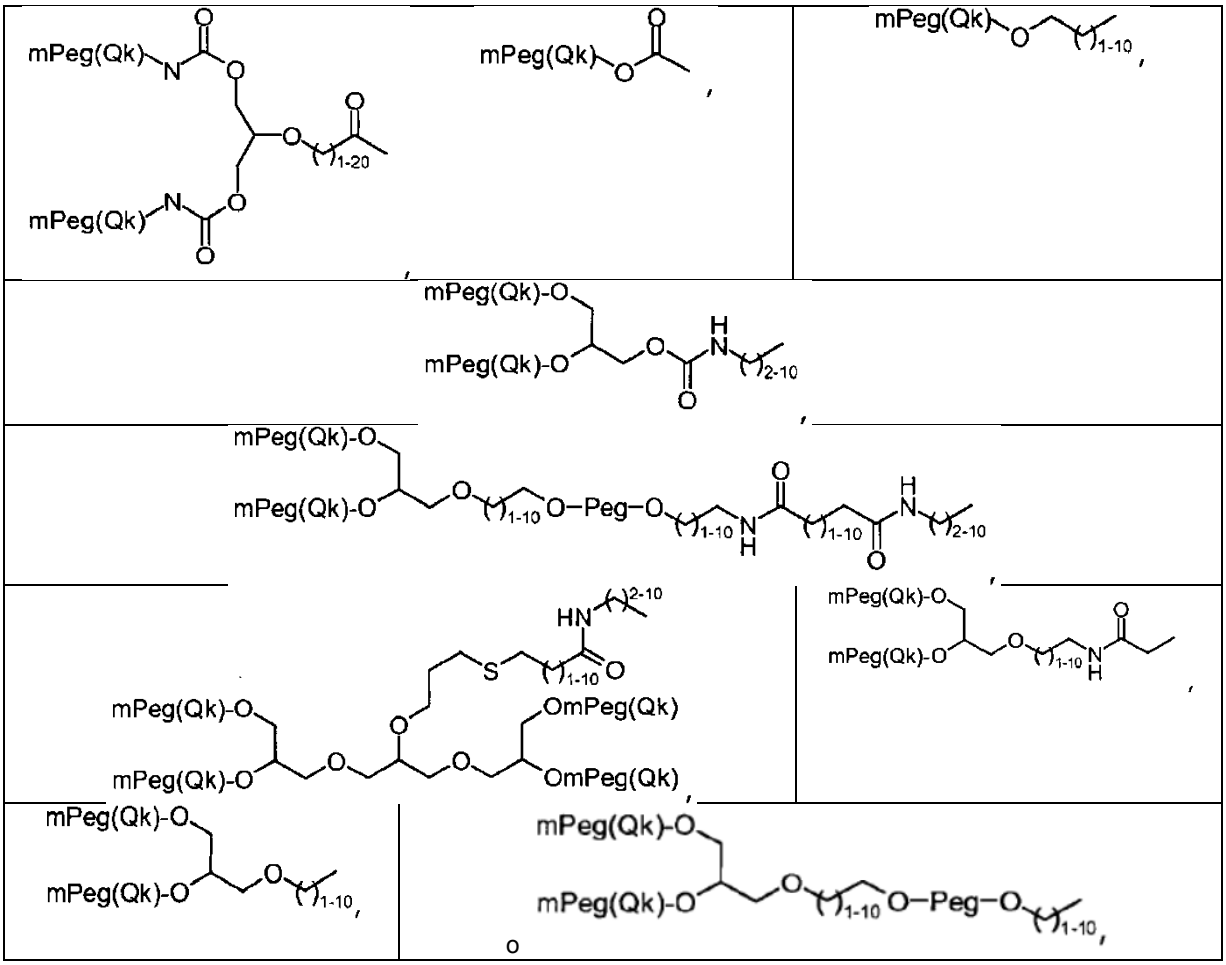
En una realización M y/o M' se seleccionan independientemente de:

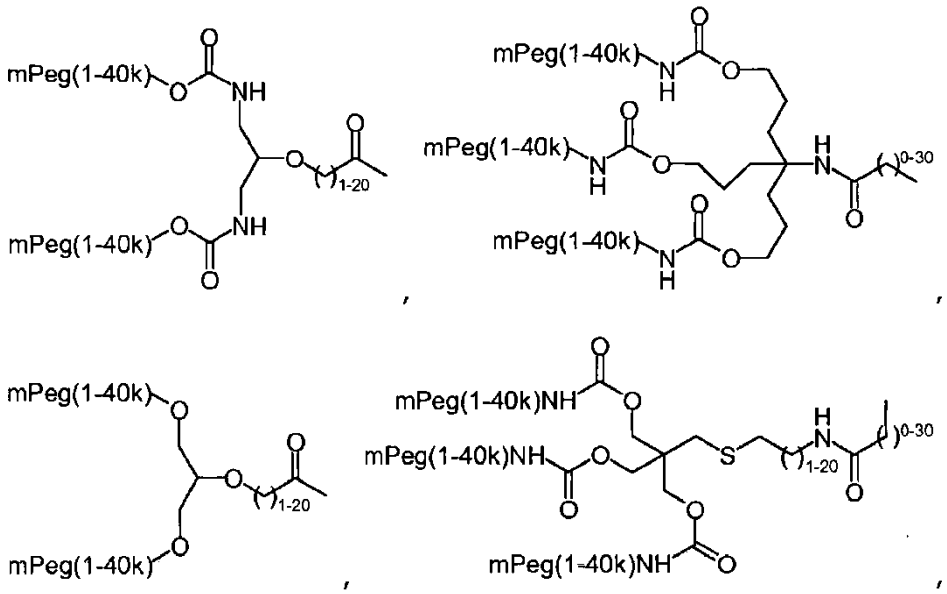
		
		
	cibacronil—	
	 ,	 ,
		
		
	 or	

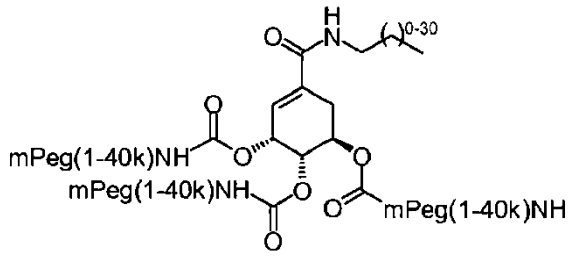
En una realización M y/o M' se seleccionan independientemente de:

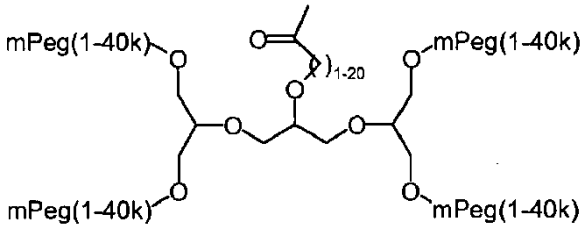
 en el que Z es 14, 16, 18 ó 20	 ,	
 ,	 ,	



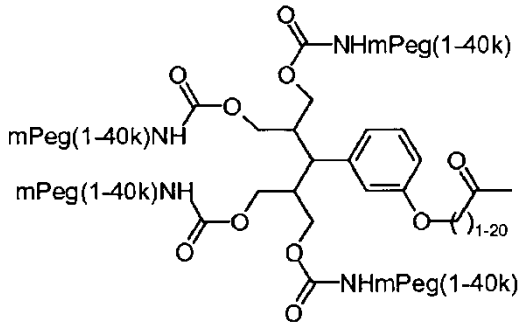
en los que Q representa un número entero de desde 10-20, 10-30, 10-40, 20-30, 20-40, 30-40, tal como 10, 20 ó 30.



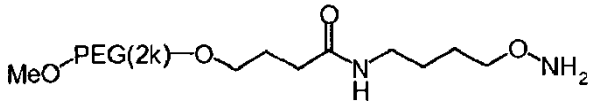


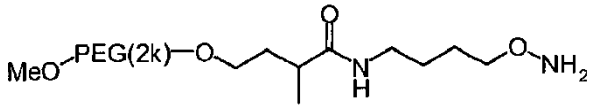


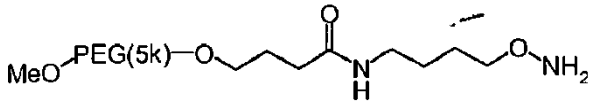
o

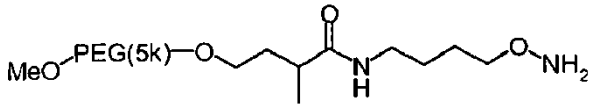


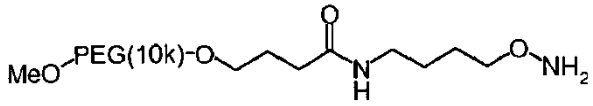
En una realización, M-L-ONH_2 y/o M'L'-ONH_2 son:

