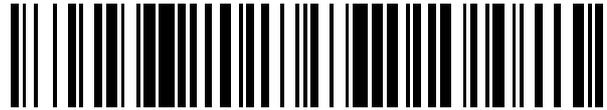


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 369**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 47/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2011** **E 11708419 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015** **EP 2536752**

54 Título: **Factor VIII recombinante modificado**

30 Prioridad:

18.02.2010 US 305723 P
16.02.2010 EP 10153716

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2015

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

BUCHARDT, JENS y
BEHRENS, CARSTEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 541 369 T3

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

DESCRIPCIÓN

Factor VIII recombinante modificado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a proteínas modificadas. En particular, la presente invención se refiere a proteínas tales como, por ejemplo, factores de coagulación conjugados con un grupo lateral hidrófobo. La invención se refiere además al uso de tales moléculas, así como a métodos para producir tales moléculas.

Antecedentes de la invención

10 La hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario causado por una deficiencia o disfunción de la actividad del factor de coagulación VIII (FVIII). El cuadro clínico no está en la homeostasis primaria - se produce normalmente la formación del coágulo sanguíneo - sino que el coágulo es inestable debido a la falta de formación de trombina secundaria. La enfermedad se trata mediante inyección intravenosa de factor de coagulación FVIII que, o bien se aísla a partir de la sangre o se produce de forma recombinante. Los pacientes que tienen hemofilia A con inhibidores se pueden tratar mediante administración a demanda del factor VIIa (FVIIa). La hemofilia B está causada por una deficiencia o disfunción de la actividad del factor de coagulación IX (FIX) y los pacientes se pueden tratar mediante administración a demanda del factor IX (FIX).

15 Las recomendaciones actuales para un tratamiento están abandonando el tratamiento a demanda tradicional para pasar a la profilaxis. La semivida circulatoria de FVIII endógeno unido al factor de von Willebrandt es de 12-14 horas y, por lo tanto, el tratamiento profiláctico debe realizar varias veces a la semana con el fin de que los pacientes tengan una vida prácticamente exenta de síntomas. La semivida circulatoria del factor VII endógeno es menor de 2 horas. La semivida circulatoria del factor IX endógeno es de 19-24 horas. La administración i.v. está asociada en muchas personas, especialmente en niños y jóvenes, con molestias y/o dolor significativo. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de prolongar la semivida circulatoria de factores de coagulación recombinantes. Existe igualmente una necesidad en la técnica de prolongar la semivida de una variedad de otras proteínas y péptidos terapéuticos de una manera dirigida al sitio, que dé como resultado preferiblemente un producto relativamente homogéneo y bien definido.

20 Se han empleado diversos métodos en el desarrollo de factores de coagulación y de proteínas farmacéuticas en general, con una semivida circulatoria significativamente prolongada. Algunos de estos métodos se refieren a la conjugación con polímeros hidrófilos tales como por ejemplo, PEG (polietilenglicol). La conjugación con cadenas laterales hidrófobas realizada por una parte, constituye un enfoque atractivo debido al hecho de que tales grupos se pueden degradar completamente *in vivo*. Por otro lado, la conjugación de proteínas con uno o varios restos hidrófobos bien definidos, no ha constituido hasta ahora un enfoque atractivo para la prolongación de la semivida de proteínas relativamente grandes, incluyendo factores de coagulación, tales como por ejemplo, FVIII. De hecho, la conjugación de tales restos hidrófobos con proteínas no se consideraría un enfoque realista debido a: 1) las proteínas grandes tales como FVIII solo son estables en tampones acuosos carentes de disolventes orgánicos; 2) restos lipófilos tales como ácidos grasos son insolubles en tales tampones acuosos; 3) sería dudoso que la fijación de restos lipófilos relativamente pequeños diera como resultado cualquier prolongación significativa de proteínas mucho más grandes, como por ejemplo, FVIII; 4) restos lipófilos, cuando se fijan a la superficie de proteínas que normalmente es hidrófila, pueden alterar su estabilidad debido a la agregación o ser energéticamente favorables pero con un plegamiento perjudicial; y 5) la interacción de la proteína con sus parejas de unión naturales se puede alterar de forma similar, lo que conduce a una actividad biológica reducida.

40 El documento WO2009/108806 describe una molécula de Factor VIII con el dominio B truncado con una semivida circulatoria modificada, estando dicha molécula conjugada covalentemente con un polímero hidrófilo a través de un oligosacárido ligado a O en el dominio B truncado, en donde la activación del Factor VIII da como resultado una eliminación del grupo lateral conjugado covalentemente.

45 Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una molécula de FVIII recombinante, en donde dicha molécula se conjuga covalentemente con al menos un grupo lateral hidrófobo, en donde el grupo lateral hidrófobo está ligado a dicha molécula a través de un ácido siálico, en donde dicho grupo lateral hidrófobo está conjugado covalentemente con un O-glicano a través de un ácido siálico, en donde dicho O-glicano está situado en un dominio B truncado y en donde la activación de FVIII da como resultado la eliminación de dicho grupo lateral hidrófobo.

55 Tales conjugados tienen una semivida circulatoria modificada y tienen preferentemente una estructura relativamente homogénea. Los conjugados, además, conservan la actividad biológica y se producen preferiblemente sin utilizar ningún disolvente orgánico. Sin embargo, es posible emplear un método para preparar tales moléculas en donde dicho método comprende el uso de cantidades traza de disolventes orgánicos.

Descripción de la invención

Definiciones:

5 Moléculas de Factor VIII: El FVIII/Factor VIII es una glicoproteína grande, compleja que es producida principalmente por los hepatocitos. FVIII consiste en 2351 aminoácidos que incluyen un péptido señal y contiene varios dominios distintos, tal y como se definen por homología. Hay tres dominios A, un dominio B único y dos dominios C. El orden de los dominios se puede representar como NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. FVIII circula en el plasma en forma de dos cadenas, separadas en la zona límite B-A3. Las cadenas están conectadas por enlaces iónicos de metales bivalentes. La cadena A1-A2-B se denomina la cadena pesada (CP), mientras que la A3-C1-C2 se denomina la cadena ligera (CL).

10 Las moléculas del Factor VIII endógeno circulan *in vivo* como una agrupación de moléculas con dominios B de diferentes tamaños. Lo que probablemente ocurre *in vivo* es una eliminación enzimática gradual del dominio B, dando como resultado una agrupación de moléculas con dominios B de diversos tamaños. En general se cree que la escisión en la posición 740, con la que se elimina la última parte del dominio B, se produce en conexión con la activación de la trombina. Sin embargo, no se puede descartar que una variante del Factor VIII en la que por ejemplo, el sitio de escisión en la posición 740 se ha deteriorado, pueda ser activa.

15 "Factor VIII" o "FVIII" tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a una glicoproteína plasmática humana que es un miembro de la vía de coagulación intrínseca y es esencial para la coagulación de la sangre. "FVIII" es la molécula de FVIII humana de longitud completa, tal y como se muestra en SEQ ID NO. 2 (aminoácidos 1-2332). El dominio B abarca los aminoácidos 741-1648 en la SEQ ID NO 2.

SEQ ID NO 2:

 ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKS-
 FPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASH-
 PVS LHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGG-
 SHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSH-
 VDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVF-
 DEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVY-
 WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ-
 TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLT-
 DSEMDVVRFDNNSPFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP-
 DDSYKSQYLNNQPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDLLI-
 IFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKS-
 DPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSW-
 YLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSLQSVCLHEVAYWYILSIGAQT-
 FLSVFFSGYTFKHKMVEYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRG-
 MTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNSRHPSTRQKQFNATTI-
 PENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDP-
 SPGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHS GDMVFTPEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLD-
 FKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGG-
 PLSLSEENNSKLLSGLMNSQESS-
 20 WGKNVSTESGRFLFKGRAHPALLTKDNALFKVSI SLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLI

ENSPSVWQNILESDETFKKVTPLIHDRM-
 LMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLFLPESAR-
 WIQRTHGKNSLNSGQGP-
 SPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNLD-
 NLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLSTRQNVESYD-
 GAYAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISP-
 NTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQI-
 DYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSS-
 FPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRK-
 KDSGVQESSHFLQGAKNNLSLAILTLEMTGDQREVGLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPD-
 LPKTSQKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLGTEGAIK-
 WNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPKTA-
 FKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVVKRHQREITRT-
 TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFI-
 AAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEH-
 LGLLGPYIRAEVEDNIMVFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNFVKNETK-
 TYFWKQVHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG-
 PLLVCHTNTLPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERN-
 CRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRRWYLLSMGSNE-
 NIHSIHFGSHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM-
 LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPGLMASGHIRDFQITASGQYQWAP-
 KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLD-
 GKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGKHNIFNPPIIARYIRLHPHYSIRSTLR-
 MELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFAT-
 WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKE-
 FLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRI-
 HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

- 5 Las moléculas de factor VIII en esta memoria pueden ser moléculas del Factor FVIII con el dominio B truncado en donde los dominios restantes se corresponden estrechamente con la secuencia tal y como se describe en los aminoácidos nº 1-740 y 1649-2332 en SEQ ID NO. 2, aunque también puede haber una o más alteraciones dentro de la región de unión a vWF, entre los residuos 1670-1684. Un enlazador preferido del dominio B (21 aminoácidos) en esta memoria se expone en SEQ ID NO 4 (SFSQNSRHPNQNPVVKRHQR). Las moléculas de FVIII en esta memoria pueden diferir ligeramente de la secuencia expuesta en SEQ ID NO 2, lo que significa que los dominios restantes (es decir, los tres dominios A y los dos dominios C) pueden diferir ligeramente por ejemplo, en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos o más, tal como aproximadamente en un 1%, 2% o 3% de la secuencia de aminoácidos tal y como se expone en SEQ ID NO 2 (aminoácidos 1-740 y 1649-2332) debido al hecho de que se pueden introducir mutaciones con el fin, por ejemplo, de reducir la capacidad de unión a vWF. Además, es plausible que las modificaciones de aminoácidos (sustituciones, deleciones, etc.) se introduzcan en otros lugares en la molécula con el fin de modificar la capacidad de unión del Factor VIII a varios otros componentes, tales como por ejemplo, LRP, diversos receptores, otros factores de coagulación, superficies celulares, introducción y/o supresión de sitios de glicosilación, etc.
- 10
- 15 Las moléculas del Factor VIII en esta memoria tienen actividad de Factor VIII, es decir, la capacidad de actuar en la cascada de coagulación de una manera funcionalmente similar o equivalente a FVIII, inducir la formación de FXa a través de la interacción con FIXa sobre una plaqueta activada y favorecer la formación de un coágulo sanguíneo. La actividad se puede evaluar *in vitro* mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como por ejemplo, el análisis de coágulos, el análisis potencial de trombina endógena, etc. Las moléculas del factor VIII en esta memoria tienen actividad de FVIII, que es al menos aproximadamente 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y 100% o incluso más del 100% de la de FVIII humano natural.
- 20

FVIII endógeno de longitud completa se sintetiza como una molécula precursora de cadena sencilla. Antes de la

secreción, el precursor se escinde en la cadena pesada y la cadena ligera. FVIII recombinante con delección del dominio B se puede producir por medio de dos estrategias diferentes. O bien la cadena pesada sin el dominio B y la cadena ligera se sintetizan individualmente como dos cadenas polipeptídicas diferentes (estrategia de dos cadenas) o el FVIII con el dominio B deleccionado se sintetiza como una cadena polipeptídica precursora única (estrategia de una sola cadena) que se escinde en las cadenas pesada y ligera del mismo modo que el precursor de FVIII de longitud completa.

En un polipéptido precursor de FVIII con el dominio B deleccionado, los restos de la cadena pesada y ligera están normalmente separados por un enlazador. Para minimizar el riesgo de introducción de epítomos inmunogénicos en el FVIII con el dominio B deleccionado, la secuencia del enlazador se obtiene preferiblemente a partir del dominio B de FVIII. Como mínimo, el enlazador debe comprender un sitio de reconocimiento para la proteasa que escinde el polipéptido precursor de FVIII con el dominio B deleccionado, en la cadena pesada y ligera. En el dominio B del FVIII de longitud completa, los aminoácidos 1644-1648 constituyen este sitio de reconocimiento. El sitio de trombina que conduce a la eliminación del enlazador en la activación de FVIII con el dominio B deleccionado, se encuentra en la cadena pesada. Por lo tanto, es poco probable que el tamaño y la secuencia de aminoácidos del enlazador influyan sobre su eliminación de la molécula de FVIII restante mediante la activación de trombina. La delección del dominio B es una ventaja para la producción de FVIII. Sin embargo, partes del dominio B se pueden incluir en el enlazador sin reducir la productividad. El efecto negativo del dominio B sobre la productividad no se ha atribuido a ningún tamaño o secuencia específica del dominio B.

El dominio B truncado puede contener varios sitios de O-glicosilación. Sin embargo, según una realización preferida, la molécula comprende solamente un oligosacárido, alternativamente, dos, tres o cuatro ligados a O en el dominio B truncado. De acuerdo con una realización preferida, el dominio B truncado comprende solo un sitio potencial de O-glicosilación y uno o varios restos hidrófobos se conjugan covalentemente con este sitio de O-glicosilación, preferentemente a través de un enlazador. La molécula del Factor VIII también contiene una cantidad de oligosacáridos ligados a N y cada uno de éstos puede servir potencialmente como anclaje para la fijación de un grupo lateral hidrófobo.

La longitud del dominio B en la molécula de FVIII wt (de tipo silvestre) es de aproximadamente 907 aminoácidos. La longitud del dominio B truncado en moléculas de esta memoria, puede variar desde aproximadamente 10 a aproximadamente 800 aminoácidos, tal como por ejemplo, desde aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 700 aminoácidos, tal como por ejemplo, aproximadamente 12-500 aminoácidos, 12-400 aminoácidos, 12-300 aminoácidos, 12-200 aminoácidos, 15-100 aminoácidos, 15-75 aminoácidos, 15-50 aminoácidos, 15-45 aminoácidos, 20-45 aminoácidos, 20-40 aminoácidos o 20-30 aminoácidos. El dominio B truncado puede comprender fragmentos de la cadena pesada y/o de la cadena ligera y/o una secuencia introducida artificialmente que no se encuentra en la molécula de FVIII wt. Las expresiones "dominio B truncado" y "dominio B deleccionado" se pueden utilizar de manera intercambiable en el presente documento.

Factor de von Willebrandt (vWF): vWF es una glicoproteína mono/multimérica grande presente en el plasma sanguíneo y producida constitutivamente en el endotelio (en los cuerpos de Weibel-Palade), los megacariocitos (gránulos α de plaquetas) y el tejido conectivo subendotelial. Su función principal es unirse a otras proteínas, particularmente al Factor VIII, y es importante en la adhesión de las plaquetas a sitios de heridas. El Factor VIII está unido a vWF aunque está inactivo en la circulación; el Factor VIII se degrada rápidamente o se elimina cuando no está unido a vWF. De esto se deduce que la reducción o la eliminación de la capacidad de unión a vWF en FVIII se ha estado considerando, por lo tanto, como una metodología muy indeseable para la obtención de variantes del Factor FVIII con semivida circulatoria prolongada.

La expresión "reducción de la capacidad de unión a vWF" en el presente documento se entiende que incluye variantes del Factor VIII, en donde la capacidad de unión a vWF se reduce en al menos 50%, preferiblemente en al menos 60%, más preferiblemente en al menos 70%, más preferiblemente en al menos 80%, más preferiblemente en al menos 90% y más preferiblemente aproximadamente el 100%. La unión de FVIII a vWF se puede medir ya sea por un ensayo similar a ELISA o como una unión directa a vWF inmovilizado usando resonancia de plasmón superficial. La región en el Factor VIII responsable de la unión a vWF es la región que abarca los residuos 1670-1684, tal y como se describe en el documento EP0319315. Se prevé que mutantes puntuales y/o por delección del Factor VIII que implican esta área modificarán la capacidad de unión a vWF. Ejemplos de mutaciones puntuales particularmente preferidas en esta memoria, incluyen variantes que comprenden una o varias de las siguientes mutaciones puntuales: Y1680F, Y1680R, Y1680N y E1682T y Y1680C. Sin estar limitada por la teoría, se prevé que la razón por la cual puede ser ventajoso fijar grupos laterales hidrófobos a moléculas de Factor VIII con una capacidad de unión a vWF reducida, en lugar de fijar tales grupos laterales a moléculas del Factor VIII con capacidad normal de unión a vWF, es que el tamaño del grupo lateral es relativamente pequeño en el gran complejo Factor VIII/vWF. Se plantea la hipótesis de que un grupo lateral relativamente grande actúa de forma más eficaz en la protección del Factor VIII libre, frente al aclaramiento.

Proteína de fusión: Las proteínas de fusión/proteínas quiméricas, son proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes que codificaban originalmente proteínas distintas. La traducción de este gen de fusión da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. Proteínas terapéuticas tales como, por ejemplo, moléculas de factores de coagulación de esta memoria, pueden estar fusionadas con otro polipéptido, por ejemplo, un polipéptido que se une a anticuerpo tal como, por ejemplo, un receptor de

Fc. Las proteínas de esta memoria también pueden estar fusionadas a dominios Fc, preferiblemente dominios Fc que comprenden mutaciones que dan como resultado funciones efectoras reducidas y/o mutaciones que dan como resultado una mayor afinidad hacia el receptor de Fc neonatal. En comparación con factores de coagulación, tales como por ejemplo, Factor VIII, los anticuerpos tienen una semivida muy larga. Por lo tanto, puede ser posible prolongar la semivida de los factores de coagulación, tales como por ejemplo, Factor VII, Factor VIII y Factor IX de forma significativa mediante la formación de un complejo no covalente entre una proteína de fusión de un factor de coagulación y un receptor de Fc, y un anticuerpo circulante.

