

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 066**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)
C07K 17/12 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)
C07K 14/555 (2006.01)
C07K 14/59 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2007 E 07766361 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2043616**

54 Título: **Conjugación N-terminal de ácido polisiálico a proteínas**

30 Prioridad:

25.07.2006 EP 06117830

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

06.05.2016

73 Titular/es:

**LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED (100.0%)
LONDON BIOSCIENCE INNOVATION CENTRE 2
ROYAL COLLEGE STREET
LONDON NW1 0NH, GB**

72 Inventor/es:

**JAIN, SANJAY;
LAING, PETER y
GREGORIADIS, GREGORY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 569 066 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

Conjugación N-terminal de ácido polisialílico a proteínas

La presente invención se refiere a métodos para producir derivados N-terminales de proteínas en los que un polisacárido, que es un ácido polisialílico, que preferiblemente presenta al menos unidades siálico terminales, y que preferiblemente consiste fundamentalmente solo en unidades de ácido siálico, se hace reaccionar en el extremo N-terminal de una proteína o un péptido bajo condiciones controladas para producir un derivado N-terminal. Los derivados son útiles para mejorar la farmacocinética y la farmacodinámica de proteínas y péptidos.

Los ácidos polisialílicos (PSA) son polímeros no ramificados naturales del ácido siálico producidos por ciertas cepas bacterianas y en mamíferos en ciertas células. Pueden ser producidos con diversos grados de polimerización desde $n =$ aproximadamente 80 o más restos ácido siálico, hasta $n = 2$, mediante una hidrólisis ácida limitada o mediante digestión con neuraminidasas, o mediante fraccionamiento de las formas naturales, derivadas de bacterias, del polímero. En años recientes, se han aprovechado las propiedades biológicas de los ácidos polisialílicos, en particular las del ácido polisialílico homopolimérico alfa-2,8-enlazado, para modificar las propiedades farmacocinéticas de proteínas y moléculas de fármacos de bajo peso molecular. La derivatización del ácido polisialílico provoca unas notables mejoras en la semivida en circulación en una serie de proteínas terapéuticas, que incluyen la catalasa y la asparaginasa, y también permite que dicha proteínas se empleen aun en presencia de anticuerpos que hayan sido generados como consecuencia no deseable (y a veces inevitable) de una exposición anterior a la proteína terapéutica [Fernández y Gregoriadis, 2006; Jain *et al.*, 2003, 2004]. El ácido polisialílico alfa-2,8-enlazado ofrece una alternativa atractiva al PEG, puesto que es un polímero biodegradable inmunológicamente invisible que es parte natural del cuerpo humano, y que se degrada, por medio de neuraminidasas tisulares, hasta el ácido siálico, un sacárido no tóxico.

Los inventores ya han descrito métodos para la unión de polisacáridos a agentes terapéuticos, tales como proteínas [documento US-A-5.846.951; documento WO-A-01879221]. Algunos de estos métodos dependen de la derivatización química del extremo "no reductor" del polímero para crear un resto aldehído reactivo a proteínas que reacciona en los grupos amina primarios. Una unidad ácido siálico terminal no reductora, puesto que contiene dioles vecinales, puede oxidarse con facilidad (y de modo selectivo) con peryodato para producir una forma de monoaldehído, que es mucho más reactiva a proteínas, y que comprende un elemento adecuadamente reactivo para la unión de proteínas mediante una aminación reductora y otras químicas. La reacción se ilustra en la figura 1, que muestra:

A) la oxidación del ácido colomínico (ácido polisialílico alfa-2,8-enlazado procedente de *E. coli*) con peryodato de sodio para formar un aldehído reactivo a proteínas en el extremo n o reductor, y

B) la reducción selectiva de la base de Schiff con cianoborohidruro de sodio para formar un enlace covalente irreversible con el grupo amino de la proteína.

El documento WO2005/016974 describe ácidos polisialílicos que tienen un grupo aldehído para su conjugación con grupos amino de proteínas o péptidos.

Debido a la naturaleza polifuncional de las proteínas, las estrategias de conjugación con PEG y PSA han conducido invariablemente a una mezcla de entidades moleculares químicamente diferentes. Pueden generarse subproductos no intencionados durante las reacciones de conjugación convencionales descritas anteriormente mediante la reacción del ácido colomínico con las cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo. Estos pueden ser suficientes como para que resulten un problema en la fabricación de los conjugados químicamente definidos requeridos por las autoridades reguladoras para un uso terapéutico en el ser humano y en animales.

Una estrategia dirigida a sitio para conjugar proteínas a polietilenglicol, que permite la preparación de derivados de proteína-PEG fundamentalmente homogéneos con una única cadena de PEG conjugada con el amino terminal de la proteína, se describe en Kinstler *et al.*, 2002. Esta selectividad se logra realizando la alquilación reductora de las proteínas con PEG-aldehídos a un pH menor que el habitual. Sin embargo, el método solo se aplicó a la conjugación con PEG.

Las reglas de la química de la PEGilación no pueden aplicarse a la polisialilación como tales, debido a la diferencia en las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas. El PSA es un polímero lábil frente a ácidos y es estable durante semanas a un pH aproximadamente neutro (fig. 2.2). Los resultados en la figura 2.2 demuestran que, a pH 6,0 y 7,4, el CA es estable durante 8 días, a pH 5,0 se produce una lenta degradación (después de 48 horas, 92% del PM inicial), y a pH 4,0 se produce una degradación lenta (después de 48 horas, 70% del PM inicial). El ácido polisialílico es muy hidrófilo, mientras que PEG es una molécula de naturaleza anfífila. Cuando la polisialilación se realiza empleando las condiciones utilizadas para la PEGilación, en muchos casos se observa la agregación y la precipitación de las proteínas.

Uno de los mayores desafíos que aún están pendientes en el desarrollo de productos farmacéuticos de proteínas es la gestión de las inestabilidades físicas y químicas de las proteínas. Los productos farmacéuticos de proteínas normalmente deben conservarse en condiciones de frío o liofilizarse para lograr una caducidad aceptable. Se han

empleado excipientes (por ejemplo, tampones estabilizantes, azúcares, polioles, tensioactivos, sales, PEG, polímeros, iones metálicos y aminoácidos) y la modificación estructural para mejorar la estabilidad de las proteínas, dotándolas de una mayor estabilidad y caducidad. Siguen siendo necesarias formulaciones mejoradas de conjugados de proteína-PSA.

5 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir un derivado N-terminal purificado de una proteína o un péptido, en el que (i) un polisacárido activado que es un ácido polisialílico se hace reaccionar en el grupo amina del N-terminal de una proteína o un péptido en una disolución ácida acuosa a un pH en el intervalo de 3 a 6,5 para producir un derivado N-terminal, y (ii) el derivado N-terminal resultante se purifica en una disolución acuosa de un pH mayor que en la etapa (i) y que está en el intervalo de 6,5 a 9,5.

10 En esta invención se describen los resultados de la aplicación de una estrategia química fácil y escalable que permite preparar conjugados dirigidos a sitio estequiométricamente definidos de polisacáridos, preferiblemente ácido polisialílico (PSA), con el N-terminal de proteínas. Generalmente, esto se realiza a través de una alquilación reductora con PSA-aldehídos en un entorno acuoso. La conjugación del N-terminal resulta ventajosa, puesto que se cree que esto minimiza cualquier interferencia no deseada entre el polisacárido y el resto de los restos aminoácidos en la proteína.

El método requiere el restablecimiento de un pH neutro poco después de la derivatización, o sino el polisacárido se degrada sustancialmente por la exposición al entorno ácido del tampón de derivatización. El método también requiere el uso de un pH controlado y, opcionalmente, la presencia de aditivos de la formulación durante la reacción para evitar la precipitación de la proteína.

20 Esta invención permite sintetizar conjugados eficaces, químicamente homogéneos y bien definidos, que tienen gran utilidad en la industria farmacéutica.

En esta memoria descriptiva, los términos "proteína" y "péptido" se emplean de modo intercambiable.

25 La proteína reacciona principalmente en el grupo amina N-terminal. Esto se logra mediante las condiciones de pH de la reacción, que estimulan selectivamente la reacción química en el N-terminal de la proteína. La figura 2.1 muestra la derivatización de una proteína con PSA. Se muestra la reducción selectiva de la base de Schiff con cianoborohidruro para formar un enlace covalente irreversible estable con el grupo amino N-terminal.

La disolución ácida acuosa es el medio de reacción en el que se realiza la reacción de derivatización. Esta puede ser una disolución tampón, por ejemplo, acetato de sodio. El medio de reacción tiene una base acuosa.

30 El método según el primer aspecto de esta invención requiere que la etapa de purificación, la etapa (ii), se realice a un pH mayor que la etapa de derivatización, la etapa (i). Preferiblemente, la etapa de purificación se realiza a un pH sustancialmente neutro. Si la purificación se realiza al mismo pH que la etapa de derivatización, que es ácido, es probable que el polisacárido sufra una degradación. En la etapa (i) del método, el pH de la disolución ácida acuosa está en el intervalo de 3,0-6,5, preferiblemente en el intervalo de 4,0-6,0. El pH de la disolución empleada en la etapa (ii) del método es menos ácido que el pH de la disolución en la primera etapa, y está en el intervalo de 6,5-9,5, preferiblemente de 6,5-8,5, más preferiblemente de 6,5-8,0.

35 En una realización de esta invención, el polisacárido se activa antes de la reacción con la proteína o el péptido para producir un derivado activado. Generalmente, el derivado activado de un polisacárido tiene un grupo aldehído reactivo, y la etapa (i) se realiza bajo condiciones reductoras. Puede utilizarse borohidruro para proporcionar las condiciones reductoras. El N-terminal de la proteína reacciona con el grupo aldehído reactivo para producir un aducto que, cuando se reduce, produce el derivado N-terminal de una proteína o un péptido.

El aldehído reactivo puede producirse mediante la oxidación selectiva del polisacárido utilizando peryodato.

45 La activación de los polisacáridos debe realizarse preferiblemente bajo condiciones que provoquen que no exista sustancialmente una ruptura intercatenaria del esqueleto de un material de partida de cadena larga (polimérico), es decir, que no se produzca sustancialmente una reducción en el peso molecular. La etapa de activación generalmente consistirá en proporcionar un resto aldehído en el terminal del polisacárido. Pueden utilizarse enzimas que sean capaces de realizar esta etapa. De modo más conveniente, la oxidación es una oxidación química. La reacción puede realizarse con reactivos inmovilizados, tales como perrutenato con una base de polímero. El método más sencillo se realiza con reactivos disueltos. El oxidante es, de forma adecuada, perrutenato, o preferiblemente peryodato. La oxidación puede realizarse con peryodato a una concentración en el intervalo de 1 mM a 1 M, a un pH en el intervalo de 3 a 10, a una temperatura en el intervalo de 0 a 60°C y durante un tiempo en el intervalo de 1 min a 48 horas.

50 Las condiciones de reducción adecuadas para la reacción de derivatización pueden utilizar hidrógeno con catalizadores o, preferiblemente, hidruros, tales como borohidruros. Estos pueden estar inmovilizados, tales como los borohidruros sobre un soporte de Amberlite (marca comercial). Preferiblemente se emplean hidruros de metal alcalino, tal como borohidruro de sodio, como agente reductor, a una concentración en el intervalo de 1 μM a 0,1 M, a un pH en el intervalo de 5,0 a 10, a una temperatura en el intervalo de 0 a 6°C, y durante un periodo de 1 min a 48

horas. Las condiciones de reacción se seleccionan de modo que los grupos carboxilo colgantes en el material de partida no se reduzcan. Otros agentes reductores adecuadas son cianoborohidruro bajo condiciones ácida, por ejemplo, cianoborohidruro sobre un soporte polimérico o cianoborohidruro de metal alcalino, ácido L-ascórbico, metabisulfito de sodio, L-selectrida, triacetoxiborohidruro, etc.

- 5 Otros derivados activados de polisacáridos pueden tener utilidad en la presente invención, incluyendo los que tienen grupos funcionales colgantes, tales como NHS, según se describió en la anterior solicitud de patente de los inventores WO 2006/090119.

10 El polisacárido es un ácido polisiálico (PSA). Sin embargo, en la invención se prefiere que el material de partida de polisacárido pueda comprender unidades distintas del ácido siálico en la molécula. Por ejemplo, las unidades de ácido siálico pueden alternar con otras unidades de sacárido. Sin embargo, preferiblemente el polisacárido consiste sustancialmente solo en unidades de ácido siálico. Preferiblemente, estas están unidas 2→8 y/o 2→9.

Preferiblemente, el material de partida de polisacárido tiene al menos 2, más preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10, por ejemplo al menos 50 unidades de sacárido. Por ejemplo, un polisacárido puede comprender al menos 5 unidades de ácido siálico.

- 15 El ácido polisiálico puede derivarse de cualquier fuente, preferiblemente una fuente natural, tal como una fuente bacteriana, por ejemplo *E. coli* K1 o K92, meningococos del grupo B, o incluso leche de vaca o N-CAM. El polímero de ácido siálico puede ser un polímero heteropolimérico, tal como el grupo 135 o el grupo V de *N. meningitidis*.

El ácido polisiálico puede estar en forma de una sal o del ácido libre. Puede estar en forma hidrolizada, de modo que el peso molecular se haya reducido después de la recuperación de una fuente bacteriana.

- 20 El polisacárido, preferiblemente ácido polisiálico, puede ser un material con una amplia gama de pesos moleculares, tal como un material que tenga una polidispersión mayor que 1,3, por ejemplo tan alta como 2 o mayor. Preferiblemente, la polidispersión del peso molecular es menor que 1,3 o 1,2, más preferiblemente menor que 1,1, por ejemplo tan baja como 1,01.

25 La purificación del derivado N-terminal en la etapa (ii) del método del primer aspecto de la presente invención puede realizarse utilizando una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de métodos de purificación adecuados incluyen HIC (cromatografía de interacción hidrófoba), SEC (cromatografía de exclusión molecular), HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y AEX (cromatografía de intercambio aniónico).

30 En el método de la presente invención, el aldehído reactivo está preferiblemente en el extremo no reductor del polisacárido. Sin embargo, el aldehído reactivo también puede proporcionarse en el extremo reductor del polisacárido. La química adecuada para preparar un polisacárido con un aldehído reactivo en el terminal reductor de un polisacárido se describe en la solicitud anterior de los inventores WO 05/016974. El proceso implica una etapa de oxidación selectiva preliminar, seguida de una reducción y después otra oxidación para producir un compuesto con un aldehído en el terminal reductor y un extremo no reductor pasivizado.

35 La presente invención tiene una utilidad particular para la producción de derivados de proteínas terapéuticas. La proteína puede ser, por ejemplo, obestatina, leptina, interferón, FSH, galactosidasa o ADNasa.

Pueden estar presentes aditivos de la formulación en la disolución acuosa en cualquiera o ambas etapas (i) y (ii) del método según el primer aspecto de la invención.

40 Un aditivo de la formulación significa un excipiente que es capaz de estabilizar la proteína o el péptido de modo interno o externo, según se describe en Wang *et al.* (1999). El excipiente puede ser un estabilizante, un solubilizante o un ion metálico. Los ejemplos adecuados de aditivos de la formulación incluyen uno o más tampones, estabilizantes, tensioactivos, sales, polímeros, iones metálicos, azúcares, polioles o aminoácidos. Estos pueden utilizarse solos o en combinación.

45 Los estabilizantes generalmente actúan a través de la desestabilización del estado desnaturalizado de una proteína que conduce a un aumento en el cambio de energía libre de Gibbs para desplegar la proteína. El estabilizante es preferiblemente un azúcar o un poliol, por ejemplo, sacarosa, sorbitol, trehalosa, glicerol, manitol, lactosa y etilenglicol. Un tampón estabilizante es el fosfato de sodio.

El solubilizante es preferiblemente un tensioactivo, preferiblemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos adecuados incluyen Tween 80, Tween 20, Tween 40, Pluoronic F68, Brij 35 y Triton X100.

50 El ion metálico es preferiblemente divalente. Los iones metálicos adecuados incluyen Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} .

El aditivo de la formulación también puede ser un polímero seleccionado de PSA, PEG o hidroxi-beta-ciclodextrina. Los aminoácidos y derivados de aminoácidos adecuados para su uso como aditivo de la formulación incluyen histidina, glicina, otros aminoácidos similares, y aspartato de sodio.

Una población de ácidos polisiálicos que tiene una amplia distribución de peso molecular puede fraccionarse en fracciones con polidispersiones menores, es decir, en fracciones con diferentes pesos moleculares ponderados. El fraccionamiento se realiza preferiblemente mediante una cromatografía de intercambio aniónico, empleando para la elución un tampón básico adecuado, según se describió en las anteriores solicitudes de patente de los inventores WO 2005/016794 y WO 2006/016161. El método de fraccionamiento es adecuado para un material de partida de ácido polisiálico, así como para los derivados. Así, la técnica puede aplicarse antes o después de las etapas del proceso fundamentales de esta invención. Preferiblemente, el derivado de ácido polisiálico resultante tiene una polidispersión menor que 1,1.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una población de derivados de ácido polisiálico de una proteína, en la que los derivados comprenden entre 2 y 200 unidades de ácido siálico, y en la que la población consiste sustancialmente solo en derivados N-terminales de la proteína.

Una población significa que no existe más de un derivado polisiálico en la composición. Los derivados pueden comprender el mismo número o un número diferente de unidades de ácido siálico. Preferiblemente, la polidispersión del ácido polisiálico en la composición es menor que 1,3, más preferiblemente menor que 1,1.

En la población, sustancialmente todas las proteínas están derivatizadas solo en el N-terminal. Esto significa que al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95% de la proteína en la población está derivatizada con PSA solo en la amina N-terminal. El grado de derivatización en el N-terminal puede medirse empleando técnicas muy conocidas en la técnica, tal como el cartografiado de péptidos y la degradación de Edman.

La proteína puede ser cualquier proteína que tenga un uso terapéutico, por ejemplo, obestatina, leptina, interferón, FSH, galactosidasa o ADNasa.

Cuando la proteína es FSH, los derivados comprenden generalmente 75-200 unidades de ácido siálico.