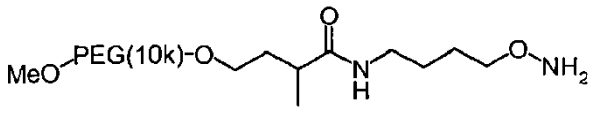




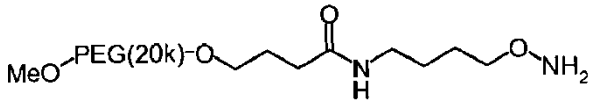




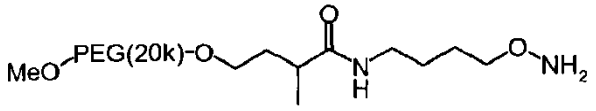



MeO
PEG(10k)
O
N
H
O
NH2

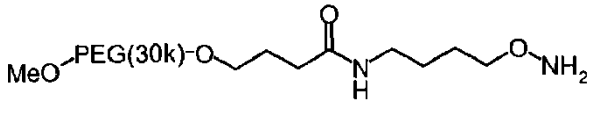
,


MeO
PEG(20k)
O
N
H
O
NH2

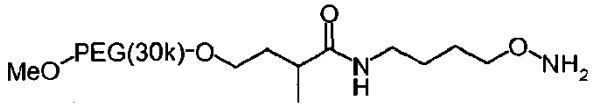
,


MeO
PEG(20k)
O
N
H
O
NH2

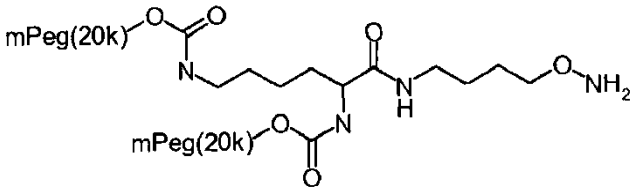
,


MeO
PEG(30k)
O
N
H
O
NH2

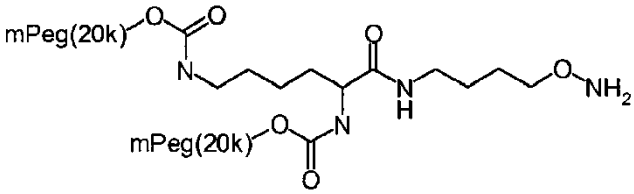
,


MeO
PEG(30k)
O
N
H
O
NH2

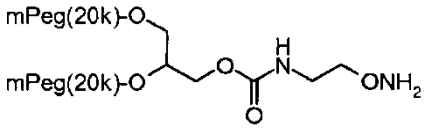
,


mPeg(20k)
O
O
N
O
N
H
O
NH2
mPeg(20k)
O
N
O

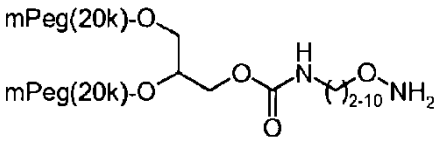
,


mPeg(20k)
O
O
N
O
N
H
O
NH2
mPeg(20k)
O
N
O

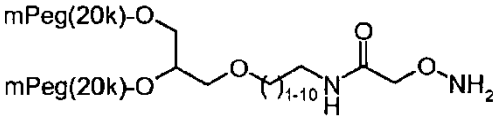
,


mPeg(20k)-O
mPeg(20k)-O
O
H
N
O
ONH2

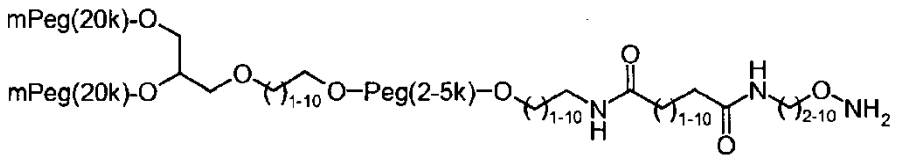
,


mPeg(20k)-O
mPeg(20k)-O
O
H
N
O
2-10
NH2
O

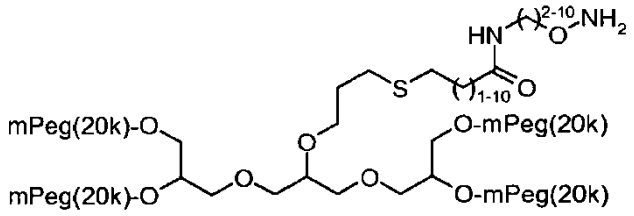
,


mPeg(20k)-O
mPeg(20k)-O
O
1-10
N
H
O
O
NH2

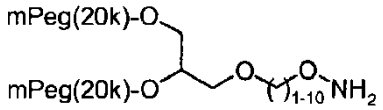
,



,

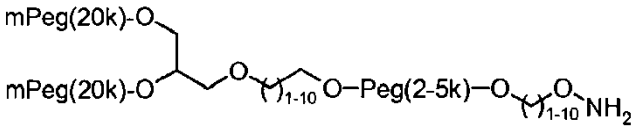


,



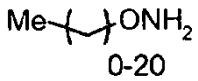
,

y



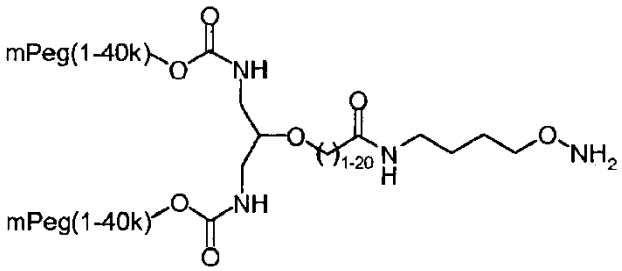
,

y

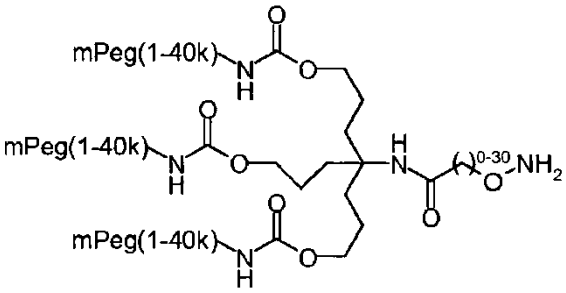


.

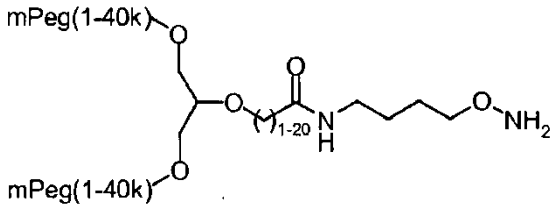
En una realización M-L-ONH_2 y/o M'-L'-ONH_2 se seleccionan independientemente de:



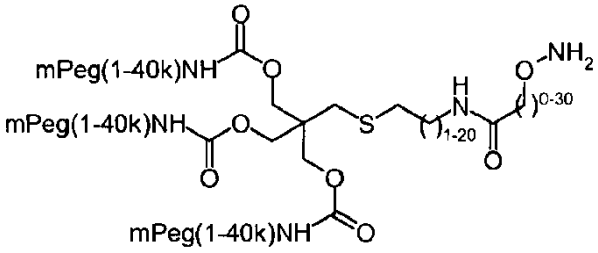
,



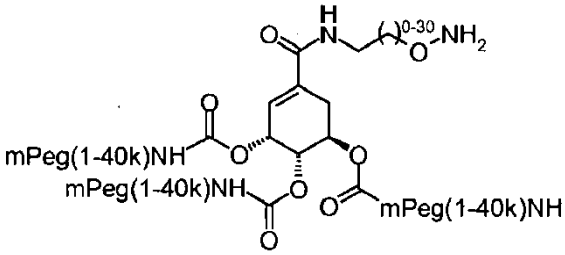
,



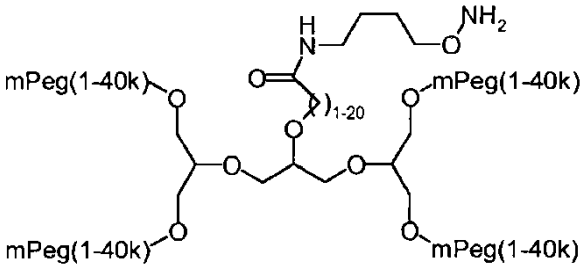
,



,

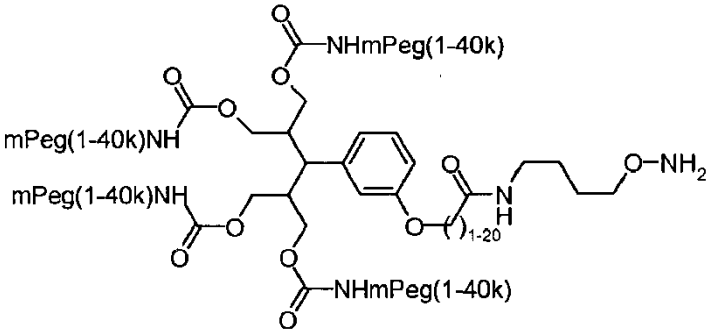


,



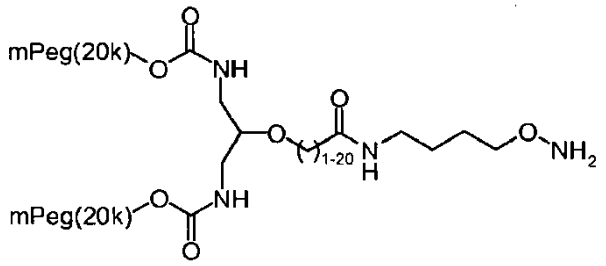
,

y

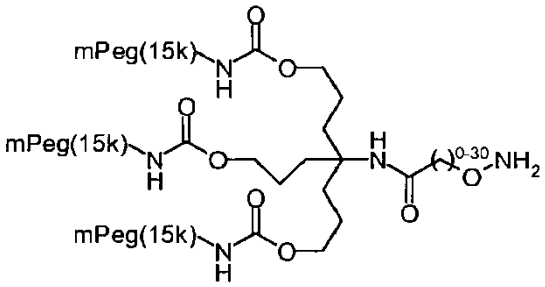


.

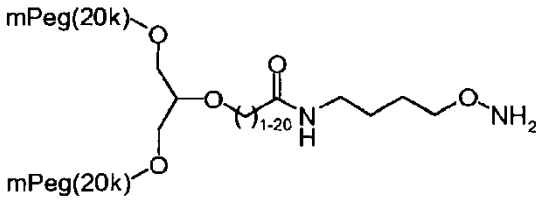
En una realización, M-L-ONH_2 y/o M'-L'-ONH_2 se seleccionan independientemente de



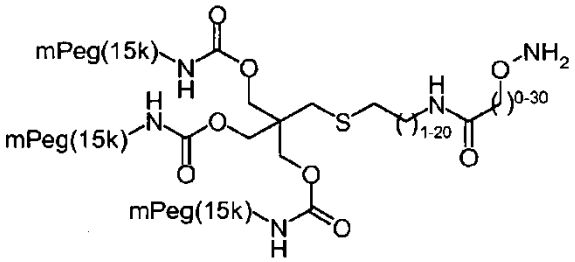
,



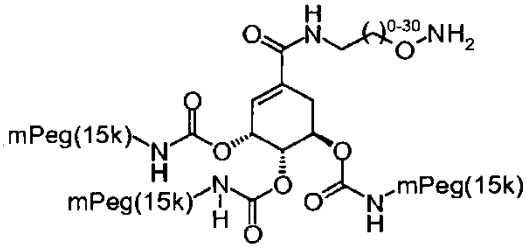
,



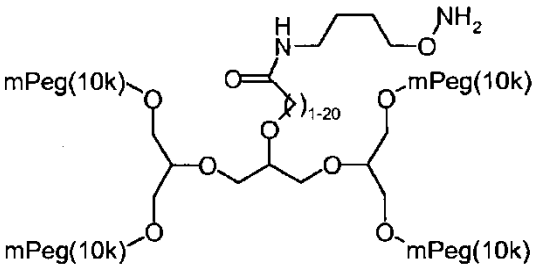
,



,

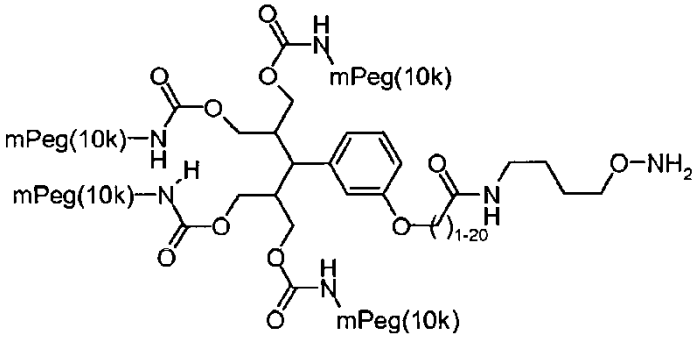


,



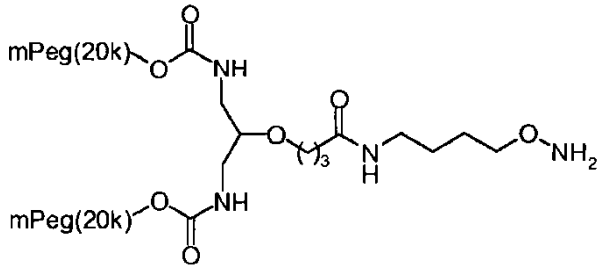
,

y

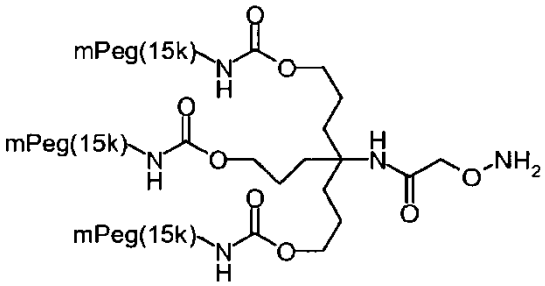


.

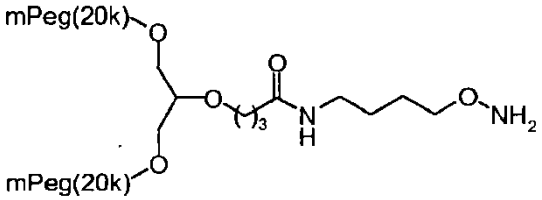
En una realización M-L-ONH_2 y/o M'-L'-ONH_2 se seleccionan independientemente de



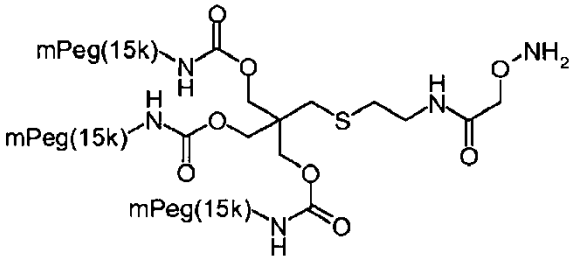
,



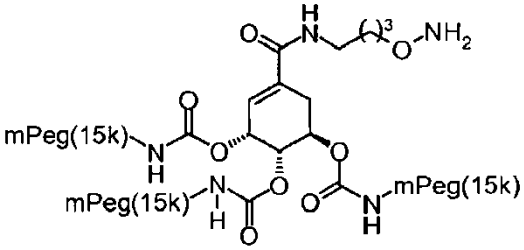
,



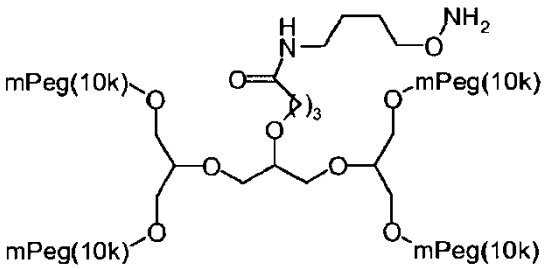
,



,

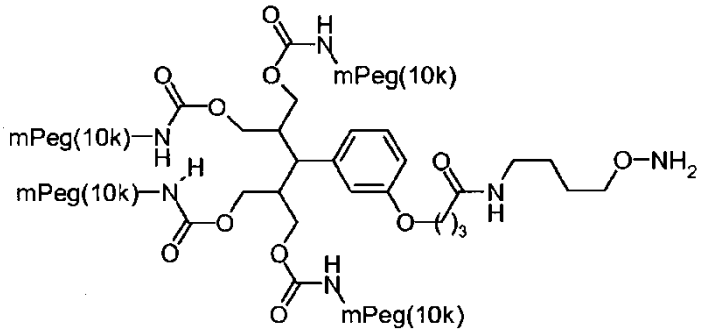


,



,

y



.

