

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 590**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**C07K 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2011 E 11703642 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2536434**

54 Título: **Método de purificación**

30 Prioridad:

**19.02.2010 US 306101 P**  
**16.02.2010 EP 10153713**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.09.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BUCHARDT, JENS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 582 590 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**

Método de purificación

**5 Campo de la Invención**

La presente solicitud se refiere a la purificación de proteínas. En particular, la invención se refiere a la purificación de proteínas que son conjugados con restos fijadores de albúmina. Esto tiene utilidad particular durante la preparación de tales conjugados cuando se desea aislar los conjugados de cualquier proteína parental que no esté conjugada con un fijador de albúmina.

**Antecedentes de la Invención**

Es sabido que la unión covalente de restos fijadores de albúmina a proteínas puede dar lugar a una semivida *in vivo* aumentada para las proteínas. Tales conjugados de fijación proteína-albúmina tienen por tanto utilidad en la administración *in vivo* de proteínas terapéuticas, profilácticas o diagnósticas y la presencia del fijador de albúmina significa que puede aumentarse la eficacia *in vivo* de la proteína.

Cuando se producen conjugados proteína-fijador de albúmina, es deseable disponer de un método eficiente para separar los conjugados de cualquier proteína parental que no esté conjugada con un fijador de albúmina. La posibilidad de realizar dicha purificación eficaz puede ser problemática en la práctica, particularmente con proteínas de gran tamaño.

Dado que los fijadores de albúmina contienen comúnmente un componente de ácido graso, la separación se aborda a menudo sobre la base de la hidrofobicidad (v.g. HPLC). Sin embargo, esto no es práctico en el caso de proteínas de mayor tamaño tales como la hormona del crecimiento humano (hGH) y Factor VIII (FVIII) debido a la inestabilidad de tales proteínas en estas condiciones.

El uso de la cromatografía de intercambio iónico es también difícil, dado que los conjugados contienen grupos sumamente hidrófobos que conducen a cierta tendencia de los conjugados a fijarse irreversiblemente a la columna de intercambio iónico, o a precipitar, especialmente en presencia de una concentración elevada de sales, v.g. durante el paso de elución.

Por consiguiente, existe necesidad de un método eficiente para purificación de conjugados proteína-fijador de albúmina, particularmente donde la proteína de interés es una proteína de gran tamaño tal como hGH o FVIII.

**Sumario de la Invención**

La presente invención proporciona métodos que permiten la purificación de los conjugados proteína-fijador de albúmina. En particular, los métodos de la invención permiten la purificación de tales conjugados proteína-fijador de albúmina a partir de una mixtura que comprende también la proteína en forma no fijada, es decir la misma proteína que está presente en los conjugados pero en una forma en la que la proteína no está conjugada al fijador de albúmina.

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona un método para purificación de una proteína que está conjugada a un resto de fijación de albúmina a partir de una mixtura que comprende (i) dicha proteína en dicha forma conjugada y (ii) dicha proteína en una forma que no está conjugada a dicho resto de fijación de albúmina, comprendiendo el método:

- 50 (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una sustancia capaz de fijarse específicamente al resto de fijación de albúmina, en donde dicha sustancia se selecciona del grupo constituido por albúmina y ciclodextrina;
- (b) poner en contacto dicho soporte sólido de (a) con dicha mixtura que comprende proteína y proteína conjugada en condiciones adecuadas para fijación del resto de fijación de albúmina a la sustancia definida en (a);
- 55 (c) eluir los componentes fijados al soporte sólido.

La elución del paso (c) comprende poner en contacto el soporte sólido con una sustancia capaz de fijarse al resto de fijación de albúmina, tal como una sustancia que es capaz de fijarse competitivamente al resto de fijación de albúmina. Una sustancia adecuada puede ser, por ejemplo, ciclodextrina. Dicha sustancia puede aplicarse a dicho soporte sólido en un gradiente de concentración creciente en el paso (c).

La sustancia capaz de fijarse específicamente al resto de fijación de albúmina en el paso (a) se selecciona del grupo constituido por albúmina o ciclodextrina.

La proteína puede seleccionarse de Factor VIII, hormona del crecimiento, Factor VII, FIX, GLP-1, insulina, o una forma variante de cualquiera de ellos.

- 5 El resto de fijación de albúmina puede prolongar la semivida de la proteína *in vivo*. El resto de fijación de albúmina puede comprender un ácido graso o derivado de ácido graso. El resto de fijación de albúmina puede ser como se define en la Figura 1C o la Figura 11C.

### **Breve Descripción de las Figuras**

- 10 La Figura 1 muestra los resultados del protocolo de cromatografía en el Ejemplo 4. La Figura 1A muestra el protocolo de gradiente de elución que se utilizó y la Figura 1B muestra el cromatograma resultante.

- 15 La Figura 2 muestra los resultados de TOF-ESI MS de la fracción 1 (Figura 2A) y la fracción 7 (Figura 2B) de la Figura 1B. La fracción 1 se identificó como hGH no modificada y la fracción 7 se identificó como conjugado fijador de albúmina-hGH.

- 20 La Figura 3 muestra los resultados de los cromatogramas del Ejemplo 5. Figura 3A = muestra de hGH, Figura 3B = muestra: mezcla de hGH y conjugado hGH-fijador de albúmina (005). No se observó separación alguna entre hGH sin modificar y los conjugados hGH-fijador de albúmina.

- 25 Las Figuras 4 y 5 muestran los cromatogramas obtenidos en el Ejemplo 6. La Figura 4A muestra el perfil de gradiente de elución utilizado en la primera parte del experimento. Figura 4B = hGH (10  $\mu$ L de 2 mg/mL). Figura 4C = conjugado hGH-fijador de albúmina (10  $\mu$ L de 2 mg/mL). Figura 4 D = co-inyección. La Figura 5 muestra los resultados de experimentos en los cuales se utilizó ciclodextrina en el tampón B. Figura 5A = hGH (5  $\mu$ L de 2 mg/mL), HPCD 10 mM en tampón B. Se observó un ligero arrastre de hGH-fijador de albúmina. Figura 5B = conjugado hGH-fijador de albúmina (5  $\mu$ L de 2 mg/mL), HPCD 10 mM en tampón B. Figura 5C = conjugado hGH-fijador de albúmina (5  $\mu$ L de 2 mg/mL), HPCD 20 mM en tampón B. Figura 5D = co-inyección: 20  $\mu$ L de 1 mg/mL de cada uno de hGH y conjugado hGH-fijador de albúmina, HPCD 20 mM en tampón B.

- 30 La Figura 6 muestra los cromatogramas resultantes del Ejemplo 7. Figura 6A: la traza más baja (azul) es un blanco. La traza más alta siguiente (rojo) es la molécula de Factor VIII utilizada. La traza superior (verde) es el conjugado de fijador de albúmina, mezcla de reacción bruta después de acoplamiento de un fijador de albúmina a los N-glucanos de la molécula Factor VIII utilizando una sialil-transferasa (véase el Ejemplo 12). Figura 6B (superior) = cromatograma, (inferior) = perfil de gradiente de elución.

- 35 La Figura 7 muestra la SDS-PAGE de las fracciones identificadas en la Figura 6B. Pistas 1-7 = fracciones 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, respectivamente. Pista 8 = N8. Pista 9 = conjugado FVIII-fijador de albúmina, mezcla de reacción bruta (17754-152-1). Pistas 10-15 = fracciones 10-15 respectivamente.

- 40 La Figura 8 muestra los cromatogramas obtenidos utilizando las preparaciones 158-1 y 158-II. Superior: N8; segunda fila: 158-1; tercera fila: 158-II; cuarta fila: perfil de gradiente de elución.

- 45 Las Figuras 9 y 10 muestran los resultados del Ejemplo 9. Figura 9A = operación analítica. Superior: cromatograma; Inferior = perfil de gradiente de elución. La Figura 9B muestra la operación preparativa. Superior = cromatograma, Inferior = perfil de gradiente de elución. Figura 10A = contenido de proteínas en cada fracción de la Figura 9B como se mide por Nanodrop (A280, E 1% 14,6). Figura 10B = SDS-PAGE de las fracciones de 10A. Pista 1 = N8; pista 2 = mezcla de reacción. 3 horas; pistas 3-9 = fracciones 3, 4, 5, 9, 10, 11 y 12 respectivamente; pista 10 = mezcla de fracción 4 + fracción 10.

- 50 La Figura 11A muestra la cromatografía en columna CD de FVIII delecionado del dominio B de tipo salvaje modificado con Sustrato 1 y ST3Gal-I selectivo para el O-glucano. Traza marcada 1: UV 280 nm, traza marcada 2: gradiente escalonado. La Figura 11B muestra trazas para experimentos afines. N8 = FVIII delecionado del dominio B de tipo salvaje 17754-235-III = producto aislado modificado con Sustrato 1 en el O-glucano. La Figura 11C da la estructura del Sustrato 1 como se utilizó en los Ejemplos.

- 55 La Figura 12 muestra los resultados del Ejemplo 12. A = resultados utilizando el sistema tampón 1. B = resultados utilizando el sistema tampón 2. C = resultados utilizando el sistema tampón 3.

- 60 La Figura 13 muestra los resultados del Ejemplo 13.

La Figura 14 muestra los resultados del Ejemplo 14.

La Figura 15 muestra los resultados del Ejemplo 15.

- 65 **Descripción Detallada de la Invención**

La presente invención está basada en el desarrollo de métodos para purificación de conjugados proteína-fijador de albúmina. Los métodos de la invención hacen uso de un enfoque de cromatografía de afinidad. Sin embargo, los presentes métodos resuelven cierto número de desventajas de los métodos de cromatografía de afinidad existentes que los harían inadecuados para uso de la purificación de los conjugados proteína-fijador de albúmina en los que la proteína es una molécula de mayor tamaño tal como hGH o FVIII.

Están disponibles columnas de intercambio de afinidad que emplean albúmina inmovilizada. Sin embargo, estas columnas están basadas en sílice y requieren altas concentraciones (v.g. 35-40%) de isopropanol en el eluyente. Tales niveles altos de isopropanol pueden ser perjudiciales para muchas proteínas terapéuticas tales como FVIII, lo que significa que este método no es adecuado en el caso presente. Un enfoque alternativo podría ser incluir una concentración baja de ácido octanoico en el eluyente. Sin embargo, este enfoque se considera también como inadecuado dado que da lugar a una pérdida gradual de eficiencia de la columna.

La presente invención utiliza en lugar de ello un enfoque moderado y eficiente de cromatografía de afinidad. Los métodos descritos en esta memoria permiten la purificación eficiente y específica de los conjugados proteína-fijador de albúmina, pero evitan los efectos perjudiciales de otros métodos por permitir el uso de sistemas tampón sólo moderados que son compatibles con proteínas sensibles tales como hGH y FVIII.

## Proteínas

La presente invención se refiere en general a proteínas que se unen a fijadores de albúmina. Puede utilizarse cualquier proteína en un método de este tipo.

Los métodos descritos en esta memoria pueden tener utilidad particular en relación con proteínas que tienen por objeto administración *in vivo*. Por ejemplo, los métodos pueden tener utilidad en relación con proteínas que tienen utilidad terapéutica, profiláctica o diagnóstica. Una proteína adecuada puede ser por tanto una proteína de se desea administrar a un animal tal como un humano. La proteína puede administrarse por cualquier razón. Son particularmente relevantes proteínas cuando existe un deseo de mantener o mejorar la estabilidad o la semivida de la proteína *in vivo* después que ha sido administrada la misma.

Los presentes métodos abordan también problemas particulares con otros métodos de purificación cuando se utilizan proteínas de mayor tamaño. Por una "proteína de mayor tamaño" se entiende, por ejemplo, una proteína de más de 30 aminoácidos, más de 50 aminoácidos o más de 100 aminoácidos. Ejemplos de tales proteínas incluyen hormonas tales como hormona del crecimiento, insulina o GLP-1 y factores de coagulación de la sangre tales como Factor VII o Factor VIII. La proteína puede ser una proteína humana. Por ejemplo, la proteína puede ser hormona del crecimiento humano, insulina humana o FVIII humano. La proteína puede ser una proteína producida por métodos recombinantes. La proteína puede ser una forma existente naturalmente de una proteína o una forma modificada de una proteína.

Por ejemplo, el Factor VIII (FVIII) es una glicoproteína grande y compleja que es producida fundamentalmente por los hepatocitos. FVIII está constituido por 2351 aminoácidos, con inclusión del péptido señal, y contiene varios dominios distintos, como se define por homología (véase SEQ ID NO: 1). Existen tres dominios A, un solo dominio B, y dos dominios C. El orden de los dominios puede indicarse como NH<sub>2</sub>-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. FVIII circula en el plasma como dos cadenas, separadas en el límite B-A3. Las cadenas están conectadas por enlaces de ion metálico bivalente. La cadena A1-A2-B se conoce como la cadena pesada (HC) mientras que la cadena A3-C1-C2 se conoce como la cadena ligera (LC).

Las moléculas de Factor VIII endógeno circulan *in vivo* como una agrupación de moléculas con dominios B de diversos tamaños. Se cree que, *in vivo*, una eliminación enzimática gradual del dominio B da como resultado una agrupación de moléculas con dominios B de diversos tamaños. Generalmente se cree que la escisión en la posición 740, por la cual se elimina la última parte del dominio B, ocurre en conexión con la activación de trombina. Sin embargo, no puede excluirse que una variante de Factor VIII en la cual v.g. el sitio de escisión en la posición 740 ha sido debilitado pueda ser activa.

"Factor VIII" o "FVIII", como se utiliza en esta memoria, se refiere por tanto a una glicoproteína del plasma humano que es un miembro del camino intrínseco de la coagulación y es esencial para la coagulación de la sangre. "FVIII nativo" se refiere a la molécula de FVIII humana de longitud total como se muestra en SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 1-2332). El dominio B abarca los aminoácidos 741-1648 en esta secuencia.

La molécula de Factor VIII para uso conforme a la presente invención puede ser una forma nativa de FVIII o una forma variante de dicha molécula FVIII nativa. La molécula de Factor VIII puede ser una forma variante existente naturalmente de una molécula de este tipo, tal como una forma en la cual el dominio B ha sido alterado o truncado. La molécula de Factor VIII puede ser una molécula FVIII generada artificialmente, basada en la secuencia FVIII nativa.

Una molécula FVIII para uso conforme a la presente invención puede ser una molécula de Factor VIII truncada en el dominio B en donde los dominios restantes corresponden estrechamente a la secuencia que se indica en los aminoácidos núms. 1-740 y 1649-2332 en la secuencia de FVIII nativa de SEQ ID NO: 1. Una molécula FVIII para uso conforme a la presente invención puede comprender alternativa o adicionalmente una o más alteraciones dentro de la región de fijación de vWF entre los residuos 1670-1684. Una molécula de este tipo puede comprender, por ejemplo, los aminoácidos 1-740 y 1649-2332 de la secuencia nativa o puede comprender 1-740, 1649-1670 y 1684-2332 de la secuencia nativa.