Semivida circulatoria modificada: Las proteínas de esta memoria tienen una semivida circulatoria modificada en comparación con la molécula de proteína de tipo silvestre, preferiblemente un aumento de la semivida circulatoria. La semivida circulatoria se incrementa preferiblemente al menos un 10%, preferiblemente al menos un 15%, preferiblemente al menos un 20%, preferiblemente al menos un 25%, preferiblemente al menos un 30%, preferiblemente al menos un 35%, preferiblemente al menos un 40%, preferiblemente al menos un 45%, preferiblemente al menos un 50%, preferiblemente al menos un 55%, preferiblemente al menos un 60%, preferiblemente al menos un 65%, preferiblemente al menos un 70%, preferiblemente al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, preferiblemente al menos un 85%, preferiblemente al menos un 90%, preferiblemente al menos un 95%, preferiblemente al menos un 100%, más preferiblemente al menos un 125%, más preferiblemente al menos un 150%, más preferiblemente al menos un 175%, más preferiblemente al menos un 200% y lo más preferiblemente al menos un 250% o 300%. Incluso más preferiblemente, tales moléculas tienen una semivida circulatoria que se incrementa al menos un 400%, 500%, 600% o incluso un 700%.

Cadena lateral hidrófoba/grupo lateral hidrófobo: Las proteínas de esta memoria se conjugan con un grupo lateral. En este sentido, un "grupo lateral" ha de entenderse como un grupo lateral que es en gran parte de naturaleza hidrófoba y en donde dicho grupo lateral no es una parte natural de la molécula de proteína.

Cuando se conjugan con una proteína, tales grupos laterales hidrófobos pueden extender la semivida circulatoria *in vivo* de la proteína, en comparación con la proteína no conjugada. Estos grupos laterales hidrófobos se pueden mencionar en esta memoria como "aglutinantes de albúmina" e incluyen derivados de ácidos grasos. Estos grupos pueden tener afinidad hacia la albúmina, *in vitro* o *in vivo* o pueden no tenerla. Se ha observado que la fijación de los aglutinantes de albúmina a proteínas o péptidos, aumenta potencialmente la semivida plasmática de dichas proteínas o péptidos. Una clase de aglutinantes de albúmina típicos se obtiene a partir de ácidos grasos, porque la albúmina es capaz de unirse a moléculas muy hidrófobas. Por lo tanto, los compuestos que tienen un resto $-(CH_2)_{12}-$ son posibles aglutinantes de albúmina. Si un compuesto de este tipo se fija a una proteína o a un péptido y se produce como resultado un aumento de la semivida plasmática de dicha proteína o péptido, se entiende que el aglutinante de albúmina puede contribuir al aumento global de la semivida plasmática mediante la unión a la albúmina y/o a través de otros mecanismos. Preferiblemente, el conjugado de aglutinante de albúmina-proteína es una molécula en la que se ha fijado un único aglutinante de albúmina a la proteína. Preferiblemente, se fija más de un aglutinante de albúmina a la proteína, tal como dos, tres, cuatro, cinco o más.

El resto que se une a la albúmina puede comprender una porción que es particularmente relevante para la unión a la albúmina y por lo tanto la circulación prolongada en el torrente sanguíneo, esta porción se puede denominar un resto que prolonga la semivida. El resto que prolonga la semivida está preferiblemente en o cerca del extremo opuesto del resto utilizado como punto de fijación al péptido. La parte restante del resto que se une a albúmina, es decir, la parte entre el resto que prolonga la semivida y el resto utilizado como punto de fijación al péptido, se puede denominar resto enlazador, enlazador, espaciador o similar. Sin embargo, la presencia de un enlazador es opcional y por lo tanto el resto que se une a la albúmina puede ser idéntico al resto que prolonga la semivida.

Preferentemente, el resto que se une a la albúmina y/o el resto que prolonga la semivida es lipófilo, y/o está cargado negativamente a pH fisiológico (7,4). Preferentemente, el resto que se une a la albúmina y/o el resto que prolonga la semivida está ligado covalentemente, opcionalmente a través de un enlazador, a un grupo amino de un residuo de ácido siálico o de un derivado de ácido siálico, a través de un enlace amida. Preferentemente, el resto que se une a la albúmina se fija a una glicol-proteína usando métodos enzimáticos, tales como por ejemplo, un método que implica el uso de una sialiltransferasa.

Para los presentes fines, las expresiones "resto que se une a la albúmina", "resto que prolonga la semivida" y "enlazador" incluyen las formas que reaccionan así como las que no reaccionan de estas moléculas. El saber a qué forma se está haciendo referencia, se aclara por el contexto en el que se utiliza la expresión. La expresión "ácido graso" se refiere a ácidos monocarboxílicos alifáticos que tienen de 4 a 28 átomos de carbono, están preferiblemente no ramificados, y/o tienen números pares y pueden estar saturados o insaturados. La expresión "diácido graso" se refiere a ácidos grasos tal como se han definido anteriormente, pero con un grupo ácido carboxílico adicional en la posición omega. Por lo tanto, los diácidos grasos son ácidos dicarboxílicos. La nomenclatura es como es habitual en la técnica, por ejemplo $-COOH$, así como $HOOC-$, se refiere a carboxi; $-C_6H_4-$ a fenileno; $-CO-$, así como $-OC-$, a carbonilo ($O=C<$); y C_6H_5-O- $-C_6H_4-$ a fenoxi.

Preferentemente, el resto que se une a la albúmina comprende un grupo acilo graso $-(CH_2)_n-CO-$, en donde $n = 1, 2, 3, \dots, 40$) o un grupo acilo graso omega-carboxi $(HO_2C-(CH_2)_n-CO-$, en donde $n = 1, 2, 3, \dots, 40$) unido al péptido o la proteína a través de un enlazador y un residuo de ácido siálico o un derivado de ácido siálico.

Preferentemente, el resto del enlazador, si está presente, tiene de 2 a 80 átomos de C, preferiblemente de 5 a 70 átomos de C. Preferentemente, el resto del enlazador, si está presente, tiene 4 a 60 heteroátomos, preferiblemente de 2 a 40 heteroátomos, más preferiblemente de 3 a 30 heteroátomos. Ejemplos particularmente preferidos de heteroátomos son átomos de N, O y S. Los átomos de H y C no son heteroátomos.

- 5 Preferentemente, el enlazador comprende al menos una molécula de OEG, y/o al menos un residuo de ácido glutámico o más bien los radicales correspondientes (OEG significa ácido 8-amino-3,6-dioxaoctánico, es decir, este radical: $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$).

- 10 Preferentemente, el resto del enlazador comprende un resto de dicarboxamida ligado a un residuo de ácido siálico mediante un enlace amida. En ejemplos preferidos, el residuo de dicarboxamida tiene 2-30 átomos de C, preferiblemente 4-20 átomos de C, más preferiblemente 4-10 átomos de C. En ejemplos preferidos adicionales, el residuo de dicarboxamida tiene de 0-10 heteroátomos, preferiblemente de 0-5 heteroátomos.

- 15 En otro ejemplo preferido, el resto del enlazador comprende un grupo que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo distal ligado a un residuo de ácido siálico mediante un enlace amida a través de sus grupos carboxilo distales. Preferentemente, este grupo es un grupo OEG.

- 20 El aminoácido ácido glutámico (Glu) comprende dos grupos de ácido carboxílico. Su grupo gamma-carboxilo se utiliza preferentemente para la formación de un enlace amida con un grupo amino de un residuo de ácido siálico o un derivado de ácido siálico, o con un grupo amino de una molécula de OEG, si está presente, o con el grupo amino de otro residuo de Glu, si está presente. El grupo amino de Glu a su vez forma un enlace amida con el grupo carboxilo del resto que prolonga la semivida o con el grupo carboxilo de una molécula de OEG, si está presente, o con el grupo gamma-carboxilo de otro Glu, si está presente. Esta forma de inclusión de Glu se denomina ocasionalmente de forma breve "gamma-Glu".

- 25 Una proteína individual en esta memoria puede comprender por tanto, grupos laterales tanto de naturaleza hidrófila como hidrófoba. Además, se desprende que es posible conjugar proteínas de esta memoria con grupos laterales hidrófobos, así como uno o varios grupos laterales que no son necesariamente de naturaleza hidrófoba; por ejemplo, grupos laterales hidrófilos, polipéptidos, etc.

- 30 Preferentemente, un conjugado estable con proteínas comprende a) uno o varios glicanos ligados a N y/o b) uno o varios glicanos ligados a O, en donde los grupos laterales hidrófobos (residuos que se unen a la albúmina) están unidos a dichos uno o varios glicanos en dicha proteína, opcionalmente a través de un espaciador hidrófilo o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o un profármaco del mismo. Los glicanos pueden ser de origen natural o se pueden modificar genéticamente en las proteínas.

- 35 Preferentemente, la cadena lateral está unida a la proteína a través de uno o varios de sus glicanos ligados a N. Preferentemente, la cadena lateral está unida a la proteína a través de uno o varios de sus glicanos ligados a O. Preferentemente, la cadena lateral está ligada a la proteína a través de sus dos glicanos ligados a N y sus glicanos ligados a O. Preferentemente, la proteína es un factor de coagulación.

Preferentemente, el espaciador hidrófilo tiene un LogP <0.

- 40 La solubilidad de un espaciador hidrófilo se puede describir por su valor de LogP. El LogP, también conocido como el coeficiente de partición, es el logaritmo de la proporción de las concentraciones de un compuesto en las dos fases de una mezcla de dos disolventes inmiscibles en equilibrio. Típicamente uno de los disolventes es agua, mientras que el segundo se selecciona entre octan-1-ol, cloroformo, ciclohexano y dipelargonato de propilenglicol (PGDP). Los valores del LogP medidos en estos diferentes disolventes muestran diferencias debidas principalmente a los efectos de la unión del hidrógeno. El octanol puede donar y aceptar enlaces de hidrógeno, mientras que el ciclohexano es inerte. El cloroformo puede donar enlaces de hidrógeno, mientras que el PGDP solo puede aceptarlos.

- 45 Preferentemente, el espaciador hidrófilo tiene un LogP inferior a -0,5 en octan-1-ol, cloroformo, ciclohexano y dipelargonato de propilenglicol (PGDP). Preferentemente, el espaciador hidrófilo tiene un LogP inferior a -1 en octan-1-ol, cloroformo, ciclohexano y dipelargonato de propilenglicol (PGDP).

- 50 Alternativamente, el valor de LogP se puede calcular como mLogP y/o cLogP para la parte del aglutinante de albúmina o la parte del espaciador hidrófilo, utilizando algoritmos publicados (T. Fujita; J. Iwasa y C. Hansch, J. Am. Chem. Soc. 86, 5175-5180, (1964) "A New Substituent Constant, Pi, Derived from Partition Coefficients", C. A. Lipinski et al. Advanced Drug Delivery Reviews, 23, 3-25, (1997) "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings" e I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, Chem. Pharm. Bull. 42, 976-978, (1994) "Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods"). Preferentemente, la proteína está ligada a un residuo que se une a la albúmina a través de un enlazador.

- 55 Preferentemente, cada tipo de glicano de la proteína está ligado a uno o dos o más residuos que se unen a la albúmina a través de uno o dos o más enlazadores. Estos residuos que se unen a la albúmina pueden ser idénticos o no. Además, estos enlazadores pueden ser idénticos o no. Por lo tanto, en un ejemplo, uno o dos o más residuos que se

unen a la albúmina se enlazan a través de un enlazador, a un tipo de glicano de la proteína y, además, uno, dos o más residuos que se unen a la albúmina están unidos a través de un enlazador con otro tipo de glicano de la proteína. Alternativamente, los residuos que se unen a la albúmina están enlazados a través de uno o varios tipos de glicanos, en adición a otros sitios en la proteína, tales como por ejemplo, un residuo de cisteína natural o introducido recombina

5

mente, uno o ambos extremos N-terminales, uno o ambos extremos C-terminales, un residuo de glutamina o un residuo de lisina. Ejemplos preferidos de tales glicanos son N-glicanos complejos bifurcados y O-glicanos de tipo núcleo 1.

Preferentemente, la proteína ha sido modificada de forma recombinante para contener más glicanos que la proteína natural. Estos glicanos son susceptibles de modificación con los residuos que se unen a la albúmina de esta memoria.

10

Preferentemente, la proteína tiene una o varias modificaciones además de las cadenas laterales hidrófobas. De este modo, la proteína puede estar unida a uno o varios polímeros hidrófilos tales como, pero no limitados a, por ejemplo, PEG, poli(ácido siálico), hidroalquil almidón, dextrano, dendrímeros, etc. Preferentemente, el polímero hidrófilo está unido a uno de los glicanos de la proteína, mientras que la cadena lateral hidrófoba está unida a otro de los glicanos de la proteína. Preferentemente, el polímero hidrófilo es un PEG unido a los O-glicanos de una molécula de FVIII, mientras que la cadena lateral hidrófoba está unida a los N-glicanos de dicha molécula de FVIII. Preferentemente, el polímero hidrófilo es un PEG unido a los N-glicanos de la molécula de FVIII, mientras que la cadena lateral hidrófoba está unida a los O-glicanos de la molécula de FVIII.

15

Preferentemente, un conjugado de la proteína tiene la fórmula (I):

20

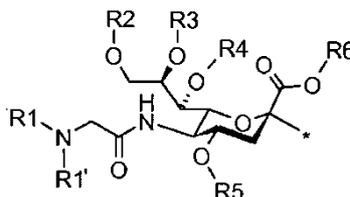


en donde

la asialoProteína representa una proteína en la que el ácido siálico terminal se ha eliminado de un glicano y z es un número entero de valor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

B2 representa un ácido glicil-siálico con la estructura

25



en la que R1, R1', R2, R3, R4, R5 y R6 son o bien un enlace que conecta B2 con B1 o un hidrógeno y en donde * significa la conexión con el asialoFactor de coagulación. Por tanto, un enlace que termina en un * representa solamente un enlace, es decir, un enlace abierto.

B1 representa un enlazador

30

W es un grupo químico que une A y B1, y

A representa un grupo lateral hidrófobo que se une con albúmina; y

sales farmacéuticamente aceptables, solvatos y profármacos de los mismos.

Preferentemente, A comprende un grupo hidrófobo tal como una cadena de alquileo $^{*}-(CH_2)_n^{*}$, en donde n = 8-26, opcionalmente conectado con sustituyentes de arilo y un grupo cargado negativamente, tal como ácido carboxílico, sulfónico, sulfénico, sulfínico, fosfónico o fosfínico, acilsulfonamida, isómeros de ácido carboxílico tales como tetrazol, hidroxi oxazol o similares.