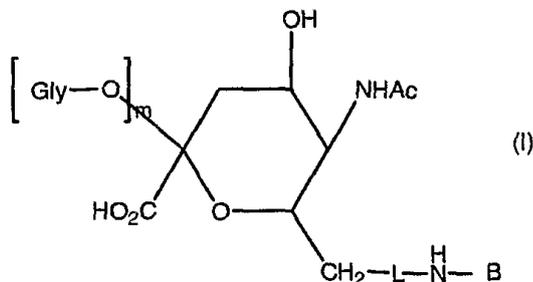
Cuando la proteína es alfa-galactosidasa, los derivados comprenden generalmente 20-150 unidades de ácido siálico.

Cuando la proteína es ADNasa, los derivados comprenden generalmente 2-120 unidades de ácido siálico.

Cuando la proteína es IFN, los derivados comprenden generalmente 80-180 unidades de ácido siálico. Los ácidos polisiálicos preferidos son como detalló anteriormente para los otros aspectos de esta invención.

El ácido polisiálico puede estar unido a una proteína directamente, es decir, tal como se muestra en la figura 1, o a través de un conector. Los conectores adecuados se derivan de reactivos que contienen grupos funcionales N-maleimida, vinilsulfona, N-yodoacetamida, ortopiridilo o N-hidroxisuccinimida. El conector también puede ser bioestable o biodegradable, y puede comprender, por ejemplo, un polipéptido o un oligómero sintético. El conector puede derivarse de un reactivo que contiene un grupo bifuncional, tal como se describe más a fondo en el documento WO 2005/016973. Un reactivo bifuncional adecuado es, por ejemplo, Bis-NHS. El reactivo puede tener la fórmula general Z-R¹-Z, en la que cada Z es un grupo funcional que puede ser igual o diferente, y R¹ es un radical orgánico bifuncional. Preferiblemente, R¹ se selecciona del grupo que consiste en alcandiilo, arileno, alcarileno, heteroarileno y alquilheteroarileno, cualquiera de los cuales puede estar sustituido y/o interrumpido con enlaces carbonilo, éster, sulfuro, éter, amida y/o amina. Se prefiere particularmente alcandiilo C₃-C₆. Lo más preferiblemente, R¹ se corresponde con la porción apropiada del reactivo bifuncional adecuado.

Los derivados de ácido polisiálico pueden tener la fórmula general (I)



en la que m es al menos uno;

HNB se deriva de B-NH₂, que es la amina N-terminal de la proteína;

L es un enlace, un grupo conector, o comprende un polipéptido o un oligómero sintético;

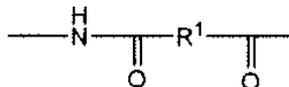
GlyO es una unidad de ácido siálico;

en la que el grupo conector, si está presente, tiene la fórmula general -Y-C(O)-R¹-C(O)-, en la que Y es NR² o NR²-

NR^2 , y R^1 es un radical orgánico difuncional, según se describió anteriormente; y R^2 es H o alquilo C_{1-6} .

En este aspecto de la invención, la proteína está unida al extremo no reductor del polisacárido.

5 Cuando la proteína está unida directamente al polisacárido, el grupo L es un enlace. Sin embargo, el grupo L puede derivarse, como alternativa, de un reactivo que contiene N-maleimida, vinilsulfona, N-yodoacetamida, ortopiridilo o N-hidroxisuccinimida. El reactivo puede tener la fórmula general $\text{Z-R}^1\text{-Z}$, según se definió anteriormente. En esta realización, L es generalmente un grupo



10 Las composiciones que comprenden los derivados de ácido siálico y un diluyente, así como las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos nuevos que tienen actividad biológica, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, también forman parte de la invención. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica, tópica o intratraqueal para un uso humano o veterinario.

Las composiciones pueden comprender además un aditivo de la formulación, tal como se detalló anteriormente.

15 Un aspecto final de la descripción es un derivado N-terminal de una proteína o un péptido que puede obtenerse mediante un método según el primer aspecto de esta invención. Cualquiera de las características preferidas de los derivados analizados anteriormente también es aplicable a este aspecto de la invención.

20 La derivatización de proteínas y péptidos, etc., puede producir una mayor semivida, una mejor estabilidad, una menor inmunogenicidad y/o control de la solubilidad y, por tanto, de la biodisponibilidad y las propiedades farmacocinéticas, o puede aumentar la solubilidad de sustancias activas o la viscosidad de disoluciones que contengan la sustancia activa derivatizada. Los nuevos métodos tienen un valor concreto para la creación de conjugados de proteínas monopolisialiladas. Se basan en la comprensión de que, a unos pH menores, los grupos amina N-terminales están más protonados y, por tanto, son muy reactivos.

La invención se ilustra con los ejemplos 1-10 y haciendo referencia a los siguientes dibujos:

25 la figura 1a es un esquema de reacción que muestra la activación de la técnica anterior de la unidad terminal de ácido siálico no reductora;

la figura 1b es un esquema de reacción que muestra la aminación reductora de la técnica anterior del resto aldehído del producto del esquema de reacción 1 empleando un resto amina-proteína;

la figura 2.1 es un esquema de reacción que muestra la derivatización N-terminal de proteínas;

30 la figura 2.2 muestra la degradación del ácido colomínico (CA) a diferentes pH utilizando GPC de triple detección (Viscotek: RI + RALS + viscosímetro);

la figura 3.1 ilustra la caracterización de conjugados de GCSF-CA mediante SE-HPLC y SDS-PAGE;

la figura 4.1 muestra la SDS-PAGE y SE-HPLC de un conjugado de CAO-leptina de 50 kDa;

la figura 5.1 muestra la eliminación *in vivo* de formulaciones de EPO (i.v.);

la figura 5.2 muestra otra eliminación *in vivo* de formulaciones de EPO (s.c.);

35 la figura 5.3 es la caracterización de conjugados de EPO-CA mediante SE-HPLC y SDS-PAGE;

la figura 6.1 ilustra la eliminación *in vivo* de EPO no glicosilada frente a EPO no glicosilada polisialilada (n = 3-4 +/-; s.c.);

la figura 6.2 ilustra otra eliminación *in vivo* de EPO no glicosilada frente a EPO polisialilada (i.v.; n = 3-4 +/- MEE);

la figura 6.3 es la caracterización de conjugados de NGEPO-CA mediante SE-HPLC y SDS-PAGE;

40 la figura 7.1 es la caracterización de conjugados de CA-insulina mediante SDS-PAGE (gel de Tris-glicina (al 4-20%));

la figura 7.2 es la caracterización de conjugados de CAO-insulina purificados mediante SE-HPLC;

la figura 7.3 muestra la eficacia *in vivo* de formulaciones de CAO-insulina (0,3 U s.c.; n = 4) en ratones hembra no endogámicos; -25 gramos;

la figura 8.1 muestra el SE-HPLC de la polisialilación de interferón-alfa 2b (mezcla de reacción de CA 39 kDa después de 24 horas);

la figura 8.2 muestra la eliminación *in vivo* de interferón polisialilado (i.v.; n = 4 +/- MEE);

la figura 9 es una SDS-PAGE de conjugados de obestatina;

5 la figura 10.1 muestra una SDS-PAGE de los conjugados del ejemplo 10.4;

la figura 10.2 es una SE-HPLC de los conjugados del ejemplo 10.5; y

la figura 10.3 es una gráfica que muestra la actividad ADNasa I frente a la concentración de cloruro de calcio.

Ejemplos

Materiales

10 El carbonato de amonio, el etilenglicol, el polietilenglicol (8 KDa), el cianoborohidruro de sodio (>98% puro), el metaperyodato de sodio y los marcadores de peso molecular se obtuvieron en Sigma Chemical Laboratory, Reino Unido. El ácido colomínico utilizado, los ácidos polisialílicos lineales α -(2→8)-enlazados de *E. coli* K1 (promedio 22,7 kDa, alta polidispersión 1,34, 39 kDa p.d. 1,4; 11 kDa, p.d. 1,27) se obtuvieron en Camida, Irlanda, el yoduro radiactivo (Na^{125}I) se obtuvo en Amersham, Reino Unido. Otros materiales incluyen 2,4-dinitrofenilhidrazina (Aldrich Chemical Company, Reino Unido), tubos de diálisis (límites de exclusión de 3,5 KDa y 10 KDa; Medicell International Limited, Reino Unido), columnas Sepharose SP HiTrap, PD-10 (Farmacia, Reino Unido), geles de poli(acrilamida y Tris-glicina (al 4-20% y al 16%), tampón de carga y tampón de ensayo de dodecilsulfato de sodio y Tris-glicina (Novex, Reino Unido). El agua desionizada se obtuvo de una unidad de purificación de agua Elgastat Option 4 (Elga Limited, Reino Unido). Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica. Se empleó un lector de placas (Dyrex Technologies, Reino Unido) para las determinaciones espectrofotométricas en ensayos de proteínas o de CA. Los ratones B6D2F1 (7-8 semanas de edad; 20 g de peso corporal) se adquirieron en Harlan, Reino Unido, y se aclimataron durante el menos una semana antes de su uso.

25 Sulfato de amonio, GCSF (SII, India), sorbitol, Tween 20, Q FF [columna de 1 ml o 5 ml; Amersham Biosciences, Reino Unido], cloruro de sodio, fosfato de sodio, columna Hitrap Butyl HP [de 1 o 5 ml; Amersham Biosciences, Reino Unido], leptina de ratón recombinante (Biomyx), eritropoyetina (EPO) y EPO no glicosilada (NGEPO) (p.m. 30600; SILL, India), Tris [Sigma, Reino Unido], acetato de sodio [BDH, UK], fosfato de sodio [BDH, UK], insulina (Sigma, Reino Unido).

1. Determinación de proteínas y ácido colomínico

30 El cálculo cuantitativo de los ácidos polisialílicos (como ácido siálico) con el reactivo resorcinol se realizó con el método del resorcinol [Svennerholm, 1957] según se ha descrito [Gregoriadis *et al.*, 1993; Fernández y Gregoriadis, 1996, 1997]. La proteína se midió mediante el método colorimétrico de BCA o la absorbancia UV a 280 nm.

2.1 Activación del ácido colomínico

35 Una disolución recién preparada de metaperyodato de sodio 0,02 M (NaIO_4) (un exceso molar en 8 veces) se mezcló con CA a 20°C y la mezcla de reacción se agitó magnéticamente durante 15 min en la oscuridad. Entonces se añadió un volumen en dos veces de etilenglicol a la mezcla de reacción para gastar el exceso de NaIO_4 y la mezcla se dejó en agitación a 20°C durante 30 min más. El ácido colomínico oxidado se dializó (tubo de diálisis de límite de exclusión molecular de 3,5 KDa) a fondo (24 h) frente a tampón carbonato de amonio al 0,01% (pH 7,4) a 4°C. Se empleó una ultrafiltración (con un límite de exclusión molecular de 3,5 kDa) para concentrar la disolución de CAO del tubo de diálisis. Después de la concentración hasta el volumen requerido, el filtrado se liofilizó y se conservó a -40°C hasta su posterior uso. Como alternativa, el CA se recuperó de la mezcla de reacción mediante precipitación (dos veces) con etanol.

2.2 Determinación del estado de oxidación de CA y derivados

45 El cálculo cualitativo del grado de oxidación del ácido colomínico se realizó con 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), que produce 2,4-dinitrofenilhidrazonas muy poco solubles tras la interacción con compuestos de carbonilo. Se añadió compuesto no oxidado (CA)/oxidado (CAO) al reactivo de 2,4-DNPH (1,0 ml), las disoluciones se agitaron y después se dejaron en reposo a 37°C hasta que se observó un precipitado cristalino [Shriner *et al.*, 1980]. El grado (cuantitativo) de oxidación de CA se midió con un método [Park y Johnson, 1949] basado en la reducción de iones ferricianuro en una disolución alcalina a ferrocianuro férrico (azul de Persia), que después se mide a 630 nm. En este caso, se empleó glucosa como patrón.

50 2.3 Cromatografía de permeación en gel

Se disolvieron muestras de ácido colomínico (CA, y CAO) en NaNO_3 (0,2 M), CH_3CN (al 10%; 5 mg/ml) y se cromatografiaron en 2x columnas GMPW_{XL} con detección mediante el índice refractivo (sistema GPC: bomba de

disolvente VE1121 GPC, detector VE3580 RI y cotejo con el programa Trisec 3 software Viscotek Europe Ltd. Las muestras (5 mg/ml) se filtraron a través de una membrana de nailon de 0,45 µm y se ensayaron a 0,7 cm/min con NaNO₃ 0,2 M y CH₃CN (al 10%) como fase móvil.

Resultados

5 El ácido colomínico (CA), un ácido polisialílico, es un homopolímero lineal alfa-2,8-enlazado de restos de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) (figura 1a). La exposición del ácido colomínico a la oxidación [Lifely et. al., 1981] se realizó durante 15 min empleando peryodato 20 mM a temperatura ambiente. Se analizó la integridad de los restos Neu5Ac internos alfa-2,8-enlazados después del tratamiento con peryodato mediante una cromatografía de permeación en gel, y los cromatogramas obtenidos para el material oxidado (CAO) se compararon con el del CA nativo. Se descubrió que el CA oxidado y el nativo muestran unos perfiles de elución casi idénticos, y no se obtuvieron pruebas de que la sucesiva etapa de oxidación produjese una fragmentación significativa de la cadena polimérica.

15 La medición cuantitativa del estado de oxidación del CA se realizó mediante una reducción del ion ferricianuro en una disolución alcalina a ferrocianuro (azul de Prusia) [Park y Johnson, 1949] empleando glucosa como patrón. La tabla 1 demuestra que el ácido colomínico oxidado presenta una cantidad mayor que una cantidad estequiométrica (>100%) del agente reductor, es decir, 112% molar de contenido en aldehído aparente, que comprende el poder reductor combinado del extremo hemicetal reductor y el aldehído introducido (en el otro extremo).

Tabla 1 - Grado de oxidación de diversos intermedios del ácido colomínico en el esquema de reacción de oxidación doble utilizando la glucosa como patrón (100%, 1 mol de aldehído por mol de glucosa; n = 3 ± d.e.)

Especie de CA	Grado de oxidación
ácido colomínico (CA)	16,1 ± 0,63
ácido colomínico oxidado (CAO)	112,03 ± 4,97
ácido colomínico reducido (CAOR)	0; no detectable
ácido colomínico oxidado reducido oxidado (CAORO)	95,47 ± 7,11

20 3. Preparación de conjugados de CA-proteína N-terminales con aditivos de la formulación

3.1 Preparación de conjugados de GCSF-CA

25 El G-CSF (18,8 kDa) se suministró como una disolución (1,05 mg/ml en tampón acetato de sodio 10 mM, pH 4,0, que contenía sorbitol al 5%, polisorbato 80 0,025 mg/ml) y se conservó a 2-8°C. La cantidad requerida de GCSF se introdujo en un tubo Eppendorf y se colocó en hielo. La cantidad de CA (por ejemplo, un exceso molar de CA 11 oxidado o no oxidado frente a la proteína) que se va añadir para la conjugación se calcula basándose en la fórmula:

$$\text{Peso de CA} = \frac{\text{Calidad de proteína (g)}}{(\text{PM de proteína})} \times (\text{PM de CA}) \times (\text{exceso molar de CA})$$

30 La cantidad requerida de CA se pesó. El CA se solubilizó en NaOAc 10 mM, sorbitol al 5%, pH 5,5 (en este caso se empleó 20% de volumen del volumen final de la reacción), la mezcla se agitó suavemente en vórtice hasta que todo el CA se hubo disuelto, y después se filtró hacia un nuevo tubo Eppendorf o se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo Eppendorf para eliminar cualquier material agregado/precipitado. Se añadió el volumen requerido de disolución madre de Tween 20 10 mg/ml para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml de Tween 20 en la mezcla de reacción final. Se añadió la cantidad requerida de la disolución de proteínas de G-CSF a la disolución de CA para obtener un exceso molar de 11 (para 40 kDa) de CA y se mezcló suavemente manteniendo la mezcla de reacción en un agitador suave a 4 ± 1°C. Se añadió una disolución de NaCNBH₃ 100 mg/ml para obtener 50 mM o 3,17 mg/ml en la mezcla de reacción final, se mezcló suavemente, y se comprobó el pH de la mezcla de reacción final, y si fue necesario se ajustó el pH a 5,5 con NaOH 1 M/HCl a 4 ± 1°C. Por último, se ajustó el volumen de la reacción empleando NaOAc 10 mM, sorbitol al 5%, pH 5,5, para obtener una concentración de proteínas de 0,67 mg/ml en la mezcla de reacción. El tubo se selló y se agitó a la temperatura deseada (4 ± 1°C) durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante un método apropiado y se tomaron muestras para el ensayo de actividad in vitro en una célula MNFS 60, SDS-PAGE (empleando un gel de Tris-glicina al 4-20%), SE-HPLC (columna Superose 6) y se comprobó el pH de la mezcla de reacción. Para eliminar cualquier precipitado, la mezcla de reacción se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min antes del análisis de SE-HPLC y la purificación; el tampón preferido para SE-HPLC es Na fosfato 0,1 M (pH 6,9).

3.2 Purificación y caracterización de conjugados de GCSF-CA

45 El resto de la muestra de la mezcla de reacción se diluyó con tampón A de AEX (acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 50 mM, pH 5,0) (1,5 ml de mezcla de reacción + 9 ml de tampón A). El pH se comprobó y se ajustó si fue

necesario a pH 5,0, se cargó sobre la columna AEX previamente equilibrada con tampón A de AEX. Las fracciones de carga se recolectaron y se etiquetaron. La columna se lavó con tampón A de AEX (al menos 5 volúmenes de columna), las fracciones se recogieron (cada fracción de 1,5 de volumen de columna) y se etiquetaron. El producto se eluye con el tampón B de AEX (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 0,65 M, pH 7,0), las fracciones se recogieron (cada fracción de 1 de volumen de columna; 6 columnas) y se etiquetaron. Si dos fracciones consecutivas no contenían proteínas (UV 280 nm), se sigue hasta la siguiente etapa. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación. Se analiza la concentración de proteínas mediante UV (280 nm) (la absorbancia de 1 mg/ml de G-CSF es de aproximadamente 0,872). Se tomaron muestras para SDS-PAGE y SE-HPLC. Para eliminar el CA libre de la mezcla se empleó HIC. Las muestras se concentraron si fue necesario.