M y/o M' pueden ser un radical orgánico seleccionado de uno de los siguientes grupos:

- alquilo C_{1-30}, alquenilo C_{2-30}, alquinilo C_{2-30}, heteroalquilo C_{1-30}, heteroalquenilo C_{2-30}, heteroalquinilo C_{2-30} lineales, ramificados y/o cíclicos, en los que puede insertarse uno o más birradicales de compuesto aromático homocíclico o birradicales de compuesto heterocíclico, y en los que dichos radicales C_{1-30} o C_{2-30} pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-PO_2OH$, $-SO_2NH_2$, $-NH_2$, -OH, -SH,

halógeno o arilo, en los que dicho arilo está opcionalmente sustituido con $-CO_2H$, $-SO_3H$, PO_2OH, $-SO_2NH_2$, $-NH_2$, -OH, -SH o halógeno; radicales esteroideos; radicales lipídicos;

- radicales polisacárido, por ejemplo dextranos; α, β o γ-ciclodextrina, radicales poliamida por ejemplo radicales poliaminoácido; radicales PVP; radicales PVA; poli(1-3-dioxalano); poli(1,3,6-trioxano); polímero de etileno/anhídrido maleico;

- colorantes de Cibacron, tales como Cibacron Blue 3GA, y cadenas de poliamida de longitud especificada, tal como se da a conocer en el documento WO 00/12587;

- un residuo de proteína sustancialmente no inmunogénica tal como un componente de la sangre tal como derivado de albúmina, o un anticuerpo o un dominio del mismo tal como un dominio Fc de IgG1 normal humana, tal como se describe en Kan, SK *et al* en The Journal of Immunology 2001, 166(2), 1320-1326 o en Stevenson, GT, The Journal of Immunology 1997, 158, 2242-2250;

- radicales polietilenglicol (PEG) o metoxi-polietilenglicol (mPEG) y derivados de amino de los mismos, en los que el peso molecular promedio puede ser de entre 500 y 100.000 Da, tal como entre 500 y 60.000 Da, tal como entre 1000 y 40.000 Da, tal como entre 5000 y 40.000 Da;

- restos que se sabe que se unen a proteínas plasmáticas, tales como por ejemplo albúmina, en los que la propiedad de unión a albúmina puede determinarse tal como se describe en J. Med. Chem, 43, 2000, 1986-1992, o un resto de unión a albúmina tal como un péptido que comprende menos de 40 residuos de aminoácido tales como los restos dados a conocer en J. Biol. Chem. 277, 38 (2002) 35035-35043.

En otras realizaciones, M y/o M' son alquilo C_1-C_{20}, tal como alquilo C_1-C_{18}. Se hace mención específica de alquilo C_{14}, C_{16} y C_{18}, que puede estar opcionalmente sustituido, en particular, con grupos cargados, grupos polares y/o halógenos. Los ejemplos de tales sustituyentes incluyen $-CO_2H$, tetrazol y halógeno. En una realización particular, todos los hidrógenos en el alquilo C_1-C_{20} están sustituidos por fluoro para formar perfluoroalquilo.

En realizaciones particulares M' es diferente de M. En realizaciones particulares M' tiene un peso molecular sustancialmente inferior al de M. En una realización particular, M' es metoxiamina ($MeONH_2$).

<u>La molécula de partida P*</u>

A continuación se comentará el sustituyente P*.

La glicoproteína P* comprende un extremo terminal de glicano, que es reactivo frente a la oxidación por peryodato.

Por tanto, el grupo reactivo en P* es parte de un hidrato de carbono, o se deriva de un residuo de hidrato de carbono tal como los encontrados en N u O-glicanos de glicoproteínas glicosiladas. Alternativamente el grupo reactivo de una glicoproteína P* puede ser un residuo de ácido siálico.

En una realización P* se selecciona de FVII, FVIII, FIX, FX, FII, FV, proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular, FXI, FXII, FXIII, así como variantes de secuencia de los mismos; inmunoglobulinas, citocinas tales como interleucinas, interferones alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias incluyendo factores estimulantes de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de las plaquetas y proteína activante de fosfolipasa (PUP). P* también puede ser cualquier otra proteína y péptido de interés biológico y terapéutico general incluyendo insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factor de necrosis tumoral, receptores de interleucina y formas solubles de receptores de interleucina, factores de crecimiento tales como factores de crecimiento tisular, tales como TGFa o TGFp y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, eritropoyetina, hormonas pigmentarias, factores de liberación del hipotálamo, hormonas antidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del folículo, hormona estimulante del tiroides, activador de plasminógeno tisular e inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, y fragmentos de las mismas.

Los péptidos y proteínas que no contienen extremos terminales de glicano pueden o bien glicosilarse enzimáticamente tal como se describe en Li Shao *et al*. Glycobiology 12(11) 762-770 (2002) usando glicosiltransferasas, o bien sintetizarse químicamente, por ejemplo usando química de péptidos convencional y componentes de aminoácidos glicosilados tales como asparagina N-galactosilada.

Alternativamente, pueden diseñarse por ingeniería genética sitios de glicosilación en proteínas o péptidos que *in vivo* se producen normalmente en su forma no glicosilada. Por ejemplo, la inserción de la secuencia consenso Cys-XXX-Ser-XXX-Pro-Cys en una repetición de EGF permite la O-glicosilación selectiva de serina usando UDP-glucosa y glucosiltransferasa (Li Shao *et al*. Glycobiology 12(11) 762-770 (2002)), mientras que la inserción de la secuencia consenso Asn-XXX-Ser/Thr permite la N-glicosilación (R.A. Dwek, Chem. Rev. 1996, 96, 683-720). Las secuencias peptídicas que contienen treonina o serina también experimentan glicosilación en presencia de UDP-

GalNAc:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa y UDP-GalNAc de una manera dependiente de la secuencia (véase por ejemplo B.C. O'Connell, F.K. Hagen y L.A. Tabak en J. Biol. Chem. 267(35), 25010-25018 (1992)). Alternativamente, puede usarse mutagénesis dirigida al sitio que introduce mutaciones de cisteína para la introducción de galactosa o estructuras de azúcar que contienen galactosa mediante formación de puentes disulfuro mixtos tal como se describe por D.P. Gamblin *et al.* en Angew. Chem. Int. Ed., 43, 828 (2004). También pueden prepararse péptidos y proteínas que contienen galactosa o N-acetilgalactosamina mediante conjugación con proteínas o péptidos que contienen asas no biogénicas tales como los métodos descritos por P.G. Schultz en J. Am. Chem. Soc, 125, 1702 (2003), o de manera no específica mediante glicosilación directa de péptidos usando sustratos donadores de glicosilo tales como tricloroacetamidil galactósidos, etc. La adición de inhibidores de glicosidasa a cultivos de fermentación, produciendo así glicoproteínas con estructuras de glicano truncadas tal como se describe en los documentos US 4925796A / US 5272066A1 también es una posibilidad para obtener proteínas que contienen galactosa o N-acetilgalactosamina, así como modificación enzimática de residuos de glutamina usando TGasa (véase por ejemplo M. Sato *et al.* Angew. Chem. Int. Ed. 43, 1516-1520, (2004)).

La producción de proteínas N-glicosiladas no se limita al uso de células huésped de mamífero tales como células CHO o BHK, sino que también puede realizarse en células de insecto, levadura o usando células bacterianas tal como se describe por M. Wacker *et al.* en Science, 298, 1790-1793 (2002). En una realización de la invención el péptido es aprotinina, inhibidor de la ruta de factor tisular u otros inhibidores de proteasa, insulina o precursores de insulina, hormona de crecimiento humana o bovina, interleucina, glucagón, oxintomodulina, GLP-1, GLP-2, IGF-I, IGF-II, activador de plasminógeno tisular, factor de crecimiento transformante γ o β, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, GRF (factor liberador de la hormona de crecimiento), factor de crecimiento humano, inmunoglobulinas, EPO, TPA, proteína C, factores de coagulación sanguínea tales como FVII, FVIII, FIX, FX, FII, FV, proteína C, proteína S, PAI-1, factor tisular, FXI, FXII y FXIII, exendina 3, exentidina 4, y enzimas o análogos funcionales de los mismos. En el presente contexto, se pretende que el término "análogo funcional" indique una proteína con una función similar a la proteína nativa. La proteína puede ser estructuralmente similar a la proteína nativa y puede derivarse de la proteína nativa mediante adición de uno o más aminoácidos a cualquiera o ambos de los extremos C y N terminales de la proteína nativa, sustitución de uno o más aminoácidos en uno o varios sitios diferentes en la secuencia de aminoácidos nativa, deleción de uno o más aminoácidos en cualquiera o ambos extremos de la proteína nativa o en uno o varios sitios en la secuencia de aminoácidos, o inserción de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos nativa. Además la proteína puede acilarse en una o más posiciones, véanse, por ejemplo, el documento WO 98/08871, que da a conocer la acilación de GLP-1 y análogos del mismo, y el documento WO 98/08872, que da a conocer la acilación de GLP-2 y análogos del mismo. Un ejemplo de un derivado de GLP-1 acilado es Lys26($N^{épsilon}$-tetradecanoil)-GLP-1 (7-37) que es GLP-1 (7-37) en el que el grupo épsilon-amino del residuo de Lys en la posición 26 se ha tetradecanoilado.

Las proteínas o partes de las mismas pueden prepararse o aislarse usando técnicas conocidas por los expertos habituales en la técnica tales como cultivo tisular, extracción a partir de fuentes animales o mediante metodologías de ADN recombinante. También se contemplan fuentes transgénicas de las proteínas, los péptidos, las secuencias de aminoácidos y similares. Tales materiales se obtienen a partir de animales transgénicos, es decir, ratones, cerdos, vacas, etc., en los que las proteínas se expresan en leche, sangre o tejidos. También se contemplan insectos transgénicos y sistemas de expresión de baculovirus como fuentes. Además, versiones mutantes de proteínas, tales como TNF mutantes y/o interferones mutantes, también están dentro del alcance de la invención. Otras proteínas de interés son proteínas de alérgenos tales como ambrosía, antígeno E, veneno de abeja, alérgeno de ácaros, y similares.

Lo anterior es ilustrativo de los péptidos biológicamente activos que son adecuados para la conjugación con un grupo de prolongación según la invención. Debe entenderse que también se contemplan los materiales biológicamente activos no mencionados específicamente, pero que tienen péptidos adecuados, y están dentro del alcance de la presente invención. En una realización, la glicoproteína es un polipéptido de FVII. En una realización, los polipéptidos son factor VIIa de tipo natural.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido de factor VII" o "polipéptido de FVII" significan cualquier proteína que comprende la secuencia de aminoácidos 1-406 del factor VIIa humano de tipo natural (es decir, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos dada a conocer en la patente estadounidense n.º 4.784.950), así como variantes de la misma.

Se pretende que el término "factor VII" abarque polipéptidos de factor VII en su forma no escindida (zimógeno), así como los que se han procesado proteolíticamente para proporcionar sus formas bioactivas respectivas, que pueden denominarse factor VIIa. Normalmente, el factor VII se escinde entre los residuos 152 y 153 para proporcionar factor VIIa. Tales variantes de factor VII pueden mostrar diferentes propiedades con respecto al factor VII humano, incluyendo estabilidad, unión a fosfolípidos, actividad específica alterada, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, "FVIIa humano de tipo natural" es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos dada a conocer en la patente estadounidense n.º 4.784.950.

Los ejemplos no limitativos de variantes de factor VII incluyen S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino *et al.*, Arch. Biochem.

Biophys. 352: 182-192, 1998); variantes de FVIIa que muestran estabilidad proteolítica aumentada tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 5.580.560; factor VIIa que se ha escindido proteolíticamente entre los residuos 290 y 291 o entre los residuos 315 y 316 (Mollerup *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 48:501-505, 1995); formas oxidadas de factor VIIa (Kornfelt *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999); variantes de FVII tal como se da a conocer en el documento PCT/DK02/00189 (correspondiente al documento WO 02/077218); y variantes de FVII que muestran estabilidad proteolítica aumentada tal como se da a conocer en el documento WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes de FVII que tienen un dominio Gla modificado y que muestran una unión a la membrana potenciada tal como se da a conocer en el documento WO 99/20767, las patentes estadounidenses US 6017882 y US 6747003, la solicitud de patente estadounidense 20030100506 (University of Minnesota) y el documento WO 00/66753, las solicitudes de patente estadounidense US 20010018414, US 2004220106 y US 200131005, las patentes estadounidenses US 6762286 y US 6693075 (University of Minnesota); y variantes de FVII tal como se da a conocer en el documento WO 01/58935, la patente estadounidense US 6806063, la solicitud de patente estadounidense 20030096338 (Maxygen ApS), los documentos WO 03/93465 (Maxygen ApS), WO 04/029091 (Maxygen ApS), WO 04/083361 (Maxygen ApS) y WO 04/111242 (Maxygen ApS), así como en el documento WO 04/108763 (Canadian Blood Services).