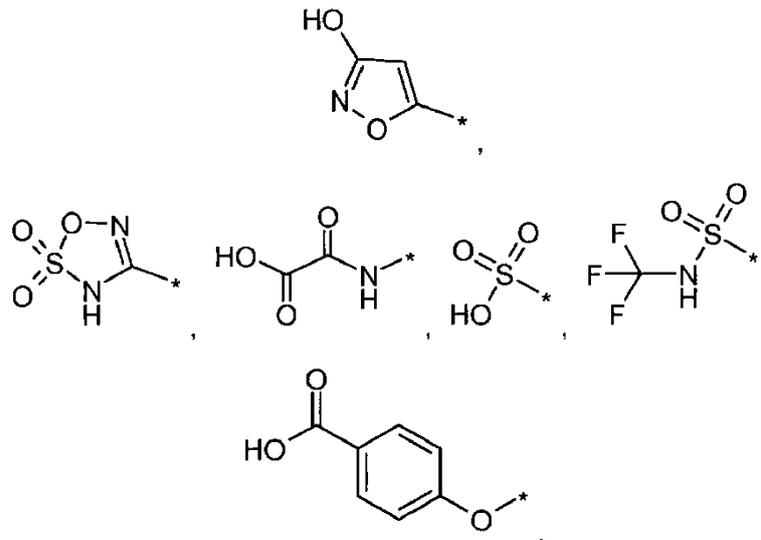
35

Preferentemente, A tiene la estructura



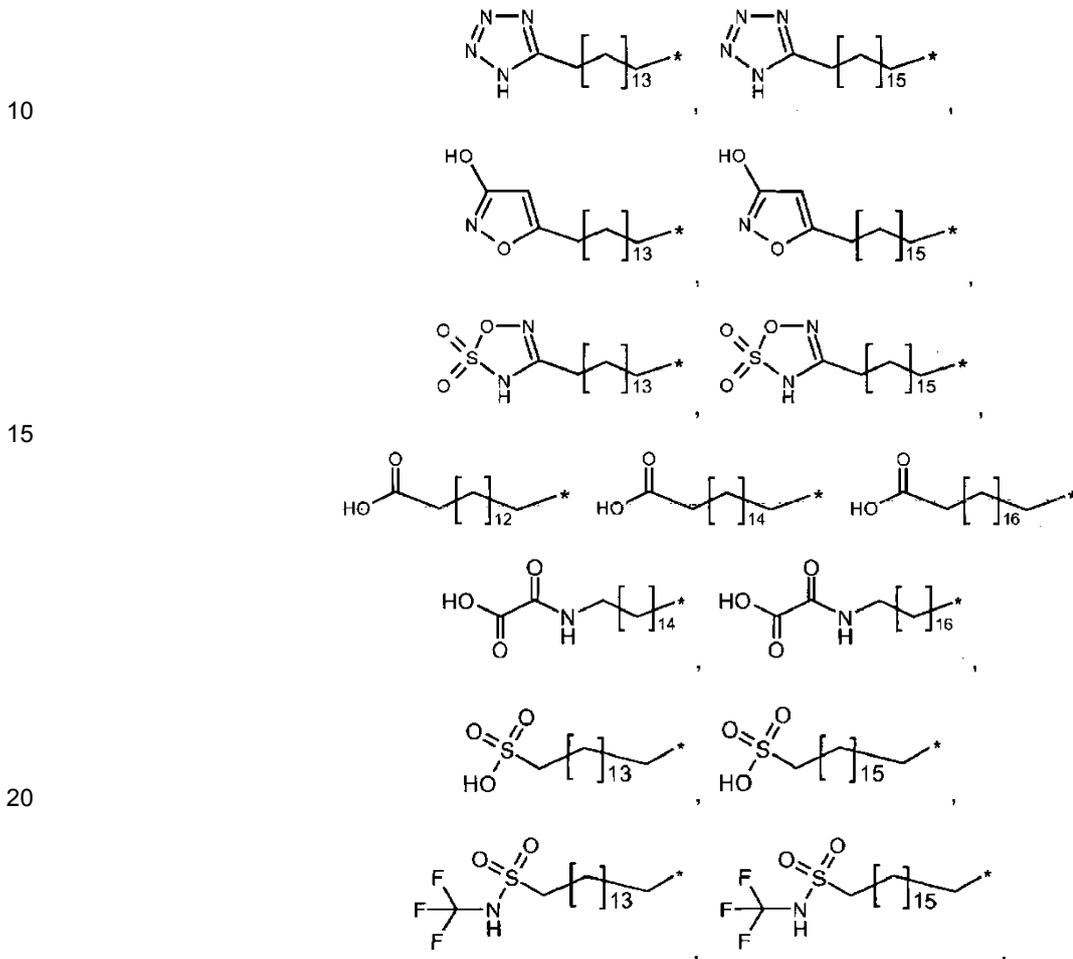
40

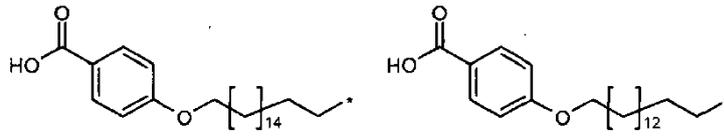
en donde * indica la fijación a B1 a través de W, por lo tanto un enlace que termina en un * representa solamente un enlace, es decir, un enlace abierto. R7 es hidrógeno, -COOH, tetrazolilo o -C(=O)-NHS(=O)2-R7a,



5 n se selecciona a partir de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25, y R7a se selecciona a partir de alquilo C₁₋₆, fenilo o alquil C₁₋₆ fenilo, en donde * indica la fijación a la parte restante del grupo A. Preferentemente, R7 es -COOH. Preferentemente, n se selecciona a partir de 14, 16 y 18. Preferentemente, R7 es -COOH y n se selecciona a partir de 14, 16 y 18.

Preferentemente, A se selecciona a partir de la siguiente lista

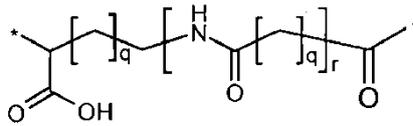




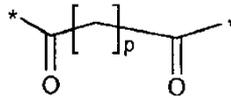
así como los grupos $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ eran $n = 8\text{-}26$

5 en donde * indica la fijación a B1 a través de W, por lo tanto un enlace que termina en un * representa solamente un enlace, es decir, un enlace abierto.

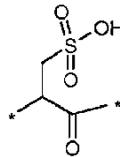
Preferentemente, W es -CONH-



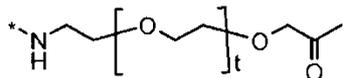
en donde $q = 0\text{-}10$ y $r = 0$ o 1



10 en donde $p = 1\text{-}20$



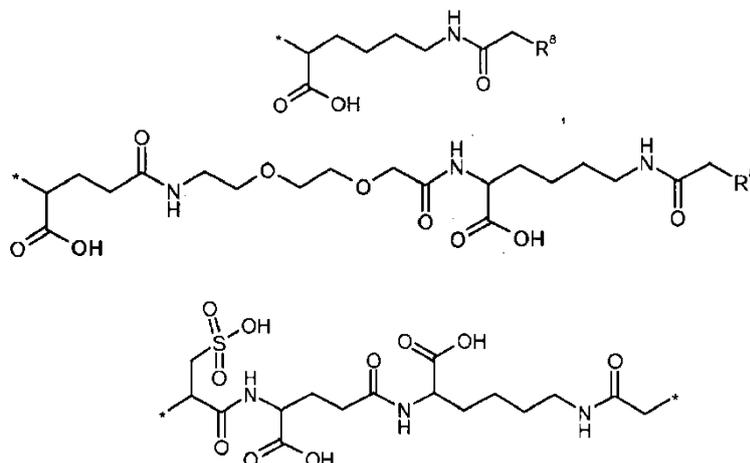
cicloalquilo C3-C10

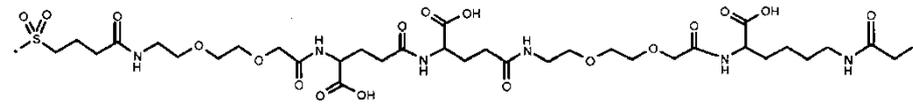
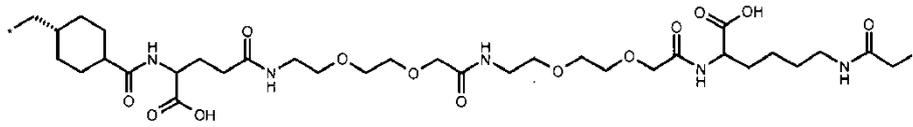


15 en donde $t=0\text{-}10$ $\text{*SO}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{*}$ elementos estructurales que conectan con B1 opcionalmente a través de un átomo de nitrógeno o unidos a una amina de B2.

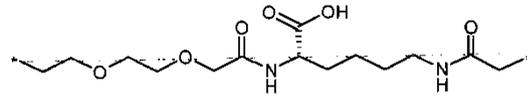
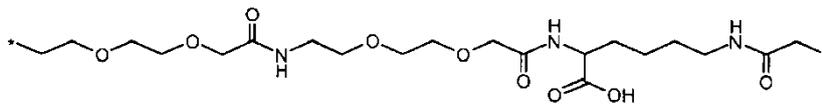
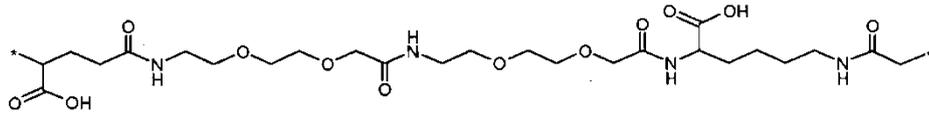
Preferentemente, B1 se selecciona a partir de la siguiente lista

20

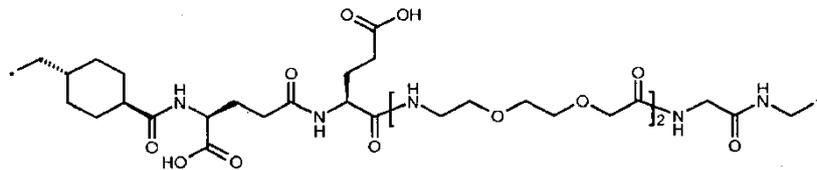
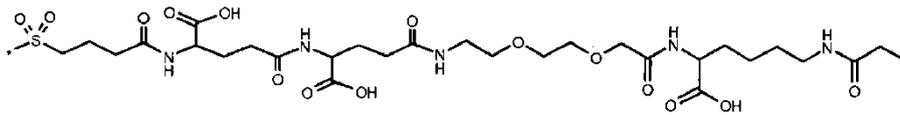




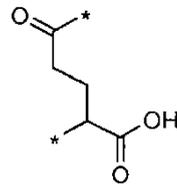
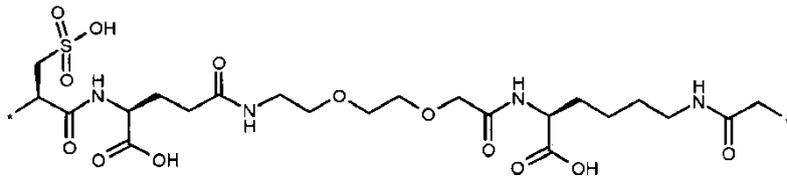
5

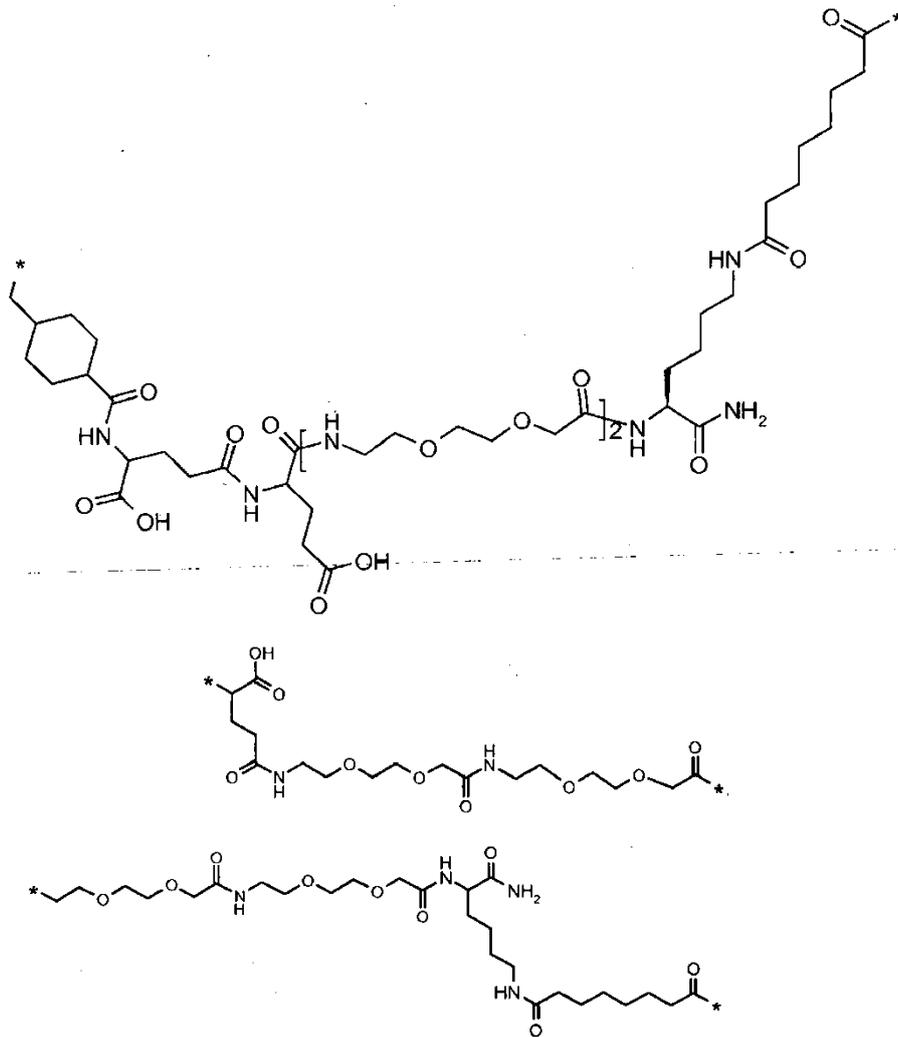


10



15



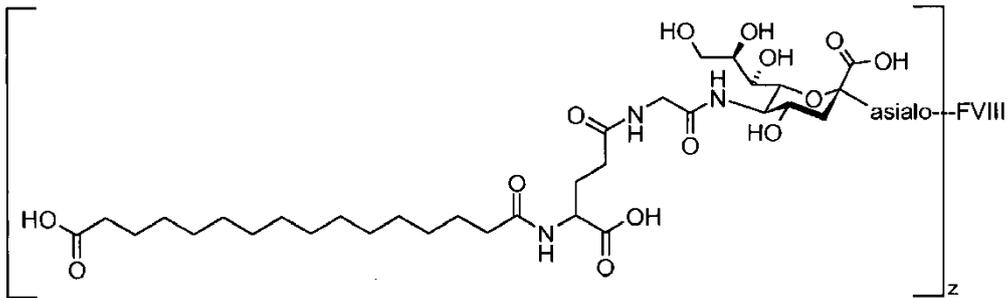
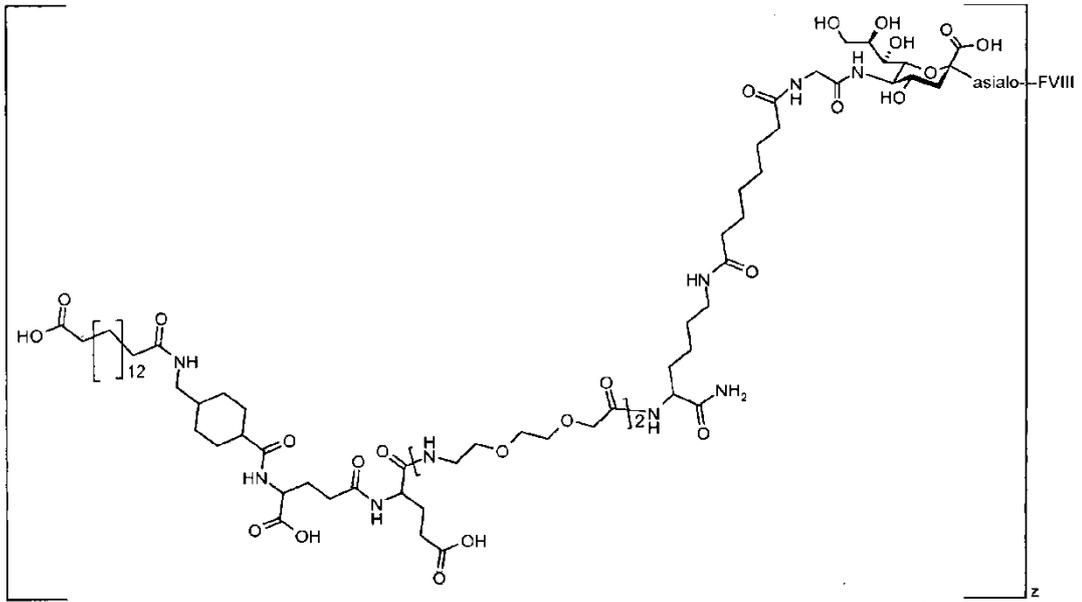


5

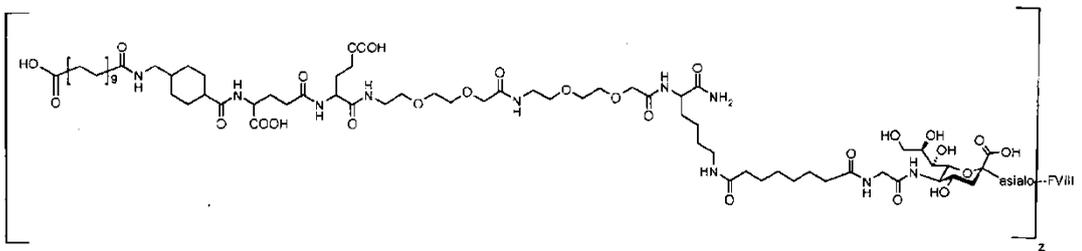
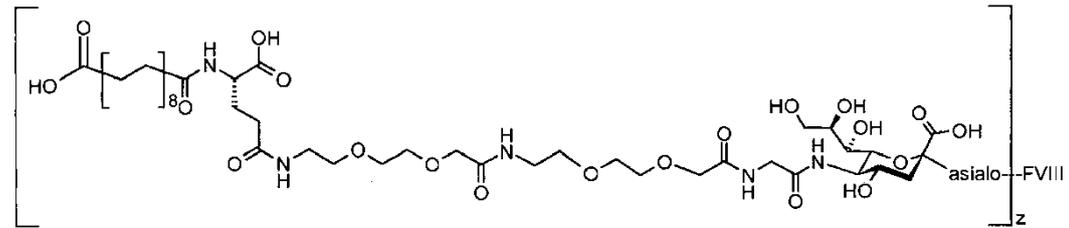
en donde * significa la fijación a B2 y W.

Preferentemente, R1, R1', R3, R4, R5 y R6 son un hidrógeno y R2 está conectado a B1. Preferentemente, R1', R2, R3, R4, R5 y R6 son un hidrógeno y R1 está conectado a B1.