Las fracciones de AEX que contenían el conjugado se reunieron y se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para obtener una concentración de 2,75 M en la disolución de carga. Esta disolución después se cargó sobre la columna HIC previamente equilibrada con tampón A de HIC (fosfato de sodio 10 mM, sulfato de amonio 2,75 M, pH 6,5). Las fracciones de carga se recogieron (cada fracción de 1,5 de volumen de columna) y se etiquetaron. La columna se lava con tampón A de HIC (al menos 5 volúmenes de columna; velocidad = 0,5 ml/min); las fracciones (1,5 volúmenes de columna) se recogieron y se etiquetaron. El producto se eluye con el tampón B de HIC (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4) (velocidad = 5 ml/min); las fracciones se recogieron (fracciones de 1 volumen de columna; 6 volúmenes de columna) y se etiquetaron. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación. Se analiza la concentración de proteínas mediante UV (280 nm). Las fracciones de HIC que contenían el conjugado purificado se reunieron y se ajustó la composición del conjugado en la disolución con una disolución de sorbitol al 50% y una disolución de Tween 20 10 mg/ml para obtener una composición final de sorbitol al 5% y Tween 20 0,025 mg/ml. Después la disolución se concentró a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ y la concentración de proteínas se analizó mediante UV (280 nm). Puede realizarse una mayor purificación mediante SE-HPLC (por ejemplo, para separar los conjugados de la proteína libre/agregados, etc.). El conjugado se esterilizó mediante filtración y se tomaron muestras para el ensayo de actividad y para la caracterización mediante SDS-PAGE y SE-HPLC. Si es necesario se retira una parte alícuota para el ensayo de proteínas y el ensayo de CA. Se conserva el resto a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta su uso posterior y se estudia la estabilidad física mediante SE-HPLC.

Se estudiaron los efectos de diversos procesos que afectan a la estabilidad de GCSF en disolución y el grado de derivatización.

Resultados

El procedimiento para preparar y purificar conjugados de ácido colomínico (CA) (en una escala de 20 mg) del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) de una manera selectiva para el N-terminal realizando la reacción a un pH reducido (pH 5,5) y a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ se detalló anteriormente. Esto implica la conjugación en presencia de cianoborohidruro de sodio, seguido de una purificación empleando una cromatografía de intercambio iónico (AEX) para eliminar el G-CSF libre, seguido de la eliminación del CA mediante una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Se empleó un pH bajo para favorecer la derivatización selectiva del grupo alfa-amino del N-terminal, y también para minimizar la agregación de GCSF durante la reacción. La composición del tampón de reacción final fue de sorbitol al 5%, Tween 20 0,5 mg/ml en NaOAc 10 mM a pH 5,5.

La formación de los conjugados de GCSF-CA se confirmó mediante SE-HPLC (cambio en los tiempos de retención de GCSF-CS comparado con GCSF; también coelución de ambos restos), una cromatografía de intercambio iónico (unión de los conjugados a la columna AEC) y una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; desplazamiento de las bandas con especies de alto peso molecular). Los conjugados utilizados en el ensayo de la línea celular in vitro (en células MNFS-60) fueron aproximadamente 40% activos comparados con la proteína nativa. Los conjugados preparados sin aditivos de la formulación condujeron a la agregación de las proteínas con un bajo grado de derivatización. La figura 3.1, parte izquierda, muestra los datos de SE-HPLC para una mezcla de reacción de GCSF-CA 39 kDa después de 24 horas, preparada en presencia de Tween 20. Las condiciones de la caracterización fueron Superdex 200, bicarbonato de amonio 0,15 M, pH 7,8. La tabla 2 muestra el análisis de los picos:

Tabla 2

Pico	TR	% de área	Especie
1	31,683	8,80	agregados
2	42,683	11,77	(CA)2-GCSF
3	49,058	68,55	CA-GCSF
4	68,833	10,89	GCSF

La parte derecha de la figura 3.1 muestra los resultados de SDS-PAGE.

4.1 Preparación de conjugados de CA-leptina N-terminales con aditivos de la formulación

La leptina se suministró como un polvo liofilizado (p.m. 16.240) y se conservó a -80°C . Se calculó la cantidad de ácido colomínico (por ejemplo, ácido colomínico oxidado o no oxidado; 7,5 de exceso molar) para ser añadido a la conjugación. El ácido colomínico se disolvió en una cantidad mínima de tampón acetato de sodio, se filtró y el pH se ajustó a 5,5. La disolución de ácido colomínico se añadió a la disolución de leptina (proteína en acetato de sodio 20 mM, sacarosa al 1%, ácido L-glutámico 10 mM y Tween 20 al 0,01%, pH 5,5), seguido de la adición de los microlitros requeridos de NaCNBH_3 para obtener 50 mM o 3,17 mg/ml en la mezcla de reacción, se mezcló suavemente y se comprobó el pH de la mezcla de reacción final, y el pH se ajustó a 5,5. El tubo se selló y se agitó a la temperatura deseada ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 24 horas. Después de la incubación se tomaron las muestras necesarias (para SDS-PAGE, SE-HPLC, etc.). Se analiza la concentración de proteínas mediante UV (280 nm) (la absorbancia de 1 mg/ml de leptina es de 0,878). Se estudiaron las diversas variables del proceso que afectan a la derivatización y la estabilidad de la proteína.

4.2 Purificación y caracterización de conjugados de leptina-CA

Se empleó HIC e IEC para eliminar el exceso de CA y leptina libre de la mezcla de reacción, respectivamente. Se retiró una parte alícuota para el ensayo de proteínas y el ensayo de CA. El resto se conservó a -80°C hasta su uso. El producto se caracterizó mediante SDS-PAGE, SE-HPLC, transferencia Western, ensayo de CA y de proteínas, etc.

Resultados

El procedimiento para preparar y purificar conjugados de ácido colomínico (CA) (en una escala de 5 mg) de leptina de una manera selectiva para el N-terminal realizando la reacción a un pH reducido (pH 5,5) y a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ se mostró anteriormente. Esto implica la conjugación en presencia de cianoborohidruro de sodio, seguido de una purificación empleando una cromatografía de intercambio iónico (AEX) para eliminar el G-CSF libre, seguido de la eliminación del CA mediante una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Se empleó un pH bajo y aditivos de la formulación para favorecer la derivatización selectiva del grupo alfa-amino del N-terminal, y también para minimizar la agregación de GCSF durante la reacción. La composición del tampón de reacción final fue de proteína en acetato de sodio 20 mM, sacarosa al 1%, ácido L-glutámico 10 mM y Tween 20 al 0,01%, pH 5,5).

La formación de los conjugados de leptina-CA se confirmó mediante SE-HPLC (cambio en los tiempos de retención de leptina-CA comparado con la leptina; también coelución de ambos restos), una cromatografía de intercambio iónico (unión de los conjugados a la columna AEC) y una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; desplazamiento de las bandas con especies de alto peso molecular). Los conjugados preparados sin aditivos de la formulación condujeron a la agregación de las proteínas con un bajo grado de derivatización.

La figura 4.1, parte izquierda, muestra la SDS-PAGE de conjugados de leptina-CAO 50 kDa, y la parte derecha muestra los resultados de SEHPLC.

5.1 Preparación de conjugados de CA-eritropoyetina (EPO) N-terminales (ejemplo comparativo)

La EPO se suministró como una disolución (0,34 mg/ml en tampón fosfato 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7,0; actividad específica: 110.000 U/ml, p.m. 30600) y se conservó a -32°C , la proteína se descongeló a $2-8^{\circ}\text{C}$ y la cantidad requerida se introdujo en un tubo Eppendorf de 2 ml. Se tomó la cantidad requerida de ácido colomínico, y la disolución de proteínas se añadió a CA sólido y se mezcló con suavidad. Se añadieron los microlitros de disolución de cianoborohidruro de sodio requeridos para obtener 50 mM o 3,17 mg/ml en la mezcla de reacción, se mezcló en vórtice y se comprobó el pH de la mezcla de reacción final; si es necesario se ajusta el pH a 7,4. El tubo se selló y se agitó a la temperatura deseada ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 24 horas. Después de la incubación se tomaron las muestras necesarias (por ejemplo, para el ensayo de actividad, SDS-PAGE, SE-HPLC).

5.2 Purificación y caracterización de conjugados de EPO-CA

El resto de la muestra de la mezcla de reacción se diluyó con tampón A de HIC (sulfato de amonio 1,2 M, pH 6,3) (1 ml de muestra + 4 ml de tampón A) y se cargó en la columna HIC previamente equilibrada con tampón A de HIC. Las fracciones de carga se recolectaron y se etiquetaron. La columna se lavó con tampón A de HIC (sulfato de amonio 1,2 M, pH 6,3) (al menos 10 ml) y las fracciones se recogieron y se etiquetaron. El producto se eluye con el tampón B de HIC (tampón Tris 10 mM, pH 7,0), se recoge la primera fracción (0,5 ml) y después fracciones de 0,5-1 ml, y se etiquetan. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación.

Se analiza la concentración de proteínas mediante UV (280 nm) (la absorbancia de 1 mg/ml de EPO es de aproximadamente 0,743). Se toman muestras para la SDS-PAGE. La separación de la EPO no conjugada se realizó empleando una cromatografía de intercambio aniónico (AXC) si el PM del CA era demasiado pequeño (por ejemplo, 22 kDa) para la separación del conjugado y la EPO mediante SE-HPLC. Para la AXC, las fracciones de HIC que contenían la proteína se diluyeron con el tampón A de AXC (tampón Tris 10 mM, pH 7,0) (1 ml de muestra + 5 ml de tampón A de AXC) y se cargaron en la columna AXC preequilibrada con tampón A de AXC. Las fracciones de carga se recolectaron y se etiquetaron. La columna se lavó con tampón B de AXC (acetato de sodio 20 mM, pH 3,0) (al

menos 10 ml), las fracciones se recogieron y se etiquetaron. El producto se eluye con el tampón C de AXC (tampón fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 1 M, pH 7,0), se recogió la primera fracción (0,5 ml) y después fracciones de 0,5-1 ml, y se etiquetaron. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación.

5 Puede realizarse una purificación alternativa mediante SE-HPLC (por ejemplo, para separar los conjugados de EPO si el CA utilizado tiene un peso molecular alto, por ejemplo 39 kDa). Se analiza la concentración de proteínas mediante UV (280 nm) (la absorbancia de 1 mg/ml de EPO es de aproximadamente 0,743). Se toman muestras para la SDS-PAGE.

10 Se retira una parte alícuota para el ensayo de proteínas y el ensayo de CA. El resto se conserva a -20°C hasta su uso. Los productos se caracterizaron mediante SDS-PAGE. Para determinar la actividad de las muestras de EPO para inducir la proliferación in vitro se emplearon células progenitoras de eritrocitos aisladas del bazo de un ratón que se hizo anémico artificialmente mediante una inyección intraperitoneal de fenilhidrazina. El protocolo se adaptó basándose en el método indicado por Krystal [1972]. El ensayo depende de la adición de EPO a progenitores de eritrocitos y la medición de la velocidad de replicación del ADN mediante la determinación de la velocidad de incorporación de ³H-timidina. Los estudios de farmacocinética (PK) y de farmacodinámica (PD) in vivo se realizaron en ratones B6D2F1.

Resultados

20 La formación de los conjugados de EPO-CA se confirmó mediante SE-HPLC (cambio en el tiempo de retención de EPO-CA comparado con EPO; también coelución de ambos restos), una cromatografía de intercambio iónico (unión de los conjugados a la columna AEC) y una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; desplazamiento de las bandas con especies de alto p.m.) (figura 5.3). Las muestras polisialiladas eran activas in vitro y mostraron un perfil muy superior (PK y PD) a la EPO normal. Las figuras 5.1 y 5.2 muestran los resultados in vivo.

La figura 5.3, parte izquierda, muestra los datos de SE-HPLC de una conjugación de EPO-CA 39 kDa después de 24 horas. La tabla 3 es la tabla de análisis de los picos. Condiciones de caracterización: columna Superdex 200, tampón bicarbonato de amonio 0,15 M, pH 7,8.

25 Tabla 3

Pico	TR	% de área	Especie
1	31,421	3,38	agregados
2	48,346	80,76	CA39-EPO
3	59,204	15,86	EPO

6.1 Preparación de conjugados (NGepo-CA) no glicosilados N-terminales (ejemplo comparativo)

30 La EPO desnuda se suministró como una disolución (0,18 mg/ml en tampón fosfato de sodio 20 mM, NaCl 300 mM, pH 6,65; actividad específica 100000 U/ml; p.m. 19000) y se conservó a -32°C, la proteína se descongeló a 2-8°C y la cantidad requerida se introdujo en un tubo Eppendorf de 2 ml. Se calculó la cantidad de ácido colomínico (por ejemplo, ácido colomínico oxidado o no oxidado) para ser añadido a la conjugación. Se pesó la cantidad requerida de ácido colomínico y se registró el peso. Se añadió la disolución de proteínas al CA sólido y se mezcló suavemente. Se añadieron los microlitros de disolución de cianoborohidruro de sodio requeridos para obtener 50 mM o 3,17 mg/ml en la mezcla de reacción, se mezcló en vórtice y se comprobó el pH de la mezcla de reacción final; si es necesario se ajusta el pH a 7,4. El tubo se selló y se agitó a la temperatura deseada ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 horas. Después de la incubación se tomaron las muestras necesarias (por ejemplo, para el ensayo de actividad, SDS-PAGE, SE-HPLC).

6.2 Purificación y caracterización de conjugados de NGepo-CA

40 El resto de la muestra de la mezcla de reacción se diluyó con tampón A de HIC (sulfato de amonio 1,2 M, pH 6,3) (1 ml de muestra + 4 ml de tampón A) y se cargó en la columna HIC previamente equilibrada con tampón A de HIC. Las fracciones de carga se recolectaron y se etiquetaron. La columna se lavó con tampón A de HIC (al menos 10 ml) y las fracciones se recogieron y se etiquetaron. El producto se eluye con el tampón B de HIC, se recoge la primera fracción (0,5 ml) y después fracciones de 0,5-1 ml, y se etiquetan. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación. Se analiza la concentración de proteínas mediante UV (280 nm) (la absorbancia de 1 mg/ml de nEPO es de aproximadamente 0,743). Se toman muestras para la SDS-PAGE. Las condiciones de reacción no dejaron EPO desnuda libre en la mezcla de reacción, así que no necesaria otra purificación. Si había EPO desnuda en la mezcla de reacción, las fracciones de HIC que contenían proteínas se concentran empleando Vivaspin 6 (5000 de corte de peso molecular), y la purificación puede realizarse mediante SE-HPLC. Se analiza la concentración de proteínas mediante UV (280 nm) (la absorbancia de 1 mg/ml de nEPO es de aproximadamente 0,743). Se toman muestras para la SDS-PAGE.

Se retira una parte alícuota para el ensayo de proteínas y el ensayo de CA. El resto se conserva a -20°C hasta su uso. El producto puede caracterizarse mediante SDS-PAGE.

Resultados

- 5 La formación de los conjugados de NGepo-CA se confirmó mediante SE-HPLC (cambio en el tiempo de retención de NGepo-CA comparado con NGEPO; también coelución de ambos restos), una cromatografía de intercambio iónico (unión de los conjugados a la columna AEC) y una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; desplazamiento de las bandas con especies de alto peso molecular) (figuras 6.1 a 6.3). La figura 6.3, parte izquierda, muestra la conjugación de EPO-CA 39k Da después de 24 horas. Las muestras polisialiladas eran activas in vitro y mostraron un perfil muy superior (PK y PD) a la NGepo normal.
- 10 La figura 6.3 muestra los resultados de SE-HPLC. El análisis de los picos se muestra en la siguiente tabla 4. Condiciones de caracterización: columna Superdex 200, tampón bicarbonato de amonio 0,15 M, pH 7,8.

Tabla 4

Pico	TR	% de área	Especie
1	31,863	3,41	agregados
2	33,212	6,65	agregados
3	42,667	14,72	(CA)2-EPO
4	48,571	74,49	CA-nEPO
5	68,183	0,73	nEPO

La figura 6.1 muestra los resultados de la eliminación in vivo. PSA-NGEPO muestra un perfil muy superior, comparado con NGEPO.

15 7.1 Preparación de conjugados de insulina-CA N-terminales

La insulina se disolvió en un mínimo de HCl 100 mM y después se ajustó hasta el pH requerido. Se calculó la cantidad de ácido colomínico (por ejemplo, ácido colomínico oxidado o no oxidado) para la conjugación. La cantidad requerida de ácido colomínico se pesó y se disolvió en un volumen mínimo de tampón de reacción, se añadió a la disolución de proteínas y se mezcló suavemente utilizando un mezclador de vórtice. Se añadieron los microlitros de disolución de cianoborohidruro de sodio requeridos para obtener una concentración final de 4 mg por ml de mezcla de reacción. Se emplea un estabilizante adecuado, si se requiere, en la mezcla de reacción. El tubo se selló y se agitó a la temperatura deseada (37°C; según sea apropiado) durante 48 horas. El tiempo y la temperatura pueden variar según la proteína utilizada. La proteína polisialilada se purificó mediante IEC y HIC. Se logró 100% de la conjugación de proteína-polímero después de 24 horas. Se caracterizó mediante PAGE nativo, SDS-PAGE, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, etc.

En la IEC, se purifican la insulina y los conjugados de insulina-ácido colomínico mediante una cromatografía de intercambio catiónico en una columna High Trap SP para separar la insulina polisialilada (no se une a la columna) de la insulina libre (que se retiene en la columna). Esto implica la separación del conjugado por debajo de su punto isoelectrónico de 5,2 (al menos una unidad por debajo) utilizando una resina de intercambio catiónico. La actividad de estos conjugados se determinó en ratones sanos.

7.2 Purificación y caracterización de conjugados de insulina-CA

La muestra de la mezcla de reacción se diluyó 5 veces con tampón A de AEX (acetato de sodio 0,05 M, pH 4,4), se comprobó el pH y se ajustó si fue necesario a pH 4,4, se cargó en la columna AEX (velocidad = 1 ml/min) previamente equilibrada con tampón A de AEX. Las fracciones de carga se recolectaron (cada fracción de 1,5 de volúmenes de columna) y se etiquetaron. La columna se lavó con tampón A de AEX (acetato de sodio 0,05 M, pH 4,4) (al menos 5 volúmenes de columna, velocidad = 1 ml/min), las fracciones se recogieron (cada fracción de 1,5 de volumen de columna y se etiquetaron. El producto se eluye con el tampón B de AEX (acetato de sodio 0,05 M, cloruro de sodio 1 M, pH 4,4) (velocidad = 1 ml/min), las fracciones se recogieron (cada fracción de 1 de volumen de columna; 6 columnas) y se etiquetaron. Si dos fracciones consecutivas no contenían proteínas, se sigue hasta la siguiente etapa. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación.