Los ejemplos no limitativos de variantes de FVII que tienen una actividad biológica aumentada en comparación con FVIIa de tipo natural incluyen variantes de FVII tal como se da a conocer en los documentos WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, PCT/DK02/00635 (correspondiente al documento WO 03/027147), la solicitud de patente danesa PA 2002 01423 (correspondiente al documento WO 04/029090), la solicitud de patente danesa PA 2001 01627 (correspondiente al documento WO 03/027147); el documento WO 02/38162 (Scripps Research Institute); y variantes de FVIIa con una actividad potenciada tal como se da a conocer en el documento JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

Los ejemplos de variantes de factor VII incluyen, sin limitación, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, y S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII,

F374Y/K337A/E296V-FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-factor VII, S60A-factor VII; R152E-factor VII, S344A-factor VII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; y FVII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde 233Thr hasta 240Asn; FVII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde 304Arg hasta 329Cys; y FVII que tiene sustituciones, adiciones o deleciones en la secuencia de aminoácidos desde 153Ile hasta 223Arg.

En una realización, la glicoproteína es un polipéptido de FVIII. En una realización, la glicoproteína es un polipéptido de FIX.

Otros aspectos de la invención

La presente invención también se refiere a glicoproteínas modificadas novedosas con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)}$$

en la que M y opcionalmente M' son independientemente un resto polimérico para aumentar el peso molecular de la glicoproteína modificada, y en la que L y L' representan independientemente un grupo de unión bivalente, y en la que P representa una glicoproteína que comprende uno o más extremos terminales de glucano oxidado de dicha glicoproteína, O, N, C y H representan átomos de oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógeno respectivamente, n es 1-10, m es 0-50, en las que dicha glicoproteína modificada tiene propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la glicoproteína de partida P* y ha conservado su actividad funcional.

En algunas realizaciones de la invención, una glicoproteína modificada de este tipo se selecciona de FVII, FVIII, FIX, FX, FII, FV, proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular, FXI, FXII, FXIII modificados así como variantes de secuencia de los mismos; inmunoglobulinas, citocinas tales como interleucinas, interferones alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias incluyendo factores estimulantes de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de las plaquetas y proteína activante de fosfolipasa (PUP).

Otras glicoproteínas modificadas son proteínas y péptidos modificados de interés biológico y terapéutico general, por ejemplo incluyendo insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factor de necrosis tumoral, receptores de interleucina y formas solubles de receptores de interleucina, factores de crecimiento tales como factores de crecimiento tisular, tales como TGFa o TGFp y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, eritropoyetina, hormonas pigmentarias, factores de liberación del hipotálamo, hormonas antidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica,

hormona estimulante del folículo, hormona estimulante del tiroides, activador de plasminógeno tisular e inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, y fragmentos de las mismas.

En una realización de la invención la glicoproteína modificada está N-glicosilada y/u O-glicosilada y/o contiene restos de ácido siálico.

En una realización de la invención la glicoproteína modificada tiene una propiedad farmacológica mejorada seleccionada del grupo que consiste en biodisponibilidad aumentada, semivida *in vivo* funcional aumentada, semivida en plasma *in vivo* aumentada, inmunogenicidad reducida, resistencia a proteasa aumentada, afinidad por albúmina aumentada, afinidad por un receptor mejorada, estabilidad en almacenamiento aumentada, semivida *in vivo* funcional reducida, semivida en plasma *in vivo* reducida. En una realización la semivida aumentada se obtiene al ser M un grupo que aumenta el peso molecular de modo que se reduce o se suprime el aclaramiento renal y/o al ser M un grupo que enmascara parejas de unión para receptores hepáticos. En una realización se obtiene inmunogenicidad reducida al ser M un grupo que bloquea la unión de anticuerpos a sitios inmunogénicos. En una realización se obtiene una afinidad por albúmina mejorada al ser M un grupo que tiene alta afinidad por albúmina. En una realización se obtiene una afinidad por un receptor mejorada al ser M un grupo que se une específicamente a un receptor de superficie en una célula diana.

En una realización de la invención la glicoproteína modificada es en la que M se selecciona del grupo que consiste en: un radical cargado orgánico de bajo peso molecular, que puede contener uno o más ácidos carboxílicos, aminas, ácidos sulfónicos, ácidos fosfónicos, o combinaciones de los mismos; una molécula hidrófila neutra de bajo peso molecular, tal como ciclodextrina o una cadena de polietileno opcionalmente ramificada; una molécula hidrófoba de bajo peso molecular tal como un ácido graso o ácido cólico o derivados de los mismos; un polietilenglicol con un peso molecular promedio de 2-40 kDa; un polímero de precisión bien definido tal como un dendrímero con una masa molecular exacta que oscila entre 700 Da y 20 kDa; un polipéptido sustancialmente no inmunogénico tal como albúmina, un anticuerpo o una parte de un anticuerpo que contiene opcionalmente un dominio Fc; y un polímero orgánico de alto peso molecular.

En una realización de la invención la glicoproteína modificada es en la que M se selecciona del grupo que consiste en un dendrímero, poli(óxido de alquileno) (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificado, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, poli(etileno-co-anhídrido de ácido maleico), poli(estireno-co-anhídrido de ácido maleico), dextrano, carboximetil-dextrano, HES, MPC o PHF.

En una realización de la invención la glicoproteína modificada es en la que M se selecciona del grupo que consiste en un ligando de unión a proteína sérica y una molécula orgánica pequeña que contiene restos que en condiciones fisiológicas altera las propiedades de carga, una estructura que inhibe la unión de glicanos a receptores, y un sustituyente neutro que impide el reconocimiento específico de glicano.

En una realización la glicoproteína modificada según la invención es en la que P se selecciona de FVII, FVIII, FIX, FX, FII, FV, proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular, FXI, FXII, FXIII, así como variantes de secuencia de los mismos; inmunoglobulinas, citocinas tales como interleucinas, interferones alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias incluyendo factores estimulantes de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de las plaquetas, proteína activante de fosfolipasa (PUP), insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factor de necrosis tumoral, receptores de interleucina y formas solubles de receptores de interleucina, factores de crecimiento tales como factores de crecimiento tisular, tales como TGFa o TGFp y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, eritropoyetina, hormonas pigmentarias, factores de liberación del hipotálamo, hormonas antidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del folículo, hormona estimulante del tiroides, activador de plasminógeno tisular e inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, y fragmentos de las mismas, o cualquier proteína de fusión que comprende cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente o fragmentos de las mismas.

En una realización la glicoproteína modificada según la invención es en la que la glicoproteína es un polipéptido de factor VII.

En una realización la glicoproteína modificada según la invención es en la que la glicoproteína tiene la secuencia de aminoácidos de factor VII humano de tipo natural.

En una realización la glicoproteína modificada según la invención es en la que la glicoproteína modificada muestra al menos aproximadamente el 10%, tal como al menos aproximadamente el 20%, tal como al menos aproximadamente el 40%, tal como al menos aproximadamente el 60%, tal como al menos aproximadamente el 80%, tal como al menos aproximadamente el 100% de la actividad específica de polipéptido de factor VII no modificado cuando se somete a prueba en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis o ensayo de unión a TF tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

En una realización la glicoproteína modificada según la invención es en la que la glicoproteína modificada muestra una biodisponibilidad que es de al menos aproximadamente el 110% de la biodisponibilidad de la glicoproteína no modificada, tal como al menos aproximadamente el 120%, aproximadamente el 130% o al menos aproximadamente el 140% de la biodisponibilidad de la glicoproteína no modificada.

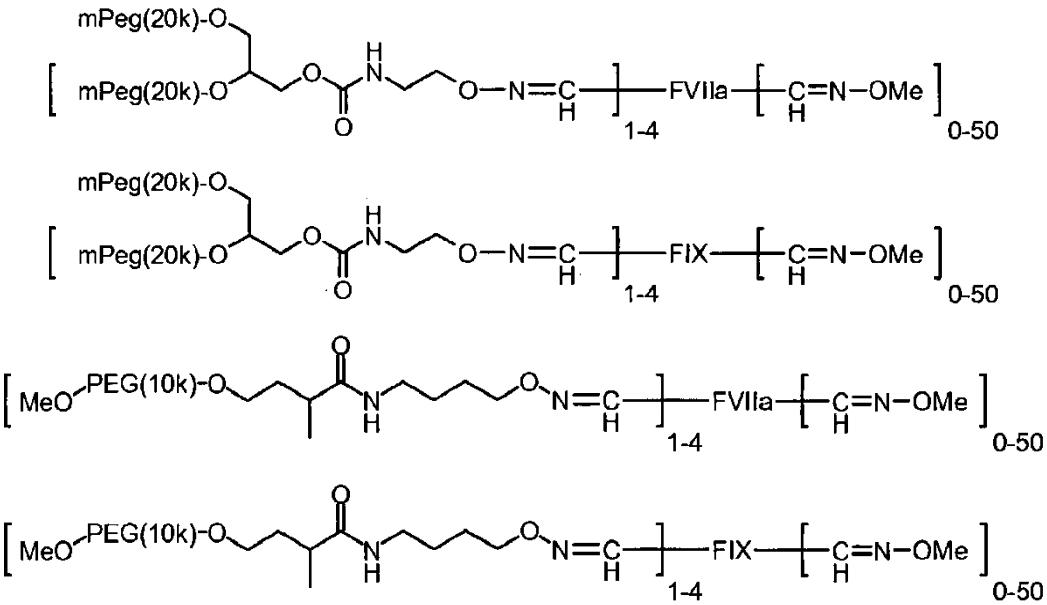
En una realización la glicoproteína modificada según la invención es en la que la glicoproteína modificada muestra una semivida en suero que es de al menos aproximadamente el 125% de la semivida de la glicoproteína no modificada, tal como aproximadamente el 150%, aproximadamente el 200% o al menos aproximadamente el 250% de la semivida de la glicoproteína no modificada.

En una realización, el método para la producción de las moléculas glicosiladas modificadas comprende la etapa adicional de formular dicha molécula glicosilada como una composición farmacéutica.

En una realización de la invención, m en las glicoproteínas modificadas con la estructura general $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m$ está en el intervalo de 0-50, tal como 0-20, tal como 0-10, tal como 0-5, tal como 0-3.

En las glicoproteínas modificadas con la estructura general $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m$ n está limitado por el número de extremos terminales de glicano no reductores de una glicoproteína específica. Por tanto, en una realización de la invención, n en las glicoproteínas modificadas con la estructura general $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m$ es igual al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína. En otra realización de la invención, n en las glicoproteínas modificadas con la estructura general $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m$ está en el intervalo de 1-10, tal como 1-5, tal como 1-3, tal como 1-2, tal como 1, tal como 2, tal como 3.

En una realización la glicoproteína modificada con la estructura general $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m$ (fórmula I) se selecciona de la lista que consiste en



COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una glicoproteína modificada que está presente en una concentración de desde 10^{-12} mg/ml hasta 200 mg/ml, tal como por ejemplo de 10^{-10} mg/ml a 5 mg/ml y en la que dicha composición tiene un pH de desde 2,0 hasta 10,0. La composición puede comprender además un sistema de tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizadores y tensioactivos. En una realización de la invención la composición farmacéutica es una composición acuosa, es decir una composición que comprende agua. Tal composición es normalmente una disolución o una suspensión. En una realización adicional de la invención la composición farmacéutica es una disolución acuosa. El término “composición acuosa” se define como una composición que comprende al menos el 50% p/p de agua. Asimismo, el término “disolución acuosa” se define como una disolución que comprende al menos el 50% p/p de agua, y el término “suspensión acuosa” se define como una suspensión que comprende al menos el 50% p/p de agua.

En otra realización la composición farmacéutica es una composición secada por congelación, a la que el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de su uso. En otra realización la composición farmacéutica es una composición secada (por ejemplo secada por congelación o secada por pulverización) lista para su uso sin ninguna

disolución previa.

En un aspecto adicional la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una disolución acuosa de una glicoproteína modificada, y un tampón, en la que dicha glicoproteína modificada está presente en una concentración de desde 0,1-100 mg/ml o superior, y en la que dicha composición tiene un pH de desde aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 10,0.

En otra realización de la invención el pH de la composición se selecciona de la lista que consiste en 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 y 10,0.