Las moléculas FVIII o moléculas FVIII truncadas en el dominio B conforme a la invención pueden diferir ligeramente de la secuencia indicada en SEQ ID NO: 1, lo que significa que la secuencia o la secuencia de los dominios restantes (es decir los tres dominios A y los dos dominios C) pueden diferir ligeramente, v.g. aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4% o 5% de la secuencia de aminoácidos nativa (v.g. como se indica en SEQ ID NO: 1) debido al hecho de que pueden introducirse mutaciones a fin de v.g. reducir la capacidad de fijación de vWF. Adicionalmente, es plausible que se introduzcan modificaciones de aminoácidos (sustituciones, deleciones, etc.) en otros lugares de la molécula a fin de modificar la capacidad de fijación de Factor VIII con diversos otros componentes tales como v.g. LRP, diversos receptores, otros factores de coagulación, superficies celulares, introducción y/o supresión de sitios de glicosilación, etc.

Las moléculas de Factor VIII conforme a la presente invención tienen actividad de Factor VIII, lo que significa la capacidad de funcionar en la cascada de coagulación de una manera funcionalmente similar o equivalente a FVIII, inducen la formación de FXa por interacción con FIXa en una plaqueta activada, y respaldan la formación de un coágulo de sangre. La actividad puede evaluarse *in vitro* por métodos bien conocidos en la técnica tales como v.g. análisis del coágulo, análisis del potencial de trombina endógena, etc. Las moléculas de Factor VIII conforme a la presente invención tienen una 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 de 100% de la del FVIII humano nativo.

#### Conjugados de fijador de albúmina

Es sabido que las propiedades *in vivo* de tales proteínas pueden mejorarse por el uso de cadenas laterales de fijación de albúmina. Tales cadenas laterales, o "fijadores de albúmina", pueden unirse a la proteína antes de la administración y pueden, por ejemplo, estabilizar la proteína *in vivo* o mejorar o prolongar la semivida de la proteína *in vivo*.

En la presente invención se describe la unión de grupos protractores a proteínas. Cuando se conjugan con una proteína, tales grupos pueden prolongar la semivida de circulación *in vivo* de la proteína comparada con la proteína no conjugada. Estos grupos protractores son del tipo que los autores de la presente invención denominan "fijadores de albúmina" e incluyen derivados de ácidos grasos. Estos grupos pueden tener o no afinidad para albúmina. Se ha demostrado que la unión de fijadores de albúmina a proteínas o péptidos aumenta potencialmente la semivida en plasma de dichas proteínas o péptidos. Una clase de fijadores de albúmina típicos se derivan de ácidos grasos, dado que la albúmina es capaz de fijar moléculas sumamente hidrófobas. Por tanto, los compuestos que tienen un resto  $-(CH_2)_{12}-$  son posibles fijadores de albúmina en el contexto de esta invención. Si un compuesto de este tipo se une a una proteína o péptido y da como resultado una semivida en plasma incrementada de dicha proteína o péptido, se entiende que el fijador de albúmina puede contribuir al aumento global de la semivida en plasma por fijación a albúmina y/o por otros mecanismos.

El fijador de albúmina puede promover por tanto la circulación del derivado con el torrente sanguíneo.

En una realización, el conjugado fijador de albúmina-proteína es una molécula en la cual un solo fijador de albúmina se ha unido a la proteína. En otras realizaciones, se ha unido a la proteína más de un fijador de albúmina, preferiblemente 2, 3, 4, ó 5.

El fijador de albúmina (resto de fijación de albúmina) puede comprender una porción que es particularmente relevante para la protracción de la circulación en el torrente sanguíneo, porción a la que puede hacerse referencia de acuerdo con ello como un resto de protracción. El resto de protracción puede tener o no afinidad para albúmina. El resto de protracción se encuentra preferiblemente en o cerca del extremo opuesto del resto de fijación de albúmina en comparación con su punto de unión al péptido.

En una realización preferida, el fijador de albúmina es, o comprende, una cadena lateral que es capaz de formar complejos no covalentes con albúmina. El fijador de albúmina puede fijar la albúmina de modo no covalente y/o de modo reversible. El fijador de albúmina puede fijar específicamente la albúmina. Como está claro por los métodos que se describen más adelante, el fijador de albúmina puede fijarse a ciclodextrina. El fijador de albúmina puede fijarse a ciclodextrina de modo no covalente y/o de modo reversible. El fijador de albúmina puede fijar ciclodextrina específicamente.

Un fijador de albúmina como se describe en esta memoria es generalmente un grupo hidrófobo.

5 La otra porción del resto de fijación de albúmina, es decir la porción comprendida entre el resto de protracción y el punto de unión al péptido, puede designarse como resto enlazador, enlazador, espaciador, o análogos. Sin embargo, la presencia de un enlazador de este tipo es opcional, y por tanto el resto de fijación de albúmina puede ser idéntico al resto de protracción.

10 En realizaciones particulares, el resto de fijación de albúmina y/o el resto de protracción es lipófilo, y/o está cargado negativamente al pH fisiológico (7,4).

15 El resto de fijación de albúmina y/o el resto de protracción pueden estar unidos covalentemente a un grupo amino del péptido por química de conjugación tal como por alquilación, acilación, o formación de amida; o a un grupo hidroxilo, tal como por esterificación, alquilación u oximación.

En una realización preferida, un éster activo del resto de fijación de albúmina y/o el resto de protracción está enlazado covalentemente a un grupo amino de un residuo de ácido siálico o un derivado de ácido siálico, por formación de un enlace amida.

20 Para los propósitos presentes, los términos "resto de fijación de albúmina", "resto de protracción", y "enlazador" incluyen tanto las formas de esta molécula que no han reaccionado como las formas que han reaccionado. Si se entiende o no una o la otra forma, está claro por el contexto en el que se utiliza el término.

25 El resto de fijación de albúmina puede ser, o puede comprender un ácido graso o diácido graso o un derivado de cualquiera de ellos.

El término "ácido graso" se refiere a ácidos alifáticos monocarboxílicos que tienen de 4 a 28 átomos de carbono, tales como 16 átomos de carbono. El mismo es preferiblemente no ramificado, y/o de número par, y puede ser saturado o insaturado.

30 El término "diácido graso" se refiere a ácidos grasos como se ha definido arriba pero con un grupo ácido carboxílico adicional en la posición omega. Por tanto, los diácidos grasos son ácidos dicarboxílicos.

35 La nomenclatura es la usual en la técnica, por ejemplo -COOH, así como HOOC-, se refiere a carboxi; -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- a fenileno; -CO-, así como -OC-, a carbonilo (O = C<); y C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-O- a fenoxi.

40 En una realización preferida, el resto de fijación de albúmina de la presente invención comprende un grupo acilo graso  $-(\text{CH}_2)_n\text{-CO-}$ , donde  $n = 1, 2, 3, \dots 40$ ) o un grupo acilo graso omega-carboxi  $(\text{HO}_2\text{C-}(\text{CH}_2)_n\text{-CO-}$ , donde  $n = 1, 2, 3, \dots 40$ ) enlazado al péptido o proteína por un enlazador y un residuo de ácido siálico o derivado de ácido siálico.

45 En una realización preferida, el resto enlazador, si está presente, tiene de 2 a 80+ átomos C, preferiblemente de 5 a 70 átomos C. En realizaciones preferidas adicionales, el resto enlazador, si está presente, tiene de 4 a 20 heteroátomos, preferiblemente de 2 a 40 heteroátomos, más preferiblemente de 3 a 30 heteroátomos. Ejemplos particularmente preferidos de heteroátomos son átomos N, y átomos O. Los átomos H no son heteroátomos.

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

50 En una realización preferida, el resto enlazador comprende un residuo di-carboxilo enlazado a un residuo de ácido siálico por un enlace amida. En ejemplos preferidos, el residuo di-carboxilo tiene de 2 a 30 átomos C, preferiblemente 4-20 átomos C, más preferiblemente 4-10 átomos C. En ejemplos preferidos adicionales, el residuo di-carboxilo tiene de 0 a 10 heteroátomos, preferiblemente 0-5 heteroátomos.

55 Ejemplos de fijadores de albúmina de acuerdo con la presente invención se ilustran en la Figura 1C y la Figura 11C.

En otro ejemplo preferido, el resto enlazador comprende un grupo que contiene a la vez un grupo amino y un grupo carboxilo distal enlazado a un residuo de ácido siálico por un enlace amida a través de sus grupos carboxilo distales. En una realización preferida, este grupo es un grupo OEG.

60 En una realización preferida particular, el ácido siálico está enlazado a un glucano de la proteína enlazado a N o enlazado a O.

65 El aminoácido ácido glutámico (Glu) comprende dos grupos ácido carboxílico. Su grupo gamma-carboxi se utiliza preferiblemente para formar un enlace amida con un grupo amino de un residuo de ácido siálico o un derivado de

5 ácido siálico, o con un grupo amino de una molécula OEG, si está presente, o con el grupo amino de otro residuo Glu, si está presente. El grupo amino de Glu forma a su vez un enlace amida con el grupo carboxilo del resto de protracción, o con el grupo carboxi de una molécula OEG, si está presente, o con el grupo gamma-carboxi de otro Glu, si está presente. A esta forma de inclusión de Glu se hace referencia de vez en cuando resumidamente como "gamma-Glu".

#### Métodos de separación

10 La presente invención se refiere a métodos que permiten la purificación de conjugados proteína-fijador de albúmina. En particular, los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse para conseguir separación entre tales conjugados y la proteína parental no conjugada o para conseguir la purificación de tales conjugados a partir de una mixtura que comprende los conjugados y la proteína parental.

15 Cuando se preparan tales conjugados de fijador de albúmina, es sumamente deseable poder ser capaces de separarlos en la mayor proporción posible de la forma no modificada de la proteína. Si quedan cantidades importantes de proteína no modificada en la formulación de proteínas que se utiliza, la actividad específica de la formulación puede parecer engañosamente alta. Esta actividad específica refleja la actividad específica total de la proteína en la formulación, no sólo la actividad específica de la proteína conjugada. Dado que la proteína conjugada puede tener diferentes características *in vivo* que la proteína no modificada, tales "positivos falsos" causados por la  
20 proteína no modificada en la formulación pueden proporcionar una información no fiable acerca de la eficacia de la formulación final. En particular, donde una forma conjugada de la proteína tiene estabilidad significativamente mejorada *in vivo* cuando se compara con la proteína no conjugada, la presencia de proteína no conjugada en una formulación puede dar como resultado que la formulación exhiba una actividad específica alta, aun cuando no tenga la misma eficacia *in vivo* que una formulación que comprenda únicamente proteína conjugada.

25 Los métodos descritos en esta memoria permiten así la purificación de la proteína conjugada respecto a la proteína no conjugada, excluyendo por tanto tales positivos falsos y haciendo posible una medida más fiable de la actividad específica para una formulación dada de proteína conjugada.

30 Los conjugados utilizados en los métodos descritos en esta memoria pueden ser cualquiera de los conjugados descritos en la misma. Los mismos pueden comprender cualquiera de las proteínas expuestas en esta memoria, particularmente aquellas proteínas expuestas anteriormente. Dichos conjugados pueden comprender también cualquiera de los fijadores de albúmina o restos de fijación de albúmina expuestos en esta memoria.

35 Los métodos presentes utilizan un enfoque de cromatografía de afinidad.

Las condiciones básicas a lo largo de los presentes métodos pueden ser seleccionadas por la persona experta basándose en métodos de rutina y técnicas de purificación conocidas en uso para la proteína de interés. Por ejemplo, pueden seleccionarse una columna de cromatografía, resina de cromatografía y sistema tampón adecuados para una proteína de interés dada. Preferiblemente, las condiciones seleccionadas son tales que la  
40 proteína de interés, o el conjugado de proteína de interés, se mantienen en forma activa a todo lo largo del proceso de cromatografía. El uso de tampones fuertes debe evitarse generalmente. Como se ha mencionado arriba, muchos métodos de separación existentes requieren la presencia de componentes que pueden tener un efecto perjudicial sobre la proteína que se purifica, o que pueden conducir a la degradación del soporte sólido. La presente invención evita estas desventajas.

Preferiblemente, los tampones utilizados en los presentes métodos no comprenden componente alguno que afecte desfavorablemente a la actividad o función de la proteína que se purifica. Por ejemplo, los tampones utilizados en los presentes métodos no contienen preferiblemente isopropanol, o contienen isopropanol únicamente en bajas  
50 concentraciones tales como menos de 30%, menos de 20%, menos de 10% o menos de 5%.

Preferiblemente, los tampones utilizados en los presentes métodos se seleccionan de modo que permitan la reutilización del soporte sólido después del paso de elución final. Por ejemplo, deberían evitarse componentes tampón que degraden o reduzcan la eficacia del soporte sólido. Por ejemplo, preferiblemente los tampones utilizados  
55 en los presentes métodos no comprenden ácido octanoico.

La muestra de interés, es decir una muestra que comprende los conjugados a purificar, se aplica a un soporte sólido en condiciones adecuadas para permitir la fijación de los conjugados al soporte sólido. La muestra de interés es una que comprende o que puede comprender una mixtura de (a) una proteína que está conjugada a un fijador de  
60 albúmina como se describe en esta memoria y (b) dicha proteína en una forma que no está conjugada a un fijador de albúmina. Por ejemplo, la muestra de interés puede ser una composición resultante de un proceso para unir un resto fijador de albúmina a una proteína. La misma puede comprender por tanto conjugados proteína-fijador de albúmina formados satisfactoriamente así como moléculas de proteína a las cuales no se ha unido el fijador de albúmina.

65

El soporte sólido puede ser cualquier soporte adecuado para uso en cromatografía de afinidad. Por ejemplo, se puede utilizar una columna de cromatografía. Es posible utilizar la resina de cromatografía, tal como una resina basada en agarosa reticulada, v.g., una resina Sepharose.

- 5 La presente invención utiliza un sistema de cromatografía estándar de este tipo, pero permite además la fijación de la proteína conjugada al soporte sólido, v.g. la resina cromatográfica.

10 El soporte sólido comprende una sustancia que permite dicha fijación de los conjugados. En particular, el soporte sólido comprende una sustancia que es capaz de fijarse al fijador de albúmina en el conjugado, en donde dicha sustancia se selecciona del grupo constituido por albúmina y ciclodextrina.

15 La sustancia puede estar presente como parte componente del soporte sólido, tal como un componente de una resina cromatográfica. La sustancia puede estar inmovilizada en el soporte sólido, por ejemplo la sustancia puede estar unida a la superficie del soporte sólido. Los Ejemplos 1 y 2 describen métodos adecuados que pueden utilizarse para inmovilizar una sustancia, tal como ciclodextrina o albúmina, en una columna cromatográfica.