Las fracciones de AEX que contenían el conjugado se reunieron y se diluyeron 10 veces con tampón A de HIC (sulfato de amonio 0,8 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4), el pH se ajustó a 7,4 con una disolución de ácido clorhídrico o una disolución de hidróxido de sodio. Esta disolución después se cargó sobre la columna HIC (velocidad = 0,3 ml/min) previamente equilibrada con tampón A de HIC (sulfato de amonio 0,8 M, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4). Las fracciones de carga se recogieron (cada fracción de 1,5 de volumen de columna) y se etiquetaron. La columna se lava con tampón A de HIC (al menos 5 volúmenes de columna; velocidad = 0,5 ml/min); las

fracciones (1,5 volúmenes de columna) se recogieron y se etiquetaron. El producto se eluye con el tampón B de HIC (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4) (velocidad = 5 ml/min); las fracciones se recogieron (fracciones de 1 volumen de columna; 6 volúmenes de columna) y se etiquetaron. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación. Se analiza la concentración de proteínas mediante UV (280 nm). Las fracciones de HIC que contenían el conjugado purificado se reunieron y se concentraron a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ y se analizó la concentración de proteínas mediante UV (280 nm).

Resultados

La formación de los conjugados de insulina-CA se confirmó mediante SE-HPLC (cambio en el tiempo de retención de insulina-CA comparado con la insulina; también coelución de ambos restos), una cromatografía de intercambio iónico (unión de los conjugados a la columna CEC) y una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; desplazamiento de las bandas con especies de alto peso molecular) (figuras 7.1 a 7.2). Las muestras polisialiladas mostraron una mayor eficacia in vivo, comparado con la proteína nativa.

En la figura 7.2, las condiciones de HPLC fueron las siguientes: columna: Superose 12; tampón: fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,9); caudal: 0,25ml/min; volumen de inyección: 200 μl .

15 8.1 Preparación de conjugados de interferón-CA N-terminales

El procedimiento para preparar y purificar conjugados de ácido colomínico (CA) de IFN α 2b implica la conjugación en presencia de cianoborohidruro de sodio, seguido de una purificación mediante HIC para eliminar el ácido colomínico libre, seguido de la eliminación del IFN no conjugado mediante AXC o SE-HPLC (si es necesario) (ejemplo 1 mg escala).

20 El IFN α 2b fue suministrado como una disolución (1,75 mg/ml en tampón acetato, pH 5) y se conservó -32°C . La proteína se descongeló a $2-8^\circ\text{C}$ y la cantidad requerida se introdujo en un tubo Eppendorf de 2 ml. Si la concentración de proteína en la mezcla de reacción era menor que 1,75 mg/ml, entonces se diluyó con la cantidad requerida de PBS, pH 7,4.

25 La cantidad requerida de CA se pesó y se registró. El CA se solubilizó en el volumen mínimo de tampón de reacción, se añadió a la disolución de proteína y se mezcló suavemente empleando un mezclador de vórtice. Se añadieron los microlitros requeridos para obtener 50 mM o 3,17 mg/ml en la mezcla de reacción, se mezcló suavemente, y se comprobó el pH de la mezcla de reacción final; si es necesario se ajusta el pH a 6,0. El tubo se selló y se agitó a la temperatura deseada ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 horas. Se tomaron las muestras necesarias después del tiempo de incubación (por ejemplo, para el ensayo de actividad, SDS-PAGE, SE-HPLC).

30 8.2 Purificación y caracterización de conjugados de interferón-CA

El resto de la muestra de la mezcla de reacción se diluyó con tampón A de HIC (tampón Tris 25 mM, cloruro de sodio 3 M, pH 7,5) (1 ml de muestra + 4 ml de tampón A) y se cargó en la columna HIC previamente equilibrada con tampón A de HIC. Las fracciones de carga se recolectaron y se etiquetaron. La columna se lavó con tampón A de HIC (tampón Tris 25 mM, cloruro de sodio 3 M, pH 7,5) (al menos 10 ml), las fracciones se recogieron y se etiquetaron. La columna se eluyó con tampón B de HIC (tampón Tris 25 mM, pH 7,5), se recogió la primera fracción (0,5 ml) y después fracciones de 0,5-1 ml, y se etiquetaron. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación.

Se analiza la concentración de proteínas mediante UV (280 nm) (la absorbancia de 1 mg/ml de IFN es de aproximadamente 1). Se toman muestras para la SDS-PAGE.

40 La separación del IFN no conjugado se realizó empleando una cromatografía de intercambio aniónico (AXC) o SEHPLC. Para la AXC, las fracciones de HIC que contenían la proteína se diluyeron con el tampón A de AXC (tampón Tris 25 mM, pH 7,5) (1 ml de muestra + 5 ml de tampón A de AXC) y se cargaron en la columna AXC preequilibrada con tampón A de AXC. Las fracciones de carga se recolectaron y se etiquetaron. La columna se lavó con tampón B de AXC (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5) (al menos 10 ml), las fracciones se recogieron y se etiquetaron. El producto se eluye con el tampón C de AXC (tampón fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 1 M, pH 7), se recogió la primera fracción (0,5 ml) y después fracciones de 0,5-1 ml, y se etiquetaron. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación.

Se realiza otra purificación mediante SE-HPLC (por ejemplo, para separar los diconjugados de los monoconjugados). (figura 8.1)

50 Se analiza la concentración de proteínas mediante UV (280 nm) (la absorbancia de 1 mg/ml de IFN es de aproximadamente 1) o mediante un ensayo BCA. Se tomaron muestras para SDS-PAGE. Se retiró una parte alícuota para el ensayo de proteínas y el ensayo de CA. El producto remanente se conservó a -20°C hasta su uso. El producto se caracterizó mediante SDS-PAGE. La actividad se determinó en una línea de células Daudi.

Resultados

5 La formación de los conjugados de interferón-CA se confirmó mediante SE-HPLC (cambio en el tiempo de retención de interferón-CA comparado con el interferón; también coelución de ambos restos), una cromatografía de intercambio iónico (unión de los conjugados a la columna AEC) y una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; desplazamiento de las bandas con especies de alto peso molecular) (figuras 8.1 a 8.2). Las muestras polisialiladas eran activas in vitro y mostraron un perfil muy superior (PK) al interferón normal.

La tabla 5 muestra el análisis de los picos del SE-HPLC en la figura 8.1.

Tabla 5

Agregado	Tr	% del área
	32,1	4,3
CA-IFN (di-)	55,1	9,7
CA-IFN (mono-)	62,4	56,2
IFN libre	74,7	29,4

9.1. Polisialilación de obestatina

10 La obestatina es una hormona supresora del apetito de 2,5 kDa. Aunque está codificada por el gen de grelina, la obestatina se opone a los efectos estimulantes del apetito de la grelina. Se ha demostrado que el tratamiento con obestatina en ratas suprime la ingesta de alimentos, inhibe la contracción del yeyuno, y disminuye la ganancia de peso.

9.2 Conjugación N-terminal (específica de sitio)

15 Se disolvió un exceso en 15 molar de ácido polisialílico 14 kDa oxidado (PSA) en tampón y se ajustó el pH a 6,0. Entonces se añadió obestatina y cianoborohidruro de sodio 50 mM (concentración final), se reajustó el pH, y la mezcla de reacción se llevó al volumen requerido. Las reacciones se realizaron a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ con agitación suave durante 18 horas.

9.3 Conjugación aleatoria (comparativo)

20 Se disolvió un exceso en 10 molar de PSA 14 kDa oxidado en tampón, y el pH se ajustó a 7,4. Entonces se añadió obestatina y cianoborohidruro de sodio 50 mM (concentración final), se reajustó el pH, y la mezcla de reacción se llevó al volumen requerido. Las reacciones se realizaron a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ con agitación suave durante 18 horas.

Análisis de la conjugación

25 La conjugación se confirma mediante una disminución en el tiempo de retención, que significa un mayor tamaño, en una cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular (SE-HPLC). Se inyectaron 100 μl de la reacción de conjugación en una columna SE-HPLC Superose 12 preequilibrada con fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,9, con un caudal de 0,25 ml/min. Se registra la absorbancia a 280 nm.

30 Los conjugados se visualizan mediante una disminución en la movilidad en una electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (figura 9). Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de Tris-glicina al 4-20% bajo condiciones no desnaturalizantes. Carril 1: marcadores de peso molecular; 2: obestatina; 3: reacción a pH 6,0; 4: reacción a pH 7,4.

Según se confirmó mediante SE-HPLC, los conjugados de obestatina-PSA fueron creados con éxito a pH 6,0 y pH 7,4. Los conjugados creados a pH 7,4 también se visualizan mediante SDS-PAGE.

10.1 Polisialilación de la ADNasa I

35 En pacientes con fibrosis quística (CF), la retención de secreciones purulentas viscosas en las vías respiratorias contribuye a una menor función pulmonar y a la exacerbación de las infecciones. Las secreciones pulmonares purulentas contienen concentraciones muy altas de ADN extracelular, que es liberado por leucocitos en degeneración que se acumulan en respuesta a una infección. El tratamiento de los pacientes de CF con desoxirribonucleasa I (ADNasa I) hidroliza el ADN y así reduce la viscoelasticidad del esputo. También se ha
40 propuesto para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico y para el transporte dirigido a tumores.

10.2 Conjugación N-terminal (específica de sitio)

Se disolvió un exceso en 20 molar de ácido polisialílico 26 kDa oxidado (PSA) en tampón y se ajustó el pH a 6,0. Entonces se añadió ADNasa I bovina (Samsong & Sigma) y cianoborohidruro de sodio 50 mM (concentración final),

se reajustó el pH, y la mezcla de reacción se llevó al volumen requerido. Las reacciones se realizaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ con agitación suave durante 18 horas.

10.3 Conjugación aleatoria (comparativo)

- 5 Se disolvió un exceso en 10-50 molar de PSA 14 kDa oxidado en tampón, y el pH se ajustó a 7,4. Entonces se añadió ADNasa I bovina (Samsong & Sigma) y cianoborohidruro de sodio 50 mM (concentración final), se reajustó el pH, y la mezcla de reacción se llevó al volumen requerido. Las reacciones se realizaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ con agitación suave durante 18 horas.

10.4 Análisis de la conjugación

- 10 Los conjugados se visualizan mediante una disminución en la movilidad en una electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (figura 10.1). Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de Tris-glicina al 4-20% bajo condiciones no desnaturalizantes. Carril 1: marcadores de peso molecular; 2: blanco; 3: ADNasa I; 4: ADNasa I de Sigma; 5: blanco; 6: ADNasa I con PSA no oxidado; 7: PSA oxidado con ADNasa I, reacción a pH 7,4; 8: PSA oxidado con ADNasa I, reacción a pH 6,0.

10.5 Purificación de conjugados

- 15 Los conjugados de ADNasa I-PSA se purificaron empleando una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC): matriz de fenil-Sepharose, tampón de partida con sulfato de amonio 2,0 M, elución en tampón sin sulfato de amonio. Las fracciones de elución después se aplicaron a una matriz de intercambio iónico Q-Sepharose Fast Flow, y se eluyeron con tampón que contenía cloruro de sodio. La purificación de los conjugados se confirmó mediante una cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular (SE-HPLC) (figura 10.2). Se inyectaron 100 μl de la reacción de conjugación en una columna SE-HPLC Superose 12 preequilibrada con fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,9, con un caudal de 0,25 ml/min. Se registra la absorbancia a 280 nm.
- 20

Los conjugados de ADNasa I-PSA muestran un menor tiempo de retención en una columna de exclusión molecular, comparado con la ADNasa I sola.

10.6 Purificación de ADNasa I activa

- 25 La ADNasa I activa se purificó a partir de una mezcla de ADNasa I activa e inactivada por calor mediante una cromatografía de heparina-Sepharose. La mezcla de ADNasa I se aplicó a la columna en un tampón con bajo contenido en sales, y se eluyó con un gradiente creciente de cloruro de sodio. La actividad por mg de la ADNasa I en la fracción A12 fue aproximadamente 4 veces mayor que la de la muestra.

10.7 Actividad de los conjugados

- 30 Se midió la actividad de los conjugados y se comparó con la de la ADNasa I no conjugada empleando el ensayo de verde de metilo (Sinicropi et al. (1994), *Anal. Biochem.*, 222(2):351-358). Los conjugados de ADNasa I-PSA purificados creados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ mostraron aproximadamente 10% de actividad (en tampón CaCl_2 4 mM (véase a continuación)), comparado con la ADNasa I no conjugada.

- 35 Se midió el efecto de la titulación de CaCl_2 sobre la actividad de hidrólisis del ADN de la ADNasa I y de los conjugados de ADNasa I-PSA ($n = 1$) (figura 10.3). El CaCl_2 es un aditivo de la formulación. Se dispuso el ensayo de ADNasa I de verde de metilo y se añadió más CaCl_2 . La actividad se expresa con relación a la actividad en un tampón CaCl_2 4 mM. El ensayo de ADNasa I de verde de metilo se dispuso con ADNasa I conjugada y libre, y el CaCl_2 se añade a concentraciones variables hasta una concentración máxima de 100 mM. Se descubrió que la adición de CaCl_2 aumenta la actividad de la ADNasa I conjugada más que la de la ADNasa I libre. Así, se requiere más CaCl_2 para la actividad completa de los conjugados de ADNasa I-PSA.
- 40

Conclusión

Se han creado conjugados de ADNasa I-PSA activos en presencia de cianoborohidruro de sodio. Los conjugados se han purificado a partir de ADNasa I libre y mostraron aproximadamente 10% de actividad por mg de ADNasa I, comparado con la de la ADNasa I libre.

45 Referencias

- Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1341 (1997), 26-34.
- Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., Synthesis, characterization and properties of polysialylated catalase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1293 (1996), 92-96.
- 50 Gregoriadis, G., McCormack, B., Wang, Z., Lively, R., Polysialic acids: potential in drug delivery, *FEBS Letters*, 315 (1993), 271-276.

Jain, S., Hirst, D. H., McCormack, B., Mital, M., Epenetos, A., Laing, P., Gregoriadis, G., Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1622 (2003), 42-49.

Jain, S., Hirst, D.H., Laing, P., Gregoriadis, G., Polysialylation: The natural way to improve the stability and pharmacokinetics of protein and peptide drugs, *Drug Delivery Systems and Sciences*, 4(2) (2004), 3-9.

- 5 Kinstler, O, Molineux, G., Treuheit, M., Ladd, D. y Gegg, C., Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates, *Advanced drug delivery reviews*, 54 (4), 2002, 477-485.

Lifely, R., Gilhert, A.S., Moreno, C.C., Sialic acid polysaccharide antigen of *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli*: esterification between adjacent residues, *Carbohydrate Research*, 94 (1981), 193-203.

Park, J.T., Johnson, M.J., A submicrodetermination of glucose, *Journal of Biological Chemistry*, 181 (1949), 149-151.

- 10 Shriner, R. L., Fuson, R.D.C., Curtin, D.Y., Morill, T.C., *The Systematic Identification of Organic Compounds*, 6^a ed., Wiley, Nueva York, 1980.

Svennerholm, L., Quantitative estimation of sialic acid II: A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method, *Biochemica et Biophysica Acta*, 24 (1957), 604-611.

- 15 Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquidprotein pharmaceuticals, *International Journal of Pharmaceutics*, 185 (1999), 129-188.

Krystal, *Exp. Hematol.*, 1983, 11(7), 649-660.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para producir un derivado N-terminal purificado de una proteína o un péptido, en el que (i) un polisacárido activado que es un ácido polisialílico se hace reaccionar en el grupo amina del N-terminal de una proteína o un péptido en una disolución ácida acuosa a un pH en el intervalo de 3 a 6,5 para producir un derivado N-terminal, y (ii) el derivado N-terminal resultante se purifica en una disolución acuosa con un pH mayor que en la etapa (i) y que está en el intervalo de 6,5 a 9,5.
- 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que el polisacárido activado tiene un grupo aldehído, y la etapa (i) se realiza bajo condiciones reductoras.
- 10 3.- Un método según la reivindicación 2, en el que el grupo aldehído reactivo está en el extremo no reductor del polisacárido.
- 4.- Un método según la reivindicación 1, en el que el polisacárido activado comprende una unidad de ácido siálico, o un resto derivado de una unidad de ácido siálico, en su extremo no reductor y/o reductor.
- 5.- Un método según la reivindicación 1, en el que el ácido polisialílico consiste sustancialmente solo en unidades de ácido siálico.
- 15 6.- Un método según la reivindicación 5, en el que el polisacárido activado presenta al menos 2, preferiblemente al menos 5, o más preferiblemente al menos 10, lo más preferiblemente al menos 50 unidades de ácido siálico en la molécula.
- 7.- Un método según la reivindicación 2, en el que el aldehído reactivo está en el extremo no reductor del polisacárido, y el extremo no reductor se ha pasivizado de modo que no reaccione con el N-terminal de una proteína.
- 20 8.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pH de la disolución acuosa en la etapa (i) está en el intervalo de 4,0-6,0, y en la etapa (ii) está en el intervalo de 6,5-8,5.
- 9.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es una proteína terapéutica.
- 10.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es leptina, interferón, FSH, galactosidasa o ADNasa.
- 25 11.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se añade un aditivo de la formulación a la disolución ácida acuosa en la etapa (i), que se selecciona de uno o más tampones, estabilizantes, tensioactivos, sales, polímeros, iones metálicos, azúcares, polioles o aminoácidos.
- 12.- Un método según la reivindicación 11, en el que el aditivo de la formulación es sorbitol, trehalosa o sacarosa.
- 13.- Un método según la reivindicación 11, en el que el aditivo de la formulación es un tensioactivo no iónico.
- 30 14.- Un método según la reivindicación 11, en el que el aditivo de la formulación es un polímero seleccionado de PSA, PEG e hidroxi-beta-ciclodextrina.
- 15.- Un método según la reivindicación 11, en el que el aditivo de la formulación es un ion metálico divalente, preferiblemente Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} o Mg^{2+} .
- 35 16.- Un método según la reivindicación 11, en el que el aditivo de la formulación es un tampón, y el tampón es fosfato/acetato de sodio.
- 17.- Un método según la reivindicación 2, en el que está presente borohidruro en la disolución ácida acuosa en la etapa (i) para proporcionar las condiciones reductoras.
- 40 18.- Una composición que comprende una población de derivados de ácido polisialílico de una proteína, en la que los derivados comprenden entre 2 y 200 unidades de ácido siálico, y en la que la población comprende al menos 85% de solo derivados N-terminales de la proteína.
- 19.- Una composición según la reivindicación 18, en la que la proteína es leptina, y los derivados comprenden 100-150 unidades de ácido siálico.
- 20.- Una composición según la reivindicación 18, en la que la proteína es FSH, y los derivados comprenden 75-200 unidades de ácido siálico.
- 45 21.- Una composición según la reivindicación 18, en la que la proteína es alfa-galactosidasa, y los derivados comprenden 20-150 unidades de ácido siálico.
- 22.- Una composición según la reivindicación 18, en la que la proteína es ADNasa, y los derivados comprenden 2-120 unidades de ácido siálico.