En una realización adicional de la invención el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, fosfato de sodio, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

En una realización adicional de la invención la composición comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional de la invención el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. En una realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de desde 0,1 mg/ml hasta 20 mg/ml. En una realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de desde 0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de desde 5 mg/ml hasta 10 mg/ml. En una realización adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de desde 10 mg/ml hasta 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas lo conoce bien el experto. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.

En una realización adicional de la invención la composición comprende además un agente isotónico. En una realización adicional de la invención el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste en una sal (por ejemplo cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol, polietilenglicol (por ejemplo PEG400), o mezclas de los mismos. Puede usarse cualquier azúcar tal como mono, di o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil-almidón y carboximetilcelulosa-Na. En una realización el aditivo de azúcar es sacarosa. Alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una realización el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente pueden usarse individualmente o en combinación. No hay un límite fijado para la cantidad usada, siempre que el azúcar o alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte de manera adversa a los efectos de estabilización obtenidos usando los métodos de la invención. En una realización, la concentración del azúcar o alcohol de azúcar es de entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de desde 1 mg/ml hasta 50 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de desde 1 mg/ml hasta 7 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de desde 8 mg/ml hasta 24 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de desde 25 mg/ml hasta 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas lo conoce bien el experto. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.

En una realización adicional de la invención la composición comprende además un agente quelante. En una realización adicional de la invención el agente quelante se selecciona de sales de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. En una realización adicional de la invención el agente quelante está presente en una concentración de desde 0,1 mg/ml hasta 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente quelante está presente en una concentración de desde 0,1 mg/ml hasta 2 mg/ml. En una realización adicional de la invención el agente quelante está presente en una concentración de desde 2 mg/ml hasta 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas lo conoce bien el experto. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.

En una realización adicional de la invención la composición comprende además un estabilizador. El uso de un estabilizador en composiciones farmacéuticas lo conoce bien el experto. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.

Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen una proteína que posiblemente muestra formación de agregados durante el almacenamiento en composiciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregados" quiere decirse una interacción física entre las moléculas de proteína que da como resultado la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o agregados visibles grandes que precipitan de la disolución. Por "durante el almacenamiento" quiere decirse una composición farmacéutica líquida o una composición una vez preparada que no se administra inmediatamente a un sujeto. En vez de eso, tras la preparación, se envasa para su almacenamiento, ya sea en forma líquida, en estado congelado o en forma secada para su posterior reconstitución para dar una forma líquida u otra forma adecuada para su administración a un sujeto. Por "forma secada" quiere decirse que la composición farmacéutica líquida o la composición se seca o bien mediante secado por congelación (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por pulverización (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5ª ed; Longman Scientific and Technical, Essez, R.U.), págs. 491-676; Broadhead *et al.* (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler *et al.* (1994) Pharm. Res. 11:12-20) o bien secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). La formación de agregados por una proteína durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar de manera adversa a la actividad biológica de esa proteína, dando como resultado una pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede provocar otros problemas tales como bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando se administra la composición farmacéutica que contiene proteína usando un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por la proteína durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" quiere decirse un aminoácido o una combinación de aminoácidos, en la que cualquier aminoácido dado está presente o bien en su forma de base libre o bien en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros están presentes en sus formas de sal. En una realización, los aminoácidos para su uso en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que portan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, isómero L o D, o mezclas de los mismos) de un aminoácido particular (metionina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o combinaciones de estos estereoisómeros o glicina o una base orgánica tal como, pero sin limitarse a, imidazol, pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido o la base orgánica particular esté presente o bien en su forma libre o bien en su forma de sal. En una realización se usa el estereoisómero L de un aminoácido. En una realización se usa el estereoisómero D. También pueden formularse composiciones de la invención con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" quiere decirse un derivado del aminoácido que se produce de manera natural que provoca el efecto deseado de reducir la formación de agregados por la proteína durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil-L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L-cisteína. Como con los demás aminoácidos, los análogos de aminoácido se incorporan en las composiciones o bien en su forma de base libre o bien en su forma de sal. En una realización adicional de la invención los aminoácidos o análogos de aminoácido se usan en una concentración que es suficiente para impedir o retrasar la agregación de la proteína.

En una realización adicional de la invención puede añadirse metionina (u otro aminoácido o análogo de aminoácido sulfúrico) para inhibir la oxidación de residuos de metionina para dar sulfóxido de metionina cuando la proteína que actúa como agente terapéutico es una proteína que comprende al menos un residuo de metionina susceptible de tal oxidación. Por "inhibir" quiere decirse una acumulación mínima de especies oxidadas de metionina a lo largo del tiempo. Inhibir la oxidación de metionina da como resultado una mayor retención de la proteína en su forma molecular apropiada. Puede usarse cualquier estereoisómero de metionina (isómero L o D) o cualquier combinación de los mismos. La cantidad que va a añadirse debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de tal manera que la cantidad de sulfóxido de metionina es aceptable para agencias reguladoras. Normalmente, esto significa que la composición no contiene más de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto puede obtenerse añadiendo metionina de tal manera que la razón de metionina añadida con respecto a residuos de metionina oscila entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1000:1, tal como de 10:1 a aproximadamente 100:1.

En una realización adicional de la invención la composición comprende además un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En una realización adicional de la invención el estabilizador se selecciona de polietilenglicol (por ejemplo PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi/hidroxicelulosa o derivados de la misma (por ejemplo HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre tales como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol, y

diferentes sales (por ejemplo cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una realización alternativa de la invención.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que potencian adicionalmente la estabilidad de una proteína terapéuticamente activa en las mismas. Los agentes estabilizantes de interés particular para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, metionina y EDTA, que protegen la proteína frente a la oxidación de metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege la proteína frente a la agregación asociada con congelación-descongelación o cizalladura mecánica.

En una realización adicional de la invención la composición comprende además un tensioactivo. En una realización adicional de la invención el tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitano, polímeros de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo, compuestos de tipo Poloxamer tales como Pluronic® F68, Poloxamer 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitano, polioxietileno y derivados de polietileno tales como derivados alquilados y alcoxilados (compuestos de tipo Tween, por ejemplo Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo fosfatidil-serina, fosfatidil-colina, fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-inositol, difosfatidil-glicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo ácido dipalmitoil-fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo palmitoil-lisofosfatidil-L-serina y ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados de alquilo, alcoxilo (éster alquílico), alcoxilo (alquil éter) de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo derivados de lauroílo y miristoílo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina de carga positiva, y glicerofosfolípidos (por ejemplo cefalinas), gliceroglicolípidos (por ejemplo galactopiranósido), esfingoglicolípidos (por ejemplo ceramidas, gangliósidos), dodecilfosfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (por ejemplo tauro-dihidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos de C_6-C_{12} (por ejemplo ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados acilados en N^{α} de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados en cadena lateral de lisina o arginina, derivados acilados en N^{α} de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado acilado en N^{α} de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, n.º de registro de CAS [577-11-7]), docusato de calcio, n.º de registro de CAS [128-49-4]), docusato de potasio, n.º de registro de CAS [7491-09-0]), SDS (dodecil-sulfato de sodio o lauril-sulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados del mismo, ácidos biliares y sales de los mismos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), tensioactivos zwitteriónicos (por ejemplo N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (por ejemplo bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo β-D-glucopiranósido de dodecilo), poloxaminas (por ejemplo Tetronic), que son copolímeros de bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo puede seleccionarse del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una realización alternativa de la invención.

El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas lo conoce bien el experto. Por comodidad se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000.

Es posible que otros componentes puedan estar presentes en la composición farmacéutica de la presente invención. Tales componentes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un compuesto zwitteriónico (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Evidentemente, tales componentes adicionales no deben afectar de manera adversa a la estabilidad global de la composición farmacéutica de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas que contienen una glicoproteína modificada según la presente invención pueden administrarse a un paciente que necesita tal tratamiento en diversos sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la piel y la mucosa, en sitios que sortean la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

La administración de composiciones farmacéuticas según la invención puede realizarse a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alveolos o una combinación de los mismos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, uretral y parenteral a pacientes que necesitan tal tratamiento.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en varias formas de dosificación, por ejemplo, como disoluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, ungüentos, pastas, tiritas, pomadas, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, pulverizaciones, polvo, aerosoles, inhalantes, colirios, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, óvulos vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, disolución para inyección, disoluciones de transformación *in situ*, por ejemplo gelificación *in situ*, endurecimiento *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, disolución para infusión e implantes.

Las composiciones de la invención pueden combinarse además con, o fijarse a, por ejemplo mediante interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un portador de fármacos, sistema de administración de fármacos y sistema de administración de fármacos avanzado con el fin de potenciar adicionalmente la estabilidad de la glicoproteína modificada, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, reducir los efectos adversos, lograr una cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica y aumentar el cumplimiento del paciente o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de portadores, sistemas de administración de fármacos y sistemas de administración de fármacos avanzados incluyen, pero no se limitan a, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilato y metacrilato, poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico) y copolímeros de bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas portadoras, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo sistemas copoliméricos de bloque bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, materiales nanoparticulados, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de la misma, bien conocidos por los expertos en la técnica de comportamiento de fases en sistemas de lípidos-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, compuestos autoemulsionantes, compuestos auto-microemulsionantes, ciclodextrinas y derivados de las mismas, y dendrímeros.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la composición de sólidos, semisólidos, polvo y disoluciones para administración pulmonar de glicoproteína modificada, usando, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos ellos dispositivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones de la presente invención son específicamente útiles en la composición de sistemas de administración de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta. Más específicamente, pero sin limitación, las composiciones son útiles en la composición de sistemas parenterales de liberación controlada y liberación sostenida (conduciendo ambos sistemas a una reducción de muchas veces en el número de administraciones), bien conocidos por los expertos en la técnica. Se prefieren incluso más preferiblemente sistemas de liberación controlada y liberación sostenida administrados por vía subcutánea. Sin limitar el alcance de la invención, ejemplos de composiciones y sistemas de liberación controlada útiles son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cristalización, condensación, co-cristalización, precipitación, co-precipitación, emulsificación, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por pulverización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación de disolvente para producir microesferas, extrusión y procedimientos de fluido supercrítico. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Composition and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000). La administración parenteral puede realizarse mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa de tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una disolución o suspensión para la administración de la glicoproteína modificada en forma de una pulverización nasal o pulmonar. Como todavía una opción adicional, las composiciones farmacéuticas que contienen la glicoproteína modificada de la invención también pueden adaptarse a la administración transdérmica, por ejemplo mediante inyección sin ajugas o a partir de un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, por ejemplo bucal.

El término “composición estabilizada” se refiere a una composición con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada.

El término “estabilidad física” de la composición de proteína tal como se usa en el presente documento se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a tensiones termomecánicas y/o interacción con superficies de contacto y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies y superficies de contacto hidrófobas. La estabilidad física de las composiciones de proteína acuosas se evalúa por medio de inspección visual y/o mediciones de la turbidez tras exponer la composición llenada en recipientes adecuados (por ejemplo cartuchos o viales) a tensión mecánica/física (por ejemplo agitación) a diferentes temperaturas durante diversos periodos de tiempo. La inspección visual de las composiciones se realiza con una luz enfocada intensa con un fondo oscuro. La turbidez de la composición se

caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez por ejemplo en una escala de desde 0 hasta 3 (una composición que no muestra turbidez corresponde a una puntuación visual de 0, y una composición que muestra turbidez visual a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una composición se clasifica como físicamente inestable con respecto a la agregación de proteína cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la composición puede evaluarse mediante sencillas mediciones de turbidez bien conocidas por el experto. La estabilidad física de las composiciones de proteína acuosas también puede evaluarse usando una sonda o agente espectroscópico del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferiblemente una molécula pequeña que se une preferentemente a un confórmero no nativo de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de la estructura de proteína es tioflavina T. La tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y quizás también de otras configuraciones de proteína, la tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y emisión potenciada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma de proteína de fibrilla. La tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente a las longitudes de onda. Pueden usarse otras moléculas pequeñas como sondas de los cambios en la estructura de proteína de estados nativos a no nativos. Por ejemplo, las sondas de “parche hidrófobo” que se unen preferiblemente a parches hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos están generalmente enterrados dentro de la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero quedan expuestos a medida que la proteína comienza a desplegarse o desnaturalizarse. Ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares pequeñas son colorantes hidrófobos aromáticos tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido, tales como complejos de metal cobalto de aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina, o similares.