20 Una sustancia adecuada para uso en o sobre un soporte sólido puede ser cualquier sustancia que se fija a un fijador de albúmina como se describe en esta memoria. Preferiblemente, la sustancia se fija a un fijador de albúmina de modo no covalente y reversiblemente. Preferiblemente, la sustancia se fija selectivamente al resto de fijación de albúmina como se describe en esta memoria. Por fijación selectiva se entiende que la sustancia se fija al fijador de albúmina con preferencia a otras moléculas. Por ejemplo, la sustancia puede fijarse al fijador de albúmina pero puede no fijarse a otra molécula, o puede fijarse a la otra molécula con menos afinidad. La sustancia puede fijarse a más de un tipo de fijador de albúmina como se describe en esta memoria, pero puede no fijarse a otra molécula, o puede fijarse a la otra molécula con menor afinidad. La sustancia puede fijarse a un fijador de albúmina pero puede no fijarse a una molécula de proteína, o puede fijarse a una proteína con menor afinidad. En particular, la sustancia puede fijarse al fijador de albúmina cuando el fijador de albúmina está conjugado a una proteína como se describe en esta memoria, pero puede no fijarse, o puede fijarse con menor afinidad a la forma no modificada (no conjugada) de la misma proteína que no comprende un fijador de albúmina.

30 En una realización, la sustancia para uso en o sobre un soporte sólido puede ser albúmina. En una realización, la sustancia puede ser ciclodextrina. La ciclodextrina puede ser del tipo beta y/o alfa. La ciclodextrina puede ser también de un tipo modificado, tal como una hidroxipropil-ciclodextrina. El soporte sólido utilizado en los métodos descritos en esta memoria puede comprender por tanto albúmina y/o ciclodextrina. El soporte sólido utilizado en los métodos descritos en esta memoria puede tener albúmina y/o ciclodextrina inmovilizadas en él.

35 Los métodos de la presente invención comprenden por tanto un paso de puesta en contacto de una mezcla que comprende proteína y proteína conjugada como se describe en esta memoria con un soporte sólido adecuado, en condiciones que permiten la fijación de la proteína conjugada al soporte sólido. Preferiblemente, la proteína conjugada se fija al soporte sólido con preferencia a la proteína no conjugada. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por incorporación de albúmina y/o ciclodextrina en el soporte sólido o inmovilización de albúmina y/o ciclodextrina en o sobre el soporte sólido.

45 Este paso realiza por tanto la fijación de la forma conjugada de la proteína al soporte sólido. Se apreciará que las condiciones específicas de este paso de carga, tales como otros componentes del tampón, volumen y caudal de tampón, pueden optimizarse para una forma dada de proteína conjugada. La característica fundamental de este paso de carga es que la proteína conjugada se carga en, y se fija sobre, el soporte sólido.

50 Preferiblemente, este paso de carga va seguido por uno o más pasos de lavado. Estos pasos de lavado tienen por objeto separar la proteína no fijada, y en particular separar del soporte sólido la proteína no conjugada y no fijada. Una vez más, las condiciones específicas tales como componentes del tampón, volumen y caudal del tampón pueden ajustarse a cada método particular. El tampón utilizado para lavado puede ser el mismo que el tampón utilizado para carga. Preferiblemente, se seleccionan un tampón de lavado, volumen y caudal del tampón que no dan como resultado la elución de la proteína conjugada fijada durante el curso del o de los pasos de lavado.

55 El eluyente resultante de este lavado puede monitorizarse opcionalmente para identificar cualesquiera componentes proteínicos que se separen. Por ejemplo, el eluyente puede dividirse en fracciones y analizarse muestras de cada fracción para evaluar su composición o para identificar y/o cuantificar componentes particulares de interés. Puede ser preferible detener este procedimiento de lavado en un momento adecuado a fin de minimizar la pérdida del producto deseado, es decir la proteína conjugada, del soporte sólido. Esto puede conseguirse por monitorización respecto a la presencia de la proteína conjugada en el eluyente y detención del lavado cuando comienza a verse la proteína conjugada. Puede ser preferible detener este lavado en un momento adecuado para separar la cantidad máxima de proteína no conjugada de la columna. Esto puede conseguirse por monitorización de la separación de proteína no conjugada en el eluyente y detención del lavado únicamente cuando la proteína conjugada ya no se separa más. Pueden utilizarse pasos de lavado múltiples.

65

Después que se ha lavado el soporte sólido, la proteína conjugada fijada al soporte sólido se eluye.

La elución comprende poner en contacto el soporte sólido con la sustancia capaz de fijarse al resto de fijación de albúmina.

5 En una realización, esta elución puede conseguirse utilizando el mismo tampón o un tampón similar al utilizado en los pasos de carga y/o lavado. Por ejemplo, puede utilizarse un proceso simple de lavado y elución. Este método puede ser apropiado cuando el mismo tampón que se utiliza para lavar la proteína no fijada de la columna separará también eventualmente la proteína no fijada. Por ejemplo, pueden obtenerse fracciones diferentes de eluyente, comprendiendo las primeras fracciones una mayor proporción de proteína no fijada (no conjugada) y comprendiendo las últimas fracciones una mayor proporción de la proteína fijada (conjugada). De este modo pueden seleccionarse fracciones adecuadas a fin de proporcionar una forma purificada adecuada de la proteína conjugada, con un contenido reducido de proteína no conjugada.

15 Un enfoque de este tipo puede ser particularmente útil cuando la proteína conjugada se fija de modo relativamente débil al soporte sólido. Así puede seleccionarse un tampón de elución adecuado a fin de proporcionar la separación gradual de la proteína conjugada del soporte sólido. Dado que la proteína conjugada se fijará al soporte sólido y la proteína no conjugada no se fijará al soporte sólido, un método de este tipo puede conseguir todavía la separación y/o purificación de estos componentes.

20 Un método alternativo puede utilizar un componente particular en el tampón de elución para conseguir la elución de la proteína conjugada. Por ejemplo, una vez que se ha(n) completado el o los pasos de lavado arriba descritos, puede haberse conseguido una separación adecuada de proteína conjugada y no conjugada y puede desearse simplemente separar el producto de interés del soporte sólido. Esto puede lograrse por inclusión en el tampón de elución de un componente que compite con la sustancia en el soporte sólido para fijación por la proteína conjugada. Por ejemplo, el tampón de elución puede comprender un componente que se fija competitivamente al resto de fijación de albúmina. La adición de un componente de este tipo al tampón de elución permitirá la rotura de la unión entre el producto y el soporte sólido, liberando así el producto en el eluyente.

30 Este método puede utilizarse en donde el fijador de albúmina se fija débilmente al soporte sólido o en donde el fijador de albúmina se fija fuertemente al soporte sólido. En particular, este método de elución puede utilizarse en donde el fijador de albúmina no se separará del soporte sólido por continuación del o los pasos de lavado. Este método puede preferirse en el caso de que se desee conseguir un alto grado de separación entre las formas de proteína conjugada y no conjugada. Es decir, donde el fijador de albúmina se une fuertemente al soporte sólido, puede realizarse un lavado extenso o riguroso a fin de separar la cantidad máxima del o de los componentes no fijados del soporte sólido. En esta realización, dicho lavado extensivo no debería separar la proteína conjugada fijada del soporte sólido. En el caso de que la separación de los componentes no fijados es completa, por ejemplo cuando el eluyente del paso de lavado ya no comprende cantidad alguna de proteína, la elución de la proteína conjugada fijada puede conseguirse por adición de un componente de elución adecuado al tampón de elución.

40 Un componente de elución adecuado puede ser cualquier sustancia capaz de fijar competitivamente el resto de fijación de albúmina, como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, el tampón de elución puede comprender ciclodextrina. La ciclodextrina puede ser del tipo beta y/o alfa. La ciclodextrina puede ser también de un tipo modificado, tal como hidroxipropil-ciclodextrina. La ciclodextrina puede interaccionar así con el resto de fijación de albúmina, debilitando con ello la interacción entre dicho resto y el soporte sólido y liberando el mismo en el eluyente.

50 Una concentración adecuada de ciclodextrina para elución puede ser, por ejemplo, hasta 100 mM, tal como entre 1 mM y 100 mM, entre 1 mM y 50 mM, entre 5 mM y 20 mM. Una concentración adecuada de ciclodextrina y el tampón de elución puede ser aproximadamente 10 mM.

Los métodos arriba descritos pueden utilizarse para mejorar la pureza de la proteína que se conjuga con un fijador de albúmina y/o reducir la cantidad de proteína nativa no conjugada de una composición de dichos conjugados proteína-fijador de albúmina.

55 De acuerdo con ello, la presente invención se refiere a un método para purificación de una proteína que está conjugada a un resto de fijación de albúmina a partir de una mixtura que comprende (i) dicha proteína en dicha forma conjugada y (ii) dicha proteína en una forma que no está conjugada a dicho resto de fijación de albúmina, comprendiendo el método:

- 60 (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una sustancia capaz de fijarse específicamente al resto de fijación de albúmina, en donde dicha sustancia se selecciona del grupo constituido por albúmina y ciclodextrina;
- (b) poner en contacto dicho soporte sólido de (a) con dicha mixtura que comprende proteína y proteína conjugada en condiciones adecuadas para fijación del resto de fijación de albúmina a la sustancia definida en (a); y

(c) eluir los componentes fijados al soporte sólido, en donde dicha elución comprende poner en contacto el soporte sólido con la sustancia capaz de fijarse al resto de fijación de albúmina.

De acuerdo con estos métodos:

- 5 - la proteína puede ser cualquier proteína que se cita en esta memoria;  
 - el resto de fijación de albúmina puede ser cualquier fijador de albúmina o cualquier resto de fijación de albúmina como se describe en esta memoria;  
 - el soporte sólido y la sustancia utilizados en el paso (a) pueden ser cualquier soporte o sustancia descritos anteriormente en el contexto de soportes sólidos;  
 10 - el paso (b) representa un paso de carga y puede llevarse a cabo como se ha expuesto anteriormente;  
 - pueden incluirse uno o más pasos de lavado como los arriba descritos entre el paso (b) y el paso (c);  
 - dicho paso de elución (c) puede llevarse a cabo como se ha descrito arriba, por ejemplo, por inclusión de un componente adicional de elución tal como ciclodextrina en el tampón de elución.

15 Los pasos arriba descritos pueden llevarse a cabo una o más veces. Por ejemplo, una composición purificada preparada conforme a los métodos descritos en esta memoria puede someterse a pasos de purificación adicionales. Una composición purificada preparada de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria puede purificarse ulteriormente por repetición de los pasos de carga y elución arriba descritos (paso (b) y (c)).

20 Los métodos de cromatografía de afinidad descritos en esta memoria permiten también la reutilización del soporte sólido. Muchos métodos cromatográficos conducen a degradación o un cambio en las propiedades del soporte sólido, lo que significa que tales soportes sólidos tienen una duración de vida limitada o requieren regeneración entre usos. Dado que los soportes sólidos utilizados en los presentes métodos no se alteran o degradan por los métodos de purificación, los mismos pueden reutilizarse fácilmente sin necesidad de regeneración y con una duración de vida  
 25 más larga que otros soportes sólidos cromatográficos.

La presente invención se refiere por tanto a un método para purificación de una proteína que está conjugada a un resto de fijación de albúmina a partir de una mezcla que comprende (i) dicha proteína en dicha forma conjugada y (ii) dicha proteína en una forma que no está conjugada a dicho resto de fijación de albúmina, comprendiendo el  
 30 método:

- (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una sustancia capaz de fijarse específicamente al resto de fijación de albúmina, en donde dicha sustancia se selecciona del grupo constituido por albúmina y ciclodextrina;  
 (b) poner en contacto dicho soporte sólido de (a) con dicha mezcla que comprende proteína y proteína conjugada en condiciones adecuadas para fijación del resto de fijación de albúmina a la sustancia definida en (a); y  
 35 (c) eluir los componentes fijados al soporte sólido.

Dicha elución del paso (c) comprende poner en contacto el soporte sólido con la sustancia capaz de fijarse al resto de fijación de albúmina.  
 40

En una segunda realización, dicha sustancia es capaz de fijarse competitivamente al resto de fijación de albúmina.

En una tercera realización, dicha sustancia es ciclodextrina.  
 45

En una cuarta realización, dicha sustancia se aplica a dicho soporte sólido en un gradiente de concentración creciente en el paso (c).

En una quinta realización, la sustancia capaz de fijarse específicamente al resto de fijación de albúmina en el paso (a) es albúmina o ciclodextrina.  
 50

En una sexta realización, la proteína se selecciona de Factor VIII, hormona del crecimiento, Factor VII, GLP-1, insulina, o una forma variante de cualquiera de ellos.

En una séptima realización, el resto de fijación de albúmina prolonga la semivida de la proteína *in vivo*.  
 55

En una octava realización, el resto de fijación de albúmina comprende un ácido graso o derivado de ácido graso.

En otra realización, el derivado de ácido graso comprende un diácido graso con al menos 12 unidades metileno.  
 60

En otra realización, el ácido graso o derivado de ácido graso está enlazado a un factor de coagulación por un ácido siálico de un glucano enlazado a N.

En otra realización, la proteína de coagulación es Factor VII o Factor VIIa.  
 65

En otra realización, la proteína de coagulación es Factor VIII.

En otra realización, la proteína de coagulación es Factor IX.

5 En una realización final, el resto de fijación de albúmina es como se define en la Figura 1C o la Figura 11C.

#### Abreviaturas:

|    |  |
|----|--|
| 10 | ABz: ácido aminobenzoico o aminobenzoílo                                   |
|    | Boc: <i>tert</i> -butiloxicarbonilo  |
|    | CD: ciclodextrina  |
|    | CMP: citidina-monofosfato  |
|    | CV: volúmenes de columna   |
| 15 | DCM: diclorometano, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , cloruro de metileno  |
|    | DIC: diisopropilcarbodiimida   |
|    | DIPEA: N,N-diisopropiletilamina  |
|    | DMF: N,N-dimetilformamida  |
|    | DMSO: dimetilsulfóxido   |
|    | FLD: detección de fluorescencia  |
| 20 | Fmoc: 9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo                                       |
|    | GSC: ácido glicil-siálico, éster de CMP                                    |
|    | HC: cadena pesada  |
|    | HOAt: 7-azahidroxibenzotriazol   |
|    | HOBt: hidroxibenzotriazol  |
| 25 | HPCD: hidroxipropil-β-ciclodextrina  |
|    | HPLC: cromatografía líquida de alta presión                                |
|    | Lac: lactosilo o lactosa   |
|    | LC: cadena ligera  |
|    | LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas                       |
| 30 | Lys(Mtt)-OH: ácido (S)-6-[(difenil-p-tolil-metil)-amino]-2-amino-hexanoico |
|    | m/z: ratio de masa a carga   |
|    | MBP: proteína de fijación de manosa  |
|    | MQ: agua MilliQ (agua sumamente purificada)                                |
|    | MS: espectrometría de masas  |
| 35 | NAN: ácido N-acetil-neuramínico  |
|    | NMP: N-metilpirrolidin-2-ona   |
|    | NMR: espectroscopía de resonancia magnética nuclear                        |
|    | OEG: ácido (2-[2-(amino)etoxi]etoxi)acético                                |
|    | O-t-Bu: éster <i>tert</i> -butílico  |
| 40 | PSC: polietilenglicol-ácido siálico, éster de CMP                          |
|    | RP: fase inversa   |
|    | ta o TA: temperatura ambiente  |
|    | SC: cadena simple (HC y LC están enlazadas covalentemente)                 |
|    | t-Bu: <i>tert</i> -butilo  |
| 45 | TFA: ácido trifluoroacético  |
|    | THF: tetrahidrofurano  |
|    | Thx: ácido <i>trans</i> -4-aminometilciclohexanocarboxílico                |
|    | TIPS: triisopropilsilano   |
|    | UM: 4-metilumbeliferilo  |
| 50 | wt: tipo salvaje.  |

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

55 Las abreviaturas de los tampones están de acuerdo con Stoll, V.S. y Blanchard, J.S., *Methods of Enzymology*, 182, 1990, Academic Press, 24-38.