23.- Una composición según la reivindicación 18, en la que la proteína es IFN, y los derivados comprenden 80-180 unidades de ácido siálico.

24.- Una composición según la reivindicación 18, en la que la proteína es obestatina, y los derivados comprenden 20-100 unidades de ácido siálico.

5 25.- Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 18-24, en la que el ácido polisiálico tiene una polidispersión menor que 1,3, preferiblemente menor que 1,2, lo más preferiblemente menor que 1,1.

26.- Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 18-25, que es una composición farmacéutica y que comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

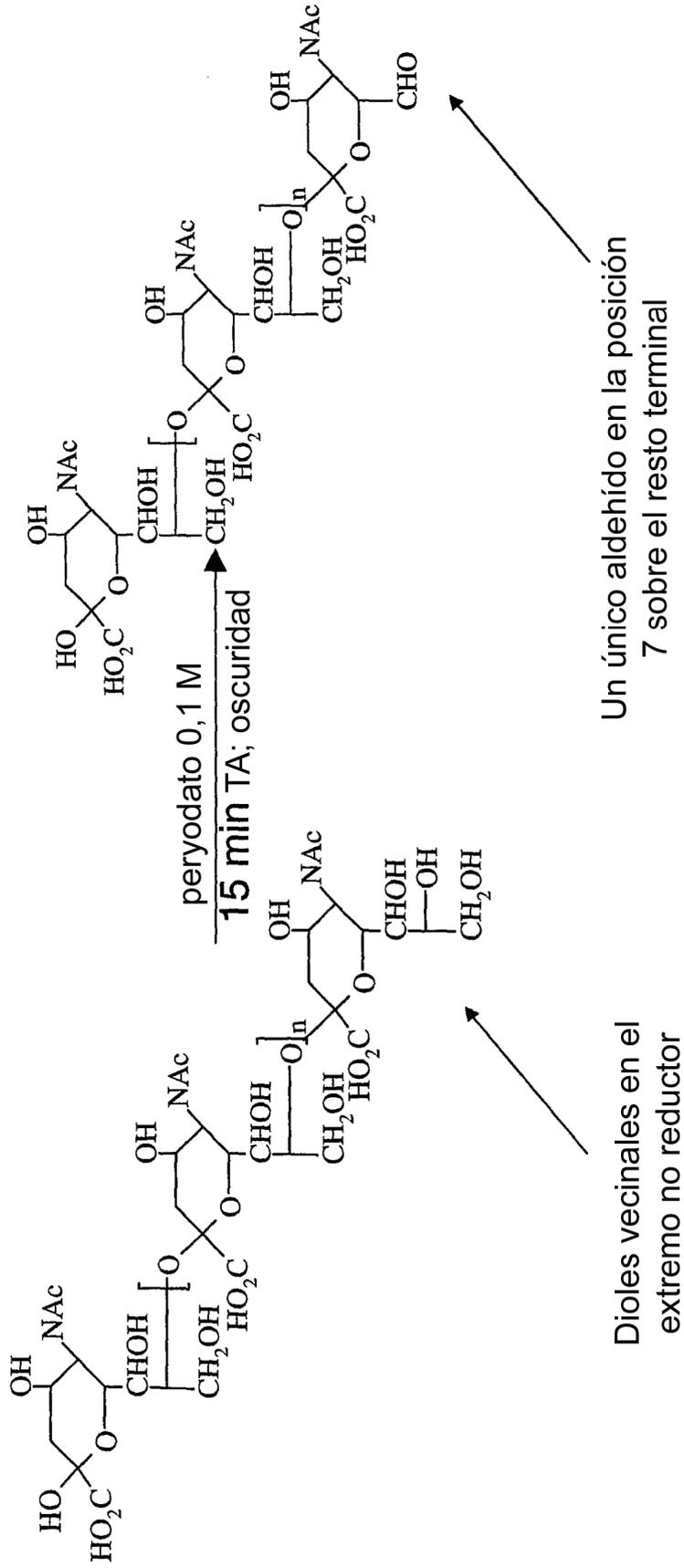


Figura 1A

Figura 1B

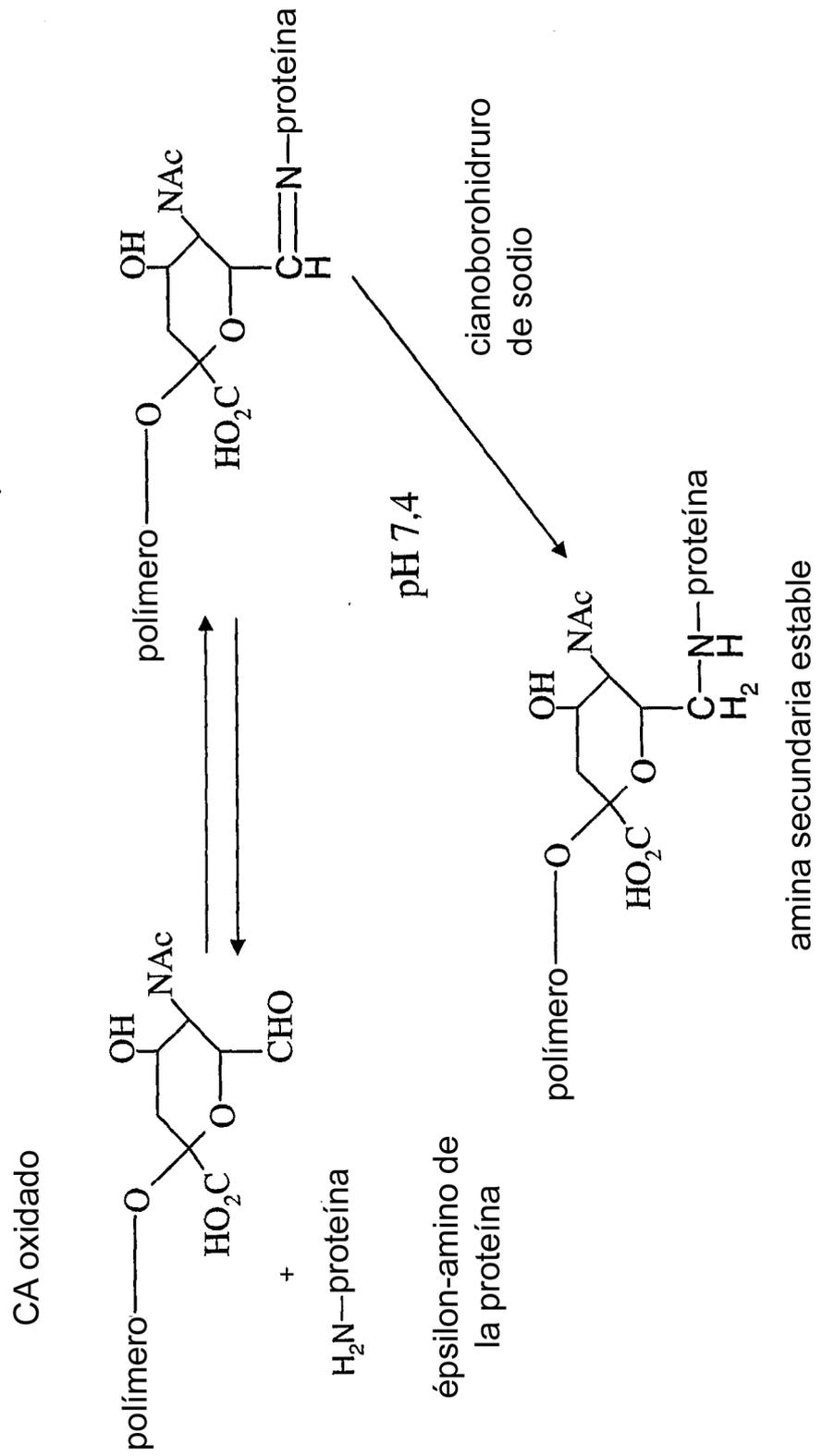
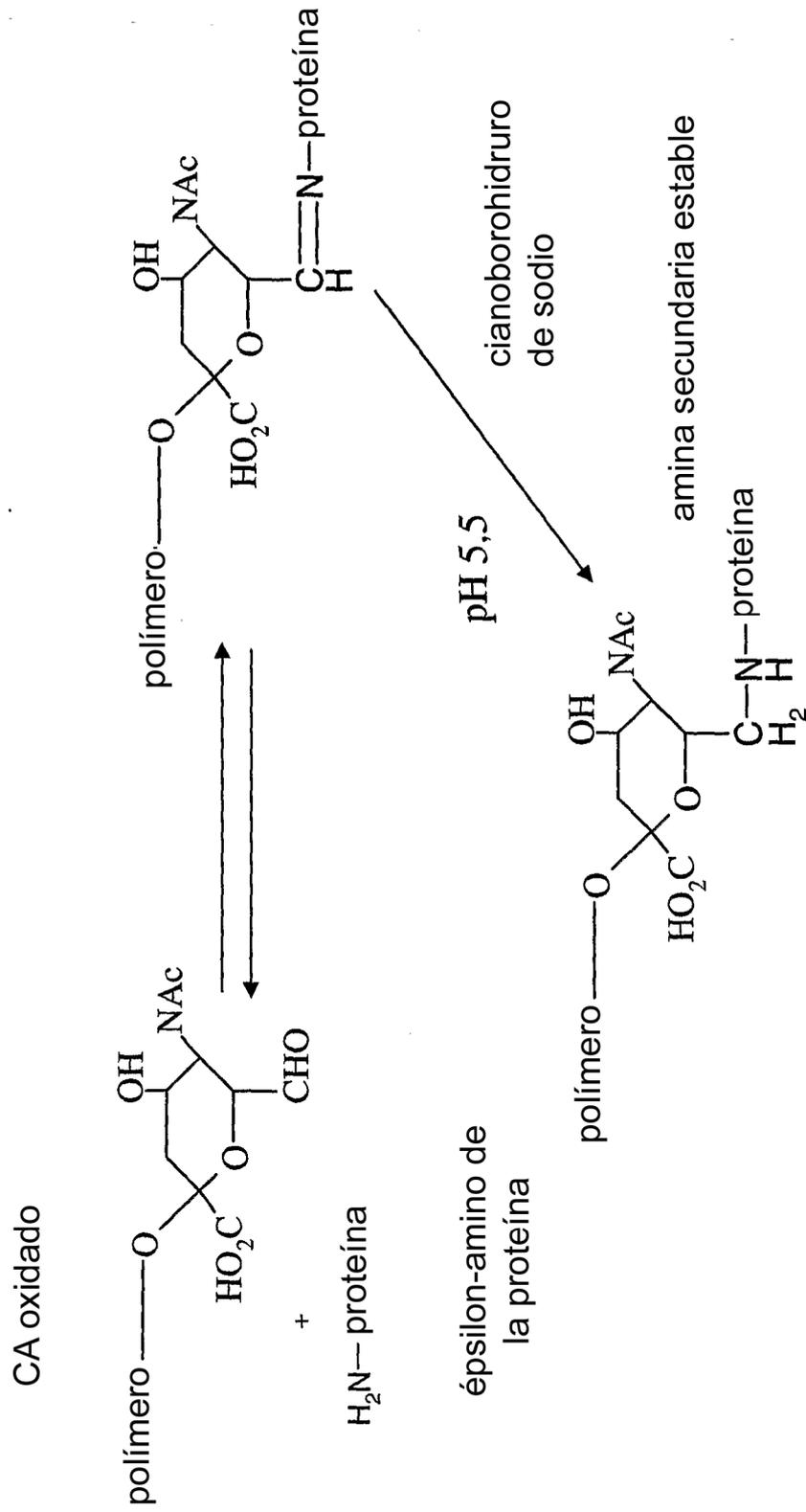