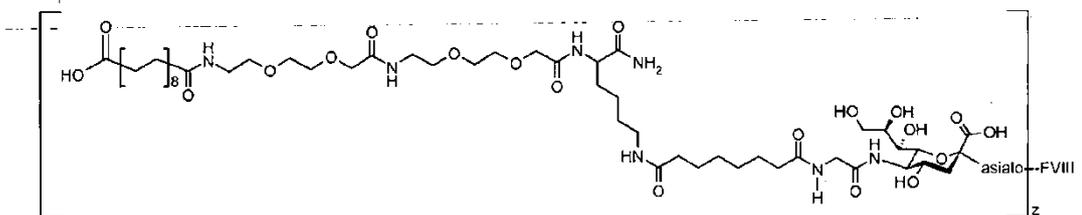
10 Preferentemente, el conjugado de proteína se selecciona a partir de la siguiente lista



5



10



- en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco cadenas laterales están fijadas por molécula de proteína ($z = 1, 2, 3, 4$ o 5). Preferentemente, una, dos, tres o cuatro cadenas laterales están fijadas a los N-glicanos de la proteína. Preferentemente, una cadena lateral está fijada a un O-glicano. Preferentemente, una, dos, tres o cuatro cadenas laterales se fijan a N-glicanos de FVIII, además de a una cadena lateral que está fijada a un O-glicano de FVIII. Preferentemente,
- 5 una, dos, tres o cuatro cadenas laterales están fijadas a los N-glicanos de FVIII además de un PEG de 40 kDa que está fijado al O-glicano de FVIII. Preferentemente, una, dos, tres o cuatro cadenas laterales están fijadas a uno o dos de los N-glicanos de FVIIa mientras que otro glicano se modifica con PEG. Preferentemente, una, dos, tres o cuatro cadenas laterales están fijadas a uno o dos de los N-glicanos de FIX, mientras que otro o el mismo glicano (ramificado) se modifica con PEG.
- 10 **Glicoproteína:** El término "glicoproteína" incluye péptidos, oligopéptidos y polipéptidos que contienen uno o varios oligosacáridos (glicanos) fijados a uno o varios residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la "cadena principal". Los glicanos pueden estar enlazados a N o a O. Los glicanos pueden ser de origen natural y/o estar insertados en la proteína mediante ingeniería genética.
- Oligosacárido ligado a N y a O:** Tal y como se usa en esta memoria, el término "glicano" o de forma intercambiable, "cadena de oligosacárido" se refiere a toda la estructura de oligosacárido que está unida covalentemente a un único residuo de aminoácido. Los glicanos están ligados normalmente a N o a O, por ejemplo, los glicanos están unidos a un residuo de asparagina (glicosilación ligada a N) o a un residuo de serina o treonina (glicosilación ligada a O). Las cadenas de oligosacáridos ligados a N pueden ser multiantenarias, tales como, por ejemplo, bi-, tri o tetraantenarias y lo más frecuentemente contienen una estructura de núcleo de $\text{Man}_3\text{-GlcNAc-GlcNAc-}$.
- 15 Ambos, N-glicanos y O-glicanos, están fijados a proteínas a través de las células que producen la proteína. La maquinaria celular de N-glicosilación reconoce y glicosila motivos de consenso de N-glicosilación (motivos N-X-S/T) en la cadena de aminoácidos, cuando la proteína naciente se transloca desde el ribosoma al retículo endoplásmico (Kiely et al 1976; Glabe et al. 1980).
- Algunas glicoproteínas, cuando se producen en un ser humano *in situ*, tienen una estructura de glicano con residuos de ácido siálico terminales o de "bloqueo", es decir, el azúcar terminal de cada antena es ácido N-acetilneuramínico unido a galactosa a través de un enlace $\alpha 2\text{-}3$ o $\alpha 2\text{-}6$. Otras glicoproteínas tienen glicanos con los extremos bloqueados con otros residuos de azúcar. Sin embargo, cuando se producen en otras circunstancias, las glicoproteínas pueden contener cadenas de oligosacáridos que tienen diferentes estructuras terminales en una o varias de sus antenas, tales como, por ejemplo, falta de residuos de ácido siálico; que contienen residuos de ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc); que contienen un residuo terminal de N-acetilgalactosamina (GalNAc) en lugar de galactosa; y similares. Los patrones de los oligosacáridos ligados a N y/o a O se pueden determinar usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación: cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC); electroforesis capilar (EC); resonancia magnética nuclear (RMN); espectrometría de masas (EM) utilizando técnicas de ionización, tales como bombardeo con átomos rápidos, electroespray o desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI); cromatografía de gases (CG); y tratamiento con exoglicosidasas junto con intercambio aniónico (AIE)-HPLC, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), espectroscopía de masas (MS), electroforesis en gel (SDS-PAGE, CE-PAGE), geles de enfoque isoeléctrico o electroforesis capilar con enfoque isoeléctrico (CE-IEF) Véase, por ejemplo, Weber et al., Anal. Biochem. 225:135 (1995); Klausen et al., J. Chromatog. 718:195 (1995); Morris et al., en Mass Spectrometry of Biological Materials, McEwen et al., compiladores, Marcel Dekker, (1990), págs. 137-167; Conboy et al., Biol. Mass Spectrom. 21:397, 1992; Hellerqvist, Meth. Enzymol. 193:554 (1990); Sutton et al., Anal. Biochem. 318:34 (1994); Harvey et al., Organic Mass Spectrometry 29:752 (1994).
- 20 La expresión "ácido siálico terminal" o, de forma intercambiable, "ácido neuramínico terminal", por lo tanto incluye residuos de ácido siálico enlazados como el residuo del azúcar terminal en un glicano o una cadena de oligosacárido, es decir, el azúcar terminal de cada antena es ácido N-acetilneuramínico unido a galactosa a través de un enlace $\alpha 2\text{-}3$ o $\alpha 2\text{-}3$ o $\alpha 2\text{-}6$.
- 25 La expresión "galactosa o un derivado del mismo" significa un residuo de galactosa, tal como D-galactosa natural o un derivado de la misma, tal como un residuo de N-acetilgalactosamina.
- La expresión "galactosa terminal o derivado de la misma" significa la galactosa o el derivado de la misma unido como el residuo de azúcar terminal a un glicano o una cadena de oligosacárido, por ejemplo, el azúcar terminal de cada antena es galactosa o N-acetilgalactosamina.
- 30 La expresión "asialo glicoproteína" incluye glicoproteínas en donde uno o varios residuos de ácido siálico terminal se han eliminado, por ejemplo, mediante tratamiento con una sialidasa o mediante tratamiento químico, exponiendo al menos un residuo de galactosa o de N-acetilgalactosamina de la "capa" subyacente de galactosa o de N-acetilgalactosamina ("residuo expuesto de galactosa").
- 35 En general, los glicanos ligados a N se pueden introducir mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos a fin de obtener motivos N-X-S/T. Las moléculas de proteína pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más glicanos ligados a N. La estructura de los glicanos ligados a N es la de rica en manosa o una forma compleja. Los glicanos ricos en manosa contienen residuos de manosa terminal en el extremo no reductor del glicano. Los N-glicanos

complejos contienen ácido siálico, galactosa o N-acetilglucosamina terminal en el extremo no reductor.

Asimismo, los O-glicanos se fijan a sitios específicos de O-glicosilación en la cadena de aminoácidos, pero los motivos que desencadenan la O-glicosilación son mucho más heterogéneos que las señales de N-glicosilación y la capacidad para predecir los sitios de O-glicosilación en las secuencias de aminoácidos sigue siendo insuficiente (Julenius et al. 2004). La construcción de sitios de O-glicosilación artificiales está asociada por ello a cierta incertidumbre.

En los conjugados de esta memoria, la cadena lateral está unida a un ácido siálico en un glicano ligado a N o a O.

Unión de grupos laterales hidrófobos:

Los métodos químicos para el acoplamiento de grupos a proteínas tienden a ser no selectivos del sitio aunque algunos son selectivos. Sin embargo, es común para la mayoría de los métodos el hecho de que los reactivos que contienen grupos hidrófobos no se pueden emplear en tampones acuosos, a menos que se añadan aditivos dañinos tales como detergentes o disolventes orgánicos. Los grupos hidrófobos son inherentemente difíciles de acoplar a proteínas debido a su insolubilidad en medio acuoso, mientras que las proteínas solo son solubles en medio acuoso.

Una serie de ventajas están asociadas con el empleo de una metodología enzimática. De acuerdo con un método enzimático preferido de esta memoria, los sustratos [grupo lateral hidrófobo]-sialilo-CMP se pueden preparar químicamente. Este sustrato se puede transferir enzimáticamente a glicanos presentes en asialo proteínas usando una enzima sialiltransferasa. Los inventores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que esta metodología enzimática se puede llevar a cabo sin adición de disolventes orgánicos. Existe una variedad de inconvenientes asociados con el uso de disolventes orgánicos, por ejemplo, la pérdida de actividad biológica, problemas ambientales, etapas adicionales que se deben realizar para asegurar que los disolventes orgánicos se eliminan por completo, etc. En el manejo de las proteínas FVIII puede ser una ventaja añadir glicerol a tampones, por ejemplo, 5-30% de glicerol, preferiblemente 10-20% de glicerol. La presencia de glicerol parece que estabiliza la molécula de Factor VIII, p. ej., en el proceso de congelación/descongelación y también puede evitar la formación de una agregación del Factor VIII. El glicerol es altamente hidrófilo y, como tal, no se considera un disolvente orgánico. Además, debido a su naturaleza altamente hidrófila, el glicerol está desprovisto de efectos negativos sobre la estabilidad de proteínas, observados para otros disolventes orgánicos, tales como etanol, propanol, acetonitrilo, dimetilformamida, N-metilpirrolidina, dimetilsulfóxido y similares. El glicerol presente durante la conjugación enzimática no necesita, por tanto, ser retirado después de que el proceso de conjugación se ha completado.

Sialiltransferasa: Las sialiltransferasas son enzimas que transfieren un ácido siálico a un oligosacárido naciente. Cada sialiltransferasa es específica de un sustrato de azúcar donante de nucleótidos particular. Las sialiltransferasas añaden ácido siálico a la galactosa terminal en los glicolípidos (gangliósidos) o glicanos de glicoproteínas ligados a N o a O. Existen alrededor de veinte sialiltransferasas diferentes que se pueden distinguir basándose en el sustrato aceptor sobre el que actúan y en el tipo de enlace que forman con el azúcar. Típicamente, se forma un enlace entre la posición 2 del ácido siálico y la posición 3 o 6 de la galactosa. Las sialiltransferasas preferidas pertenecen a la clase de enzimas EC 4.2.99. Ejemplos no limitantes son ST3Gal-I (específica de O-glicanos) y ST3Gal-III (específica de N-glicanos) y ST6GalNAc-I. Por tanto, es posible diseñar la estructura de la proteína conjugada, por ejemplo, mediante selección de una sialiltransferasa específica y/o diseñando una proteína con un patrón de glicosilación particular.

Sustrato aceptor: El término aceptor o sustrato aceptor se refiere al sustrato nucleofílico que está ligado a un sustrato donante a través de un enlace glicosídico en una reacción mediada por sialiltransferasa (véase, por ejemplo, Boons and Hale, Organic Synthesis with Carbohydrates, Sheffield Academic Press, 2000, Sheffield, Inglaterra). El aceptor es un mono- u oligosacárido o un derivado de los mismos. La parte reactiva del aceptor es un grupo hidroxilo contenido en un mono- u oligosacárido o un derivado de este tipo. Típicamente, el grupo hidroxilo reactivo en una reacción mediada por sialiltransferasa es un grupo hidroxilo sobre una galactosa terminal o no terminal. Típicamente, el grupo hidroxilo reactivo es un grupo 3- o 6-hidroxilo en una galactosa terminal. Otro tipo de grupo hidroxilo reactivo es un grupo 8-hidroxilo de un ácido siálico terminal.

Sustrato donante: El término donante o sustrato donante se refiere al sustrato electrófilo que está ligado a un sustrato aceptor a través de un enlace glicosídico en una reacción mediada por una sialiltransferasa (véase, por ejemplo, Boons and Hale, Organic Synthesis with Carbohydrates, Sheffield Academic Press, 2000, Sheffield, Inglaterra). Los sustratos donantes son nucleótidos de azúcar del tipo Leloir o no Leloir. Los nucleótidos de azúcar preferidos de esta memoria son monofosfatos de ácido siálico citidina con sustituyentes ligados al grupo N-acetilo del ácido siálico.

Las células hospedadoras para producir proteínas recombinantes son preferiblemente de origen mamífero con el fin de garantizar que la molécula se procesa correctamente durante el plegamiento y la modificación post-traducciona, por ejemplo, glicosilación y sulfatación. Preferentemente, las células son células de mamífero, más preferiblemente una línea celular de mamífero establecida, incluyendo, sin limitación, las líneas celulares CHO, de riñón de cría de hámster (BHK) y HEK293.

Actualmente se prefieren las células HEK293, COS, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de cría de hámster (BHK) y de mieloma, en particular las células de ovario de hámster chino (CHO).

Composición farmacéutica: Una composición farmacéutica en esta memoria se entiende que incluye composiciones que comprenden moléculas de proteínas de acuerdo con la presente invención, adecuadas para una administración parenteral, tales como por ejemplo, composiciones acuosas estériles listas para el uso o composiciones estériles secas que se pueden reconstituir, por ejemplo, en agua o en un tampón acuoso. Las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender varios excipientes, estabilizantes, etc., farmacéuticamente aceptables.

Los ingredientes adicionales en tales composiciones pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar adversamente a la estabilidad global de la formulación farmacéutica. La administración parenteral puede realizarse mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una solución o una suspensión para la administración de la proteína en forma de un aerosol nasal o pulmonar. Como una opción adicional más, las composiciones farmacéuticas también pueden estar adaptadas a la administración transdérmica, por ejemplo, mediante inyección sin aguja o a partir de un parche, opcionalmente un parche iontoforético o transmucoso, por ejemplo, administración bucal.

El término "tratamiento", tal como se usa en esta memoria, se refiere a la terapia médica de cualquier sujeto humano u otro animal que lo requiera. Se espera que dicho sujeto haya sido objeto de un examen físico por un médico, que haya dado un diagnóstico provisional o definitivo que indique que el uso de dicho tratamiento específico es beneficioso para la salud de dicho ser humano u otro sujeto animal. La coordinación de los tiempos y la finalidad de dicho tratamiento pueden variar de un individuo a otro, de acuerdo con la situación actual de la salud del sujeto. Por lo tanto, dicho tratamiento puede ser profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula recombinante de FVIII, en donde dicha molécula se conjuga covalentemente con al menos un grupo lateral hidrófobo, en donde el grupo lateral hidrófobo está unido a dicha molécula a través de un ácido siálico, en donde dicho grupo lateral hidrófobo está conjugado covalentemente con un O-glicano a través de un ácido siálico en donde dicho O-glicano está situado en un dominio B truncado, y en donde la activación de FVIII da como resultado la eliminación de dicho grupo lateral hidrófobo.

En una realización, los restos de la cadena pesada y ligera del polipéptido precursor de FVIII están separados a través de un enlazador, en donde la secuencia del enlazador se obtiene a través del dominio B de FVIII, y en donde el enlazador comprende un sitio de reconocimiento para la proteasa que separa el polipéptido precursor de FVIII con el dominio B truncado en la cadena pesada y la ligera.

En otra realización, la longitud del dominio B truncado es de 20-30 aminoácidos.

En otra realización, el grupo lateral hidrófobo se selecciona a partir de uno o varios del grupo que consiste en: ácido graso y diácido graso.

En otra realización, dicha molécula de FVIII tiene una capacidad reducida de unión a vWF.

En otra realización, dicha molécula de FVIII se conjuga adicionalmente con al menos un polímero hidrófilo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar una molécula de acuerdo con la invención, en donde dicho método comprende fijar un grupo lateral hidrófobo a una proteína recombinante a través de una reacción catalizada por una sialiltransferasa.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una molécula de acuerdo con la invención para el tratamiento de la hemofilia.

Un aspecto final de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de acuerdo con la invención.

Abreviaturas:

CV = volúmenes de columna

FLD = detección de fluorescencia

MQ = agua MilliQ (agua altamente purificada)

m/z = proporción entre masa y carga

MS = espectrometría de masas

HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento

- RP = fase inversa
- LC-MS = cromatografía líquida - espectrometría de masas
- RMN = espectroscopía de resonancia magnética nuclear
- rt o RT = temperatura ambiente
- 5 Boc = *terc* butiloxicarbonilo
- O-*t*-Bu = éster *terc* butílico
- t*-Bu = *terc* butilo
- CMP = monofosfato de citidina
- DCM = diclorometano, CH₂Cl₂, cloruro de metileno
- 10 DIC = diisopropilcarbodiimida
- DIPEA = N,N-diisopropiletilamina
- DMF = N,N-dimetilformamida
- DMSO = dimetilsulfóxido
- Fmoc = 9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
- 15 Lys(Mtt)-OH = ácido (S)-6-[(difenil-p-tolil-metil)amino]-2-amino-hexanoico
- Thx = ácido *trans*-4-aminometilciclohexanocarboxílico
- GSC: éster CMP de ácido glicil siálico
- MBP: proteína que se une a manosa
- NAN = ácido N-acetil neuramínico
- 20 NMP = N-metilpirrolidin-2-ona
- OEG = ácido (2[2-(amino)etoxi]etoxi)acético
- TFA = ácido trifluoroacético
- THF = tetrahidrofurano
- TIPS = triisopropilsilano
- 25 UM = 4-metilumbeliferilo
- Lac = lactosilo o lactosa
- CP: cadena pesada
- CL: cadena ligera
- CS: cadena sencilla (CP y CL están conectadas covalentemente)
- 30 PSC: éster CMP de ácido siálico y polietilenglicol
- wt: tipo silvestre

Las abreviaturas de los aminoácidos siguen las convenciones de la IUPAC.