#### **EJEMPLOS**

##### **Ejemplo 1. Preparación de una columna de ciclodextrina**

60 Se preparó una columna de Sepharose con β-CD inmovilizada a partir del producto Sigma M2314, 6-monodesoxi-6-monoamino-beta-ciclodextrina y una columna NHS Hitrap (GE Healthcare). La columna Hitrap contenía 10 μmol de grupos reactivos. Se disolvieron 5 μmol de amino-CD M2314 (PM1171, 5,9 mg) se disolvieron en 1 mL de tampón de acoplamiento.

65

|    |  |                           |
|----|--|---------------------------|
| A: | NaHCO <sub>3</sub> 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3 | (Tampón de acoplamiento)  |
| B: | etanolamina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3        | (tampón de desactivación) |
| C: | NaOAc 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4,0              | (tampón de lavado)        |
| D: | glicina 2 M-HCl, pH 2,0                      | (tampón de acidificación) |

5 El acoplamiento se realizó estrictamente de acuerdo con el protocolo de instrucciones de GE Healthcare 71-7006-00 AT para columnas HiTrap. Resumidamente, se utilizó 1 mL de la solución de amino-CD para el acoplamiento que se llevó a cabo durante 40 min a la temperatura ambiente. El rendimiento de acoplamiento no se determinó. La columna se desactivó luego repetidamente (tampón B)/lavó (tampón C) conforme al protocolo.

**Ejemplo 2. Preparación de una columna HSA**

10 Se preparó una columna Sepharose-HSA utilizando una columna NHS HiTrap de 1 mL como en el Ejemplo 1. La sustitución fue de 10 µmol/mL. Se utilizó HSA de Sigma (A1653). Se prepararon aprox. 1,5 mL de una solución de 10 mg/mL (0,15 µmol/mL) en tampón A y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm.

|    |   |                           |
|----|---|---------------------------|
| A: | 0,2 M NaHCO <sub>3</sub> , NaCl 0,5 M, pH 8,3 | (Tampón de acoplamiento)  |
| B: | 0,5 M etanolamina, NaCl 0,5 M, pH 8,3         | (tampón de desactivación) |
| C: | NaOAc 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4,0               | (tampón de lavado)        |
| D: | glicina 2 M-HCl, pH 2,0                       | (tampón de acidificación) |

15 El acoplamiento se realizó estrictamente de acuerdo con el protocolo de instrucciones de GE Healthcare 71-7006-00 AT para columnas HiTrap. Se utilizó 1 mL de la solución de HSA. El rendimiento de acoplamiento se determinó conforme al método "acidificación a pH 2,5":

20 Después de acoplamiento (en tampón A), la columna se lavó con tampón A y se recogieron 3 mL de líquido de lavado. Se diluyeron 50 µL de la solución con 50 µL de tampón D, es decir el lavado se diluyó 6 veces. La solución de acoplamiento original, 50 µL, se diluyó con 50 µL de tampón D, y luego 10 veces con tampón A: tampón D 1:1, es decir dilución total: 20 veces. Se midió A280 por triplicado para las dos soluciones:

| Muestra   | A280  | Media | Sin diluir |
|---|-------|-------|------------|
| Solución de acoplamiento diluida 20 veces       | 0,225 | 0,225 | 4,50       |
|   | 0,244 |       |            |
|   | 0,207 |       |            |
| Lavado diluido 6 veces                          | 0,228 | 0,215 | 1,29       |
|   | 0,221 |       |            |
|   | 0,197 |       |            |
| Eficiencia de acoplamiento: (4,50-1,29)/4,5=71% |       |       |            |

25 La columna se desactivó luego repetidamente (tampón B)/lavado (tampón C) conforme al protocolo. A continuación, se cambió el tampón a HEPES 50 mM, pH 7,5. Lavado durante aprox. 45 min. La misma se lavó finalmente con imidazol 20 mM, a pH 7,3, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM durante aprox. 30 minutos.

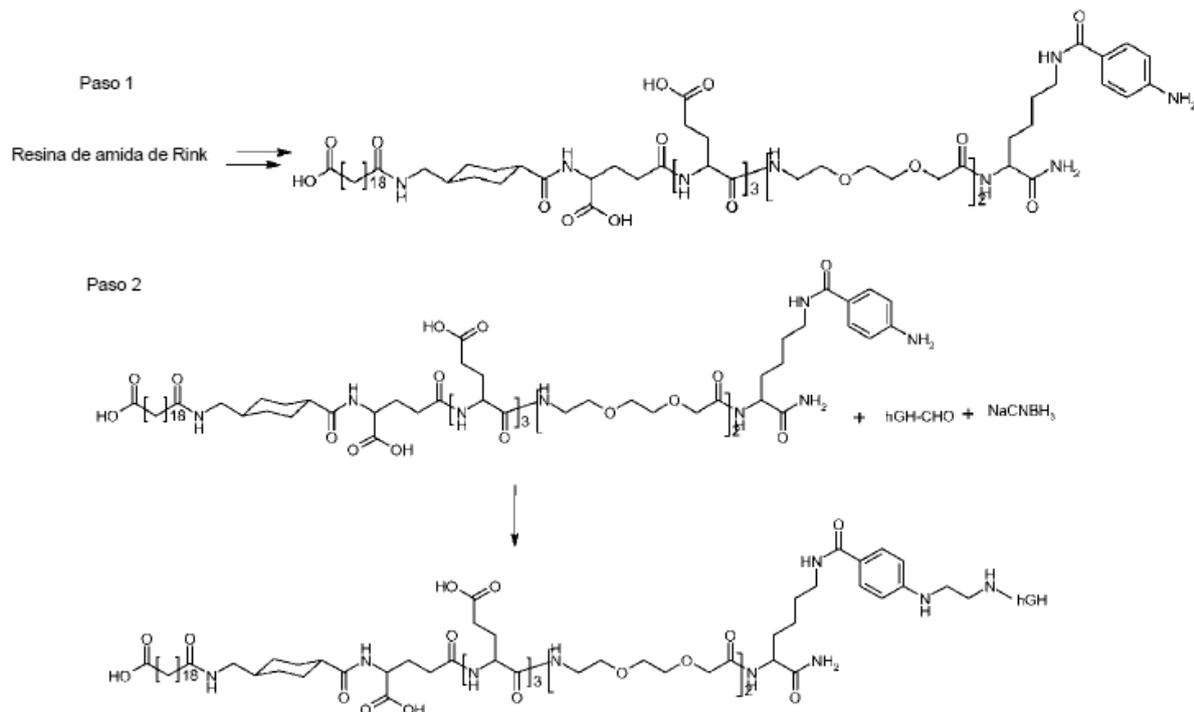
**Ejemplo 3. Preparación de una columna de referencia, sin ligando de afinidad unido alguno**

30 Se preparó una columna de referencia siguiendo el protocolo expuesto en el Ejemplo 1, excepto que el paso de acoplamiento se cambió por un lavado con 6 mL de tampón de desactivación + reacción durante 30 min.

**Ejemplo 4. Separación de hGH y conjugado fijador de albúmina-hGH en la columna de ciclodextrina del Ejemplo 1.**

35 Se preparó un conjugado fijador de albúmina-hGH que tenía una estructura como se muestra en la Figura 1C y se purificó por HPLC utilizando el procedimiento siguiente:

40 La preparación se reseña en el esquema que sigue. La misma consistía en dos pasos:  
 Paso 1: Preparación de un fijador de albúmina que contenía un asa de anilina para conjugación a un hGH-aldehído  
 Paso 2: Conjugación al hGH-aldehído. La función aldehído está localizada en el residuo Gln-141 de hGH.



### Paso 1

- 5 Se pesó resina de amida de Rink protegida con Fmoc (2,0 g, 0,6 mmol/g) en un matraz de reacción y se hinchó en 3 x 30 mL de NMP. La resina se escurrió y se trató dos veces con 30 mL de piperidina al 25% en NMP, durante 10 min y 1 hora respectivamente. La resina se escurrió y se lavó con 6 x 30 mL de NMP.
- A continuación, se pesaron Fmoc-Lys (Mtt)-OH (1500 mg, 2 eq) y HOBt (324 mg, 2,4 eq) y se disolvieron en 20 mL de azul de bromofenol 0,5 mM en NMP. Esta solución se añadió a la resina escurrida seguido por la adición de DIC (374  $\mu$ L, 2,4 eq). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 3,5 horas hasta cambio de color desde azul oscuro a verde claro. Finalmente, la resina se escurrió y se lavó con 6 x 30 mL de NMP, 3 x 30 mL de DCM, y se escurrió.
- 10
- 15 La resina se trató con 10 mL de hexafluoroisopropanol durante 10 minutos (con agitación). Se escurrió la misma, y se lavó con 3 x 30 mL de DCM, y se repitieron el tratamiento con hexafluoroisopropanol y el lavado. Finalmente, la resina se escurrió y se lavó con 3 x 30 mL de NMP.
- Se pesaron Boc-4-ABz-OH (569 mg, 2,4 eq.) y HOBt (324 mg, 2,4 eq.) y se disolvieron en 20 mL de azul de bromofenol 0,5 mM en NMP. Se añadió esta solución a la resina escurrida seguido por la adición de DIC (374  $\mu$ L, 2,4 eq.). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche hasta cambio de color de azul oscuro a verde claro. La resina se escurrió y se lavó con 6 x 30 mL de NMP. Se tomó una pequeña cantidad de cuentas para testar la escisión con TFA demostrando que el producto deseado se fijaba a la resina.
- 20
- 25 La resina se escurrió y se trató dos veces con 30 mL de piperidina al 25% en NMP, durante 10 min y 1 hora respectivamente. La resina se escurrió, se lavó con 6 x 30 mL de NMP, y se escurrió dejando la resina húmeda 10 g (húmeda). Una cantidad de 1,7 g (0,2 mmol) de la resina húmeda se retiró para reacción ulterior.
- El acoplamiento de Fmoc-OEG-OH se realizó utilizando el procedimiento siguiente: Se pesaron Fmoc-OEG-OH (154 mg, 2 eq. comparado con la carga de resina) y HOBt (135 mg, 2 eq.) y se disolvieron en 5 mL de azul de bromofenol 0,5 mM en NMP. Se añadió esta solución a la resina escurrida seguido por la adición de DIC (62  $\mu$ L, 2 eq.). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche hasta cambio de color desde azul oscuro a verde claro. Finalmente, se escurrió la resina, se lavó con 6 x 5 mL NMP, y se escurrió. Se escurrió la resina y se trató dos veces con 5 mL de piperidina a 25% en NMP, durante 10 min y 1 hora respectivamente. La resina se escurrió y se lavó con 6 x 5 mL de NMP. A continuación, el acoplamiento de Fmoc-OEG-OH (tiempo de
- 30
- 35

acoplamiento 3,5 horas) y la separación del grupo Fmoc se repitieron a fin de obtener un compuesto con dos grupos terminales OEG y una amina libre.

En los 5 pasos siguientes, los aminoácidos Fmoc-Glu(O-t-Bu)-OH (3 acoplamientos, Fmoc-Glu-OtBu (un acoplamiento) y ácido Fmoc-tranexámico se acoplaron y se desprotegió Fmoc por el mismo procedimiento que para Fmoc-OEG-OH arriba descrito, con las cantidades y condiciones siguientes (HOBt: 135 mg, 2 eq. DIC: 62  $\mu$ L, se utilizaron 2 eq. para todos los acoplamientos):

1° acoplamiento: Fmoc-Glu(OtBu)-OH: 170 mg, 2 eq., tiempo de acoplamiento: una noche

2° acoplamiento: Fmoc-Glu(OtBu)-OH: 170 mg, 2 eq., tiempo de acoplamiento: 2 h

3° acoplamiento: Fmoc-Glu(OtBu)-OH: 170 mg, 2 eq., tiempo de acoplamiento: una noche

4° acoplamiento: Fmoc-Glu-OtBu: 170 mg, 2 eq., tiempo de acoplamiento: una noche

5° acoplamiento: Fmoc-Thx-OH: 152 mg, 2 eq., tiempo de acoplamiento: una noche

Finalmente, el grupo Fmoc se retiró como se ha descrito arriba.

Se pesaron ácido dodecanodioico, éster mono-tBu ( $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOtBu}$ , 159 mg, 2 eq., véase WO 2005/012347 A2) y HOBt (135 mg, 2 eq.) y se disolvieron en 5 mL de azul de bromofenol 0,5 mM en NMP. Se añadió esta solución a la resina escurrida, seguido por la adición de DIC (62  $\mu$ L, 2 eq.). El tiempo de acoplamiento fue una noche. Finalmente, la resina se lavó con 6 x 5 mL de NMP, 6 x 5 mL de DCM y se escurrió.

La resina se trató con 5 mL de TFA:agua:DCM:TIPS y 6,3/0,3/2,9/0,4 (v/v) durante 1 hora (con agitación) y se filtró en 50 mL de dietil-éter frío. El precipitado generado se aisló por centrifugación, se lavó 3 veces con dietil-éter, y se secó a la temperatura ambiente durante una noche dejando el producto bruto como un sólido, 160 mg.

El sólido bruto se disolvió en una mezcla de TFA, agua, acetonitrilo y DMSO, y se purificó por RP-HPLC preparativa utilizando un gradiente de 40-80% acetonitrilo. El compuesto puro se aisló como un sólido, 70 mg, y se identificó por LC-MS.

## Paso 2

Se prepararon las soluciones siguientes

Solución 1:  $\text{N}^{\text{E}141}$ -(2-hidroxi-3-aminopropil)-hGH (200 mg, 9  $\mu$ mol, en 150 mL de tampón, véase WO 2005070468A2) disuelto en tampón de trietanolamina 20 mM, NaCl 0,12 M.