Figura 2.1



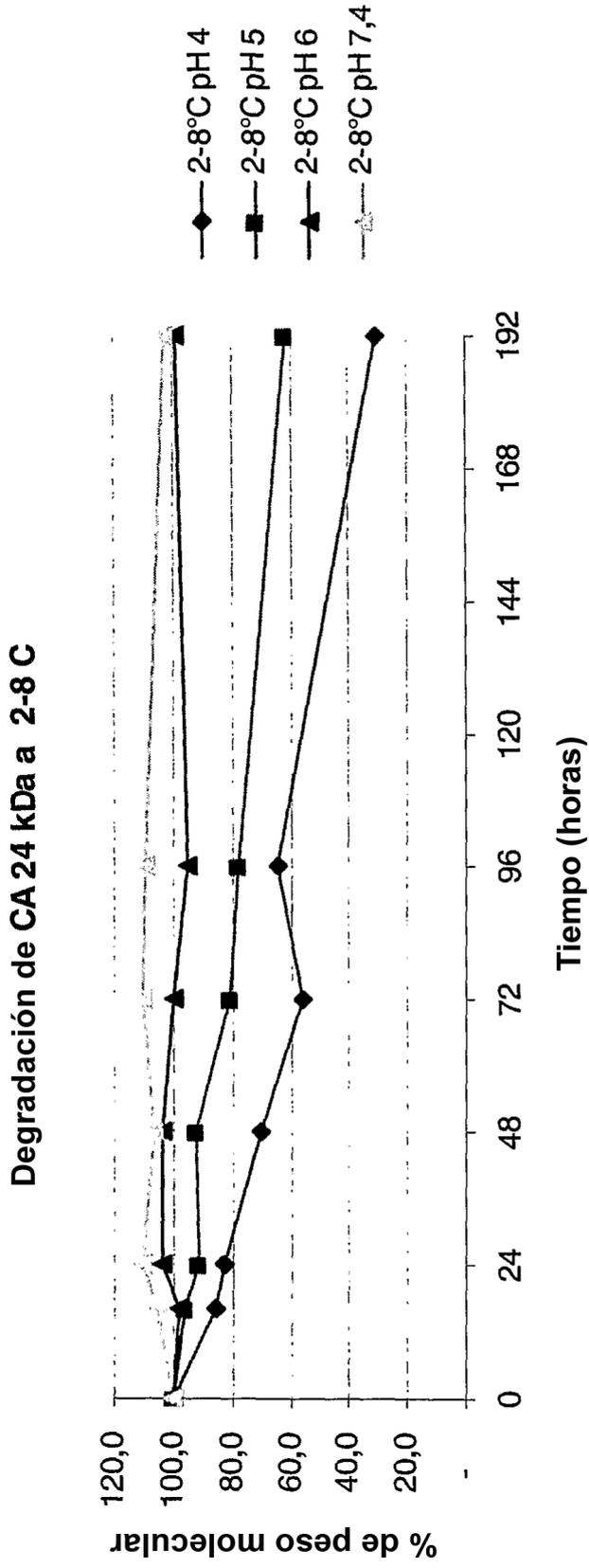


Figura 2.2

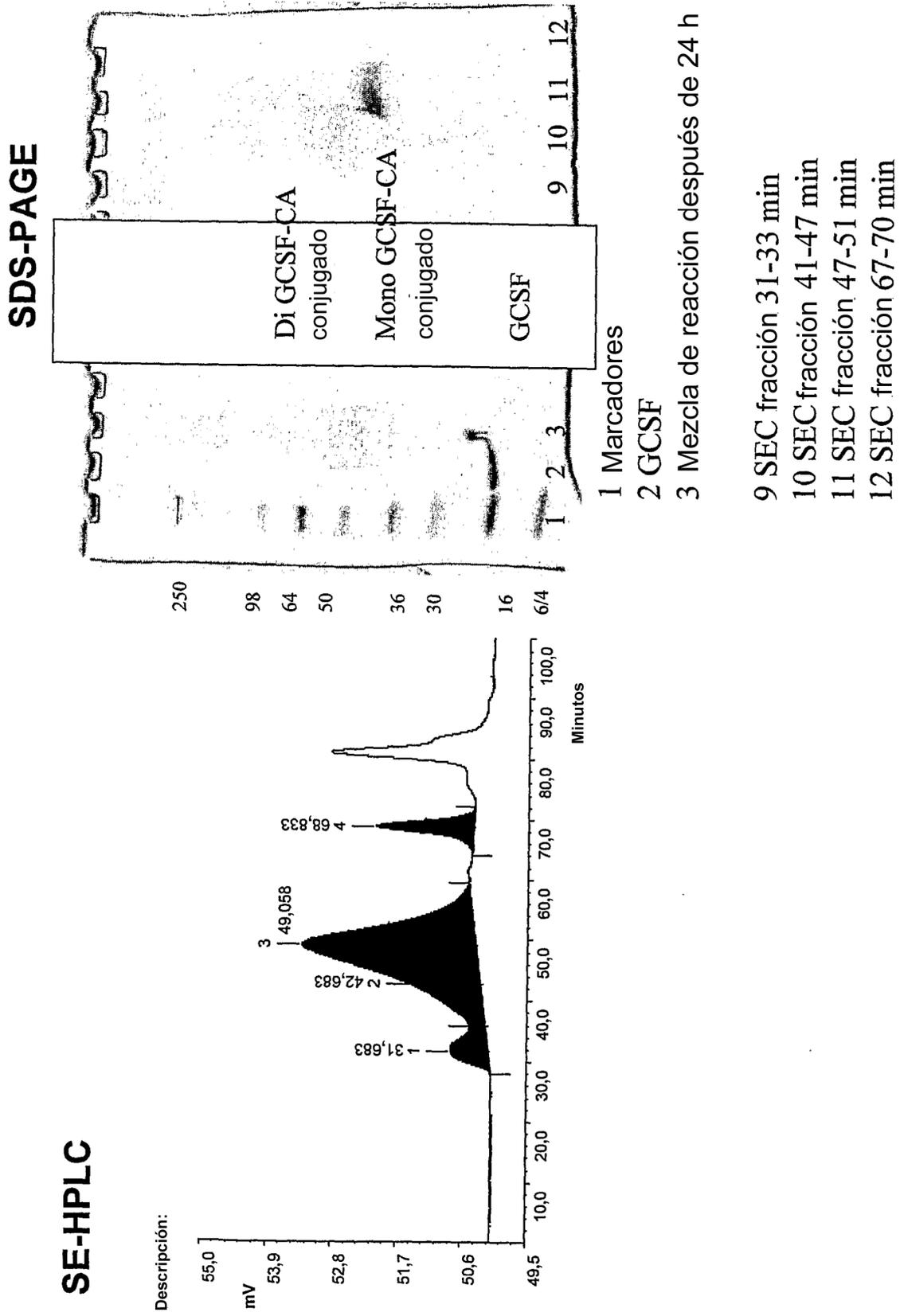


Figura 3.1

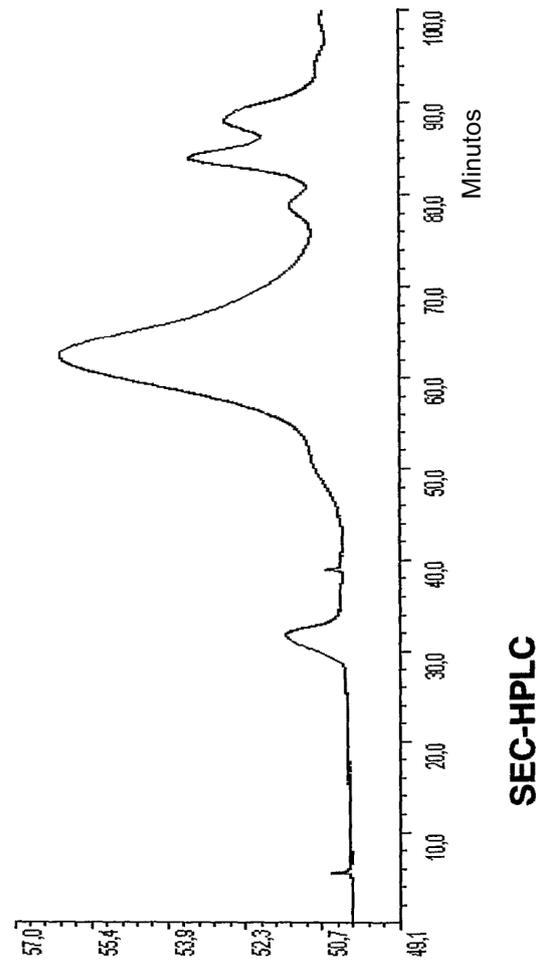
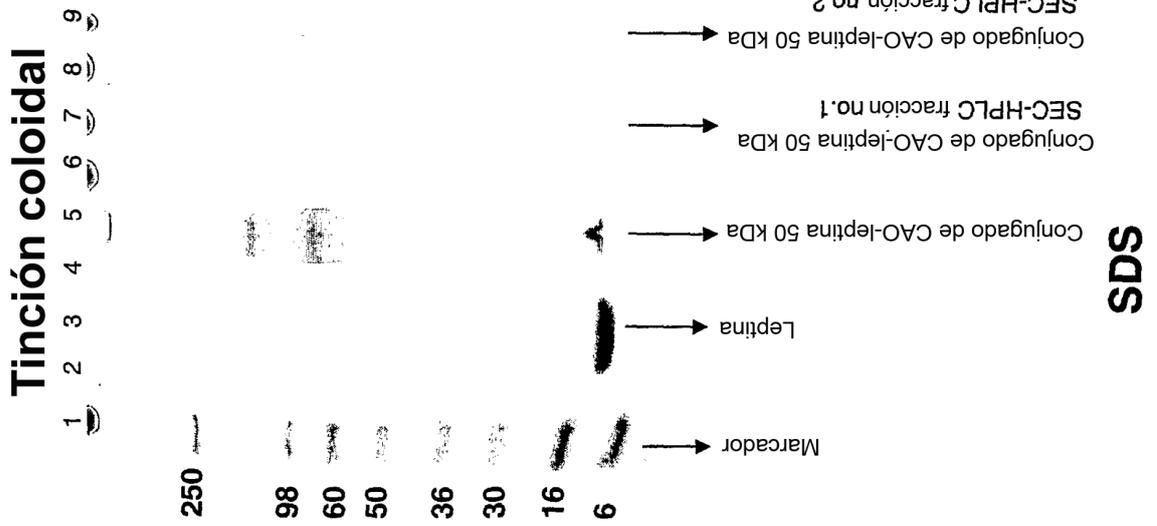
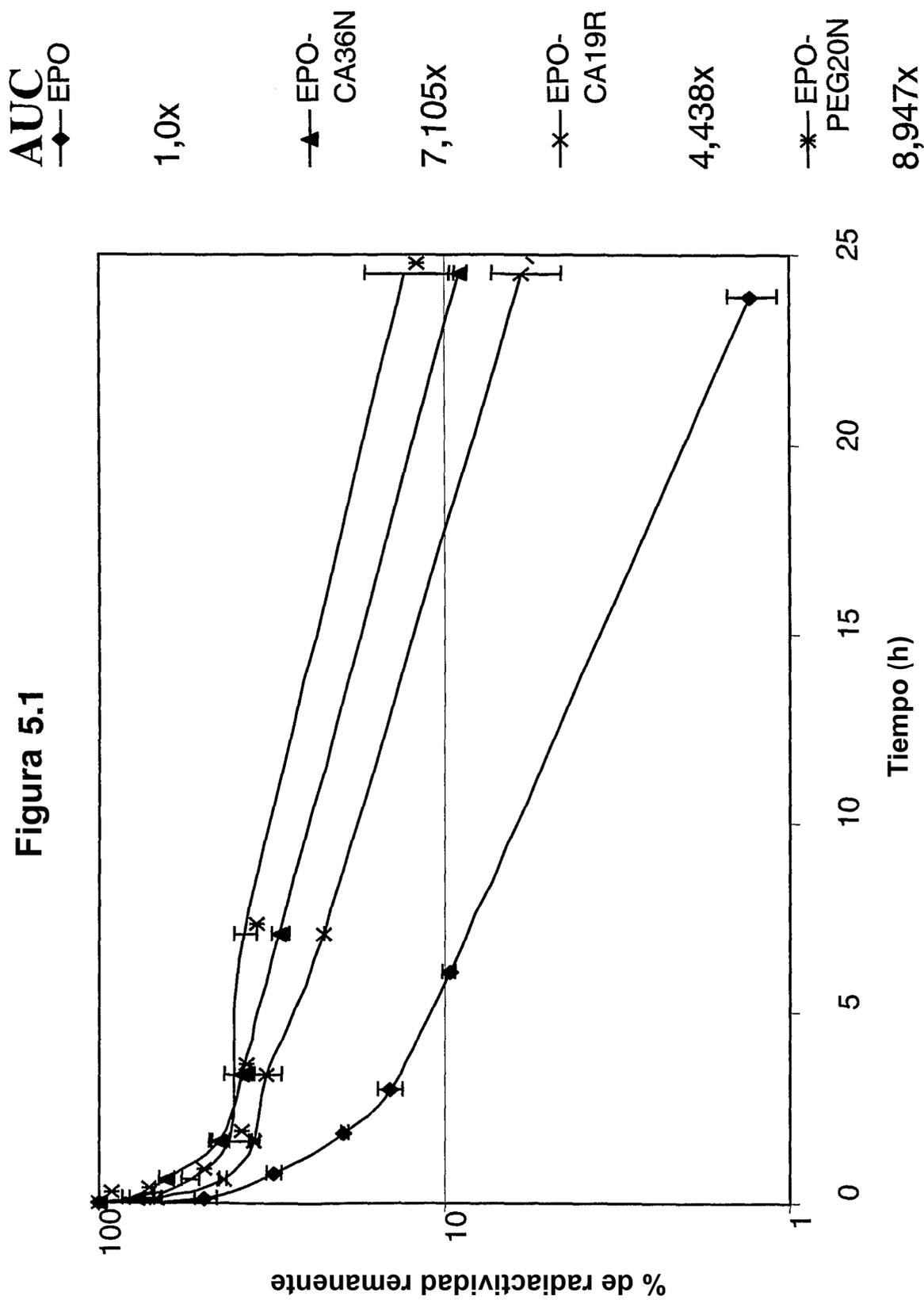
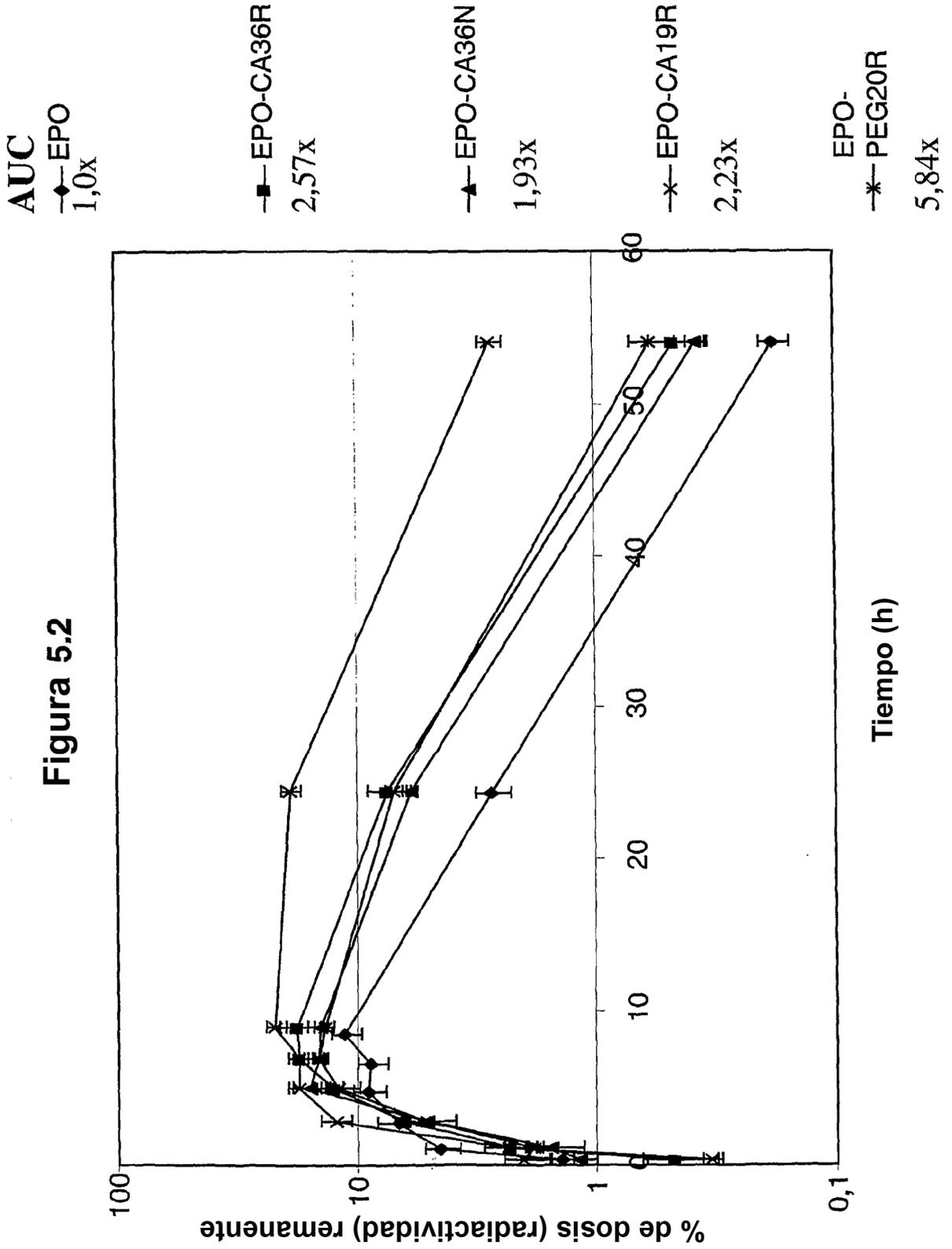


Figura 4.1

Figura 5.1





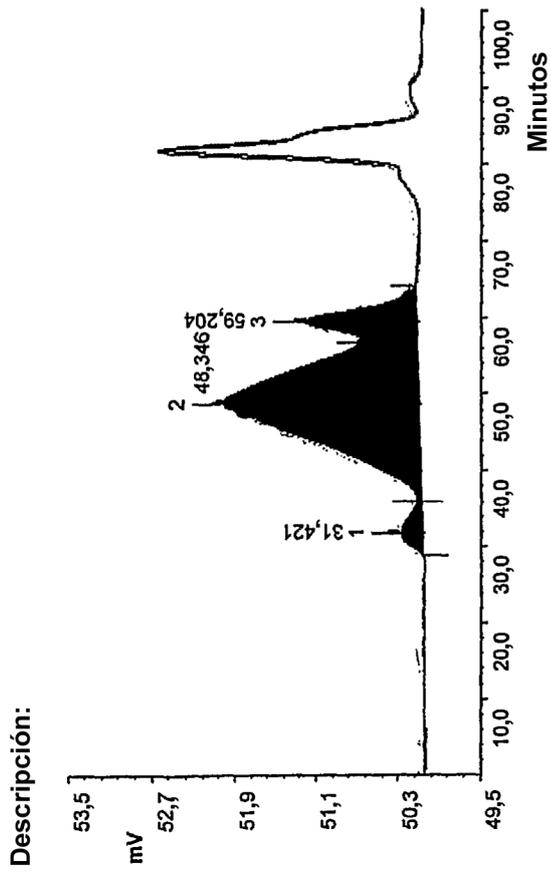
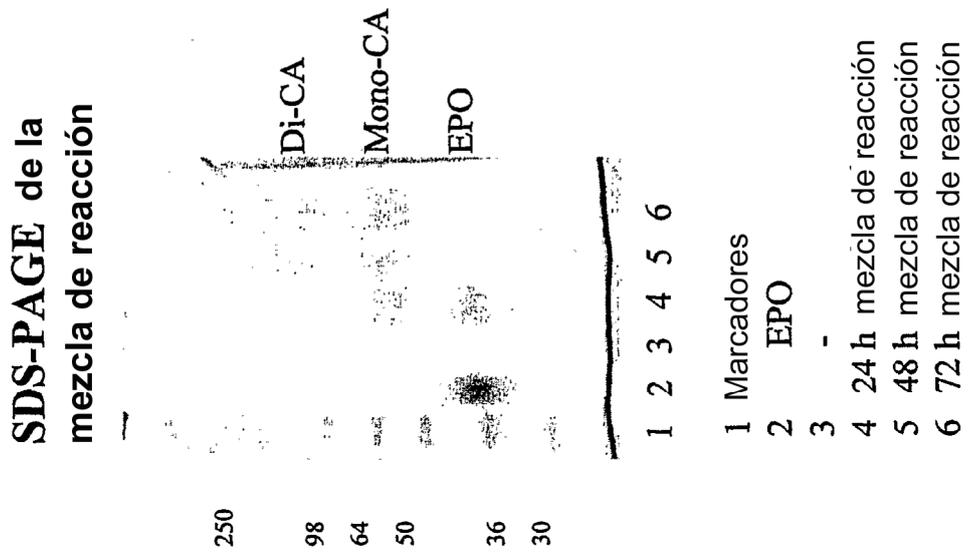
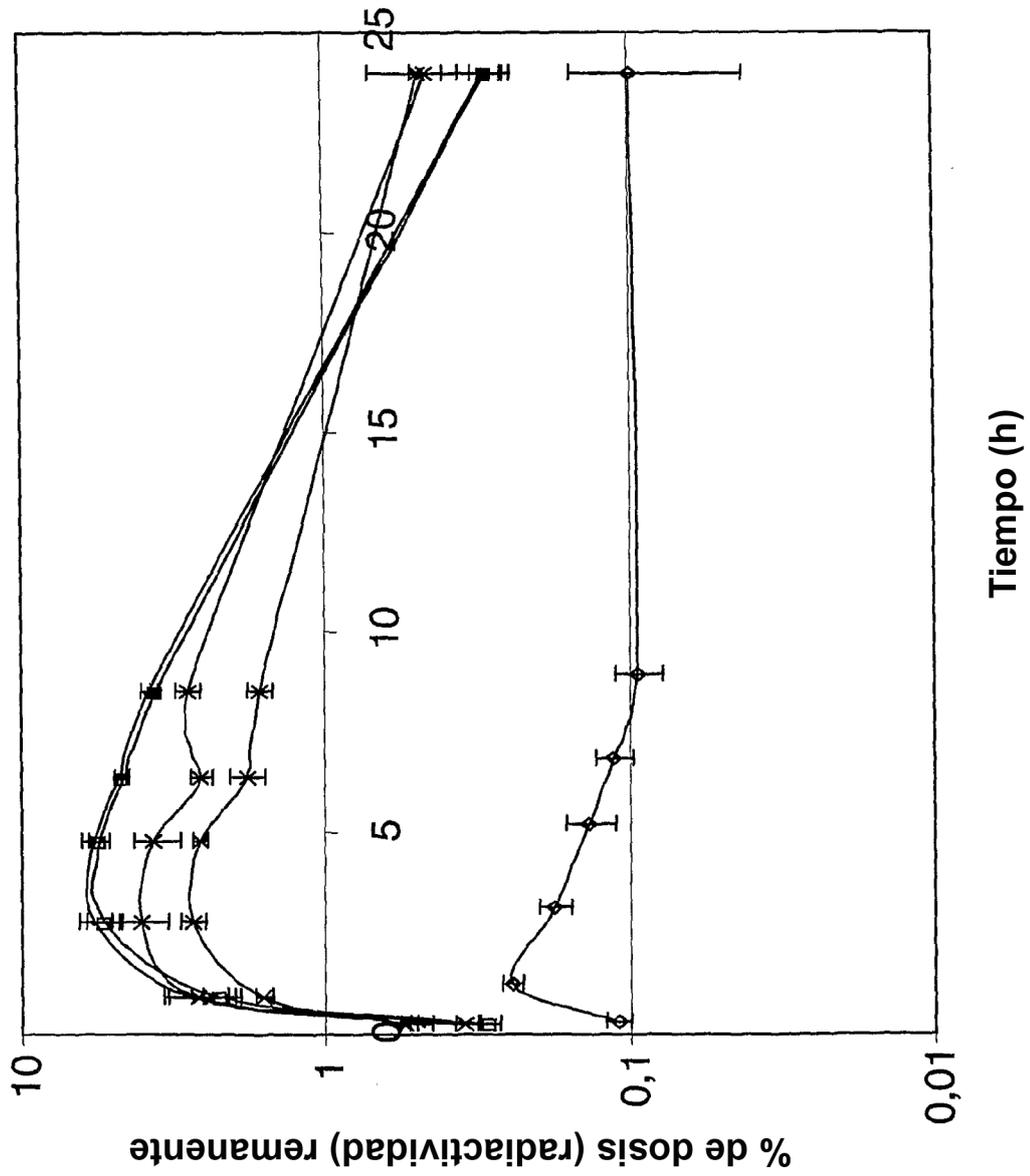
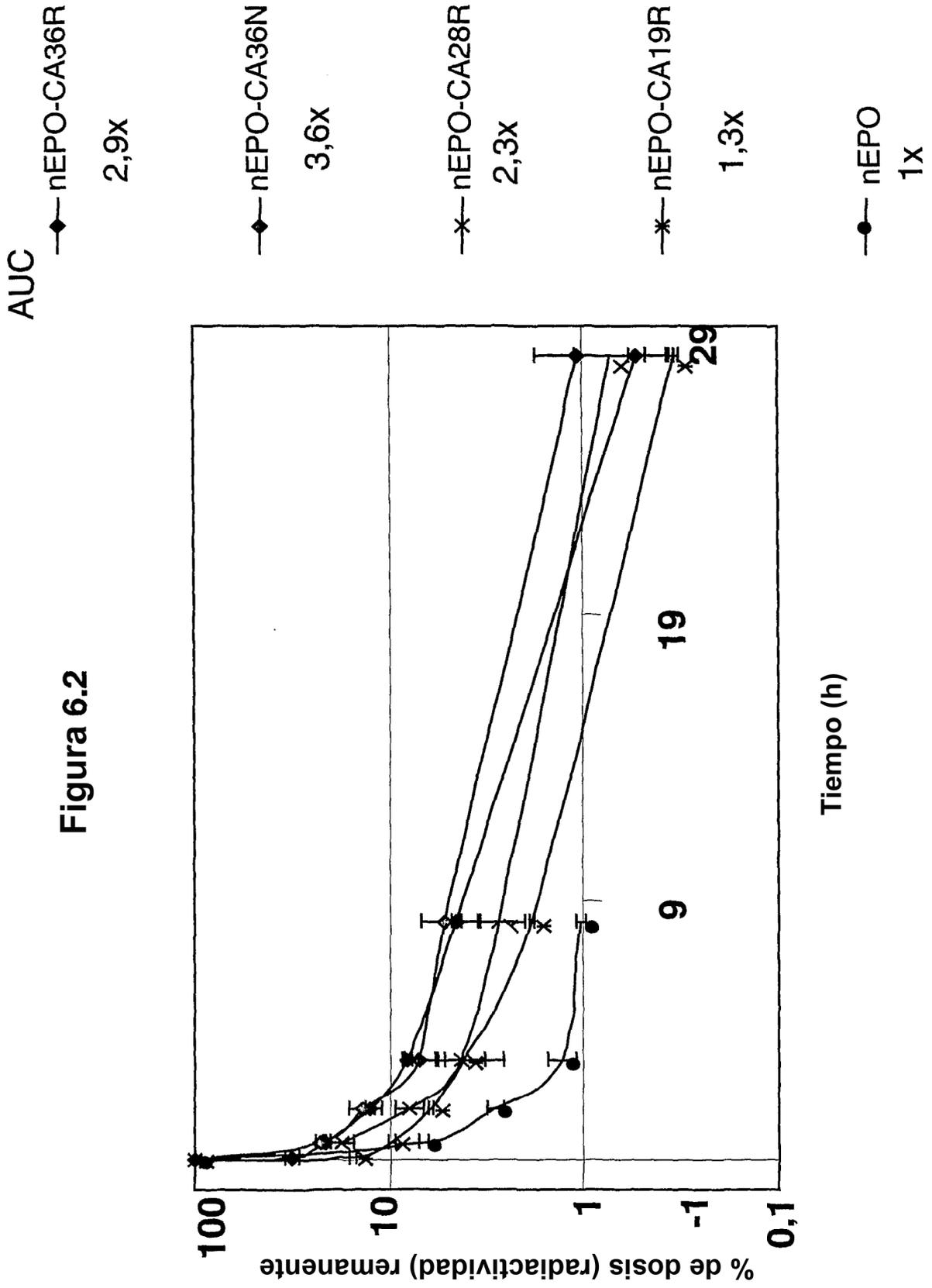