Las abreviaturas de los tampones se basan en Stoll, V. S. y Blanchard, J. S., *Methods of Enzymology*, 182, 1990, Academic Press, 24-38.

35 EJEMPLOS

Procedimientos generales

HPLC

El análisis RP-HPLC se realizó en un sistema Agilent 1100 utilizando ya sea una columna de sílice Agilent Zorbax o Vydac C18 (típicamente 4,6 mm x 50 mm, 5 µm, 300 Å). La detección fue mediante UV a 214 nm y 280 nm. La elución se realizó con un gradiente adecuado de tampones estándar agua/0,1% de TFA (A) y acetonitrilo/TFA (B).

- 5 La RP-HPLC preparativa se realizó en un sistema Waters (bomba de gradiente 2545 y detector 2489) o un sistema Gilson (bomba de gradiente 321, detector 155 UV/VIS y manipulador de líquidos GX-271) utilizando un gradiente similar al sistema analítico y o bien una columna C18 de 2 o 5 cm. En algunos casos, se empleó un sistema neutro utilizando NH₄HCO₃ 10 mM (ac) y 90% de acetonitrilo con 10% de NH₄HCO₃ 10 mM (ac) como tampones A y B, respectivamente.

LC-MS

- 10 El análisis LC-MS se realizó en un espectrómetro de masas PE-Sciex API 150 equipado con dos bombas de Perkin Elmer Serie 200 Micro, un muestreador automático de Perkin Elmer Serie 200, un detector de UV 785A de Applied Biosystems. Una columna C18 de sílice Waters Xterra de 3,0 mm x 50 mm de 5 µm, se eluyó a 1,5 ml/min a temperatura ambiente, usando los mismos tampones que para el sistema de HPLC. Se equilibró con 5% de tampón B, se eluyó durante 1,0 min con 5% de tampón B y luego con un gradiente lineal de 5 a 90% de tampón B durante 7 min.
- 15 La detección se realizó mediante detección UV a 214 nm y corriente de iones total. Una fracción del eluyente de la columna se introdujo en la interfaz de pulverización iónica de un espectrómetro de masas PE-Sciex API 100. Se escaneó el intervalo de masas de 100-800 amu cada 2 segundos durante la migración.

Purificación de proteínas

- 20 La cromatografía de proteínas se realizó en un sistema cromatográfico Akta Explorer y columnas de GE Health Care.

- 25 La cromatografía de afinidad a ciclodextrina se realizó usando una columna preparada inmovilizando 6-monodesoxi-6-monoamino-beta-ciclodextrina (producto de Sigma M2314) en una columna Hitrap NHS (GE Healthcare, CV 1 ml, producto 17-0716-01) siguiendo el folleto de instrucciones de GE Healthcare 71-7006-00 AT. La cromatografía se realizó utilizando imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, 10% de glicerol como tampón de partida, e imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, 10% de glicerol, hidroxipropilciclodextrina 20 mM como tampón de elución.

SDS-PAGE

- 30 La electroforesis en gel de SDS poliacrilamida se realizó utilizando geles NuPAGE con 7% de Tris-acetato (Invitrogen). Los geles se tiñeron con Coomassie (Invitrogen LC6065) o se tiñeron con plata (kit de tinción SilverQuest, Invitrogen) y en su caso también se tiñeron para PEG con yoduro de bario, tal y como ha descrito M. M. Kurfurst en Anal. Biochem. 200(2):244-248, 1992.

- 35 Las muestras de FVIII y conjugados de FVIII se trataron opcionalmente con trombina (2 µl, 20 U/ml para cada muestra 1 µl) antes del tratamiento con LDS. La incubación con trombina se realizó durante 10 min a 37°C. A continuación, la muestra se trató de acuerdo con procedimientos convencionales de SDS PAGE. En estos análisis, una banda correspondiente a la trombina apareció en el intervalo de peso molecular bajo del gel.

Determinación de la concentración de proteínas

- 40 La concentración de FVIII y de conjugados de FVIII se determinó por medición UV (A280) con un coeficiente de extinción de 14,6 (1%). Alternativamente, en su caso, se utilizó un método de HPLC. El análisis se llevó a cabo en un sistema Agilent 1100 a 40°C usando una columna C4 214TP5215 (2,1 x 150 mm) de Grace Vydac (Mikrolab, Aarhus, Dinamarca), con 5 mm de tamaño de partícula, con un caudal de 200 ml/min. Los disolventes eran 0,07% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua Milli-Q (disolvente A) y 0,1% TFA en acetonitrilo (disolvente B). La proteína del Factor VIII se eluyó con un gradiente lineal de 40% a 55% de disolvente B durante 60 min. La concentración de proteína de las muestras individuales se determinó por integración del área en el cromatograma de HPLC y la comparación con un patrón del factor VIII. La concentración de Factor VIII en el patrón se determinó por análisis de aminoácidos después de la hidrólisis en HCl 6 N a 110°C durante 24 h. Las muestras se analizaron en una HPLC HP1100 usando un marcado con fluorescencia, esencialmente tal y como describe el fabricante (Agilent Technologies, resumen 5968-5658E).
- 45

Material de partida de GSC utilizado en los experimentos.

- 50 GSC (éster 5'-monofosfato de citosina de ácido glicil siálico) se obtuvo de Albany Molecular Research Inc. con 74% de pureza según la HPLC analítica (C18 de 4,6 x 50 mm de Zorbax; A: bicarbonato de amonio acuoso 10 mM; B: 90% de acetonitrilo + 10% de A; caudal: 1 ml/min, gradiente: 0-100% de B durante 16 min, 40°C de temperatura del horno, detección con UV (214 nm, 280 nm); GSC: Rt = 0,5 min).

Ejemplo 1. Producción de Factor VIII D-glicosilado recombinante con dominio B truncadoLínea celular y procedimiento de cultivo

Empleando ADNc del Factor VIII, se construyó un plásmido de expresión de mamífero. Los plásmidos codifican un Factor VIII con el dominio B deletado, en donde la cadena pesada del Factor VIII comprende los aminoácidos 1-740 del Factor VIII humano de longitud completa y la cadena ligera del Factor VIII comprende los aminoácidos 1649-2332 del Factor VIII humano de longitud completa (esta molécula en este documento se puede denominar "N8", véase Thim et al. Hemofilia (2010) 16, 349). Las secuencias de la cadena pesada y ligera están conectadas por un enlazador de 21 aminoácidos (SFSQNSRHPSQNPPVLKRHRQ - **SEQ ID NO 4**) que comprende la secuencia de aminoácidos 741-750 y 1638-1648 del Factor VIII humano de longitud completa. Células de ovario de hámster chino (CHO) se transfectaron con el plásmido y se seleccionaron con el sistema de dihidrofolato reductasa conduciendo eventualmente a una célula clónica productora en suspensión, cultivada en medio exento de componente animal.

- 5 La primera etapa en el procedimiento es la inoculación de un vial de células, procedente de un vial del banco de células de trabajo, en un medio de crecimiento definido químicamente y exento de componente animal. Inicialmente después de la descongelación, las células se incuban en un matraz T. Uno o dos días después de la descongelación, las células se transfieren a un matraz de agitación y el volumen del cultivo se expande mediante diluciones sucesivas con el fin de mantener la densidad celular entre $0,2$ a $3,0 \times 10^6$ células/ml. La siguiente etapa es la transferencia del matraz de agitación del cultivo a biorreactores de siembra. El volumen del cultivo ahí se expande aún más antes de la transferencia final al biorreactor de producción. Se utiliza el mismo medio definido químicamente y exento de componente animal para todas las etapas de expansión del inóculo. Después de la transferencia al biorreactor de producción, el medio se complementa con componentes que aumentan la concentración del producto. En el biorreactor de producción las células se cultivan en un proceso discontinuo repetido, con un tiempo de ciclo de tres días. En la recogida, el 80-90% del volumen del cultivo se transfiere a un tanque de recogida. El fluido restante del cultivo se diluye a continuación con medio de nuevo aporte, con el fin de obtener la densidad celular inicial y luego se inicia un nuevo periodo de crecimiento. El lote de recogida se clarifica mediante centrifugación y filtración y se transfiere a un tanque de retención antes de iniciar el proceso de purificación. Al material recogido exento de células se añade un tampón en el tanque de retención para estabilizar el pH.
- 10
- 15
- 20
- 25 Al final del ciclo de producción, las células se recogen y se congelan, con el fin de finalizar la producción del banco de células. Este banco de células se analiza para comprobar la presencia de micoplasmas, esterilidad y contaminación vírica.

Purificación

30 Para el aislamiento del Factor VIII con delección del dominio B (Y1680F) a partir de medios de cultivo celulares, se utilizó un procedimiento de purificación de cuatro etapas que incluía una etapa de concentración en una columna Capto MMC, una etapa de cromatografía de inmunoabsorción, una cromatografía de intercambio aniónico y finalmente una etapa de filtración en gel. Típicamente se utilizó el siguiente procedimiento: 11 litros de medio filtrado estéril se bombearon sobre la columna (1,6 x 12 cm) de Capto MMC (GE Healthcare, Suecia) equilibrada en tampón A: imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, 0,02% de Tween 80, pH = 7,5 con un caudal de 15 ml/min. La columna se lavó con 75 ml de tampón A seguido por lavado con 75 ml de tampón A que contenía NaCl 1,5 M. La proteína se eluyó con imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, NaCl 2,5 M, etilenglicol 8 M, pH = 7,5 con un caudal de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 8 ml y se sometió a ensayo la actividad del Factor VIII (ensayo cromogénico). Las fracciones que contenían Factor VIII se agruparon y, normalmente, se obtuvo un volumen de agrupación de aproximadamente 50 ml.

40 Se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal contra el Factor VIII (Kjalke Eur J Biochem 234 773). Mediante cartografiado de epítomos (resultados no mostrados) se observó que este anticuerpo, F25, reconocía la secuencia más C-terminal de la cadena pesada desde el residuo de aminoácidos 725 al 740. El anticuerpo F25 se acopló a Sefarosa 4 FF activada con NHS (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) a una densidad de 2,4 mg por ml de gel, esencialmente como lo describe el fabricante. La agrupación de la etapa anterior se diluyó 10 veces con imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, pH = 7,3 y se aplicó a la columna de Sefarosa F25 (1,6 x 9,5 cm) equilibrada con imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M pH = 7,3 con un caudal de 0,5 ml/min. La columna se lavó con tampón de equilibrio hasta que la señal UV fue constante y luego con imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 0,65 M, pH = 7,3 hasta que la señal UV fue constante de nuevo. El Factor VIII se eluyó con imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, NaCl 2,5 M, 50% de etilenglicol, pH = 7,3 con un caudal de 1 ml/min. Las fracciones de 1 ml se recogieron y se sometió a ensayo la actividad del Factor VIII (ensayo cromogénico). Las fracciones que contenían el Factor VIII se agruparon y, normalmente, se obtuvo un volumen de agrupación de aproximadamente 25 ml.

55 Un tampón A: imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH = 7,3 y un tampón B: imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, NaCl 1 M, pH = 7,3 se preparó para la etapa de intercambio iónico. Una columna (1 x 10 cm) de Macro-Prep 25Q Support (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) se equilibró con 85% de tampón A/15% de tampón B con un caudal de 2 ml/min. La agrupación de la etapa anterior se diluyó 10 veces con tampón A y se bombeó a la columna con un caudal de 2 ml/min. La columna se lavó con 85% de tampón A/15% de tampón B con un caudal de 2 ml/min y el Factor VIII se eluyó con un gradiente lineal de 15% de tampón B a 70% de tampón B en 120 ml con un caudal de 2 ml/min. Se recogieron fracciones de 2 ml y se sometió a ensayo la actividad del Factor VIII (ensayo cromogénico). Las fracciones que contenían el Factor VIII se agruparon y, normalmente, se obtuvo un volumen de agrupación de aproximadamente 36 ml.

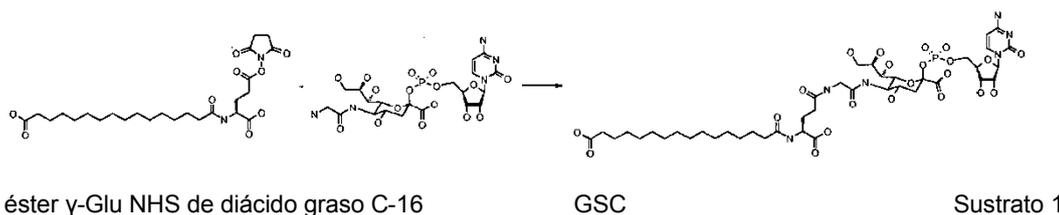
60

5 La agrupación de la etapa anterior se aplicó a una columna Superdex 200, equilibrada con grado prep (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) (2,6 x 60 cm) y se eluyó a 1 ml/min con imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% Tween 80, glicerol 1 M, NaCl 150 mM, pH = 7,3. Las fracciones de 3 ml se recogieron y se sometió a ensayo la actividad del Factor VIII (ensayo cromogénico). Las fracciones que contenían el Factor VIII se agruparon y, normalmente, se obtuvo un volumen de agrupación de aproximadamente 57 ml. La agrupación que contenía el Factor VIII se almacenó a -80°C.

Con el uso del procedimiento de purificación de cuatro etapas anterior, se obtuvo un rendimiento global de aproximadamente 15% a juzgar por la actividad cromogénica y las mediciones del ELISA

10 La molécula de Factor VIII recombinante N8 obtenida en el Ejemplo 1 tiene un glicano ligado a O presente en el dominio B (véase Thim et al. Hemofilia (2010) 16, 349). Una fijación específica de un grupo lateral hidrófobo a este O-glicano permite por lo tanto la producción de una molécula que tiene una estructura homogénea. Además, después de la activación de la molécula, se elimina el dominio B y la cadena lateral hidrófoba y, por lo tanto, la molécula activada tiene una estructura que es similar al Factor VIII endógeno activado.

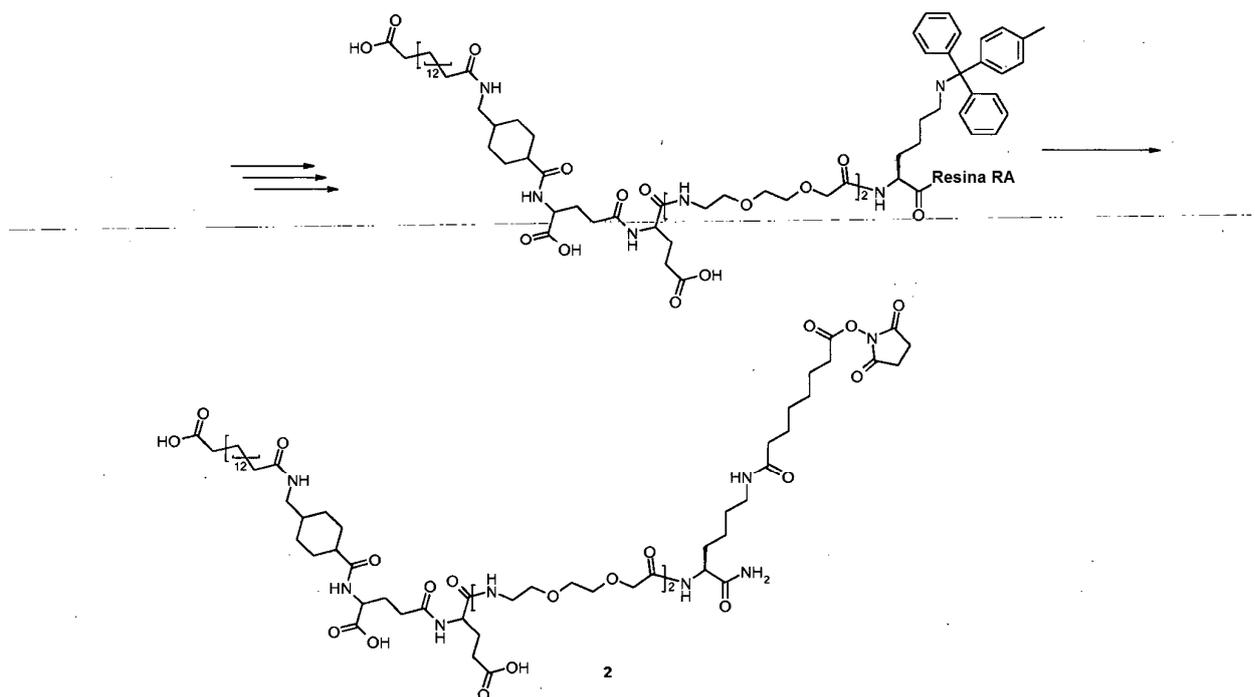
15 **Ejemplo 2. Acoplamiento del éster γ -Glu NHS de diácido graso C-16 a GSC para obtener el sustrato 1 de sialiltransferasa**



20 GSC (éster CMP de ácido glicil siálico) (7,5 mg, 11 μ mol) se disolvió en una mezcla de tampón Tris (100 mM, pH 8,4, 50 μ l) y 50 μ l de acetonitrilo. Se obtuvo un sistema de dos fases. El éster γ -Glu NHS de diácido graso C-16 (7 mg; para la preparación del compuesto análogo C-18 véase el documento WO 2005/012347 A2, ejemplo 5) se disolvió en THF (50 μ l), a continuación, se añadió tampón TRIS (50 μ l) para obtener una solución clara. Esta solución se añadió a la solución de GSC. Se obtuvo una solución clara. Después de aproximadamente 4 h de tiempo de reacción, la muestra se concentró a vacío para eliminar la mayor parte de disolventes orgánicos y luego se congeló a -20°C. El producto (**1**) se identificó mediante HPLC y LC-MS.