Solución 2: El compuesto aislado en el paso 1 (30 mg, 2 eq.) disuelto en 3,6 mL de AcOH y 2,4 mL de agua.

Solución 3: 3-metiltilio-1-propanol: 290 mg disueltos en 4 mL de agua

Solución 4:  $\text{NaIO}_4$  (48 mg) disuelto en 1 mL de agua.

Solución 5:  $\text{NaCNBH}_3$  (22 mg disueltos en 50  $\mu$ L de agua + 15  $\mu$ L de AcOH): se utilizaron 2 eq., 20  $\mu$ mol, 30  $\mu$ L.

La solución 1 se envolvió en papel metalizado Alu, seguido por adición de solución 3 (4,4 mL) y solución 4 (333  $\mu$ L). La mezcla de reacción se incubó en el frigorífico durante 40 minutos. La mezcla de reacción se cambió de tampón a MES 50 mM, pH 6,0 utilizando un dispositivo de ultrafiltración Amicon Ultracel 10 k (centrifugación 4 veces (4000 rpm/min, 10°C, 10-20 minutos). El volumen final era 10 mL. Se añadió la solución 2 a esta solución. La mezcla de reacción se agitó suavemente a la temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual se añadió la solución 5 (30  $\mu$ L). La reacción se dejó continuar durante una noche.

Después de 20 horas de tiempo de reacción, se observó por HPLC una conversión de aprox. 60% en el conjugado de hGH deseado. La mezcla de reacción se diluyó con 20 mL de agua y se filtró. La mezcla de reacción se cambió de tampón a agua utilizando un dispositivo de ultrafiltración Amicon Ultracel 10 k (centrifugación 4 veces (4000 rpm/min, 10°C, 15 minutos). El volumen final era 10 mL. La solución se añadió lentamente a 30 mL de trietanolamina al 20%, pH 8,5. El pH final de la solución era 8,5. Esta solución se cambió luego de tampón a dietanolamina 20 mM, pH 8,5 utilizando un dispositivo de ultrafiltración Amicon Ultracel 10 k (centrifugación 4 veces (4000 rpm/min, 10°C, 15 minutos). El volumen final era 47 mL.

La solución se aplicó a una columna Mono-Q 10/100 (GE-Healthcare) y se eluyó utilizando trietanolamina 20 mM, pH 8,5 como tampón de partida (A) y trietanolamina 20 mM, pH 8,5, NaCl 1 M como tampón de elución (B). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se eluyeron alrededor de tampón B 400 mM y se agruparon. Estas fracciones agrupadas se cambiaron de tampón y se purificaron de nuevo utilizando el mismo sistema cromatográfico. Las fracciones que contenían el producto deseado se cambiaron de tampón a bicarbonato de amonio 10 mM utilizando un dispositivo de ultrafiltración Amicon Ultracel 10 k (centrifugación 4 veces (4000 rpm/min,

10°C, 15 minutos). El volumen final era 9 mL. Finalmente, se liofilizó la solución, obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco, 14,7 mg. El producto denominado 005 se identificó por LC-MS.

Experimento cromatográfico:

5 Se mezclaron 0,5 mg de hGH con 0,5 mg del conjugado fijador de albúmina-hGH 005.

La mixtura se sometió a cromatografía en la columna descrita en el Ejemplo 1 utilizando las condiciones siguientes:

|           |   |
|-----------|---|
| Caudal:   | 0,5 ml/min  |
| Tampón A: | imidazol 20 mM, CaCl <sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, 10 % glicerol |
| Tampón B: | A + hidroxipropil-ciclodextrina 20 mM                                       |
| Temp:     | 22°C  |

10 La Figura 1A muestra el perfil de gradiente de elución, y la Figura 1B muestra el cromatograma que se obtuvo. Todos los cromatogramas son señales FLD (ext. 280, emm. 348). La Figura 2 muestra los perfiles de espectrometría de masas para la fracción 1 (Figura 2A) y la fracción 7 (Figura 2B). La fracción 1 se identificó como hGH no modificada, y la fracción 7 se identificó como conjugado fijador de albúmina-hGH.

15 Este ejemplo muestra que hGH y un conjugado hGH-fijador de albúmina pueden separarse en una columna con ciclodextrina inmovilizada.

20 **Ejemplo 5: Separación de hGH y conjugado fijador de albúmina-hGH en la columna de referencia del Ejemplo 3.**

Las condiciones fueron como se expone en el Ejemplo 4. No se observó separación alguna entre hGH y el conjugado hGH-fijador de albúmina (véase Figura 3). Esto demostraba que la interacción de afinidad en la columna de ciclodextrina es específica. Todos los cromatogramas son señales FLD.

25 **Ejemplo 6: Separación de hGH y conjugado fijador de albúmina-hGH en la columna de albúmina del Ejemplo 2.**

30 El hGH y el conjugado fijador de albúmina-hGH se procesaron utilizando la columna descrita en el Ejemplo 2.

Muestra hGH: 2 mg/ml en HEPES 20 mM pH 7,5

Muestra: Mixtura de hGH / conjugado hGH-fijador de albúmina conforme al Ejemplo 4, 2 mg/ml en HEPES 20 mM pH 7,5

Caudal: 0,5 ml/min

Tampón A: imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3

Tampón B: 35% i-PrOH en A

Temp: 25°C

La Figura 4 muestra los cromatogramas resultantes. Todos los cromatogramas son señales FLD. Se incluyó luego la ciclodextrina en el tampón B como sigue:

A: imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3

B: HPCD 10 ó 20 mM en A

Temp: 22°C

35 La figura 5 muestra los cromatogramas resultantes. Todos los cromatogramas son señales FLD.

40 Este ejemplo muestra que hGH y un conjugado hGH-fijador de albúmina pueden separarse en la columna con HSA inmovilizada del Ejemplo 2; sin embargo, la eficiencia de separación de esta columna es mucho más pobre que la columna CD inmovilizada del Ejemplo 1.

**Ejemplo 7: Separación de FVIII y conjugado fijador de albúmina-FVIII, en la columna de albúmina del Ejemplo 2.**

El Factor VIII y un conjugado fijador de albúmina-FVIII preparado de acuerdo con el Ejemplo 11 se procesaron utilizando la columna descrita en el Ejemplo 2.

5 La molécula de Factor VIII utilizada en este ejemplo (N8) era una proteína Factor VIII delecionada del dominio B (Thim et al. Haemophilia (2010), 16, 349). El fijador de albúmina utilizado en el conjugado de FVIII en este experimento era como se muestra en la Figura 11C

10 Se utilizó un gradiente escalonado, que saltaba desde 0% a 20% a 60% a 100% de tampón B. La Figura 6A muestra el cromatograma resultante. Todos los cromatogramas son señales FLD. Se encontró que la mezcla de reacción bruta contenía un compuesto que era más retenido en la columna comparado con FVIII.

15 La Figura 6B muestra un cromatograma resultante del uso de 30 µL de conjugado FVIII-fijador de albúmina, mezcla de reacción bruta, inyectado (aprox. 60 µg proteína).

Se llevó a cabo la SDS-PAGE sobre las fracciones que se muestran en la Figura 6B. Se tomaron 20 µL de cada fracción. Para N8 y 152-1: se diluyeron 20 µL de solución x 150. Se añadió a todas las muestras una cantidad apropiada de trombina. Se incubaron éstas durante 10 min a 37°C y se añadieron luego 7,5 µL de tampón LDS.

Procedimiento: Protocolo de Invitrogen  
 Gel: Gel de Tris-acetato Nupage al 7%, 1,0\*15 pocillos  
 Tampón: Tampón de ejecución SDS Tris-acetato Nupage (20x). 40 µL diluidos con 760 µL de agua MQ  
 Tampón de Muestra: Tampón de muestra LDS Nupage (4x)  
 Marcador: Estándar HPM HiMark  
 Programa: 70 min, 150 v, 120 mA & 25 W  
 Volumen: 7 µL/pocillo  
 Kit de tinción: SilverQuest (sin fijación)

20 Los resultados se muestran en la Figura 7. Se encontró que el conjugado FVIII fijador de albúmina se fijaba a la columna, y podía eluirse nuevamente con tampón que contenía HPCD.

25 **Ejemplo 8. Separación de FVIII y conjugado fijador de albúmina-FVIII, en la columna de ciclodextrina del Ejemplo 1.**

Se utilizaron las mismas condiciones del Ejemplo 4. 158-1 y 158-11 representan dos preparaciones en las cuales FVIII se ha modificado parcialmente con un fijador de albúmina.

30 Los resultados se muestran en la Figura 8. En estos cromatogramas puede verse que las dos preparaciones exhiben grados de modificación diferentes.

35 **Ejemplo 9. Separación de FVIII y el conjugado fijador de albúmina-FVIII (convertido parcialmente, mezcla de reacción bruta) en la columna de ciclodextrina del Ejemplo 1.**

Los reactivos utilizados fueron como sigue:

| Reactivo                           | Cantidad      | Cantidad  | Concentración         | eq |
|------------------------------------|---------------|-----------|-----------------------|----|
| Factor VIII                        | 0,25 mg       | 1,44 nmol | 5 mg/ml               | 1  |
| Sialidasa, * 0,6m U/µl             | 26 mU/12,5 µl | 6,5 mU    | 0,6→1,8 U/ml gel      |    |
| MBP-ST3Gal3                        | 25 µl         | 22 mU     | 0,9 mg/ml / 1,06 U/mg |    |
| Sustrato 1 Fijador de albúmina GSC | 15 µl         | 15 nmol   | 1 nmol/µl             | 10 |

40 Se descongelaron 0,25 mg de N8 (carga interna, en 50 µL). Se lavó sialidasa inmovilizada con 3 x 50 µL de H<sub>2</sub>O, seguido por 3 x 50 µL de tampón HEPES. Se separó éste por centrifugación y se eliminó el exceso de tampón. Se descongeló MBP-ST3Gal-III. Se descongeló el Sustrato 1.

45 Se añadieron a la sialidasa lavada: N8 (50 µL); MBP-ST3Gal-III (25 µL); Sustrato 1 (15 µL). La reacción se incubó a 32°C durante un periodo de 1 hora. Se apartaron 5 µL para análisis por HPLC (columna CD) y se diluyeron hasta 50 µL con tampón A. Se inyectaron 50 µL.

La Figura 9A muestra la realización analítica.

Caudal: 0,5 ml/min  
 Tampón A: imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, 10 % glicerol  
 Tampón B: A + 20 mM HPCD  
 FLD: ext 280, emm 348 (para F8)  
 Temp: 22°C

Se filtró la mixtura de reacción, utilizando una columna Pierce Spin. Volumen aprox. 85 µL. La mixtura completa se aplicó a la columna CD, conforme al método anterior. La Figura 9B muestra la realización preparativa.

5 Se recogieron manualmente las fracciones siguientes:

|              |                  |              |                 |
|--------------|------------------|--------------|-----------------|
| Fracción 3:  | 2,0 → 2,5 min.   | Fracción 4:  | 2,6 → 3,0 min.  |
| Fracción 5:  | 3,1 → 4,1 min.   | Fracción 6:  | 4,2 → 5,2 min.  |
| Fracción 7:  | 5,3 → 6,3 min.   | Fracción 8:  | 6,4 → 7,4 min.  |
| Fracción 9:  | 7,5 → 8,0 min.   | Fracción 10: | 8,1 → 9,0 min.  |
| Fracción 11: | 9,1 → 9,4 min.   | Fracción 12: | 9,5 → 10,0 min. |
| Fracción 13: | 10,1 → 10,6 min. | Fracción 14: | 10,7 → 11,2min  |
| Fracción 15: | 11,3 → 12,0 min. | Fracción 16: | 12,1 →          |

La Figura 10A muestra el contenido de proteína en cada una de las fracciones como se mide por NanoDrop (A280, E1%, 14,6).

10 El gel SDS-PAGE demostró que las fracciones N8 no modificadas (fracciones 3-5) se habían separado del conjugado fijador de albúmina-N8 (fracciones 9-12) v.g. por comparación de las fracciones 5 y 11 (desplazadas ligeramente hacia masa mayor en las muestras escindidas con trombina). Véase la Figura 10B.

15 **Ejemplo 10. Mono-funcionalización de FVIII-O-glucano deleciónado del dominio B de tipo salvaje utilizando ST3Gal-I y aislamiento del producto utilizando una columna CD**

20 Se mezcló FVIII deleciónado del dominio B de tipo salvaje (5,7 mg/mL, 352 µL, 10,2 nmol) en tampón (imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,02% Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, NaCl 500 mM) con sialidasa (*A. urifaciens*, 12 µL, 0,43 mg/mL, 130 U/mL, ref.: Christensen y Egebjerg, Biotechnol. Appl. Biochem., 41, 225-231), His-ST3Gal-I (21,6 U/mg, 100 µL) y Sustrato 1 (150 µL, 200 nmol). El Sustrato 1 se muestra en la Figura 11C.

25 La mixtura se incubó a 32°C durante 2,5 horas, después de lo cual se aisló el conjugado FVIII por cromatografía de afinidad de ciclodextrina: El material se cargó en la columna de ciclodextrina inmovilizada y se lavó con 18 mL de tampón de partida imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, 10% glicerol. La elución se realizó como un paso para 100% de tampón de elución, imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, 10% glicerol, hidroxipropilciclodextrina 20 mM, con lo cual el producto se eluyó como 730 µg en 2,5 mL (véase Figura 11). El producto se trató luego con CMP-NAN (40 µL, 34 mg/mL) y MBP-SBD-ST3Gal-III (200 µL, 0,33 mg/mL, aprox. 0,5 U/mL) a 32°C durante 1 hora, y se congeló a -80°C.

30 Después de descongelación, el producto se purificó en una columna rotativa AIEC (Vivapure Q Mini M, intercambio de aniones fuertes) que se había equilibrado con 10 mL de imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,02% Tween 80, glicerol 1M, pH 7,3. Después de ello, la columna se lavó con

1. 2x10 ml de 20 mM imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,02 % Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3,
- 35 2. 2x10 ml de 20 mM imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,02 % Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, NaCl 50mM
3. 2x10 ml de 20 mM imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,02 % Tween 80, glicerol 1 M, pH 7,3, 200 mM NaCl.

40 Finalmente, el conjugado de FVIII se eluyó con imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,02% Tween 80, glicerol 1M, pH 7,3, NaCl 1 M, dando el conjugado 586 µg en 700 µL. Se aplicó el mismo a una columna de filtración con gel Superdex 200 10/300 GL, y se eluyó con histidina (1,5 mg/mL), CaCl<sub>2</sub> (0,25 mg/mL), Tween 80 (0,1 mg/mL), NaCl (18 mg/mL), sacarosa (3 mg/mL).