Figura 5.3

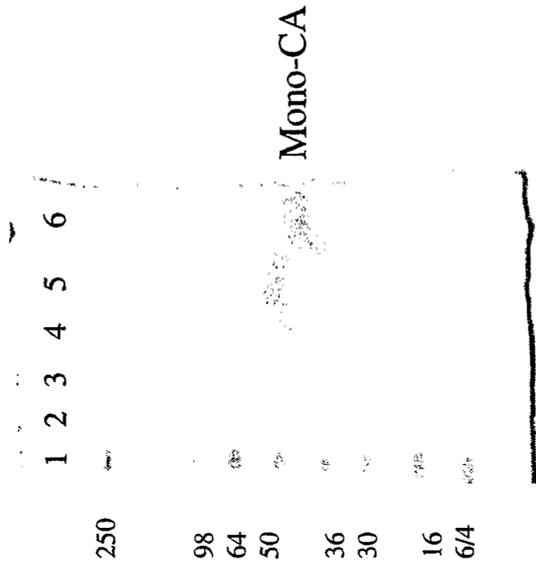
Figura 6.1

AUC
 ◆-nEPO
 1x
 ■-nEPO-CAR36R
 126x
 ---nEPO-CAR36N
 134x
 *---nEPO-CAR28R
 96x
 *---nEPO-CAR19R
 62x





**SDS-PAGE
de 24 h SEC**



- 1 Marcadores
- 2 SEC 29-33 min
- 3 SEC 33-37 min
- 4 SEC 37-41 min
- 5 SEC 45-41 min
- 6 SEC 49-53 min