25 La purificación se realizó mediante RP-HPLC usando el sistema de tampón neutro y una columna C4 Jupiter de 10 x 250 cm. Caudal de 5 ml/min, gradiente de 2% de tampón B/min. Se recogió una fracción de elución tardía que contenía el producto **1**. La fracción se concentró hasta sequedad. A pesar de la relativamente buena retención en la columna C4, el producto mostraba una solubilidad total en agua y se volvió a disolver en NH₄HCO₃ 10 mM. La concentración del producto en la solución se determinó que era 4,1 μ M por medición con UV a 272 nm (grupo CMP) utilizando GSC como patrón. Rendimiento 4,2 mg (50%). La identidad del producto se confirmó mediante LCMS. La solución del producto se almacenó a -20°C. Usando el protocolo anterior, se preparó un sustrato de sialil transferasa que era portador de una cadena lateral hidrófoba. El sustrato **1** resultó ser completamente soluble en tampón acuoso.

30

Ejemplo 3.: Preparación de éster NHS de aglutinante de albúmina 2

Una resina Rink-amida (Novabiochem, 0,4 g, 0,25 mmol) se utilizó para la síntesis en un sintetizador de péptidos por microondas CEM Liberty. Se utilizaron protocolos de química Fmoc estándar con los siguientes aminoácidos y en ese orden (todas las soluciones con 7 equivalentes de aminoácido en NMP que contenían HOAt 0,3 M):

- 5 1. Fmoc-Lys(Mtt)-OH: 1,12 g en 6 ml
2. Fmoc-OEG-OH: 1,39 g en 12 ml (2 acoplamientos)
3. Fmoc-Glu-OtBu: 0,77 g en 6 ml
4. Fmoc-Thx-OH: 0,68 g en 6 ml
5. éster mono t-butílico de diácido C-16 (véase el documento WO 2005/012347 A2, ejemplo 4): 0,62 g en 6 ml

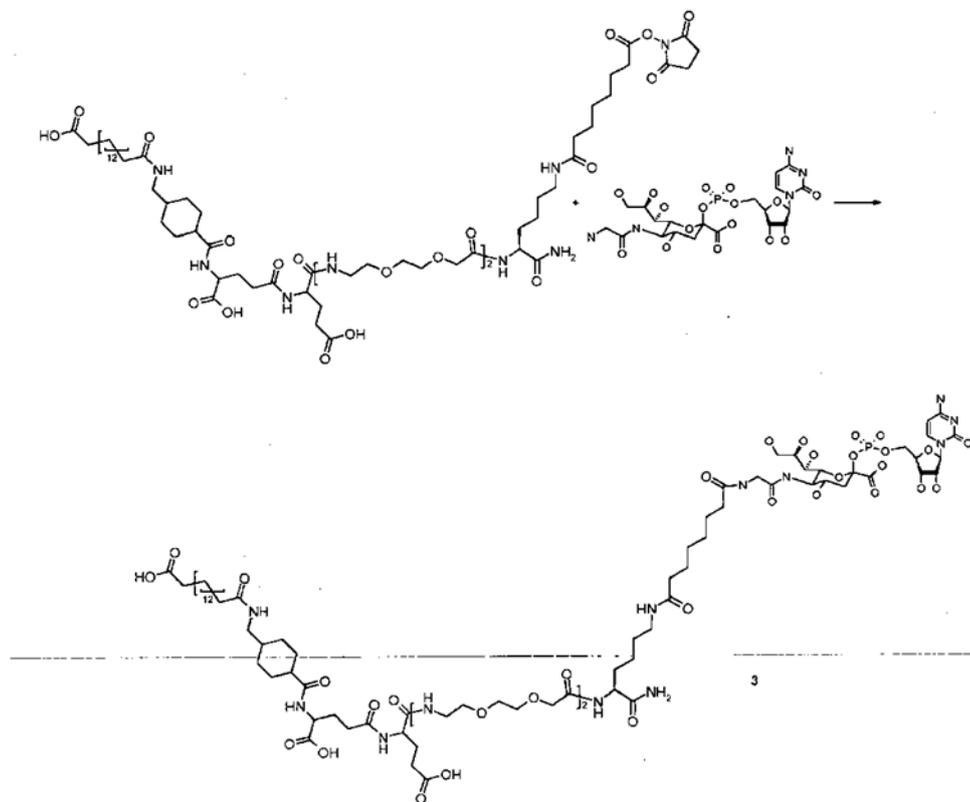
10 Todos los acoplamientos se realizaron mediante la adición de 7 eq. de DIC.

Después de estos acoplamientos, se retiró la resina del sintetizador Liberty y se lavó, se drenó y se trató con 5 ml de hexafluoro isopropanol durante 10 minutos. Después, la resina se lavó con DCM y se drenó. Luego, se repitió el tratamiento con hexafluoro isopropanol y el lavado con DCM.

15 Se disolvió éster bis-NHS de ácido subérico (368 mg) en NMP (10 ml, con azul de bromofenol 0,5 mM) y se añadió DIPEA (170 μ l). Esta solución se añadió a la resina drenada y se dejó reaccionar durante una noche. Después del acoplamiento, la resina se lavó con NMP, a continuación, DCM y se drenó. A la resina drenada, se añadió una mezcla de TFA: TIPS: Mercaptoetanol: H₂O 94:1:2,5:2,5 y la resina se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se drenó lentamente en 75 ml de éter dietílico enfriado con hielo, dando como resultado la precipitación del producto. Después de agitar a rt durante 0,5 horas y centrifugar, se produjo el producto como un sólido que se lavó dos veces con éter dietílico y se secó a vacío. El producto crudo se disolvió en una mezcla de tampones A y B de HPLC y se purificó mediante RP-HPLC preparativa. La identidad del producto y la pureza se confirmaron por HPLC y LCMS.

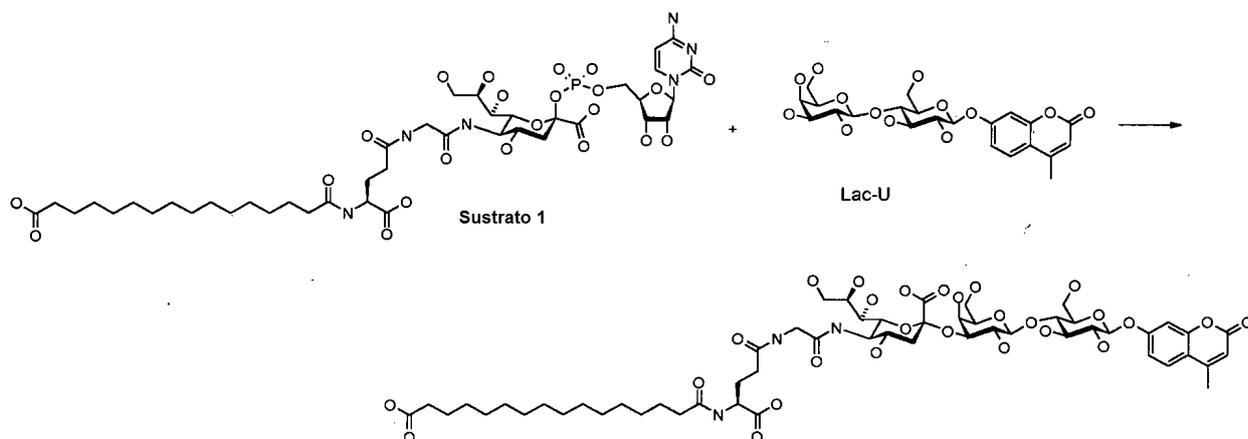
20 Usando el protocolo anterior, se preparó una cadena lateral que se unía a albúmina, altamente compleja como un éster NHS. Este compuesto está preparado para reaccionar con GSC en el ejemplo 4.

25

Ejemplo 4. Acoplamiento del éster NHS a GSC para producir el sustrato 3

El éster NHS **2** del Ejemplo 3 (20 mg) se disolvió en THF (500 μ l) y se añadió tampón TRIS (100 mM, pH 8,4, 1500 μ l). GSC (20 mg) se pesó y se añadió a la solución de éster NHS y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante un período de 30 min. La mezcla de reacción se diluyó hasta 4 ml con agua MQ y se purificó por RP HPLC, como se ha descrito en el Ejemplo 2. Gradiente 10- \rightarrow 50% de tampón B. Las fracciones relevantes fueron identificadas por LCMS y se liofilizaron. Una vez más, el producto mostró una excelente solubilidad en agua. Rendimiento: 7,7 mg. El producto se identificó por LCMS.

Usando el protocolo anterior, se preparó un sustrato de sialiltransferasa que era portador de una cadena lateral hidrófoba que se unía a albúmina compleja. El sustrato **3** demostró ser completamente soluble en tampón acuoso.

10 Ejemplo 5. Acoplamiento del sustrato 1 a lactosa marcada con fluorescencia

Reactivos utilizados para la reacción:

Tampón: HEPES 100 mM, pH 7,5

Enzima: α 2,3-(N)-sialiltransferasa, de rata, rec. de CalBiochem, n° de cat. 566218. La enzima se diluyó en tampón y se concentró aproximadamente 10 veces en un dispositivo de ultrafiltración de 10 kDa de Millipore Biomax: se administraron 100 μ l a cada uno de los dos dispositivos y se centrifugó a 12.000 G durante 2 + 6 min a rt. El volumen final era de aproximadamente 8-10 μ l (cada uno) y conc. de 1700 mU/ml. Se utilizaron

12,5 mU, 7,5 μ l para la reacción

Aceptor: Lac-UM. Solución de 0,5 mg/ml (1 mM) en TRIS 50 mM, pH 7,4 + CaCl₂ 1 mM. Se utilizó un volumen de 2,5 μ l (2,5 nmol) en cada reacción

Donante, sustrato 1: 12,5 nmol, 3 μ l se usaron en cada reacción

5 **Donante de control,** CMP-NAN, 1,4 mg, es decir, 2,2 μ mol/540 μ l de HEPES pH 7,5: 4,1 mM. Se utilizó 12,5 nmol en cada reacción, es decir, 3 μ l

10 Se llevaron a cabo dos reacciones en tubos Eppendorf y esto fue seguido por RP HPLC. Se utilizó el siguiente método de HPLC: columna C18 2,1 x 50 mm, Tampones: A: agua pura, B: MeCN puro, Caudal: 0,2 ml/min, Temperatura de la columna: 40°C, Detección UV: 214 y 254 nm, FLD: Exc: 315 nm, em: 375 nm. Las reacciones se cuantificaron siguiendo la traza FLD.

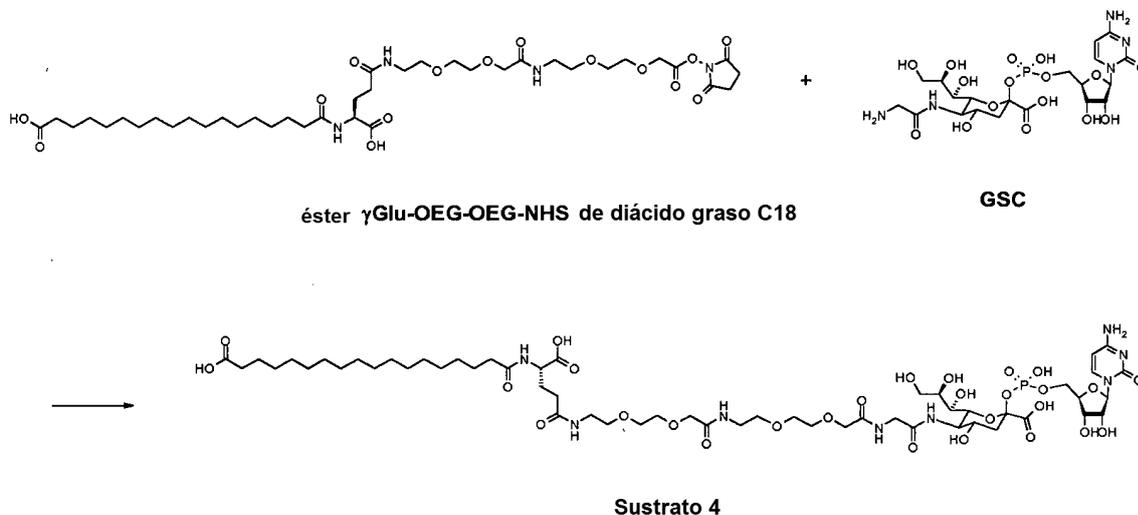
Reacción 1: aceptor + donante + enzima. La reacción alcanzó 81% de conversión en el producto, después de un período de 20 h. El producto se confirmó mediante LCMS.

Reacción 2: aceptor + donante control + enzima. La reacción alcanzó 97% de conversión en el producto después de un período de 20 h.

15 Una reacción de control sin enzima no produjo ninguna formación de producto después de 20 h.

Esta reacción se utilizó para verificar la capacidad del sustrato **1** para reaccionar como donante en una reacción de acoplamiento catalizada con sialiltransferasa con lactosa marcada con fluorescencia (Gal-Glc, que es un imitador del disacárido GalNAc-Glc terminal sobre glicanos de asialo-proteína) como aceptor. Todas las reacciones se llevaron a cabo en tampones acuosos.

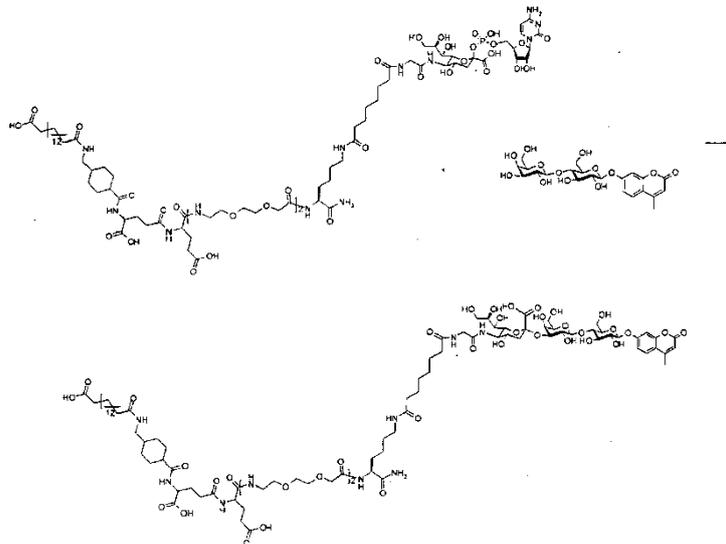
20 **Ejemplo 6. Acoplamiento de éster γ Glu-OEG-OEG NHS de diácido graso C18 a GSC para producir el sustrato de sialil-transferasa 4**



25 **Ácido** 17-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-((2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)-etoxi]etilcarbamoil)metoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)heptadecanoico (300 mg; 0,36 mmol, para la preparación de este compuesto, véase el documento WO 2009/115469 A1) se disolvió en una mezcla de THF (6 ml) y tampón HEPES 100 mM pH 7,5 (4,5 ml). Se añadió una solución de GSC (éster 5'-monofosfato de citosina de ácido glicil siálico, 252 mg; 0,397 mmol) en una mezcla de THF (4,5 ml) y tampón HEPES 100 mM pH 7,5 (6 ml). La mezcla de reacción se incubó durante 1 h. La HPLC mostró la conversión completa del material de partida GSC. La mezcla de reacción se purificó mediante varias migraciones en HPLC preparativa (C18 50 x 200 mm; A: agua; B: acetoneitrilo; C: bicarbonato de amonio acuoso 100 mM; caudal: 50 ml/min; gradiente: 90 (A): 0 (B): 10 (C) isocrático durante 8 min, a continuación, cambio a lineal a 60 (A): 30 (B): 10 (C) durante 40 min; Sustrato 4: R_t = 36 min). Las fracciones se analizaron por HPLC analítica. Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron para eliminar el bicarbonato de amonio. Los contraiones de amonio se intercambiaron con cationes de sodio, disolviendo el polvo liofilizado en agua y haciéndolo pasar a través de una columna corta de Dowex 50W X2 - a su forma de sodio. El eluido acuoso se liofilizó una vez más para proporcionar un total de 278 mg de sustrato 4. LC-MS (electrospray) API3000-MS (300-2000): R_t = 3,98 min, m/z = 1345. ¹H-RMN (DMSO; 400 MHz; picos seleccionados): δ 1,22 ppm (bs; 28H); 1,40 (bs, 4H); 1,72 (m, 1H); 1,86 (m, 1H); 2,07 (m, 4H); 5,75 (m, 2H); 6,77 (bs, 1H); 7,02 (bs, 1H); 7,23 (bs, 1H); 7,55 (m, 1H); 7,68 (m, 1H); 7,95 (s, 1H); 8,48 (s, 1H).