El término “estabilidad química” de la composición de proteína tal como se usa en el presente documento se refiere a cambios covalentes químicos en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con menos potencia biológica potencial y/o propiedades inmunogénicas aumentadas potenciales en comparación con la estructura de la proteína nativa. Pueden formarse diversos productos de degradación química dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína nativa y el entorno al que se expone la proteína. Lo más probablemente, la eliminación de la degradación química no puede evitarse completamente y con frecuencia se observan cantidades crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la composición de proteína tal como conoce bien el experto en la técnica. La mayoría de las proteínas son propensas a desamidación, un proceso en el que el grupo amida de cadena lateral en residuos de glutaminilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradaciones implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular en los que dos o más moléculas de proteína se unen de manera covalente entre sí mediante interacciones de transamidación y/o disulfuro que conducen a la formación de productos de degradación de dímero, oligómero y polímero unidos de manera covalente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). Puede mencionarse la oxidación (por ejemplo de residuos de metionina) como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la composición de proteína puede evaluarse midiendo la cantidad de los productos de degradación química en diversos puntos de tiempo tras la exposición a diferentes condiciones del entorno (con frecuencia la formación de productos de degradación puede acelerarse, por ejemplo, aumentando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual se determina con frecuencia mediante separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño de la molécula y/o la carga usando diversas técnicas de cromatografía (por ejemplo SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

Por tanto, tal como se expuso anteriormente, una “composición estabilizada” se refiere a una composición con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada. En general, una composición debe ser estable durante el uso y almacenamiento (en cumplimiento con condiciones de uso y almacenamiento recomendadas) hasta que se alcanza la fecha de caducidad. En una realización de la invención la composición farmacéutica que comprende la glicoproteína modificada es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En otra realización de la invención la composición farmacéutica que comprende la glicoproteína modificada es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En una realización adicional de la invención la composición farmacéutica que comprende la glicoproteína modificada es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

En una realización incluso adicional de la invención la composición farmacéutica que comprende la glicoproteína modificada es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

Debe interpretarse que el uso de los términos “un” y “una” y “el/la” y referentes similares en el contexto de describir la invención cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

A menos que se mencione lo contrario, todos los valores exactos proporcionados en el presente documento son representativos de valores aproximados correspondientes (por ejemplo, pueden considerarse que todos los valores

a modo de ejemplo exactos proporcionados con respecto a un factor o medición particular también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificado por “aproximadamente” cuando sea apropiado).

Se pretende que la descripción en el presente documento de cualquier aspecto o realización de la invención usando términos tales como “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” o “que contiene” con referencia a un elemento o elementos proporcione soporte para un aspecto o realización similar de la invención que “consiste en”, “consiste esencialmente en” o “comprende sustancialmente” ese elemento o elementos particulares, a menos que se mencione lo contrario o se contradiga claramente por el contexto (por ejemplo, debe entenderse que una composición descrita en el presente documento como que comprende un elemento particular también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se mencione lo contrario o se contradiga claramente por el contexto).

Todos los títulos y subtítulos se usan en el presente documento únicamente por comodidad y no debe interpretarse como que limitan la invención de ninguna manera.

Se pretende que el uso de todos y cada uno de los ejemplos, o redacción a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionados en el presente documento simplemente ilustre mejor la invención y no supone una limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. No debe interpretarse que ningún término en la memoria descriptiva indica que ningún elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

La mención de documentos de patente en el presente documento se realiza sólo por comodidad y no refleja ninguna opinión sobre la validez, patentabilidad y/o aplicabilidad de tales documentos de patente.

Ejemplos

Abreviaturas:

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FVIIa: Factor VIIa

FVIII: Factor VIII

FIX: Factor IX

Materiales, aparatos y métodos

Purificaciones:

Se realizaron purificaciones de proteína en columna de intercambio iónico (HiTrap Q HP, Amersham Bioscience) o columna de exclusión molecular (XK26/60 HiLoad Superdex 200, Amersham Bioscience) usando un instrumento Äkta FPLC, con un colector de fracciones FC-950 (Amersham Bioscience). Los tampones de elución, las columnas y el colector de fracciones se termostatizaron a 5ºC.

SDS-PAGE:

Se realizó SDS-PAGE usando el sistema Xcell Surelock™ Mini-Cell de Invitrogen™ con geles precolados de Bis-Tris al 4-12%, tampón de corrida NuPAGE MES SDS, patrón Mark 12 y tampón de muestra NUPAGE LDS según el protocolo convencional de Invitrogen. Se tiñeron los geles con SimpleBlue™ según los protocolos de Invitrogen.

Disoluciones de tampón

Tampón GlyGly: Gly-Gly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 6,0

Tampón GlyGly libre de $CaCl_2$: Gly-Gly 25 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0

Tampón Hepes: Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 5 mM, Tween 80 al 0,01%, pH = 7,4

Ejemplo

Tratamiento con $NaIO_4$ de FVIIa y actividad de S2288

Estudio de correlación entre $NaIO_4$ y la actividad peptidolítica residual → ninguna relación obvia.

Ensayo I

Determinación de la actividad peptidolítica para FVIIa:

Se midió la actividad peptidolítica usando el sustrato cromogénico S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilina) de Chromogenix, Mölndal, Suecia. Se aplicó el siguiente protocolo: Se preparó una disolución madre 10 mM de S2288 en tampón Hepes. De manera similar se preparó una disolución madre 200 nM de factor tisular en tampón Hepes. Se prepararon disoluciones madre 200 nM de entidades de prueba y compuesto de referencia (por ejemplo FVIIa de tipo natural) en tampón Hepes. Se sometieron a prueba compuestos en pocillos de ELISA por triplicado. En un experimento típico, se añadieron 10 ul de disoluciones de entidad de prueba 200 nM, 50 ul de disoluciones madre de factor tisular 200 nM y 135 ul de tampón Hepes al pocillo. Se inició la reacción mediante adición de 5 ul de disolución madre de S2288 200 nM. Se analizaron continuamente los pocillos en un lector de ELISA (absorbancia a 405 nm) durante 15 min a temperatura ambiente. Se calcularon las actividades relativas a partir de las velocidades iniciales, y se compararon con velocidades de FVIIa de tipo natural. Se notificaron las actividades para análogos de FVIIa modificados como porcentaje de la actividad de FVIIa de tipo natural.

Ejemplo 1

10K-PEG-ONH$_2$: Se disolvió 10K-SMB-PEG (1,00 g; 0,1 mmol; Nektar Inc) en DCM (10 ml). Se añadió 4-(*N*-t-butoxicarbonilaminoxi)butilamina (0,20 g, 1 mmol, preparada tal como se describe en el documento WO 2005014049 A2) y se agitó la mezcla a ta durante 16 h. Se añadió dietil éter (90 ml) y se separó el precipitado blanco por filtración. Se repitió el procedimiento redisolviendo el precipitado en DCM (10 ml) y añadiendo dietil éter (90 ml). Entonces se redisolvió el material precipitado en DCM (6 ml) y se añadió resina de intercambio iónico Amberlyst 15 (2,0 g; lavada previamente con DCM y el 10% de EtOH en DCM). Se agitó la mezcla durante 30 min a ta, entonces se separó la resina por filtración y se lavó extensamente con DCM. Se concentraron las disoluciones de DCM combinadas hasta un volumen mínimo en un evaporador rotatorio, después se añadió dietil éter (90 ml) para precipitar el producto. Se disolvió el producto en DCM (6 ml) y se añadió TFA (6 ml). Se agitó la mezcla a ta durante ½ h. Se precipitó el producto con dietil éter (100 ml) y se separó por filtración. Se redisolvió el producto en DCM (5 ml) y se añadió trietilamina (1 ml). Se agitó la mezcla durante 5 min, después se precipitó de nuevo el producto con dietil éter (100 ml). Se separó el precipitado por filtración, se lavó dos veces con dietil éter y se secó durante la noche en un horno a vacío. Rendimiento: 475 mg (46%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$; picos seleccionados): δ 1,25 ppm (d, 3H); 1,50-1,75 (m, 6H); 1,82 (m, 1H); 3,38 (s, 3H); 3,45-3,90 (m, aproximadamente 900 H).

Ejemplo 2

mono-10K-PEG-FVIIa (0128-0000-1018-1A):

A factor VIIa (14 mg, 0,28 umol) disuelto en 10 ml de Gly-Gly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 6,0 (tampón GlyGly) se le añadieron 100 ul de una disolución de $NaIO_4$ 20 mM en tampón GlyGly libre de $CaCl_2$ y 1000 ul de una disolución de 10K-PEGONH$_2$ (ejemplo 1, 42 mg; 4,2 umol; 15 equivalentes con respecto a factor VIIa) en tampón GlyGly. Se colocó la mezcla sobre hielo durante 2 h, con agitación ocasional. Entonces se añadieron 500 ul de una disolución de MeONH$_2$.HCl (17 mg; 0,21 mmol) en tampón GlyGly (pH ajustado a 6,0 con NaOH 1 M) a la mezcla de reacción. Se dejó la mezcla sobre hielo durante 10 min adicionales. Entonces se le añadió a la mezcla de reacción una disolución fría de EDTA dibásico 100 mM (4,5 ml) mientras se mantenía el pH por debajo de 9,0. Entonces se ajustó el pH a 8,0 usando 100 ul de HCl acuoso 1 N.

Cromatografía de intercambio iónico:

Se eliminó el PEG-ONH$_2$ en exceso mediante cromatografía de intercambio iónico. Se cargó la mezcla de reacción enfriada en una columna de intercambio iónico HiTrap Q de 5 ml (Amersham Bioscience) previamente equilibrada en GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0. Se eluyó la columna con GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 (tampón A) a lo largo de 10 vc; seguido por GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 8,0 (tampón B) a lo largo de 15 vc a flujo (1 ml/min) y temperatura (5ºC) constantes. Se monitorizó el efluente mediante absorbancia a 280 nm.

Cromatografía de exclusión molecular:

Se eliminó FVIIa no pegilado de variantes de FVIIa glicopegiladas recuperadas en fracciones combinadas a partir de HiTrap Q mediante cromatografía de exclusión molecular en Superdex 200 usando una ÄKTA FPLC con instrumento Frac-950 (Amersham Bioscience) realizada a 5ºC. Se equilibró previamente (10 vc) la columna XK26/60 HiLoad Superdex 200 (320 ml de vc) y tras la carga se eluyó con GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 6,0, a una velocidad de flujo de 2,5 ml/min. Se monitorizó el efluente mediante absorbancia a 280 nm. Se recogieron fracciones de 10 ml. Se analizaron las fracciones con SDS-PAGE (geles de NuPAGE de Bis-Tris al 4-12%) teñidos con Simple Blue tal como se describe por Invitrogen. Se combinaron las fracciones que contenían FVIIa mono-pegilado puro y se concentraron mediante filtración a través de un filtro de centrífuga Amicon Ultra™-15 (MWCO de 10 K) a 4000 rpm, 10ºC, durante 13,5 min, obteniendo un volumen final de 4,1 ml.

Se determinó que la concentración de proteína era de 0,29 mg/ml mediante mediciones de UV (usando $E_{280\ nm}$ = 1,32 ml/mg/cm), lo cual es igual a 0,35 mg/ml de FVIIa-10K-PEG. La actividad peptidolítica (ensayo de S2288) era del 79% con respecto a FVIIa de tipo natural.

Ejemplo 3

Preparación de 10K-PEG-FVIIa con alto grado de sustitución (HS) y con bajo grado de sustitución (LS)

A factor VIIa (14 mg, 0,28 umol) disuelto en 10 ml de Gly-Gly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 6,0 (tampón GlyGly) se le añadieron 100 ul de una disolución de $NaIO_4$ 20 mM en tampón GlyGly libre de $CaCl_2$ y 1000 ul de una disolución de 10K-PEG-ONH_2 (ejemplo 1, 42 mg; 4,2 umol; 15 equivalentes con respecto a factor VIIa) en tampón GlyGly. Se colocó la mezcla a 4ºC durante 24 h, con agitación ocasional. Entonces se añadieron 500 ul de una disolución de $MeONH_2$.HCl (17 mg; 0,21 mmol) en tampón GlyGly (pH ajustado a 6,0 con NaOH 1 M) a la mezcla de reacción. Se dejó la mezcla sobre hielo durante 10 min adicionales. Entonces se le añadió a la mezcla de reacción una disolución fría de EDTA dibásico 100 mM (4,5 ml) mientras se mantenía el pH por debajo de 9,0. Entonces se ajustó el pH a 8,0 usando 60 ul de HCl acuoso 1 N.

Cromatografía de intercambio iónico:

Se eliminó el PEG-ONH_2 en exceso mediante cromatografía de intercambio iónico. Se cargó la mezcla de reacción enfriada en una columna de intercambio iónico HiTrap Q de 5 ml (Amersham Bioscience) previamente equilibrada en GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0. Se eluyó la columna con GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 (tampón A) a lo largo de 10 vc; seguido por GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 8,0 (tampón B) a lo largo de 15 vc a flujo (1 ml/min) y temperatura (5ºC) constantes. Se monitorizó el efluente mediante absorbancia a 280 nm.