45 El eluato contenía un producto principal que se eluyó con 0,58 volúmenes de columna, que se recogieron y contenían 348 µg del conjugado deseado en 2,5 mL. El producto se caracterizó por SDS-PAGE no reducida indicando que las bandas correspondientes a A1 y A3C1C2 que contenían los glucanos modificados se desplazaban

hacia PM mayor. Asimismo, la cromatografía analítica de afinidad de ciclodextrina con y sin FVIII delecionado del dominio B de tipo salvaje demostró que el conjugado (denominado 17754-235-III) se fijaba a ciclodextrina, mientras que el FVIII delecionado del dominio B de tipo salvaje no lo hacía (véase la Figura 11B).

5 **Ejemplo 11. Acoplamiento del Sustrato 1 a los N-glucanos de FVIII delecionado del dominio B de tipo salvaje utilizando ST3Gal-III.**

10 Se obtuvo asialo-FVIII delecionado del dominio B de tipo salvaje por sometimiento a una reacción de PEGilación utilizando sialidasa (*A. urifaciens*), ST3Gal-I, y PSC de 40 kDa como se describe en WO 2009/108806 A1. Una vez completada la reacción, se separó el asialo-VIII (no PEGilado) del FVIII PEGilado por AIEC. Finalmente, el asialo-FVIII se cambió de tampón utilizando una columna AIEC MonoQ. Una cantidad de 37,4 mg del asialo-FVIII aislado de la primera 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 histidina tampón (1,5 mg/mL), CaCl<sub>2</sub> (0,25 mg/mL), Tween 80 (0,1 mg/mL), NaCl (50 mM), y sacarosa (3 mg/mL). El producto se eluyó utilizando un gradiente de histidina tampón (1,5 mg/mL), CaCl<sub>2</sub> (0,25 mg/mL), Tween 80 (0,1 mg/mL), NaCl (1M), sacarosa (3 mg/mL). El producto se eluyó en NaCl aprox. 500 mM.

20 El asialo-FVIII delecionado del dominio B de tipo salvaje obtenido como anteriormente (1 mg, 5,6 nmol, en 800 µL de histidina tampón (1,5 mg/mL), CaCl<sub>2</sub> (0,25 mg/mL), Tween 80 (0,1 mg/mL), NaCl (500 mM), sacarosa (3 mg/mL)) se trató con ST3Gal-III (500 µL, se concentró a 50 µL, 500 mU) y Sustrato 1 (45 µL, 60 mmol). La reacción se incubó a 32°C durante 21,5 horas (producto bruto).

25 Se retiró una muestra para análisis por SDS-PAGE. A continuación, se añadió una solución de CMP-NAN (2 mg, 3,1 µmol en 20 µL de tampón (imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,02% Tween 80, NaCl 500 mM, glicerol 1 M, pH 7,3)) y se incubó a 32°C durante 1 hora.

30 La mezcla de reacción se diluyó a 19 mL con aprox. 18 mL de imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,02% Tween 80, NaCl 500 mM, glicerol 1 M, pH 7,3. La concentración de sales era entonces aprox. 28 mM. El producto se purificó luego por AIEC en columna rotativa como se reseña en el Ejemplo 10. El conjugado (820 µg) se recuperó en 1 mL. Se aplicó el mismo a una columna de filtración con gel Superdex 200 10/300 GL, y se eluyó con histidina tampón (1,5 mg/mL), CaCl<sub>2</sub> (0,25 mg/mL), Tween 80 (0,1 mg/mL), NaCl (18 mg/mL), sacarosa (3 mg/mL). El eluato contenía un pico a aprox. 0,43 volúmenes de columna y otro pico a aprox. 0,58 volúmenes de columna. El primer pico se identificó por SDS-PAGE, y estaba constituido por STGal-III (probablemente en forma agregada). El segundo pico contenía el segundo conjugado, que se aisló como 273 µg en 2,5 mL. El producto se caracterizó por SDS-PAGE no reducida con escisión previa de trombina, con arreglo a lo cual las bandas correspondientes a A1 y A3C1C2 que contenían los glucanos modificados se desplazaban claramente hacia PM mayor.

40 **Ejemplo 12. Caracterización de hGH y conjugado hGH-fijador de albúmina en la columna CD con sistemas tampón diferentes**

Se utilizó la columna de ciclodextrina del Ejemplo 1. Se inyectaron en la columna hGH y el conjugado de hGH [005] y se eluyeron con un gradiente escalonado como se describe en el Ejemplo 4. Se investigaron los sistemas tampón siguientes:

45 Sistema tampón 1 (véase Figura 12A):

A: imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, 10 % glicerol

B: imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, 10 % glicerol + HPCD 20mM

Sistema tampón 2 (véase Figura 12B):

A: imidazol 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3

50 B: imidazol 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3 + HPCD 20mM

Sistema tampón 3 (véase Figura 12C):

A: 20 mM Tampón trietanolamina, pH 7,3

B: 20 mM Tampón trietanolamina, pH 7,3 + HPCD 20mM

55 Los analitos utilizados fueron como sigue:

hGH: 1,5 mg/0,5 mL. Se inyectaron 5 µL.

005: (hGH de fijación de albúmina). 0,6 mg/0,5 mL. Se inyectaron 7 µL.

La Figura 12 muestra que el conjugado hGH-fijador de albúmina 005 se fija a la columna CD con indiferencia del sistema tampón, mientras que hGH por sí mismo no lo hace, por lo cual los compuestos son separables.

5

El tercer cromatograma es una muestra en blanco. El cuarto ilustra el gradiente escalonado.

### **Ejemplo 13. Caracterización de diferentes conjugados hGH-fijador de albúmina utilizando la columna CD**

10 El sistema tampón 1 del Ejemplo 12 se utilizó para comparación de la fijación de tres conjugados hGH-fijador de albúmina diferentes a la columna CD del Ejemplo 1. Otras condiciones eran iguales que en el Ejemplo 12.

15 La Figura 13A muestra que únicamente 005 se fija a la columna CD, mientras que los conjugados hGH-fijador de albúmina 007 y 0012 se retardan en la columna, dado que el conjugado fijador de albúmina-hGH comienza a eluirse antes de la adición del tampón B. La impurificación con hGH en las muestras 007 y 0012 demostraba que estos conjugados se retardaban en la columna CD (Figura 13B).

### **Ejemplo 14. Separación de FVIIa y el conjugado fijador de albúmina-FVIIa en la columna de ciclodextrina del Ejemplo 1.**

20

Se utilizaron los reactivos siguientes:

25 Asialo FVIIa (carga interna): en tampón Gly-Gly, pH 6 (1,39 mg/mL), 300 µL, se utilizaron 13 nmol de Sustrato 1 (fijador de albúmina-GSC): (PM 1869: se utilizaron 2 mg/mL, 30 µL 32 nmol)

25

MBP-SBP-ST3Gal-III: 1,2 U/mL, se utilizaron 100 µL.

30 Asialo-FVIIa se refería a un FVIIa recombinante que había sido pretratado previamente con una sialidasa y se había purificado. Se descongeló asialo-FVIIa, y se añadieron Sustrato 1 y ST3Gal-III. La mezcla se incubó a 32°C. Después de 110 min. se separó una muestra en la columna CD del Ejemplo 1. Las condiciones cromatográficas eran como en el Ejemplo 9. La Figura 14 muestra el resultado. El primer pico que se eluía correspondía a asialo-FVIIa sin modificar, y el último pico que se eluía correspondía al asialo-FVIIa modificado con el fijador de albúmina, como se muestra por un aumento de peso molecular de las cadenas pesada y ligera de FVIIa utilizando SDS-PAGE.

30

### **Ejemplo 15. Separación de FIX y el conjugado fijador de albúmina-FIX en la columna de ciclodextrina del Ejemplo 1.**

35

Se utilizaron los reactivos siguientes:

40 FIX (carga interna): en histidina 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, tampón de NaCl 50 mM de pH 6 (11 mg/mL). Se diluyeron 100 µL (20 nmol) a 1 mL con tampón de imidazol 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3, 10% glicerol de pH 7,3. Se utilizaron 100 µL (2 nmol).

40

Sustrato 1 (fijador de albúmina GSC, PM1869): 2 mg/mL, se utilizaron 7,5 µL (8 nmol) de MBP-SBP-ST3Gal-III: 1,2 U/mL, se utilizaron 25 µL.

45

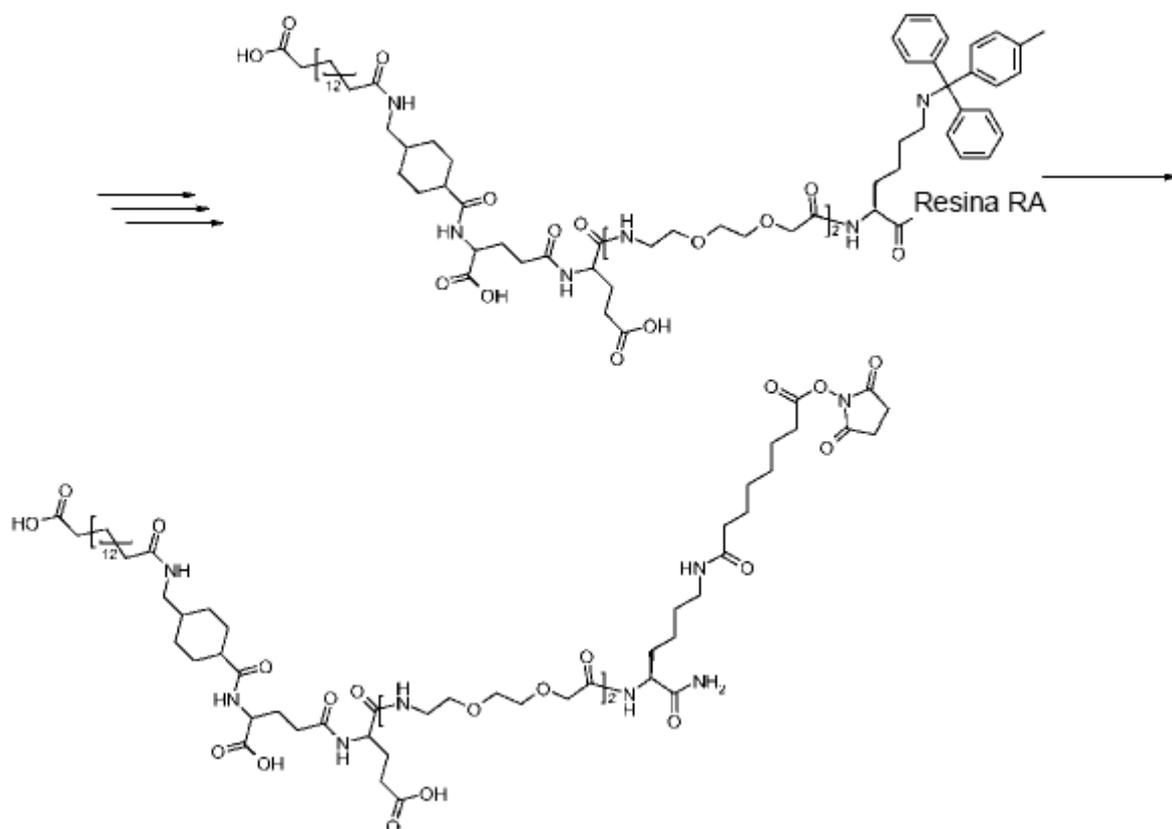
Sialidasa-neuramidasa: 50 µL (6,7 mU) (*C. perfringens*, tipo VI-A, N-5254, de Sigma) en agarosa (suspensión), 0,6-1,8 U/mL de gel.

La sialidasa se centrifugó utilizando una columna rotativa Pierce y se lavó dos veces con agua, 500 µL, y luego tres veces con tampón HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7. Se puso en rotación la columna y la enzima se añadió al FIX descongelado. La reacción se agitó suavemente a la temperatura ambiente durante una noche y se filtró luego utilizando una columna rotativa Pierce. Se añadieron Sustrato 1 y ST3Gal-III al filtrado resultante que contenía asialo-FIX y se incubó el todo a 32°C durante 46 horas. Una muestra de la mezcla de reacción se separó en la columna CD del Ejemplo 1. Las condiciones de la cromatografía eran como en el Ejemplo 9. La Figura 15 muestra el resultado. El primer pico que se eluía corresponde a asialo-FIX sin modificar, y el último pico de elución corresponde al asialo-FIX modificado con el fijador de albúmina, como se muestra por un aumento en el peso molecular de las cadenas pesada y ligera de FVIIa utilizando SDS-PAGE. Los geles exhibían también la presencia de pequeñas cantidades de FIXa generadas por auto-activación de FIX.

50

55

### **Ejemplo 16. Preparación del éster de NHS fijador de albúmina**

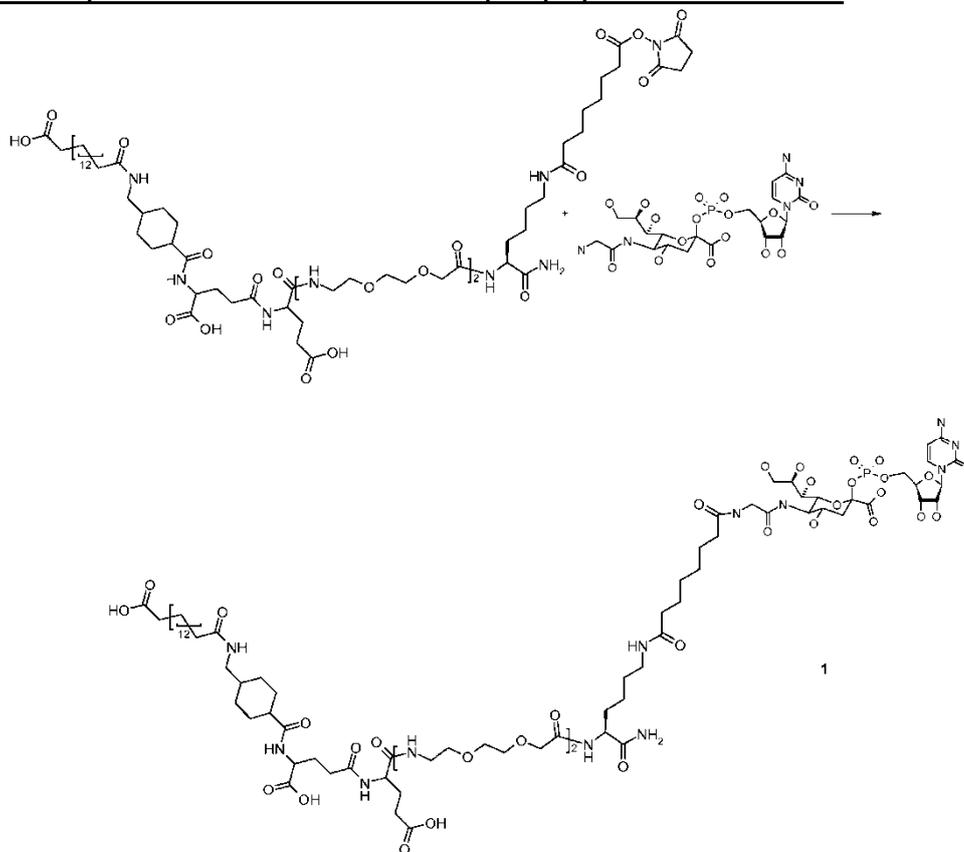


Se utilizó la resina amida de Rink (0,4 g, 0,25 mmol) para la síntesis en un sintetizador de péptidos microondas CEM Liberty. Se utilizaron protocolos estándar de química Fmoc, empleándose los aminoácidos siguientes y en el orden indicado (todas las soluciones con 7 eq. de aminoácido en NMP que contenía HOAt 0,3 M):

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
- 10 5. Mono t-butiléster del diácido C-16 (véase WO 2005/012347 A2, Ejemplo 4): 0,62 g en 6 mL. Todos los acoplamientos se realizaron por adición de 7 eq de DIC.