35

Ejemplo 7. Acoplamiento del sustrato 3 a lactosa marcada con fluorescencia



5 **Aceptor:** Lac-UM, solución de 0,5 mg/ml (1 mM) en tampón TRIS (50 mM, pH 7,4 + CaCl₂ 1 mM). En cada reacción se emplearon 2,5 µl (2,5 nmol).

Enzima: MBP-ST3Gal-III de rata, 1,06 U/mg; 0,9 mg/ml (0,954 mU/µl). En cada reacción se emplearon 2,6 µl (2,5 mU) (para una referencia de la enzima, véase, por ejemplo, el documento de EE.UU. 7220555 B2)

Donante, sustrato 3: 2,5 µg/µl en tampón imidazol, en cada reacción se emplearon 10 µl (13,4 nmol)

Donante control: CMP-NAN, 1,4 mg, tampón HEPES 4,1 mM

10 **Reacción 1:** Aceptor (2,5 µl) + Donante (10 µl) + Enzima (2,6 µl)

Reacción 2: Aceptor (2,5 µl) + Donante control (4 µl) + Enzima (2,6 µl)

Reacción 3: Aceptor (2,5 µl) + Donante (10 µl) (sin enzima)

Se llevaron a cabo tres reacciones en tubos Eppendorf, aceptor + donante + enzima se mezclaron y se incubaron a 37°C.

15 Las reacciones se controlaron mediante HPLC, utilizando el siguiente método de HPLC: Columna C18 2,1 x 50 mm, Tampones: A: 0,1% de TFA en agua, 1: 0,1% de TFA en MeCN, caudal: 0,2 ml/min, temperatura de la columna: 40°C, DAD: 214 y 254 nm, FLD: Exc: 315 nm, em: 375 nm

Resultados:

Reacción 1: casi completamente convertido en el producto después de 2 horas.

20 Reacción 2: convertido completamente en el producto después de 1 hora.

Reacción 3: ninguna reacción

Los productos fueron identificados por LCMS.

25 Esta reacción se utilizó para verificar la capacidad del sustrato 3 para reaccionar como donante en una reacción de acoplamiento catalizada con sialiltransferasa con lactosa marcada con fluorescencia (Gal-Glc, que es un imitador del disacárido terminal GalNAc-Glc en glicanos de asialoproteína) como aceptor. Todas las reacciones se realizaron en tampones acuosos.

Ejemplo 8. Acoplamiento del sustrato 1 a los N-glicanos de FVIII wt con el dominio B deleciónado - ("N8") utilizando ST3Gal III

30 **FVIII wt con el dominio B deleciónado:** 0,3 mg en 150 µl de tampón (imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, NaCl 500 mM, glicerol 1 M, pH 7,3)

Sialidasa/neuraminidasa: 60 µl (aproximadamente 72 mU) (*C. perfringens*, tipo VI-A, N-5254 de Sigma, 0,6-1,8 U/ml de gel) en agarosa (suspensión)

Sustrato 1: 4 μ l, 4,1 mM, 16 nmol, en NH_4HCO_3 10 mM

ST3Gal-III: 300 μ l (0,9 mg/ml). Mismo lote que el utilizado en el ejemplo 7

	PM/actividad	cantidad
FVIII	178,400 Da	0,15 mg, 0,84 nMol
Sialidasa	0,6-1,8 U/ml gel	60 ml, aprox. 72 mU
Sustrato 1	4,1 mM	20 nmol
ST3Gal-III	0,9 mg/ml; 1,06 U/mg	300 mU, aprox. 95 mU

5 La sialidasa se lavó en un dispositivo de minifiltrado para centrifugación (Pierce): dos veces con agua 2 x 200 μ l, a continuación, tres veces con tampón (HEPES, 100 mM pH 7,5). Finalmente, se drenó. Se añadió FVIII (0,3 mg en aproximadamente 150 μ l de tampón) y se mezcló. Cada 15 minutos, la reacción se mezcló con una pipeta. Después de 3 horas de reacción, la mezcla se filtró y se tomó una muestra para el análisis SDS PAGE. La mitad del filtrado se utilizó para una reacción adicional (70 μ l). ST3Gal-III (300 μ l) se concentró hasta aproximadamente 30 μ l utilizando un dispositivo de ultrafiltración de 10 kDa de Millipore Biomax: 12.000 g durante aproximadamente 6 minutos). El sustrato **1** (4 μ l) y ST3Gal-III (10 μ l del material concentrado) se añadieron al filtrado. La mezcla se incubó a 32°C. Se tomaron muestras para SDS PAGE después de 1 hora y después de 23 horas.

Análisis SDS PAGE de las muestras (no reducida)

1 μ l de la muestra se diluyó con 100 μ l de tampón de FVIII. Se tomaron 2 x 25 μ l de cada muestra para el análisis con o sin tratamiento previo con trombina.

15 El gel se tiñó con SilverQuest

Las pistas (2-5 y 7-12 eran con y sin tratamiento con trombina, respectivamente):

2: FVIII wt con el dominio B deleciónado: dos bandas de color intenso correspondientes a la CP y la CL, una banda menos intensa correspondiente a la CS

3: La mezcla de reacción después de 3 h con sialidasa: idéntica a la pista 1.

20 4 y 5: La mezcla de reacción después de 1 h y 23 h con sustrato **1** y ST3Gal-III: idénticas a la pista 2, pero con bandas adicionales correspondientes a ST3-Gal-III.

7: FVIII wt con el dominio B deleciónado: una serie de bandas correspondientes a la CL (dominios A3C1C2), A1 y A2.

8: La mezcla de reacción después de 3 h con sialidasa: idéntica a la pista 7

25 9 y 10: La mezcla de reacción después de 1 h y 23 h con el sustrato **1** y ST3Gal-III. Muy similar a las pistas 7 y 8, pero destaca que las bandas A1 y A3C1 C2 se habían desplazado ligeramente hacia un PM mayor correspondiente a la modificación con el resto de ácido graso del sustrato **1**.

El análisis en gel de SDS-PAGE aportó pruebas de la fijación de los grupos 1-4 de ácido C16-gammaGlu-siálico en los asialo-N-glicanos de FVIII wt con el dominio B deleciónado.

30 Este ejemplo muestra que el sustrato **1** se puede acoplar a FVIII. Sorprendentemente, el sustrato que contenía ácido graso altamente hidrófobo, era soluble en agua sin impedimentos y fácil de manejar en tampones.

Ejemplo 9. Preparación de FVIII wt con el dominio B deleciónado modificado en N-glicano ("N8") mediante reacción con el sustrato **1 y ST3Gal-III: Compuesto 5**

35 Asialo-FVIII wt con el dominio B deleciónado (1 mg, 5,6 nmol, en 800 μ l de tampón histidina (1,5 mg/ml), CaCl_2 (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (500 mM), sacarosa (3 mg/ml) se trató con ST3Gal-III (500 μ l, conc. hasta 50 μ l, 500 mU) y sustrato **1** (20 μ l, 80 nmol). La reacción se incubó a 32°C durante 22 h. Se extrajo una muestra para el análisis SDS PAGE. Después, se añadió una solución de CMP-NAN (2 mg, 3,1 μ mol en 20 μ l de tampón (imidazol 20 mM, CaCl_2 10 mM, 0,02% de Tween 80, NaCl 500 mM, glicerol 1 M, pH 7,3)) y se incubó a 32°C durante 1 h.

40 La mezcla de reacción se diluyó hasta 19 ml con aproximadamente 18 ml de imidazol 20 mM, CaCl_2 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3. La concentración de sal era entonces de aproximadamente 28 mM. La solución

se cargó en una columna spin AIEC (Vivapure Q Mini M, intercambio aniónico fuerte) que se había equilibrado con 10 ml de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3. A continuación, la columna se lavó con 1. 2 x 10 ml de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, 2. 2 x 10 ml de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, NaCl 50 mM, 3. 2 x 10 ml de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, NaCl 200 mM.

Finalmente, el conjugado de FVIII se eluyó con imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, NaCl 1 M. El conjugado (700 µg) se recuperó en 1 ml. Se aplicó a una columna de filtración en gel Superdex 200 10/300 GL y se eluyó con histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (18 mg/ml), sacarosa (3 mg/ml). El eluido contenía un pico a aproximadamente 0,4 volúmenes de columna y otro pico a aproximadamente 0,60 volúmenes de columna. El primer pico se identificó por SDS PAGE como la enzima ST3Gal-III (probablemente en forma agregada). El segundo pico contenía el conjugado (5), aislado como 226 µg en 3,5 ml. El producto se caracterizó por SDS PAGE no reducida antes de la escisión con trombina, según la cual las bandas correspondientes a A1 y A3C1C2 que contenían los glicanos modificados se desplazaron ligeramente hacia un mayor PM. En este ejemplo, el sustrato 1 se acopló a los N-glicanos de FVIII y el conjugado fue aislado mediante etapas cromatográficas. El acoplamiento se llevó a cabo fácilmente.

Ejemplo 10. Preparación de FVIII wt con el dominio B deleciónado modificado en N-glicano mediante reacción con el sustrato 3 y ST3Gal-III: Compuesto 6

Asialo-FVIII wt con el dominio B deleciónado (1 mg, 5,6 nmol, en 800 µl de tampón histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (500 mM), sacarosa (3 mg/ml), se trató con ST3Gal-III (500 µl, conc. hasta 50 µl, 500 mU) y sustrato 3 (45 µl, 60 nmol). La reacción se incubó a 32°C durante 21,5 h. Se extrajo una muestra para el análisis SDS PAGE. Después, se añadió una solución de CMP-NAN (2 mg, 3,1 µmol en 20 µl de tampón (imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, NaCl 500 mM, glicerol 1 M, pH 7,3)) y se incubó a 32°C durante 1 h.

La mezcla de reacción se diluyó hasta 19 ml con aproximadamente 18 ml de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3. La concentración de sales era entonces de aproximadamente 28 mM. El producto se purificó después mediante una columna spin AIEC como se ha descrito en el ejemplo 9. El conjugado (820 µg) se recuperó en 1 ml. Se aplicó a una columna de filtración en gel Superdex 200 10/300 GL y se eluyó con histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (18 mg/ml), sacarosa (3 mg/ml). El eluido contenía un pico en aproximadamente 0,43 volúmenes de columna y otro pico en aproximadamente 0,58 volúmenes de columna. El primer pico se identificó mediante SDS-PAGE como la enzima ST3Gal-III (probablemente en forma agregada). El segundo pico contenía el conjugado (6), aislado como 273 µg en 2,5 ml. El producto se caracterizó mediante SDS PAGE no reducida con escisión previa con trombina, según la cual las bandas correspondientes a A1 y A3C1 C2 que contenían los glicanos modificados se desplazaban claramente hacia un PM más alto.

En este ejemplo, el sustrato 3 se acopló a los N-glicanos de FVIII y el conjugado se aisló mediante etapas cromatográficas.

Ejemplo 11. Preparación de FVIII wt con el dominio B deleciónado modificado en O-glicano mediante reacción con el sustrato 3 y ST3Gal-I: Compuesto 7

FVIII wt con el dominio B deleciónado (5,7 mg/ml, 352 µl, 10,2 nmol) en tampón (imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, NaCl 500 mM) se mezcló con sialidasa (*A. ureafaciens*, 12 µl, 0,43 mg/ml, 130 U/ml, véase Christensen y Egebjerg, *BioTechnol. Appl. Biochem.*, 41, 225-231), HIS-ST3Gal-I (21,6 U/mg, 100 µl) y sustrato 3 (150 µl, 200 nmol). La mezcla se incubó a 32°C durante 2,5 h después de lo cual el FVIII conjugado fue aislado por cromatografía de afinidad y ciclodextrina. El material se cargó en la columna con ciclodextrina inmovilizada y se lavó con 18 ml de tampón de partida. La elución se realizó como una etapa hasta el 100% del tampón de elución, mediante la cual el producto eluyó como 730 µg en 2,5 ml. A continuación, el producto se trató con CMP-NAN (40 µl, 34 mg/ml) y MBP-SBD-ST3Gal-III (200 µl, 0,33 mg/ml, aproximadamente 0,5 U/ml) a 32°C durante 1 h, y se congeló. Después de la descongelación, el producto se purificó mediante columna spin AIEC tal y como se ha descrito en el ejemplo 9 y la elución final se realizó con 5 x 350 µl de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, NaCl 1 M proporcionando 586 µg de conjugado en 700 µl. Se aplicó a una columna de filtración en gel Superdex 200 10/300 GL y se eluyó con histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (18 mg/ml), sacarosa (3 mg/ml). El eluido contenía un pico principal a 0,58 volúmenes de columna que se recogió y contenía 348 µg de conjugado (7) en 2,5 ml. El producto se caracterizó mediante SDS PAGE no reducida indicando que la banda correspondiente a la CP que contenía el glicano modificado, se desplazaba ligeramente hacia un PM mayor. Además, una cromatografía de afinidad analítica con ciclodextrina con y sin aparición de picos con FVIII wt con el dominio B deleciónado mostró que el conjugado se unía a ciclodextrina mientras que FVIII wt con el dominio B deleciónado no lo hizo.

Ejemplo 12. Preparación de FVIII wt con el dominio B deleciónado modificado con O-glicano PEGilado/cadena lateral hidrófoba en N-glicano: Compuesto 8

FVIII wt con el dominio B deleciónado (1 mg, 5,6 nmol) se sometió a una reacción de PEGilación usando sialidasa (*A. ureafaciens*), ST3Gal-I, y PSC de 40 kDa (para una descripción de este compuesto véase el documento WO

2007/056191 A2) como se ha descrito en el documento WO2009/108806 A1. Después de completar la reacción, el producto se aplicó a una columna de filtración en gel Superdex 200 10/300 GL y se eluyó con imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, NaCl 25 mM. El producto que contenía el FVIII PEGilado eluyó como dos picos parcialmente separados entre 0,38 y 0,54 volúmenes de columna. Esta agrupación se purificó mediante columna de centrifugación-spin AIEC como se ha descrito en el ejemplo 9 (omitiendo la etapa 3) y el final de la elución se realizó con 3 x 300 µl de tampón imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, NaCl 1 M proporcionando el FVIII PEGilado, 240 µg en 600 µl. A continuación, el producto se trató con MBP-SBD-ST3Gal-III (125 µl, 0,33 mg/ml, aproximadamente 0,5 U/ml) y el sustrato 3 (15 µl, 20 nmol). La mezcla de reacción se incubó a 32°C durante 20 h, después de lo cual se añadió CMP-NAN (34 mg/ml, 14 µl) y se dejó reaccionar a 32°C durante 1 h. La mezcla de reacción se congeló después a -80°C. La muestra descongelada se diluyó con tampón (25 ml de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3) y se purificó en una columna de centrifugación-spin AIEC como se ha descrito en el ejemplo 9. La elución final se realizó con 3 x 250 µl de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% de Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, NaCl 1 M. La agrupación se aplicó a una columna de filtración en gel Superdex 200 10/300 GL y se eluyó con histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (18 mg/ml), sacarosa (3 mg/ml). El eluido contenía un pico en 0,58 volúmenes de columna que contenía FVIII no PEGilado y dos picos no separados de aproximadamente 0,43 volúmenes de columna. El pico de elución temprana de estos dos picos era probablemente ST3Gal-III (en forma agregada) mientras que el pico de elución tardía contenía el compuesto deseado. Las fracciones que contenían el compuesto deseado (8) con poca cantidad de ST3Gal-III se recogieron (50 µg en 2,5 ml) y una SDS PAGE no reducida mostró que la CL se desplazó a un PM mayor, lo que es consistente con la fijación de un PEG al O-glicano. Una PAGE-SDS no reducida con escisión previa con trombina mostraba que las bandas correspondientes a A1 y A3C1 C2 que contenían los glicanos modificados estaban desplazadas hacia un PM más alto, lo que era consistente con la fijación del sustrato 3 a los N-glicanos.

Ejemplo 13. Asialo FVIII wt con el dominio B deleciónado

25 Asialo FVIII wt con el dominio B deleciónado se obtuvo a través del tratamiento de FVIII wt con el dominio B deleciónado con una sialidasa, a través de dos rutas. La primera ruta incluía el tratamiento de FVIII wt con el dominio B deleciónado con una sialidasa inmediatamente antes o simultáneamente a un acoplamiento mediado con sialiltransferasa (una sola etapa) de grupos modificantes a O- o N-glicanos de FVIII. Esto se ha descrito en los ejemplos 8, 11 y 12.