SE-HPLC

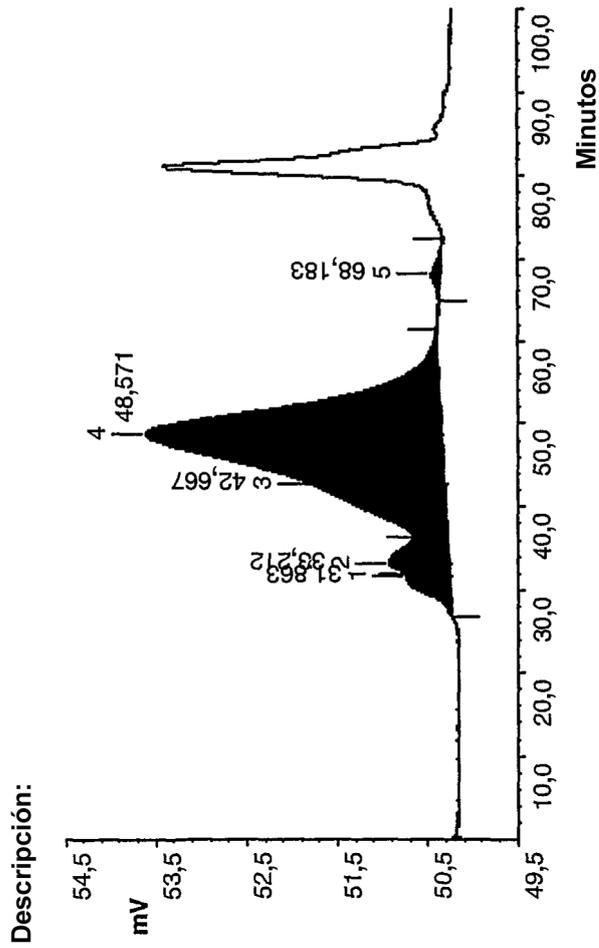


Figura 6.3

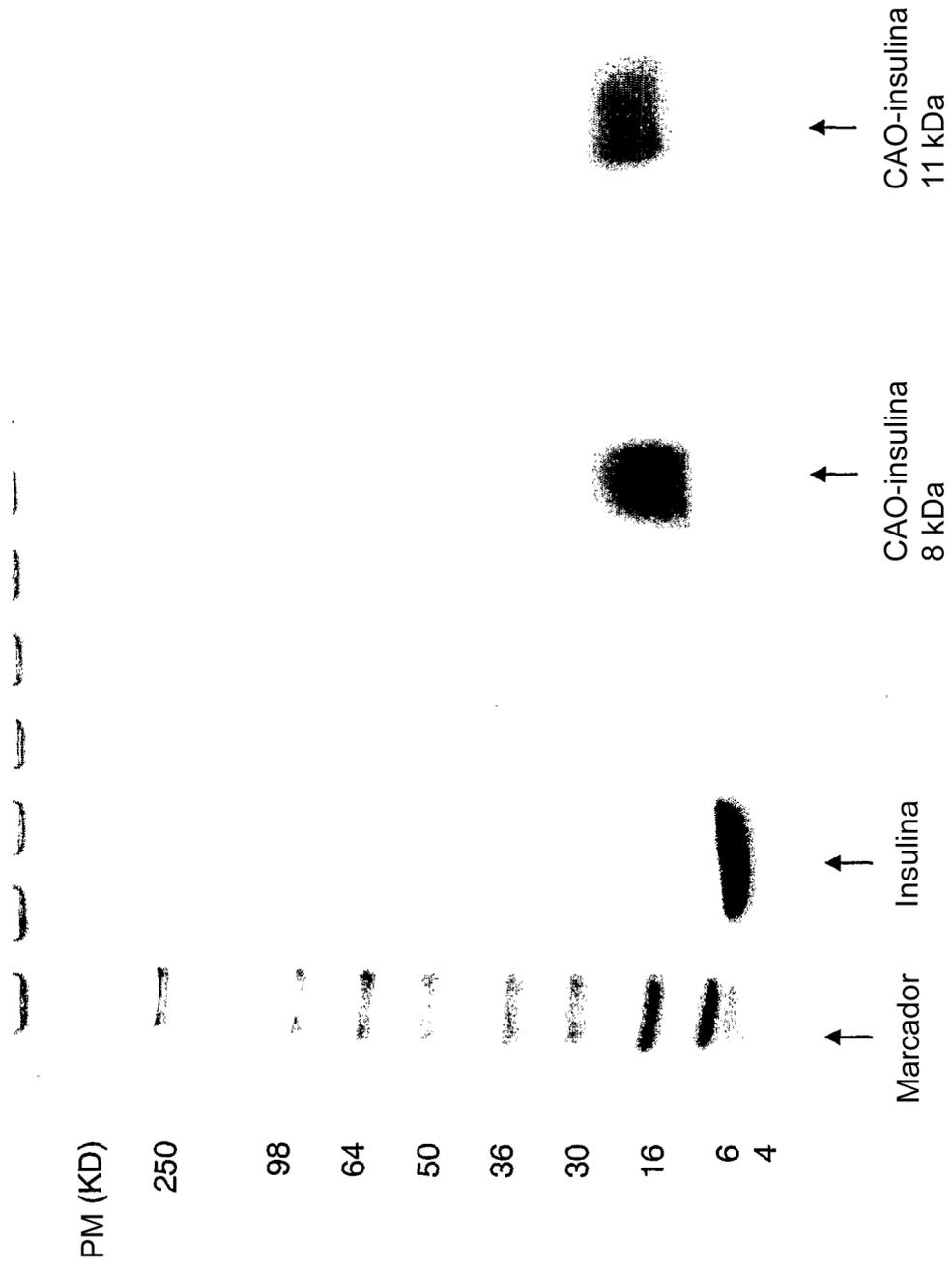


Figura 7.1

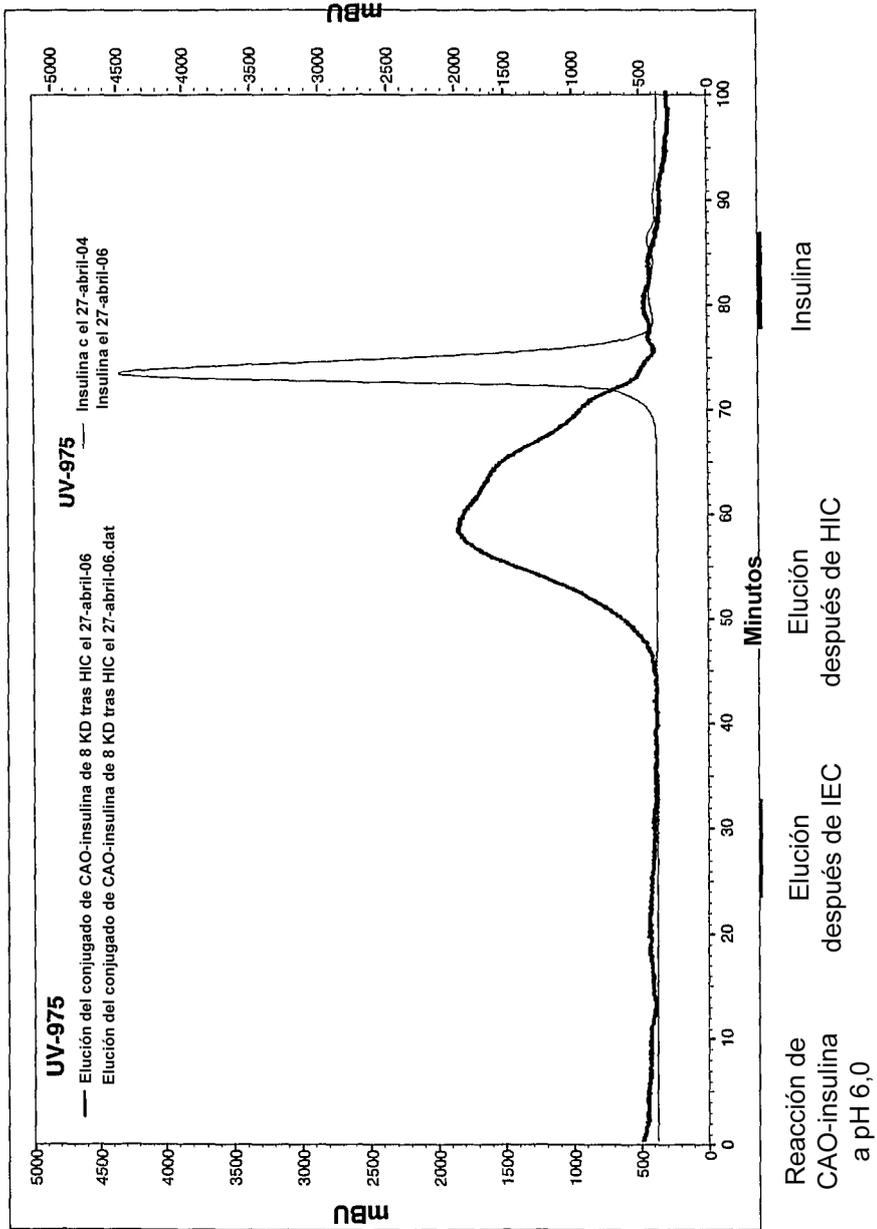


Figura 7.2

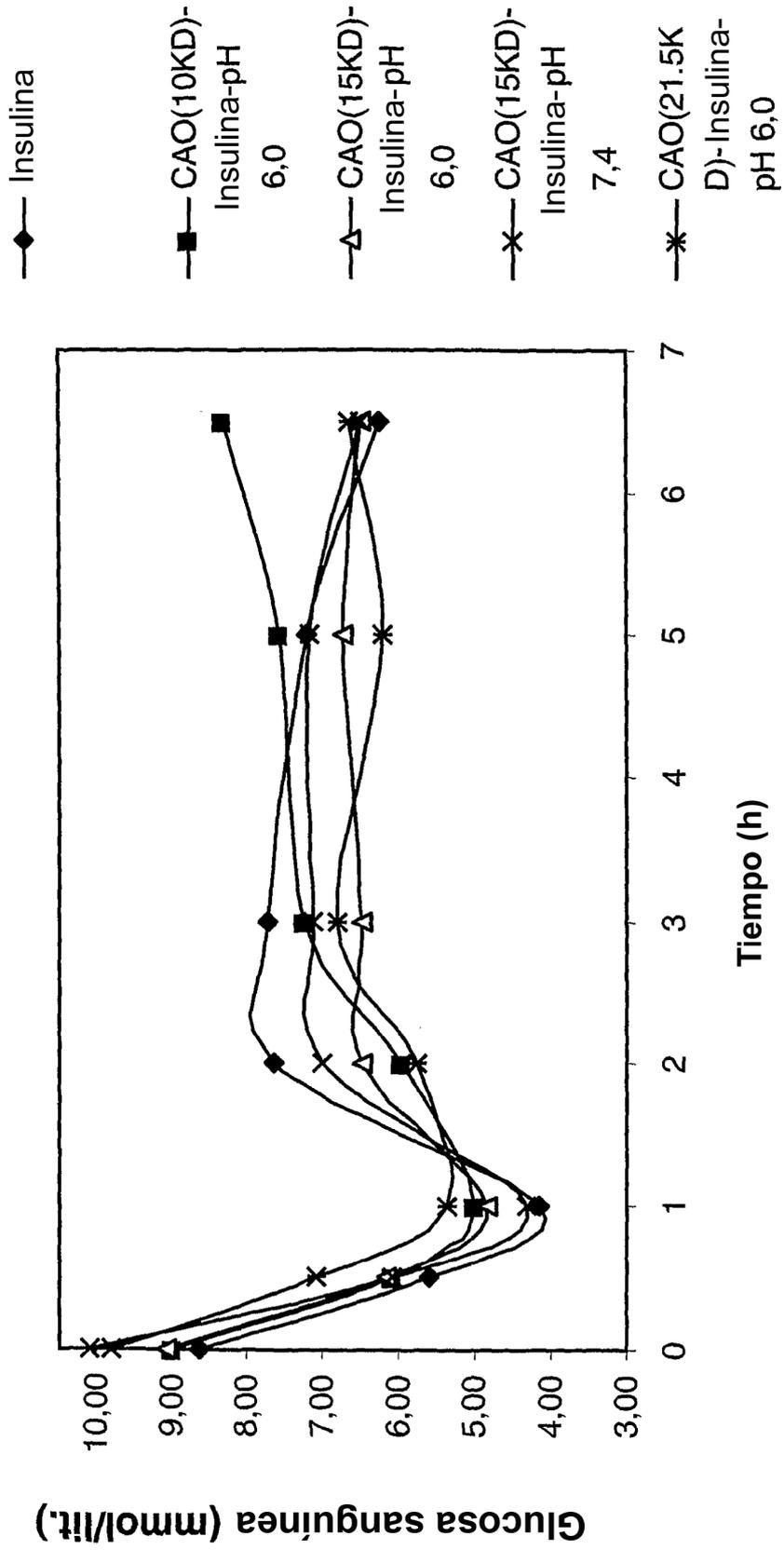


Figura 7.3

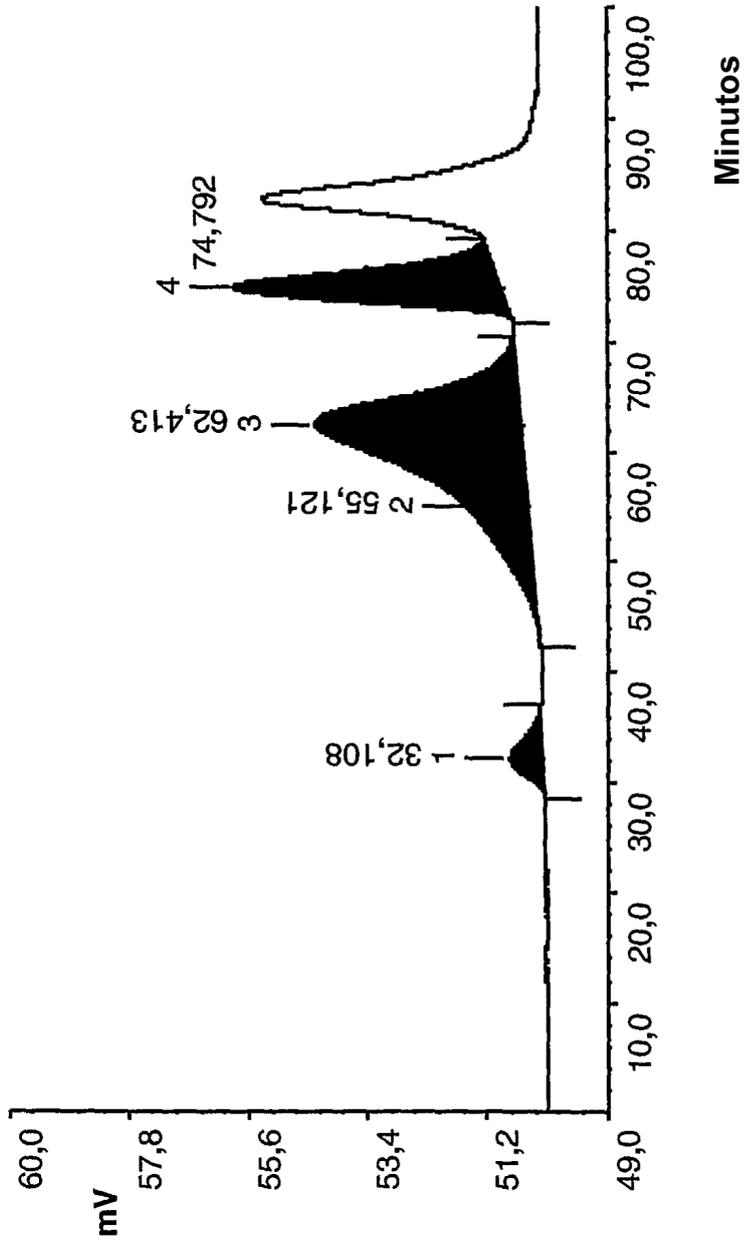
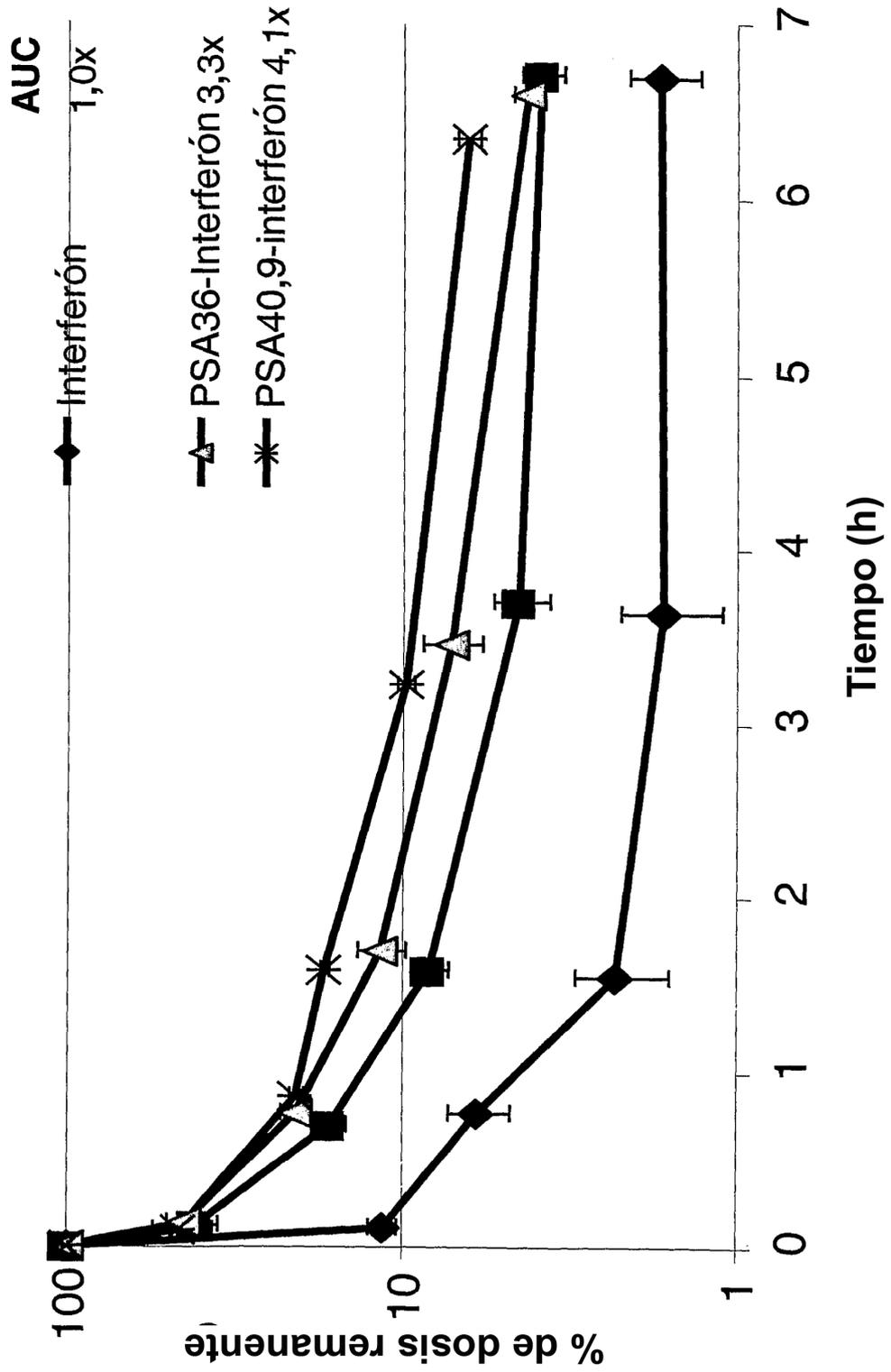


Figura 8.1

Figura 8.2



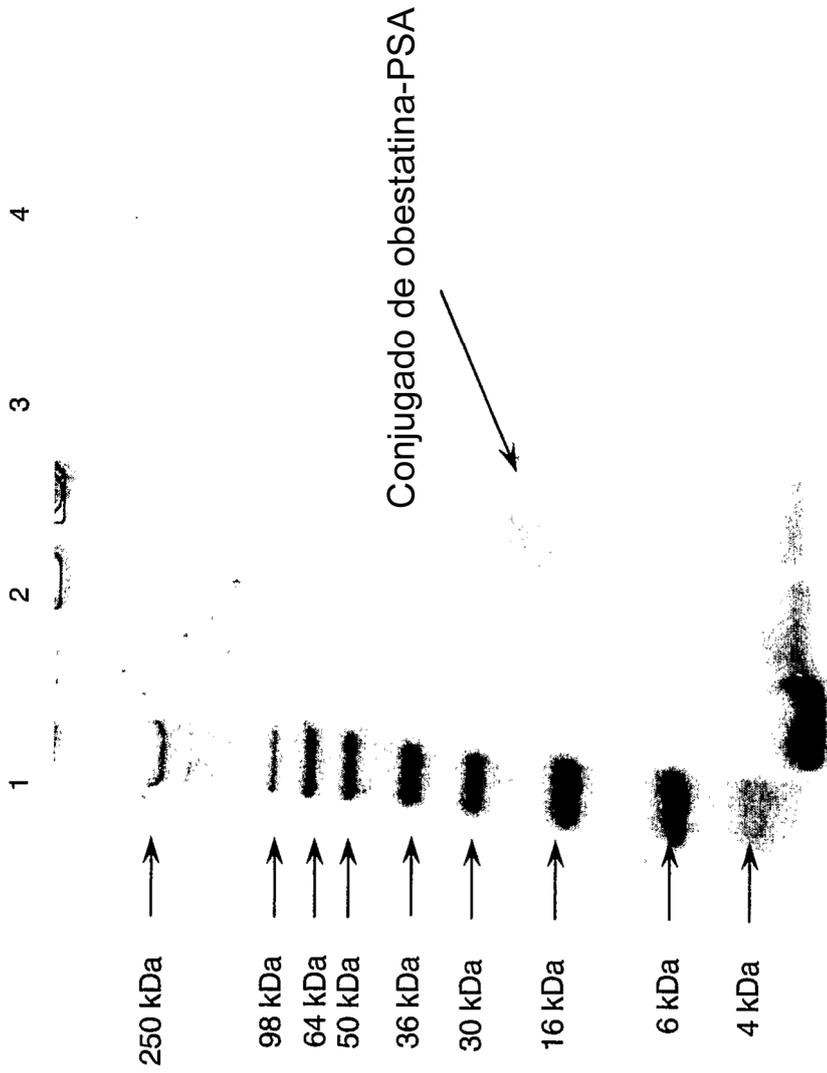


Figura 9

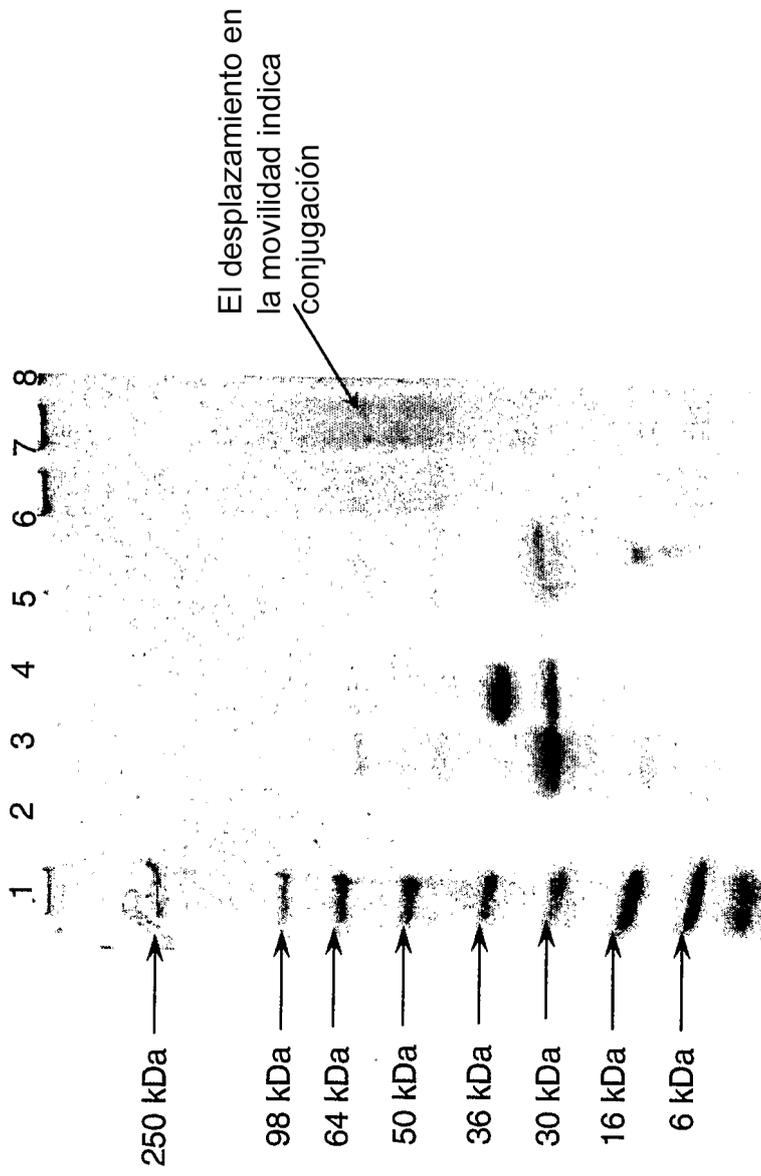


Figura 10.1

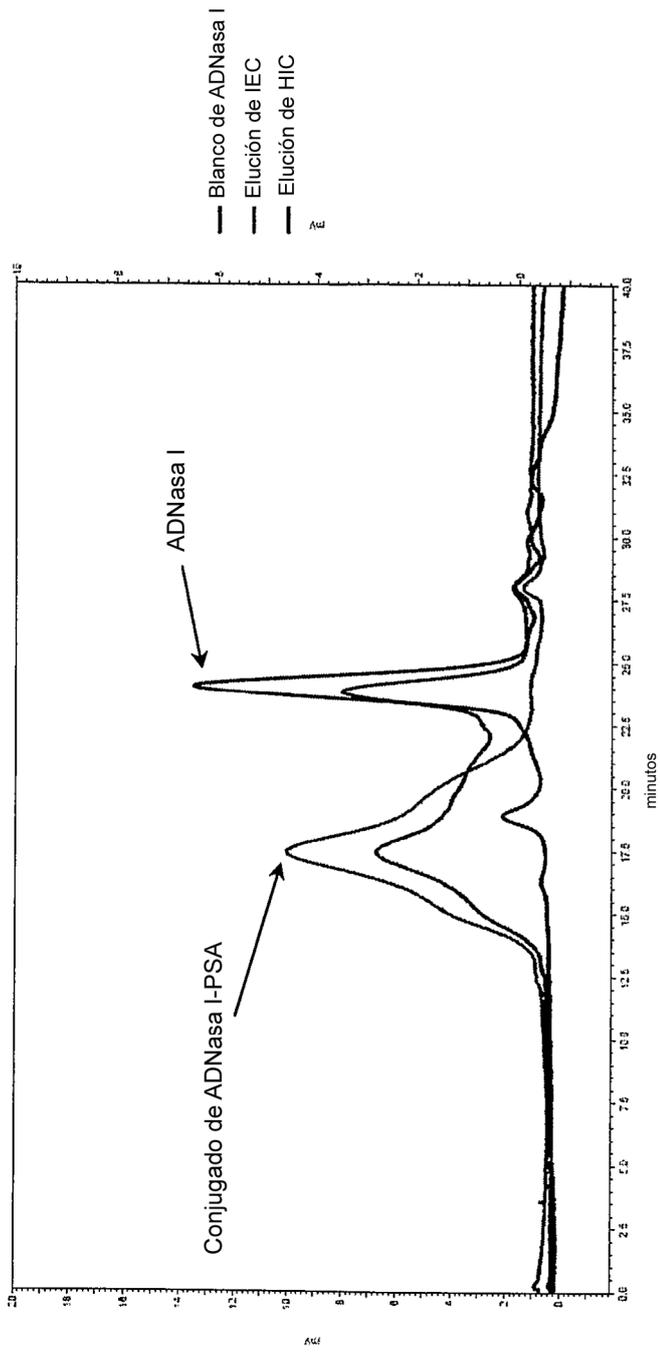


Figura 10.2

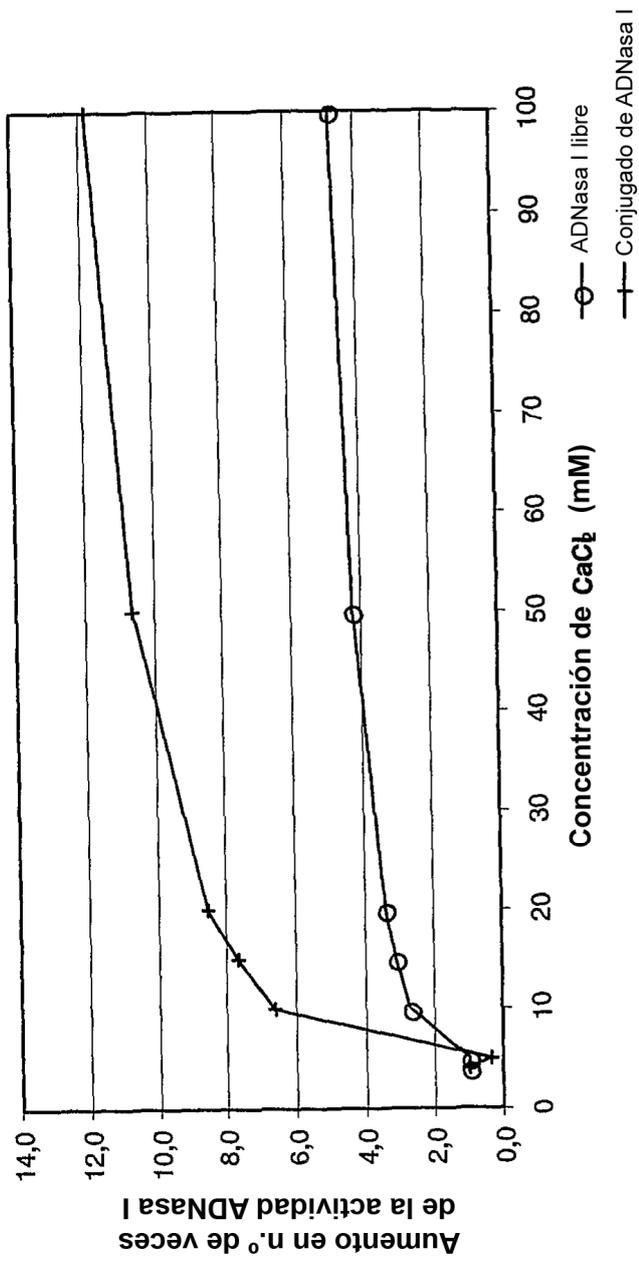


Figura 10.3