Cromatografía de exclusión molecular:

Se eliminó FVIIa no pegilado de variantes de FVIIa glicopegiladas recuperadas en fracciones combinadas a partir de HiTrap Q mediante cromatografía de exclusión molecular en Superdex 200 usando una ÄKTA FPLC con instrumento Frac-950 (Amersham Bioscience) realizada a 5ºC. Se equilibró previamente (10 vc) la columna XK26/60 HiLoad Superdex 200 (320 ml de vc) y tras la carga se eluyó con GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 6,0, a una velocidad de flujo de 2,5 ml/min Se monitorizó el efluente mediante absorbancia a 280 nm. Se recogieron fracciones de 10 ml. Se analizaron las fracciones con SDS-PAGE (geles de NuPAGE de Bis-Tris al 4-12%) teñidos con Simple Blue tal como se describe por Invitrogen. Se combinaron las fracciones según el nivel de sustitución con PEG, y se concentraron mediante filtración a través de un filtro de centrífuga Amicon Ultra™-15 (MWCO de 10 K) a 4000 rpm, 10ºC.

HS (tri/tetra-10K-PEG) FVIIa: 0,92 mg de proteína ($UV_{280\ nm}$)/ml, volumen total = 1,6 ml.

HS (di/tri-10K-PEG) FVIIa: 0,63 mg de proteína ($UV_{280\ nm}$)/ml, volumen total = 1,4 ml.

LS (mono/di-10K-PEG) FVIIa: 1,2 mg de proteína ($UV_{280\ nm}$)/ml, volumen total = 1,4 ml.

Mono-10K-PEG-FVIIa: 0,7 mg de proteína ($UV_{280\ nm}$)/ml, volumen total = 2,3 ml.

Ejemplo 4

Preparación de 40K-PEG-FVIIa con alto grado de sustitución (HS) y con bajo grado de sustitución (LS)

A factor VIIa (14 mg, 0,28 umol) disuelto en 15 ml de Gly-Gly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 6,0 (tampón GlyGly) se le añadieron 50 ul de disolución de $NaIO_4$ 20 mM en tampón GlyGly libre de $CaCl_2$ y 1500 ul de una disolución de 40K-PEG-ONH_2 ((20K-PEG)OCH_2(20K-PEG)$OCHCH_2OC(=O)O$-$CH_2CH_2ONH_2$; documento WO 2006042847, 112 mg; 2,8 umol; 10 equivalentes con respecto a factor VIIa) en tampón GlyGly. Se colocó la mezcla a 4ºC durante 48 h, con agitación ocasional. Entonces se añadieron 500 ul de una disolución de $MeONH_2$.HCl (17 mg; 0,21 mmol) en tampón GlyGly a la mezcla de reacción seguido por ajuste del pH a pH 6,0 usando NaOH 1 N. Se dejó la mezcla sobre hielo durante 10 min. Entonces se le añadió a la mezcla de reacción una disolución fría de EDTA dibásico 100 mM (4,5 ml) mientras se mantenía el pH por debajo de 9,0. Entonces se ajustó el pH a 8,0 usando 60 ul de HCl acuoso 1 N.

Cromatografía de intercambio iónico:

Se eliminó el PEG-ONH_2 en exceso mediante cromatografía de intercambio iónico. Se cargó la mezcla de reacción enfriada en una columna de intercambio iónico HiTrap Q de 5 ml (Amersham Bioscience) previamente equilibrada en GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0. Se eluyó la columna con GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, pH 8,0 (tampón A) a lo largo de 10 vc; seguido por GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 8,0 (tampón B) a lo largo de 15 vc a flujo (1 ml/min) y temperatura (5ºC) constantes. Se monitorizó el efluente mediante absorbancia a 280 nm. Se

combinaron las fracciones y se ajustó el pH a 6,0 usando HCl 1 N.

Cromatografía de exclusión molecular:

Se eliminó FVIIa no pegilado de variantes de FVIIa glicopegiladas recuperadas en fracciones combinadas a partir de HiTrap Q mediante cromatografía de exclusión molecular en Superdex 200 usando una ÄKTA FPLC con instrumento Frac-950 (Amersham Bioscience) realizada a 5ºC. Se equilibró previamente (10 vc) la columna XK26/60 HiLoad Superdex 200 (320 ml de vc) y tras la carga se eluyó con GlyGly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 6,0, a una velocidad de flujo de 2,5 ml/min. Se monitorizó el efluente mediante absorbancia a 280 nm. Se recogieron fracciones de 10 ml. Se analizaron fracciones que contenían actividad UV (280 nm) con SDS-PAGE (geles de NuPAGE de Bis-Tris al 4-12%) teñidos con Simple Blue tal como se describe por Invitrogen. Se combinaron las fracciones según el nivel de sustitución con PEG, y se concentraron mediante filtración a través de un filtro de centrífuga Amicon Ultra™-15 (MWCO de 10 K) a 4000 rpm, 10ºC.

HS (di/tri-40K-PEG) FVIIa: 0,46 mg de proteína ($UV_{280\ nm}$)/ml, volumen total = 3,0 ml.

LS (mono/di-40K-PEG) FVIIa: 0,75 mg de proteína ($UV_{280\ nm}$)/ml, volumen total = 3,7 ml.

Mono-40K-PEG-FVIIa: 0,53 mg de proteína ($UV_{280\ nm}$)/ml, volumen total = 4,5 ml.

Ejemplo 5

Preparación de 5K-PEG-FVIIa con alto grado de sustitución (HS) y con bajo grado de sustitución (LS)

- Influencia sobre la concentración de peryodato y la actividad peptidolítica del compuesto final.

Se prepararon las siguientes disoluciones madre:

Disolución madre de PEG 2,8 mM: 5K-PEG-ONH_2 (4,03 mg; 0,8 umol, preparado a partir de éster 5K-PEG-NHS tal como se describió en el ejemplo 1) disuelto en 281 ul de tampón GlyGly libre de $CaCl_2$ (Gly-Gly 25 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0). Disolución madre de $NaIO_4$ 20 mM: $NaIO_4$ (426 mg; 2 mmol) en 100 ml tampón GlyGly libre de $CaCl_2$ (Gly-Gly 25 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0). Disolución de EDTA 100 mM: Sal de disodio de EDTA (292 mg) en 10 ml de agua. Disolución de $CaCl_2$ 1 M: $CaCl_2$ (1,12 g) en 10 ml de agua (filtrada a través de un filtro de 0,45 um). Disolución de factor VIIa 12,8 uM: A (1,4 mg, 0,028 umol) disuelto en 1,0 ml de Gly-Gly 25 mM, NaCl 50 mM, $CaCl_2$ 25 mM, pH 6,0 (tampón GlyGly) se le añadieron 95 ul de una disolución de EDTA 100 mM seguido por 1,095 ml de tampón GlyGly libre de $CaCl_2$ (concentración de FVIIa final = 0,64 mg/ml). Se mezclaron las disoluciones madre según el siguiente esquema:

Entrada	FVIIa 12,8 uM	Tampón GlyGly libre de $CaCl_2$	$NaIO_4$ 20 mM	PEG5000-ONH_2 2,8 mM	volumen total
1	50 ul	40 ul	0 ul	10 ul	100 ul
2	50 ul	20 ul	20 ul	10 ul	100 ul
3	50 ul	30 ul	10 ul	10 ul	100 ul
4	50 ul	38 ul	2 ul	10 ul	100 ul
5	50 ul	39,5 ul	0,5 ul	10 ul	100 ul

Todas las mezclas de reacción se agitaron suavemente a temperatura ambiente durante 2 h. Entonces se le añadieron a cada vial 25 ul de disolución de $CaCl_2$ 1 M. Entonces se analizaron muestras para determinar la actividad peptidolítica tal como se describió en la sección de ensayos.

Entrada	Conc. de $NaIO_4$ final	Razón de FVIIa:$NaIO_4$	Razón de ácido siálico:$NaIO_4$*	Actividad peptidolítica relativa
1	0,0 mM	1:0	1:0	100
2	4,0 mM	1:625	1:138	3,6
3	2,0 mM	~1:312	~1:70	15
4	0,4 mM	~1:63	~1:14	47
5	0,1 mM	~1:16	~1:3,5	82
* El número promedio de ácidos siálicos en FVIIa es igual a 4,5 tal como se determina mediante ensayo de neuraminidasa - galactosa oxidasa tal como se describe en el ejemplo 8 a continuación.				

En todos los casos, se obtuvo una mezcla idéntica de producto mono, di y tri-pegilado, tal como se analizó mediante SDS-PAGE (geles de NuPAGE de Bis-Tris al 4-12%) teñidos con SilverQuest tal como se describe por Invitrogen.

Ejemplo 6:

Preparación de 10K-PEG-FIX con alto grado de sustitución (HS) y con bajo grado de sustitución (LS):

Estos materiales se preparan usando el protocolo descrito en el ejemplo 3.

Ejemplo 7:

Preparación de 40K-PEG-FIX con alto grado de sustitución (HS) y con bajo grado de sustitución (LS)

Se purificó factor IX (BeneFix) a partir de excipientes según el siguiente procedimiento: Se reconstituyó el material secado por congelación (1000 UI) en agua estéril (4 ml) y se le añadió EDTA (200 ul, disolución acuosa 0,25 M, pH 6). Tras 10 min a 5ºC, se cargó la muestra en una columna Resource Q de 1 ml (Amersham Bioscience) previamente equilibrada en GlyGly 25 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0. Se usó la columna a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se eluyó la columna con GlyGly 25 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0 (tampón A) a lo largo de 30 vc; seguido por GlyGly 25 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM, pH 6,0 (tampón B) a lo largo de 15 vc a flujo (1 ml/min) y temperatura (5ºC) constantes. Se monitorizó el efluente mediante absorbancia a 280 nm. Se recogió una fracción de 4,2 ml, y se determinó mediante absorbancia (1,32/mg/ml) que la concentración de proteína era de 0,52 mg/ml.

Reacción de pegilación:

A Benefix purificado en GlyGly 25 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0 (2 ml; 1,04 mg; 18,54 mmol) se le añadieron 80 ul ($NaIO_4$ 1 mM, 80 nmol, 1 equivalente con respecto al contenido de ácido siálico en BeneFix). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, después se añadió una disolución de 40K-PEG-ONH_2 ((20K-PEG)OCH_2(20K-PEG)$OCHCH_2OC$(=O)O-$CH_2CH_2ONH_2$; documento WO 2006042847; 926 ul; 500 uM; 25x) en GlyGly 25 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0. Se dejó la mezcla a ta durante 48 h. Entonces se añadió metionina (100 ul, 5 mM en GlyGly 25 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0) seguido por $MeONH_2$ (100 ul, 5 mM en GlyGly 25 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0). Se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min, y después se congeló hasta -80ºC hasta la purificación adicional.

Cromatografía de intercambio iónico:

Se eliminaron el reactivo PEG-ONH_2 en exceso y FIX no pegilado de las variantes de FIX glicopegiladas mediante cromatografía de intercambio iónico usando una columna Resource Q de 1 ml usada en una ÄKTA FPLC con instrumento Frac-950 (todos de Amersham Bioscience). Se monitorizó el efluente mediante absorción a 280 nm. Se recogieron fracciones de 1000 ul y se mantuvo el flujo a 1 ml/min durante el procedimiento. Se descongeló lentamente la mezcla de reacción congelada y se le añadió EDTA (400 ul, disolución acuosa 0,25 M, pH 6). Se ajustó la conductividad de la mezcla a 9,3 mS mediante adición de agua. Entonces se aplicó la mezcla a la columna Resource Q que se equilibró previamente en 20 vc de histidina 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,0. Se lavó la columna con 15 vc de histidina 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,0 seguido por 15 vc de histidina 10 mM, NaCl 50 mM, Tween 80 al 0,01%, pH 6,0 (tampón A). Entonces se eluyó la columna con un gradiente creciente (0-80%) de histidina 10 mM, $MgCl_2$ 50 mM, Tween 80 0,01%, pH 6,0 (tampón B), a lo largo de 15 vc, seguido por el 100% de tampón B a lo largo de 20 vc. Se analizaron las fracciones en SDS-PAGE (geles de NuPAGE de Bis-Tris al 4-12%) teñido con Simple Blue tal como se describe por Invitrogen. Se combinaron las fracciones según el nivel de sustitución con PEG.

LS (mono/di-40K-PEG) FIX: 34,3 ug de proteína ($UV_{280\ nm}$)/ml, volumen total = 3 ml.

Mono-40K-PEG-FIX: 70,7 ug de proteína ($UV_{280\ nm}$)/ml, volumen total = 3 ml.

Ejemplo 8:

Cuantificación del contenido de ácidos siálicos en FVIIa:

Se determinó el contenido de ácido siálico usando el kit de ensayo de neuraminidasa Amplex Red (sialidasa) (A-22178) de Molecular Probes Inc. (29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402), tal como se describe en el documento WO 2005014035 A2.