30 Alternativamente, el asialo FVIII wt con el dominio B deleciónado se obtuvo de la siguiente manera (ejemplos 9 y 10). FVIII wt con el dominio B deleciónado se sometió a una reacción de PEGilación usando sialidasa (*A ureafaciens*), ST3Gal-I y PSC de 40 kDa tal y como se describe en el documento WO2009/108806 A1. Después de completar la reacción, el asialo-FVIII (no PEGilado) se separó del FVIII PEGilado mediante AIEC. Por último, el asialo-FVIII se sometió a un intercambio de tampón utilizando una columna MonoQ AIEC. Una cantidad de 37,4 mg del asialo-FVIII aislado a partir de la AIEC en 82 ml de tampón, se diluyó con agua MQ (150 ml) para obtener una conductividad de 12 mS/cm y se cargó en la columna que se había equilibrado con tampón de histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (50 mM), sacarosa (3 mg/ml). El producto se eluyó usando un gradiente de tampón de histidina (1,5 mg/ml), CaCl₂ (0,25 mg/ml), Tween 80 (0,1 mg/ml), NaCl (1 M), sacarosa (3 mg/ml). El producto eluyó a aproximadamente NaCl 500 mM.

40 Ejemplo 14. Acoplamiento enzimático del sustrato 4 a asialo transferrina. Preparación de transferrina modificada con N-glicano.

El sustrato 4 (2,7 mg; 2,0 µmol) se disolvió en 100 µl de tampón imidazol (imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,02% Tween 80, NaCl 150 mM, glicerol 1 M pH 7,3) que contenía 20% (p/v) de HPCD. Una solución de asialo transferrina (0,4 mg) en 200 µl de tampón imidazol se añadió, seguido de enzima MBP-SBD-ST3Gal III (0,33 mg/ml) en 20 µl de tampón Hepes (Hepes 14 mM; NaCl 140 mM, 50% (v/v) de glicerol, pH 7,0). A la mezcla se añadió tampón imidazol adicional (80 µl) hasta tener un volumen total de reacción de 400 µl, y luego se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se analizó por LC/MSD TOF (Agilent Technology®), aplicando algoritmos de desconvolución a los espectros medidos a 300-2000 Da. La distribución del producto se calculó basándose en la intensidad del pico (rendimiento; m/z): asialo transferrina sin reaccionar (28%; 78386,3869 Da); asialo transferrina monoderivatizada (48%; 79409,8768 Da); asialotransferrina doblemente derivatizada (24%; 80440,8368 Da). Este ejemplo muestra que es posible obtener, posteriormente, datos analíticos que muestran la masa del producto formado para verificar que el grupo lateral hidrófobo del sustrato 4 se había transferido al asialo glicano de un polipéptido (transferrina).

50 Ejemplo 15. Unión a albúmina de FVIII conjugado con una cadena lateral hidrófoba

55 Una columna de sefarosa-HSA (albúmina de suero humano) se preparó utilizando una columna HiTrap NHS (GE Healthcare, VC 1 ml, producto 17-0716-01) siguiendo el folleto de instrucciones GE Healthcare 71-7006-00 AT. La sustitución era de 10 µmol/ml. Se utilizó HSA de Sigma (A1653). Una cantidad de 1 mg en 1 ml de tampón se utilizó para el acoplamiento. La eficacia del acoplamiento se determinó en un 71% mediante el protocolo descrito en el folleto de instrucciones mencionado anteriormente.

La columna se utilizó con las siguientes condiciones:

Caudal: 0,5 ml/min

Tampón de equilibrado: Tampón A: imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, 10% de glicerol

Tampón de elución: Tampón B: hidroxipropilciclodextrina 20 mM en tampón A

5 Temperatura: 22°C

Detección: detección de fluorescencia, excitación 315 nm, emisión: 375 nm

Se utilizó un gradiente por etapas, con etapas de 0% a 20% (tiempo de retención 3 min) para 60% (5,25 min) a 100% (7,5 min) de tampón B.

Se realizaron tres migraciones de esta manera:

10 1) una muestra en blanco, que no mostraba picos, pero tenía una señal ancha de baja intensidad que se correspondía al gradiente por etapas de hidroxipropilciclodextrina

2) una muestra de FVIII BDD wt ("N8"), que mostraba un pico en un tiempo de retención de 2,5 min correspondiente al volumen vacío de la columna, por tanto, esta proteína no tiene afinidad por la columna

15 3) una muestra de la mezcla de reacción cruda de un conjugado de aglutinante de albúmina y FVIII preparado de forma análoga al compuesto **6** del Ejemplo 10, que mostraba un pico en un tiempo de retención de 2,5 min correspondiente al volumen vacío de la columna, además de un pico con una retención de 7,5 min correspondiente a la elución en 20% de tampón B. Por lo tanto, una fracción de la proteína se unió a la columna. Esta fracción se aisló y se encontró que era FVIII modificado con la cadena lateral hidrófoba correspondiente al compuesto **6**. Esto se determinó mediante la observación de un desplazamiento en las bandas correspondientes a CL y CP en el análisis SDS PAGE.

En un experimento similar se encontró que ninguna de las proteínas de las muestras 2 o 3 unidas a una columna, contenía proteína sin inmovilizar.

Este ejemplo muestra que, en las condiciones del experimento, FVIII BDD wt no se une a HSA, mientras que el derivado de FVIII modificado con la cadena lateral hidrófoba correspondiente al compuesto **6**, se une a HSA.

25 **Ejemplo 16. Caracterización de la actividad *in vitro* (FVIII:C) de FVIII conjugado con cadenas laterales hidrófobas**

La actividad de FVIII (FVIII:C) de los derivados de FVIII **5-8** se evaluó en un ensayo cromogénico de FVIII utilizando reactivos Coatest SP (Chromogenix) del modo siguiente: muestras de FVIII y un patrón de FVIII (por ejemplo, rFVIII de tipo silvestre purificado, calibrado frente al séptimo patrón internacional de FVIII procedente de NIBSC) se diluyeron en tampón de ensayo Coatest (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 1% de BSA, pH 7,3, con conservante). Se añadieron 50 µl de muestras, patrones y control negativo de tampón, a placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) por duplicado. El reactivo factor IXa/factor X, el reactivo fosfolípido y CaCl₂ del kit Coatest SP se mezclaron 5:1:3 (vol:vol:vol) y 75 µl de esta mezcla se añadieron a los pocillos. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 50 µl de la mezcla de sustrato de factor Xa S-2765/inhibidor de trombina I-2581 y las reacciones se incubaron 10 min a temperatura ambiente antes de añadir 25 µl de ácido cítrico 1 M, pH 3. La absorbancia a 415 nm se midió en un lector de placas de microtitulación Spectramax (Molecular Devices) con absorbancia a 620 nm empleada como longitud de onda de referencia. El valor del control negativo se restó de todas las muestras y una curva de calibración preparada mediante regresión lineal de los valores de absorbancia se representó frente a la concentración de FVIII. La actividad específica se calculó dividiendo la actividad de las muestras entre la concentración de proteína determinada por HPLC.

Tabla 1

Conjugado	Modificaciones	Actividad específica FVIII:C (UI/mg)
5 (Ejemplo 9)	Fijación del sustrato 1 a los N-glicanos	6378
6 (Ejemplo 10)	Fijación del sustrato 3 a los N-glicanos	5522
7 (Ejemplo 11)	Fijación del sustrato 3 al O-glicano	6628

Conjugado	Modificaciones	Actividad específica FVIII:C (UI/mg)
8 (Ejemplo 12)	Fijación del sustrato 3 a los N-glicanos y un PEG de 40 kDa al O-glicano	4530
FVIII BDD wt ("N8")	-	9300-10000

Ejemplo 17: FVIII:C medida en el ensayo de coagulación de una etapa

La FVIII:C de los derivados de FVIII 5-8 se evaluó adicionalmente en un ensayo de coagulación de una etapa de FVIII de la siguiente manera: muestras obtenidas a partir de FVIII y un patrón de FVIII (por ejemplo, rFVIII de tipo silvestre purificado calibrado frente al séptimo patrón internacional de FVIII procedente de NIBSC) se diluyeron en tampón HBS/BSA (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 con 1% de BSA) hasta aproximadamente 10 U/ml, seguido por una dilución de 10 veces en plasma carente de FVIII que contenía vWF (Dade Behring). Las muestras se diluyeron posteriormente en tampón HBS/BSA. El tiempo de coagulación APTT se midió en un instrumento ACL300R o ACL5000 (Instrumentation Laboratory) utilizando el programa de un solo factor. El plasma carente de FVIII con vWF (Dade Behring) se utilizó como plasma del ensayo y SynthASil, (HemosIL[®], Instrumentation Laboratory) como reactivo de aPTT. En el instrumento para la coagulación, la muestra diluida o el patrón se mezcló con el plasma carente de FVIII y los reactivos de aPTT a 37°C. Se añadió cloruro de calcio y el tiempo hasta la formación del coágulo se determinó por la turbidez. La FVIII:C en la muestra se calculó basándose en una curva estándar de los tiempos de formación de coágulo de las diluciones del patrón de FVIII. Los datos de la Tabla 2 demuestran que la actividad específica FVIII:C medida por el ensayo de coagulación de los derivados de FVIII **5-8** era de buena a excelente.

Tabla 2

Conjugado	Modificaciones	Actividad específica FVIII:C en ensayo de coagulación de una etapa (UI/mg)
5 (Ejemplo 9)	Fijación del sustrato 1 a los N-glicanos	3522
6 (Ejemplo 10)	Fijación del sustrato 3 a los N-glicanos	4165
7 (Ejemplo 11)	Fijación del sustrato 3 al O-glicano	5766
8 (Ejemplo 12)	Fijación del sustrato 3 a los N-glicanos y un PEG de 40 kDa al O-glicano	1750
FVIII BDD wt ("N8")	-	9300-10000

Ejemplo 18. Caracterización farmacocinética de FVIII conjugado con cadenas laterales hidrófobas

La farmacocinética de variantes rFVIII se evaluó en ratones carentes de FVIII (ratones con el exón 16 de FVIII desactivado (KO) con antecedentes C57Bl/6, criados en Taconic M&B) o en ratones carentes de vWF (ratones con el exón 4 + 5 de vWF KO con antecedentes C57Bl/6, criados en Charles River, Alemania). Los ratones vWF-KO tenían 13% de FVIII:C normal, mientras que los ratones FVIII-KO no tenían una FVIII:C detectable. Se utilizó una mezcla de machos y hembras (aproximadamente 1:1) con un peso aproximado de 25 gramos y un intervalo de edad de 16-28 semanas. Los ratones recibieron una única inyección i.v. de rFVIII (280 UI/kg) en la vena de la cola. Se extrajo sangre del plexo orbital en puntos de tiempo hasta 64 horas después de la dosificación, utilizando tubos de vidrio capilares no recubiertos. Se tomaron tres muestras de cada ratón, y en cada punto de tiempo se recogieron de 2 a 4 muestras. La sangre se estabilizó inmediatamente con citrato de sodio y se diluyó en cuatro volúmenes de tampón de Coatest SP para FVIII (véase el ejemplo 16) antes de 5 min de centrifugación a 4000 x g. El plasma obtenido a partir de la sangre diluida se congeló en hielo seco y se mantuvo a -80°C. FVIII:C se determinó en un ensayo cromogénico tal y como se ha descrito en el ejemplo 16. El análisis farmacocinético se llevó a cabo por métodos no compartimentales (NCA) utilizando el programa informático WinNonlin Pro versión 4.1. La Tabla 2 muestran las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos: La semivida ($t_{1/2}$), el aclaramiento (CL) y el tiempo medio de residencia (MRT). Los datos muestran que el aclaramiento se redujo y la semivida y el tiempo medio de residencia aumentaron después de la conjugación de FVIII con cadenas laterales hidrófobas.

Tabla 3

Conjugado	Modificaciones de FVIII BDD wt	Especie	t½ (h)	MRT (h)	CL (ml/h/kg)
5 (Ejemplo 9)	Fijación del sustrato 1 a los N-glicanos	ratón FVIII KO	12	15	4,5
6 (Ejemplo 10)	Fijación del sustrato 3 a los N-glicanos	ratón FVIII KO	11	14	6,6
7 (Ejemplo 11)	Fijación del sustrato 3 al O-glicano	ratón FVIII KO	9,4	14	4,6
8 (Ejemplo 12)	Fijación del sustrato 3 a los N-glicanos y un PEG de 40 kDa al O-glicano	ratón vWF KO	11	15	6,6
FVIII BDD wt ("N8")	-	ratón FVIII KO	6,7-9,3	9,9-11	8,1-10
FVIII BDD wt ("N8")	-	ratón vWF KO	0,5	0,64	151

Ejemplo 19. Preparación de FVIIa modificado con cadena lateral hidrófoba en el N-glicano

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- 5 Asialo FVIIa (lote interno): se utilizó en tampón Gly-Gly, pH 6 (1,39 mg/ml), 500 µl, 13 nmol, se utilizó sustrato 1 (aglutinante de albúmina-GSC): (PM 1869): 2 mg/ml, 30 µl o 32 nmol.

MBP-SBP-ST3Gal-III: se utilizaron 1,2 U/ml, 100 µl

- 10 Asialo-FVIIa se refiere a un FVIIa recombinante que había sido tratado previamente con una sialidasa y se había purificado. El Asialo-FVIIa se descongeló y se añadió sustrato 1 y ST3Gal-III. La mezcla se incubó a 32°C. Después de 110 min, se separó una muestra mediante cromatografía de afinidad con ciclodextrina. El cromatograma contenía dos picos. El primer pico que eluyó se correspondía a un asialo-FVIIa no modificado y el pico que eluyó el último se correspondía a un asialo-FVIIa modificado con el aglutinante de albúmina, como se muestra por un aumento en el peso molecular de las cadenas pesadas y ligeras de FVIIa utilizando SDS-PAGE.

- 15 Este ejemplo muestra que es posible la modificación de FVIIa en sus N-glicanos con la cadena lateral hidrófoba del sustrato 3.

Ejemplo 20. Preparación de FIX modificado con cadena lateral hidrófoba en el N-glicano

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- 20 FIX (lote interno): en histidina 10 mM, CaCl₂ 3 mM, tampón de NaCl 50 mM pH 6 (11 mg/ml). 100 µl (20 nmol) se diluyó hasta 1 ml con tampón imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, glicerol al 10% pH 7,3. Se utilizaron 100 µl (2 nmol)

Sustrato 1 (aglutinante de albúmina GSC, PM 1869): se utilizaron 2 mg/ml, 7,5 µl (8 nmol) MBP-SBP-ST3Gal-III: 1,2 U/ml, se utilizaron 25 µl .

Sialidasa/neuraminidasa: 50 µl (6,7 mU) (*C. perfringens*, tipo VI-A, N-5254 de Sigma) en agarosa (suspensión), 0,6-1,8 U/ml de gel

- 25 La sialidasa se centrifugó utilizando una columna de centrifugación Pierce y se lavó dos veces con 500 µl de agua, luego tres veces con tampón HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7. Se centrifugó y la enzima se añadió al FIX descongelado. La reacción se agitó suavemente a temperatura ambiente durante la noche y después se filtró, utilizando una columna de centrifugación Pierce. El filtrado resultante que contenía asialo FIX se proporcionó al sustrato 1 y ST3Gal-III, y se incubó a 32°C durante 46 h. Una muestra de la mezcla de reacción se separó por cromatografía de afinidad y ciclodextrina. El cromatograma contenía dos picos. El primer pico de la elución se correspondía a asialo-FIX no modificado y el último pico de la elución se correspondía al asialo-FIX modificado con el aglutinante de albúmina, como se muestra por un aumento en el peso molecular de las cadenas pesadas y ligeras de
- 30

FVIIa, utilizando SDS-PAGE. Los geles también mostraron la presencia de pequeñas cantidades de FIXa generadas mediante autoactivación de FIX.

Este ejemplo muestra que es posible la modificación de FIX en sus N-glicanos con la cadena lateral hidrófoba del sustrato 3.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de FVIII recombinante, en donde dicha molécula se conjuga covalentemente con al menos un grupo lateral hidrófobo, en donde el grupo lateral hidrófobo está ligado a dicha molécula a través de un ácido siálico, en donde dicho grupo lateral hidrófobo está conjugado covalentemente con un O-glicano a través de un ácido siálico, en donde dicho O-glicano está situado en un dominio B truncado y en donde la activación de FVIII da como resultado la eliminación de dicho grupo lateral hidrófobo.
5
2. Una molécula de FVIII según la reivindicación 1, en donde los restos de la cadena pesada y ligera del polipéptido precursor de FVIII están separados por un enlazador, en donde la secuencia del enlazador se obtiene a partir del dominio B de FVIII, y en donde el enlazador comprende un sitio de reconocimiento para la proteasa que separa el polipéptido precursor de FVIII con el dominio B truncado en la cadena pesada y ligera.
10
3. Una molécula de FVIII según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la longitud del dominio B truncado es de 20-30 aminoácidos.
4. Una molécula de FVIII según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el grupo lateral hidrófobo se selecciona entre uno o varios del grupo que consiste en: ácido graso y diácido graso.
5. Una molécula de FVIII según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha molécula de FVIII tiene una capacidad de unión a vWF reducida.
15
6. Una molécula de FVIII según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha molécula de FVIII está conjugada además con al menos un polímero hidrófilo.
7. Un método de preparación de una molécula según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho método comprende la fijación de un grupo lateral hidrófobo a una proteína recombinante a través de una reacción catalizada por una sialiltransferasa.
20
8. Uso de una molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para el tratamiento de la hemofilia.
9. Una composición farmacéutica que comprende una molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.