Después de estos acoplamientos, la resina se retiró del sintetizador Liberty y se lavó, escurrió, y trató con 5 mL de hexafluoro-isopropanol durante 10 minutos. La resina se lavó luego con DCM y se escurrió. Se repitieron luego el tratamiento con hexafluoro-isopropanol y el lavado con DCM.

Se disolvió bis-NHS éster de ácido subérico (368 mg) en NMP (10 mL, con azul de bromofenol 0,5 mM) y se añadió DIPEA (170  $\mu$ L). Se añadió esta solución a la resina escurrida y se dejó reaccionar durante una noche. Después del acoplamiento, la resina se lavó con NMP, DCM y se escurrió. Se añadió a la resina escurrida una mezcla de TFA:TIPS:mercaptoetanol:H<sub>2</sub>O 94:1:2,5:2,5 y la resina se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se escurrió lentamente en 75 mL de dietil-éter enfriado en hielo, dando como resultado precipitación del producto. La agitación ulterior a la temperatura ambiente durante 0,5 horas y centrifugación proporcionó el producto como un sólido que se lavó dos veces con dietil-éter y se secó a vacío. El producto bruto se disolvió en una mezcla de acetonitrilo que contenía tampones A y B de HPLC, y se purificó por RP-HPLC preparativa utilizando un -gradiente de tampones acetonitrilo/agua con 0,1% de TFA. La identidad y pureza del producto se confirmaron por HPLC y LCMS. Utilizando el protocolo anterior, se preparó una cadena lateral de fijación de albúmina muy compleja como un éster de NHS. Este compuesto está listo para reaccionar con GSC en el Ejemplo 17.

**Ejemplo 17. Acoplamiento del éster de NHS a GSC para proporcionar el Sustrato 1**

5 El éster de NHS del Dietil-éter (20 mg) se disolvió en THF (500  $\mu$ L) y se añadió tampón TRIS (100 mM, pH 8,4, 500  $\mu$ L). Se pesó GSC (20 mg) y se añadió a la solución del éster de NHS y se dejó reaccionar a la temperatura ambiente durante un periodo de 30 min. La mezcla de reacción se diluyó a 4 mL con agua y se purificó por RP-HPLC utilizando un gradiente de tampones acetonitrilo/agua con 0,1% de TFA. Gradiente 10  $\rightarrow$  50% tampón B. las fracciones relevantes se identificaron por LCMS y se liofilizaron. El producto exhibía una solubilidad excelente en agua. Rendimiento: 7,7 mg. El producto se identificó por LCMS.

10 Utilizando el protocolo anterior, se preparó un sustrato de sialil-transferasa que llevaba una cadena lateral hidrófoba compleja de fijación de albúmina. El Sustrato 1 era totalmente soluble en tampones acuosos.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

15 <110> Novo Nordisk A/S

<120> Método de purificación

<130> 8060

20

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

25

<210> 1

< 211> 2332

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

30

<400> 1

ES 2 582 590 T3

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr  
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro  
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys  
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro  
50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val  
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val  
85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala  
100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val  
115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn  
130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser  
145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu  
165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu  
180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp





ES 2 582 590 T3

| 1010         | 1015                     | 1020                            |
|--------------|--------------------------|---------------------------------|
| Asn Ser 1025 | Pro Ser Val Trp Gln 1030 | Asn Ile Leu Glu Ser 1035        |
| Phe Lys 1040 | Lys Val Thr Pro Leu 1045 | Ile His Asp Arg Met 1050        |
| Lys Asn 1055 | Ala Thr Ala Leu Arg 1060 | Leu Asn His Met Ser 1065        |
| Thr Ser 1070 | Ser Lys Asn Met Glu 1075 | Met Val Gln Gln Lys 1080        |
| Pro Ile 1085 | Pro Pro Asp Ala Gln 1090 | Asn Pro Asp Met Ser 1095        |
| Met Leu 1100 | Phe Leu Pro Glu Ser 1105 | Ala Arg Trp Ile Gln 1110        |
| Gly Lys 1115 | Asn Ser Leu Asn Ser 1120 | Gly Gln Gly Pro Ser 1125        |
| Leu Val 1130 | Ser Leu Gly Pro Glu 1135 | Lys Ser Val Glu Gly 1140        |
| Leu Ser 1145 | Glu Lys Asn Lys Val 1150 | Val Val Gly Lys Gly 1155        |
| Lys Asp 1160 | Val Gly Leu Lys Glu 1165 | Met Val Phe Pro Ser 1170        |
| Leu Phe 1175 | Leu Thr Asn Leu Asp 1180 | Asn Leu His Glu Asn 1185        |
| Asn Gln 1190 | Glu Lys Lys Ile Gln 1195 | Glu Glu Ile Glu Lys 1200        |
| Leu Ile 1205 | Gln Glu Asn Val Val 1210 | Leu Pro Gln Ile His 1215        |
| Gly Thr 1220 | Lys Asn Phe Met Lys 1225 | Asn Leu Phe Leu Leu 1230        |
| Gln Asn 1235 | Val Glu Gly Ser Tyr 1240 | Asp Gly Ala Tyr Ala 1245        |
| Gln Asp 1250 | Phe Arg Ser Leu Asn 1255 | Asp Ser Thr Asn Arg 1260        |
| His Thr      | Ala His Phe Ser Lys      | Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu |

ES 2 582 590 T3

|      |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |      |     |     |
|------|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|
| 1265 |      |     |     |     |     | 1270 |     |     |     |     |      | 1275 |     |     |
| Gly  | Leu  | Gly | Asn | Gln | Thr | Lys  | Gln | Ile | Val | Glu | Lys  | Tyr  | Ala | Cys |
|      | 1280 |     |     |     |     | 1285 |     |     |     |     | 1290 |      |     |     |
| Thr  | Thr  | Arg | Ile | Ser | Pro | Asn  | Thr | Ser | Gln | Gln | Asn  | Phe  | Val | Thr |
|      | 1295 |     |     |     |     | 1300 |     |     |     |     | 1305 |      |     |     |
| Gln  | Arg  | Ser | Lys | Arg | Ala | Leu  | Lys | Gln | Phe | Arg | Leu  | Pro  | Leu | Glu |
|      | 1310 |     |     |     |     | 1315 |     |     |     |     | 1320 |      |     |     |
| Glu  | Thr  | Glu | Leu | Glu | Lys | Arg  | Ile | Ile | Val | Asp | Asp  | Thr  | Ser | Thr |
|      | 1325 |     |     |     |     | 1330 |     |     |     |     | 1335 |      |     |     |
| Gln  | Trp  | Ser | Lys | Asn | Met | Lys  | His | Leu | Thr | Pro | Ser  | Thr  | Leu | Thr |
|      | 1340 |     |     |     |     | 1345 |     |     |     |     | 1350 |      |     |     |
| Gln  | Ile  | Asp | Tyr | Asn | Glu | Lys  | Glu | Lys | Gly | Ala | Ile  | Thr  | Gln | Ser |
|      | 1355 |     |     |     |     | 1360 |     |     |     |     | 1365 |      |     |     |
| Pro  | Leu  | Ser | Asp | Cys | Leu | Thr  | Arg | Ser | His | Ser | Ile  | Pro  | Gln | Ala |
|      | 1370 |     |     |     |     | 1375 |     |     |     |     | 1380 |      |     |     |
| Asn  | Arg  | Ser | Pro | Leu | Pro | Ile  | Ala | Lys | Val | Ser | Ser  | Phe  | Pro | Ser |
|      | 1385 |     |     |     |     | 1390 |     |     |     |     | 1395 |      |     |     |
| Ile  | Arg  | Pro | Ile | Tyr | Leu | Thr  | Arg | Val | Leu | Phe | Gln  | Asp  | Asn | Ser |
|      | 1400 |     |     |     |     | 1405 |     |     |     |     | 1410 |      |     |     |
| Ser  | His  | Leu | Pro | Ala | Ala | Ser  | Tyr | Arg | Lys | Lys | Asp  | Ser  | Gly | Val |
|      | 1415 |     |     |     |     | 1420 |     |     |     |     | 1425 |      |     |     |
| Gln  | Glu  | Ser | Ser | His | Phe | Leu  | Gln | Gly | Ala | Lys | Lys  | Asn  | Asn | Leu |
|      | 1430 |     |     |     |     | 1435 |     |     |     |     | 1440 |      |     |     |
| Ser  | Leu  | Ala | Ile | Leu | Thr | Leu  | Glu | Met | Thr | Gly | Asp  | Gln  | Arg | Glu |
|      | 1445 |     |     |     |     | 1450 |     |     |     |     | 1455 |      |     |     |
| Val  | Gly  | Ser | Leu | Gly | Thr | Ser  | Ala | Thr | Asn | Ser | Val  | Thr  | Tyr | Lys |
|      | 1460 |     |     |     |     | 1465 |     |     |     |     | 1470 |      |     |     |
| Lys  | Val  | Glu | Asn | Thr | Val | Leu  | Pro | Lys | Pro | Asp | Leu  | Pro  | Lys | Thr |
|      | 1475 |     |     |     |     | 1480 |     |     |     |     | 1485 |      |     |     |
| Ser  | Gly  | Lys | Val | Glu | Leu | Leu  | Pro | Lys | Val | His | Ile  | Tyr  | Gln | Lys |
|      | 1490 |     |     |     |     | 1495 |     |     |     |     | 1500 |      |     |     |
| Asp  | Leu  | Phe | Pro | Thr | Glu | Thr  | Ser | Asn | Gly | Ser | Pro  | Gly  | His | Leu |
|      | 1505 |     |     |     |     | 1510 |     |     |     |     | 1515 |      |     |     |
| Asp  | Leu  | Val | Glu | Gly | Ser | Leu  | Leu | Gln | Gly | Thr | Glu  | Gly  | Ala | Ile |

ES 2 582 590 T3

|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |      |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|
| 1520 |     |     |     |     |     | 1525 |     |     |     |     |      | 1530 |     |     |
| Lys  | Trp | Asn | Glu | Ala | Asn | Arg  | Pro | Gly | Lys | Val | Pro  | Phe  | Leu | Arg |
| 1535 |     |     |     |     |     | 1540 |     |     |     |     | 1545 |      |     |     |
| Val  | Ala | Thr | Glu | Ser | Ser | Ala  | Lys | Thr | Pro | Ser | Lys  | Leu  | Leu | Asp |
| 1550 |     |     |     |     |     | 1555 |     |     |     |     | 1560 |      |     |     |
| Pro  | Leu | Ala | Trp | Asp | Asn | His  | Tyr | Gly | Thr | Gln | Ile  | Pro  | Lys | Glu |
| 1565 |     |     |     |     |     | 1570 |     |     |     |     | 1575 |      |     |     |
| Glu  | Trp | Lys | Ser | Gln | Glu | Lys  | Ser | Pro | Glu | Lys | Thr  | Ala  | Phe | Lys |
| 1580 |     |     |     |     |     | 1585 |     |     |     |     | 1590 |      |     |     |
| Lys  | Lys | Asp | Thr | Ile | Leu | Ser  | Leu | Asn | Ala | Cys | Glu  | Ser  | Asn | His |
| 1595 |     |     |     |     |     | 1600 |     |     |     |     | 1605 |      |     |     |
| Ala  | Ile | Ala | Ala | Ile | Asn | Glu  | Gly | Gln | Asn | Lys | Pro  | Glu  | Ile | Glu |
| 1610 |     |     |     |     |     | 1615 |     |     |     |     | 1620 |      |     |     |
| Val  | Thr | Trp | Ala | Lys | Gln | Gly  | Arg | Thr | Glu | Arg | Leu  | Cys  | Ser | Gln |
| 1625 |     |     |     |     |     | 1630 |     |     |     |     | 1635 |      |     |     |
| Asn  | Pro | Pro | Val | Leu | Lys | Arg  | His | Gln | Arg | Glu | Ile  | Thr  | Arg | Thr |
| 1640 |     |     |     |     |     | 1645 |     |     |     |     | 1650 |      |     |     |
| Thr  | Leu | Gln | Ser | Asp | Gln | Glu  | Glu | Ile | Asp | Tyr | Asp  | Asp  | Thr | Ile |
| 1655 |     |     |     |     |     | 1660 |     |     |     |     | 1665 |      |     |     |
| Ser  | Val | Glu | Met | Lys | Lys | Glu  | Asp | Phe | Asp | Ile | Tyr  | Asp  | Glu | Asp |
| 1670 |     |     |     |     |     | 1675 |     |     |     |     | 1680 |      |     |     |
| Glu  | Asn | Gln | Ser | Pro | Arg | Ser  | Phe | Gln | Lys | Lys | Thr  | Arg  | His | Tyr |
| 1685 |     |     |     |     |     | 1690 |     |     |     |     | 1695 |      |     |     |
| Phe  | Ile | Ala | Ala | Val | Glu | Arg  | Leu | Trp | Asp | Tyr | Gly  | Met  | Ser | Ser |
| 1700 |     |     |     |     |     | 1705 |     |     |     |     | 1710 |      |     |     |
| Ser  | Pro | His | Val | Leu | Arg | Asn  | Arg | Ala | Gln | Ser | Gly  | Ser  | Val | Pro |
| 1715 |     |     |     |     |     | 1720 |     |     |     |     | 1725 |      |     |     |
| Gln  | Phe | Lys | Lys | Val | Val | Phe  | Gln | Glu | Phe | Thr | Asp  | Gly  | Ser | Phe |
| 1730 |     |     |     |     |     | 1735 |     |     |     |     | 1740 |      |     |     |
| Thr  | Gln | Pro | Leu | Tyr | Arg | Gly  | Glu | Leu | Asn | Glu | His  | Leu  | Gly | Leu |
| 1745 |     |     |     |     |     | 1750 |     |     |     |     | 1755 |      |     |     |
| Leu  | Gly | Pro | Tyr | Ile | Arg | Ala  | Glu | Val | Glu | Asp | Asn  | Ile  | Met | Val |
| 1760 |     |     |     |     |     | 1765 |     |     |     |     | 1770 |      |     |     |
| Thr  | Phe | Arg | Asn | Gln | Ala | Ser  | Arg | Pro | Tyr | Ser | Phe  | Tyr  | Ser | Ser |