Ejemplo 9:

Pegilación 40 K mediada por peryodato de FVIII

Se disolvió factor VIII (Refacto; Wyeth, 2000 UI) en 1 ml de tampón de dispersión que contenía: NaCl (36 mg/ml); sacarosa (12 mg/ml); L-histidina (6 mg/ml); KCl (1 mg/ml); polisorbato 80 (0,4 mg/ml). Después se sometieron a intercambio de tampón 400 UI (en 200 ul de tampón de constitución) con GlyGly 20 mM, NaCl 0,15 M; $CaCl_2$ 10 mM; Tween 80 al 0,02%, pH 7,3 mediante filtración por centrifugación usando un instrumento Amicon Ultra 15, MWCO de 10 K (3x12 min, 13.000 rpm). A 30 ul de esta disolución de FVIII se le añadieron 10 ul de 40K-PEG-ONH_2 500 uM (SunBright GL2-400CA; 20 mg/ml) en GlyGly 20 mM, NaCl 0,15 M; $CaCl_2$ 10 mM; Tween 80 al 0,02%, pH 7,3,

seguido por 3 ul de una disolución acuosa de $NaIO_4$ 100 uM y 12 ul de disolución de GlyGly 20 mM, NaCl 0,15 M; $CaCl_2$ 10 mM; Tween 80 al 0,02%, pH 7,3. Se incubó la reacción durante 16 h a 4ºC, después se analizó mediante gel de SDS (gel de acetato de Tris al 7%, 150 V/70 min) y se tiñó con plata con SilverQuest tal como se describe por Invitrogen.

DISPOSICIONES A MODO DE EJEMPLO

Para ilustrar mejor la invención descrita en el presente documento, aquí se proporciona una lista no limitativa de algunas disposiciones y características a modo de ejemplo de la invención:

1. Un método para preparar una glicoproteína modificada con la estructura general

$$(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m \qquad \text{(fórmula I)},$$

en la que M y opcionalmente M' son independientemente un resto polimérico para aumentar el peso molecular de la glicoproteína modificada, y en la que L y L' representan independientemente un grupo de unión bivalente, y en la que P representa una glicoproteína que comprende uno o más extremos terminales de glucano oxidado de dicha glicoproteína, O, N, C y H representan átomos de oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógeno respectivamente, n es 1-10, m es 0-50, comprendiendo el método las etapas de

a) oxidar con iones peryodato al menos un extremo terminal de glicano presente en la glicoproteína P*, en la que P* representa una pluralidad de glicoformas para obtener la glicoproteína $P\text{-}(CHO)_{n+m}$ que contiene uno o más grupos aldehído, y

b) hacer reaccionar $P(CHO)_{n+m}$ con $M\text{-}L\text{-}O\text{-}NH_2$ para obtener la glicoproteína modificada con la estructura $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CHO)_m$, y

c) hacer reaccionar cualquier grupo aldehído que no ha reaccionado en la glicoproteína con estructura $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CHO)_m$ con $M'\text{-}L'\text{-}O\text{-}NH_2$ para obtener la glicoproteína modificada con la estructura $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m$,

en el que dichos iones peryodato están presentes en una cantidad de 0,1-5 equivalentes con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína, y en el que dicha glicoproteína modificada tiene propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la glicoproteína de partida P* y ha conservado su actividad funcional.

2. El método según la realización 1, en el que dicha glicoproteína está N-glicosilada y/u O-glicosilada y/o contiene restos de ácido siálico.

3. El método según una cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende la etapa adicional de confirmar que la glicoproteína modificada tiene propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la glicoproteína de partida.

4. El método según una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la propiedad farmacológica mejorada se selecciona del grupo que consiste en biodisponibilidad aumentada, semivida *in vivo* funcional aumentada, semivida en plasma *in vivo* aumentada, inmunogenicidad reducida, resistencia a proteasa aumentada, afinidad por albúmina aumentada, afinidad por un receptor mejorada, estabilidad en almacenamiento aumentada, semivida *in vivo* funcional reducida, semivida en plasma *in vivo* reducida.

5. El método según la realización 4, en el que la semivida aumentada se obtiene al ser M y/o M' un grupo que aumenta el peso molecular de modo que se reduce o se suprime el aclaramiento renal y/o al ser M un grupo que enmascara parejas de unión para receptores hepáticos.

6. El método según la realización 4, en el que la inmunogenicidad reducida se obtiene al ser M y/o M' un grupo que bloquea la unión de anticuerpos a sitios inmunogénicos.

7. El método según la realización 4, en el que la afinidad por albúmina mejorada se obtiene al ser M y/o M' un grupo que tiene alta afinidad por albúmina.

8. El método según la realización 4, en el que la afinidad por un receptor mejorada se obtiene al ser M y/o M' un grupo que se une específicamente a un receptor de superficie en una célula diana.

9. El método según una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que M y/o M' se seleccionan del grupo que consiste en: un radical cargado orgánico de bajo peso molecular, que puede contener uno o más ácidos carboxílicos, aminas, ácidos sulfónicos, ácidos fosfónicos, o combinaciones de los mismos; una molécula hidrófila neutra de bajo peso molecular, tal como ciclodextrina o una cadena de polietileno opcionalmente ramificada; una

molécula hidrófoba de bajo peso molecular tal como un ácido graso o ácido cólico o derivados de los mismos; un polietilenglicol con un peso molecular promedio de 2-40 kDa; un polímero de precisión bien definido tal como un dendrímero con una masa molecular exacta que oscila entre 700 Da y 20 kDa; un polipéptido sustancialmente no inmunogénico tal como albúmina, un anticuerpo o una parte de un anticuerpo que contiene opcionalmente un dominio Fc; y un polímero orgánico de alto peso molecular.

10. El método según una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que M y/o M' se seleccionan del grupo que consiste en un dendrímero, poli(óxido de alquileno) (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificado, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, poli(etileno-co-anhídrido de ácido maleico), poli(estireno-co-anhídrido de ácido maleico), dextrano, carboximetil-dextrano, HES, MPC y PHF.

11. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-9, en el que M y/o M' se seleccionan del grupo que consiste en un ligando de unión a proteína sérica y una molécula orgánica pequeña que contiene restos que en condiciones fisiológicas altera las propiedades de carga, una estructura que inhibe la unión de glicanos a receptores, y un sustituyente neutro que impide el reconocimiento específico de glicano.

12. El método según una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que P se selecciona de FVII, FVIII, FIX, FX, FII, FV, proteína C, proteína S, tPA, PAI-1, factor tisular, FXI, FXII, FXIII, así como variantes de secuencia de los mismos; inmunoglobulinas, citocinas tales como interleucinas, interferones alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias incluyendo factores estimulantes de colonias de granulocitos, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento derivados de las plaquetas, proteína activante de fosfolipasa (PUP), insulina, proteínas vegetales tales como lectinas y ricinas, factores de necrosis tumoral y alelos relacionados, formas solubles de receptores de factor de necrosis tumoral, receptores de interleucina y formas solubles de receptores de interleucina, factores de crecimiento tales como factores de crecimiento tisular, tales como TGFa o TGFp y factores de crecimiento epidérmico, hormonas, somatomedinas, eritropoyetina, hormonas pigmentarias, factores de liberación del hipotálamo, hormonas antidiuréticas, prolactina, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del folículo, hormona estimulante del tiroides, activador de plasminógeno tisular e inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA e IgD, y fragmentos de las mismas, o cualquier proteína de fusión que comprende cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente o fragmentos de las mismas.

13. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-12, en el que la glicoproteína es un polipéptido de factor VII.

14. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-12, en el que la glicoproteína tiene la secuencia de aminoácidos de factor VII humano de tipo natural.

15. El método según una cualquiera de las realizaciones 13-14, en el que la glicoproteína modificada muestra al menos aproximadamente el 10%, tal como al menos aproximadamente el 20%, tal como al menos aproximadamente el 40%, tal como al menos aproximadamente el 60%, tal como al menos aproximadamente el 80%, tal como al menos aproximadamente el 100% de la actividad específica de polipéptido de factor VII no modificado cuando se somete a prueba en uno o más de un ensayo de coagulación, ensayo de proteólisis o ensayo de unión a TF tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

16. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-15, en el que la glicoproteína modificada muestra una biodisponibilidad que es de al menos aproximadamente el 110% de la biodisponibilidad de la glicoproteína no modificada, tal como al menos aproximadamente el 120%, aproximadamente el 130% o al menos aproximadamente el 140% de la biodisponibilidad de la glicoproteína no modificada.

17. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-15, en el que la glicoproteína modificada muestra una semivida en suero que es de al menos aproximadamente el 125% de la semivida de la glicoproteína no modificada, tal como aproximadamente el 150%, aproximadamente el 200% o al menos aproximadamente el 250% de la semivida de la glicoproteína no modificada.

18. El método según una cualquiera de las realizaciones 1-17, en el que dichos iones peryodato están presentes en una cantidad de menos de 20 equivalentes, tal como menos de 10 equivalentes, tal como menos de 5 equivalentes, tal como menos de 1 equivalente con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína, tal como en el intervalo de 0,1-20 equivalentes, tal como en el intervalo de 0,1-10 equivalentes, tal como en el intervalo de 0,1-5 equivalentes, tal como en el intervalo de 0,1-1 equivalentes, con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar una glicoproteína modificada con la estructura general $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m$ (fórmula I), en la que M y opcionalmente M' son independientemente un resto polimérico para aumentar el peso molecular de la glicoproteína modificada, y en la que L y L' representan independientemente un grupo de unión bivalente, y en la que P representa una glicoproteína que comprende uno o más extremos terminales de glucano oxidado de dicha glicoproteína, O, N, C y H representan átomos de oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógeno respectivamente, n es 1-10, m es 0-50, comprendiendo el método las etapas de:

a) oxidar con iones peryodato al menos un extremo terminal de glicano presente en la glicoproteína P*, en la que P* representa una pluralidad de glicoformas para obtener la glicoproteína $P\text{-}(CHO)_{n+m}$ que contiene uno o más grupos aldehído, y

b) hacer reaccionar $P(CHO)_{n+m}$ con $M\text{-}L\text{-}O\text{-}NH_2$ para obtener la glicoproteína modificada con la estructura $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CHO)_m$, y

c) hacer reaccionar cualquier grupo aldehído que no ha reaccionado en la glicoproteína con estructura $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CHO)_m$ con $M'\text{-}L'\text{-}O\text{-}NH_2$ para obtener la glicoproteína modificada con la estructura $(M\text{-}L\text{-}O\text{-}N{=}CH)_n\text{-}P\text{-}(CH{=}N\text{-}O\text{-}L'\text{-}M')_m$;

en el que dichos iones peryodato están presentes en una cantidad de 0,1-5 equivalentes con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína, y en el que dicha glicoproteína modificada tiene propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la glicoproteína de partida P* y ha conservado su actividad funcional, y en el que P se selecciona de FVII, FVIII y FIX.

2. Método según la reivindicación 1, en el que M y/o M' se seleccionan del grupo que consiste en: un radical cargado orgánico de bajo peso molecular, que puede contener uno o más ácidos carboxílicos, aminas, ácidos sulfónicos, ácidos fosfónicos, o combinaciones de los mismos; una molécula hidrófila neutra de bajo peso molecular, tal como ciclodextrina o una cadena de polietileno opcionalmente ramificada; una molécula hidrófoba de bajo peso molecular tal como un ácido graso o ácido cólico o derivados de los mismos; un polietilenglicol con un peso molecular promedio de 2-40 kDa; un polímero de precisión bien definido tal como un dendrímero con una masa molecular exacta que oscila entre 700 Da y 20 kDa; un polipéptido sustancialmente no inmunogénico tal como albúmina, un anticuerpo o una parte de un anticuerpo que contiene opcionalmente un dominio Fc; y un polímero orgánico de alto peso molecular.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que M y/o M' se seleccionan del grupo que consiste en un dendrímero, poli(óxido de alquileno) (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificado, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, poli(etileno-co-anhídrido de ácido maleico), poli(estireno-co-anhídrido de ácido maleico), dextrano, carboximetil-dextrano, HES, MPC y PHF.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la glicoproteína es un polipéptido de factor VII.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la glicoproteína modificada muestra una biodisponibilidad que es de al menos aproximadamente el 110% de la biodisponibilidad de la glicoproteína no modificada, tal como al menos aproximadamente el 120%, aproximadamente el 130% o al menos aproximadamente el 140% de la biodisponibilidad de la glicoproteína no modificada.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dichos iones peryodato están presentes en una cantidad de 0,1-1 equivalentes, con respecto al número de extremos terminales de glicano no reductores presentes en la glicoproteína.