ES 2 582 590 T3

|      |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |      |     |
|------|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
| 1775 |      |     |     |     |     | 1780 |     |     |     |     |      |     | 1785 |     |
| Leu  | Ile  | Ser | Tyr | Glu | Glu | Asp  | Gln | Arg | Gln | Gly | Ala  | Glu | Pro  | Arg |
|      | 1790 |     |     |     |     | 1795 |     |     |     |     | 1800 |     |      |     |
| Lys  | Asn  | Phe | Val | Lys | Pro | Asn  | Glu | Thr | Lys | Thr | Tyr  | Phe | Trp  | Lys |
|      | 1805 |     |     |     |     | 1810 |     |     |     |     | 1815 |     |      |     |
| Val  | Gln  | His | His | Met | Ala | Pro  | Thr | Lys | Asp | Glu | Phe  | Asp | Cys  | Lys |
|      | 1820 |     |     |     |     | 1825 |     |     |     |     | 1830 |     |      |     |
| Ala  | Trp  | Ala | Tyr | Phe | Ser | Asp  | Val | Asp | Leu | Glu | Lys  | Asp | Val  | His |
|      | 1835 |     |     |     |     | 1840 |     |     |     |     | 1845 |     |      |     |
| Ser  | Gly  | Leu | Ile | Gly | Pro | Leu  | Leu | Val | Cys | His | Thr  | Asn | Thr  | Leu |
|      | 1850 |     |     |     |     | 1855 |     |     |     |     | 1860 |     |      |     |
| Asn  | Pro  | Ala | His | Gly | Arg | Gln  | Val | Thr | Val | Gln | Glu  | Phe | Ala  | Leu |
|      | 1865 |     |     |     |     | 1870 |     |     |     |     | 1875 |     |      |     |
| Phe  | Phe  | Thr | Ile | Phe | Asp | Glu  | Thr | Lys | Ser | Trp | Tyr  | Phe | Thr  | Glu |
|      | 1880 |     |     |     |     | 1885 |     |     |     |     | 1890 |     |      |     |
| Asn  | Met  | Glu | Arg | Asn | Cys | Arg  | Ala | Pro | Cys | Asn | Ile  | Gln | Met  | Glu |
|      | 1895 |     |     |     |     | 1900 |     |     |     |     | 1905 |     |      |     |
| Asp  | Pro  | Thr | Phe | Lys | Glu | Asn  | Tyr | Arg | Phe | His | Ala  | Ile | Asn  | Gly |
|      | 1910 |     |     |     |     | 1915 |     |     |     |     | 1920 |     |      |     |
| Tyr  | Ile  | Met | Asp | Thr | Leu | Pro  | Gly | Leu | Val | Met | Ala  | Gln | Asp  | Gln |
|      | 1925 |     |     |     |     | 1930 |     |     |     |     | 1935 |     |      |     |
| Arg  | Ile  | Arg | Trp | Tyr | Leu | Leu  | Ser | Met | Gly | Ser | Asn  | Glu | Asn  | Ile |
|      | 1940 |     |     |     |     | 1945 |     |     |     |     | 1950 |     |      |     |
| His  | Ser  | Ile | His | Phe | Ser | Gly  | His | Val | Phe | Thr | Val  | Arg | Lys  | Lys |
|      | 1955 |     |     |     |     | 1960 |     |     |     |     | 1965 |     |      |     |
| Glu  | Glu  | Tyr | Lys | Met | Ala | Leu  | Tyr | Asn | Leu | Tyr | Pro  | Gly | Val  | Phe |
|      | 1970 |     |     |     |     | 1975 |     |     |     |     | 1980 |     |      |     |
| Glu  | Thr  | Val | Glu | Met | Leu | Pro  | Ser | Lys | Ala | Gly | Ile  | Trp | Arg  | Val |
|      | 1985 |     |     |     |     | 1990 |     |     |     |     | 1995 |     |      |     |
| Glu  | Cys  | Leu | Ile | Gly | Glu | His  | Leu | His | Ala | Gly | Met  | Ser | Thr  | Leu |
|      | 2000 |     |     |     |     | 2005 |     |     |     |     | 2010 |     |      |     |
| Phe  | Leu  | Val | Tyr | Ser | Asn | Lys  | Cys | Gln | Thr | Pro | Leu  | Gly | Met  | Ala |
|      | 2015 |     |     |     |     | 2020 |     |     |     |     | 2025 |     |      |     |
| Ser  | Gly  | His | Ile | Arg | Asp | Phe  | Gln | Ile | Thr | Ala | Ser  | Gly | Gln  | Tyr |

ES 2 582 590 T3

|      |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |      |     |     |
|------|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|
| 2030 |      |     |     |     |     | 2035 |     |     |     |     |      | 2040 |     |     |
| Gly  | Gln  | Trp | Ala | Pro | Lys | Leu  | Ala | Arg | Leu | His | Tyr  | Ser  | Gly | Ser |
|      | 2045 |     |     |     |     | 2050 |     |     |     |     | 2055 |      |     |     |
| Ile  | Asn  | Ala | Trp | Ser | Thr | Lys  | Glu | Pro | Phe | Ser | Trp  | Ile  | Lys | Val |
|      | 2060 |     |     |     |     | 2065 |     |     |     |     | 2070 |      |     |     |
| Asp  | Leu  | Leu | Ala | Pro | Met | Ile  | Ile | His | Gly | Ile | Lys  | Thr  | Gln | Gly |
|      | 2075 |     |     |     |     | 2080 |     |     |     |     | 2085 |      |     |     |
| Ala  | Arg  | Gln | Lys | Phe | Ser | Ser  | Leu | Tyr | Ile | Ser | Gln  | Phe  | Ile | Ile |
|      | 2090 |     |     |     |     | 2095 |     |     |     |     | 2100 |      |     |     |
| Met  | Tyr  | Ser | Leu | Asp | Gly | Lys  | Lys | Trp | Gln | Thr | Tyr  | Arg  | Gly | Asn |
|      | 2105 |     |     |     |     | 2110 |     |     |     |     | 2115 |      |     |     |
| Ser  | Thr  | Gly | Thr | Leu | Met | Val  | Phe | Phe | Gly | Asn | Val  | Asp  | Ser | Ser |
|      | 2120 |     |     |     |     | 2125 |     |     |     |     | 2130 |      |     |     |
| Gly  | Ile  | Lys | His | Asn | Ile | Phe  | Asn | Pro | Pro | Ile | Ile  | Ala  | Arg | Tyr |
|      | 2135 |     |     |     |     | 2140 |     |     |     |     | 2145 |      |     |     |
| Ile  | Arg  | Leu | His | Pro | Thr | His  | Tyr | Ser | Ile | Arg | Ser  | Thr  | Leu | Arg |
|      | 2150 |     |     |     |     | 2155 |     |     |     |     | 2160 |      |     |     |
| Met  | Glu  | Leu | Met | Gly | Cys | Asp  | Leu | Asn | Ser | Cys | Ser  | Met  | Pro | Leu |
|      | 2165 |     |     |     |     | 2170 |     |     |     |     | 2175 |      |     |     |
| Gly  | Met  | Glu | Ser | Lys | Ala | Ile  | Ser | Asp | Ala | Gln | Ile  | Thr  | Ala | Ser |
|      | 2180 |     |     |     |     | 2185 |     |     |     |     | 2190 |      |     |     |
| Ser  | Tyr  | Phe | Thr | Asn | Met | Phe  | Ala | Thr | Trp | Ser | Pro  | Ser  | Lys | Ala |
|      | 2195 |     |     |     |     | 2200 |     |     |     |     | 2205 |      |     |     |
| Arg  | Leu  | His | Leu | Gln | Gly | Arg  | Ser | Asn | Ala | Trp | Arg  | Pro  | Gln | Val |
|      | 2210 |     |     |     |     | 2215 |     |     |     |     | 2220 |      |     |     |
| Asn  | Asn  | Pro | Lys | Glu | Trp | Leu  | Gln | Val | Asp | Phe | Gln  | Lys  | Thr | Met |
|      | 2225 |     |     |     |     | 2230 |     |     |     |     | 2235 |      |     |     |
| Lys  | Val  | Thr | Gly | Val | Thr | Thr  | Gln | Gly | Val | Lys | Ser  | Leu  | Leu | Thr |
|      | 2240 |     |     |     |     | 2245 |     |     |     |     | 2250 |      |     |     |
| Ser  | Met  | Tyr | Val | Lys | Glu | Phe  | Leu | Ile | Ser | Ser | Ser  | Gln  | Asp | Gly |
|      | 2255 |     |     |     |     | 2260 |     |     |     |     | 2265 |      |     |     |
| His  | Gln  | Trp | Thr | Leu | Phe | Phe  | Gln | Asn | Gly | Lys | Val  | Lys  | Val | Phe |
|      | 2270 |     |     |     |     | 2275 |     |     |     |     | 2280 |      |     |     |
| Gln  | Gly  | Asn | Gln | Asp | Ser | Phe  | Thr | Pro | Val | Val | Asn  | Ser  | Leu | Asp |



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para purificación de una proteína que está conjugada a un resto de fijación de albúmina a partir de una mixtura que comprende (i) dicha proteína en dicha FORMA conjugada y (ii) dicha proteína en una forma que no está conjugada a dicho resto de fijación de albúmina, comprendiendo el método:
  - (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una sustancia capaz de fijarse específicamente al resto de fijación de albúmina, en donde dicha sustancia se selecciona del grupo constituido por albúmina y ciclodextrina;
  - (b) poner en contacto dicho soporte sólido de (a) con dicha mixtura que comprende proteína y proteína conjugada en condiciones adecuadas para fijación del resto de fijación de albúmina a la sustancia definida en (a); y
  - (c) eluir los componentes fijados al soporte sólido, en donde dicha elución comprende poner en contacto el soporte sólido con la sustancia capaz de fijarse al resto de fijación de albúmina.
2. Un método según la reivindicación 1 en el que dicha sustancia se aplica a dicho soporte sólido en un gradiente de concentración creciente en el paso (c).
3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la proteína se selecciona de Factor VIII, hormona del crecimiento, Factor VII, Factor IX, GLP-1, insulina, o una forma variante de cualquiera de ellos.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el resto de fijación de albúmina prolonga la semi-vida de la proteína en vivo.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el resto de fijación de albúmina comprende un ácido graso o derivado de ácido graso.
6. Un método según la reivindicación 5, en el que el derivado de ácido graso comprende un diácido graso que tiene al menos 12 unidades metileno.
7. Un método según la reivindicación 5 ó 6, en el que el ácido graso o derivado de ácido graso está enlazado a un factor de coagulación por un ácido siálico de un glucano unido a N.
8. Un método según la reivindicación 5 ó 6, en el que el ácido graso o derivado de ácido graso está unido al factor de coagulación por un ácido siálico de un glucano unido a O.
9. Un método según la reivindicación 7 u 8 en el que la proteína de coagulación es Factor VII o Factor VIIa.
10. Un método según la reivindicación 7 u 8 en el que la proteína de coagulación es Factor VIII.
11. Un método según la reivindicación 7 u 8 en el que la proteína de coagulación es Factor IX.

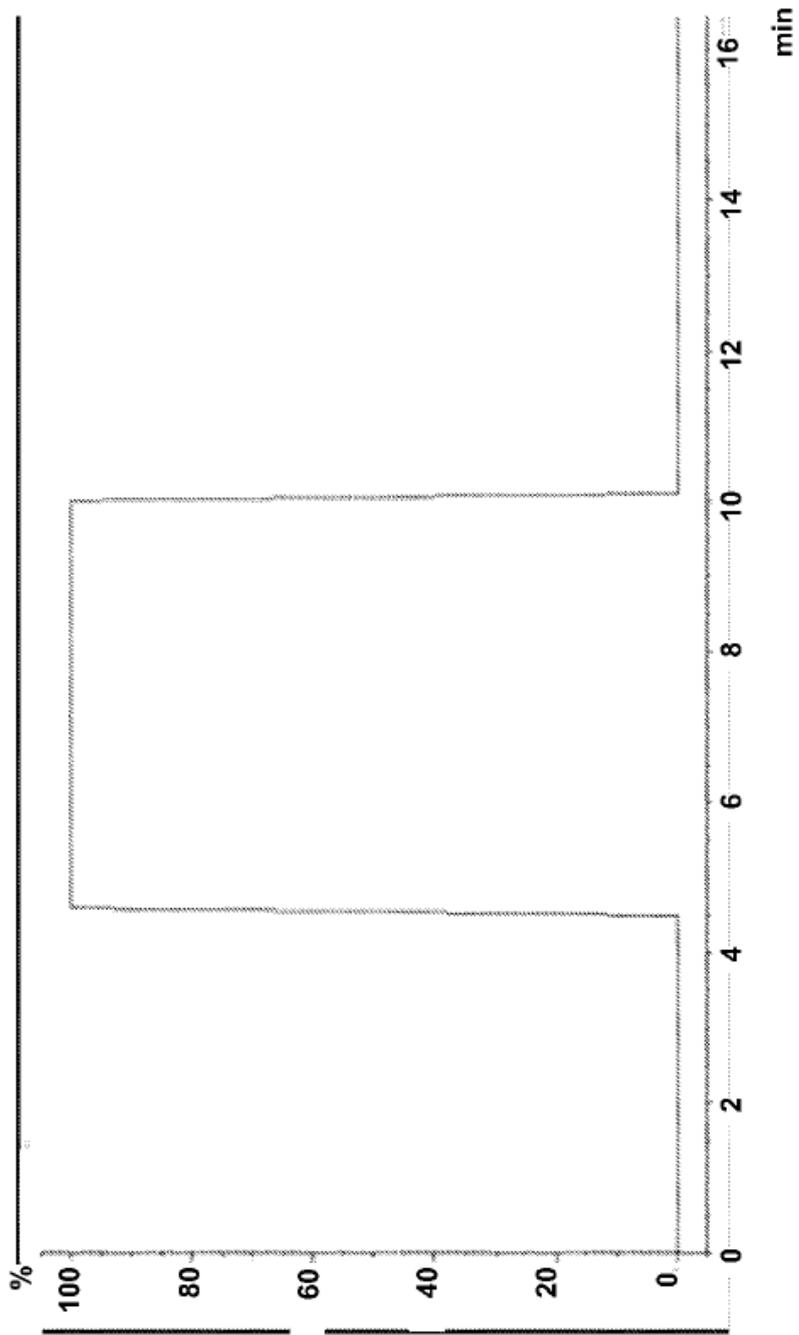


Figura 1 A

Figura 1 B

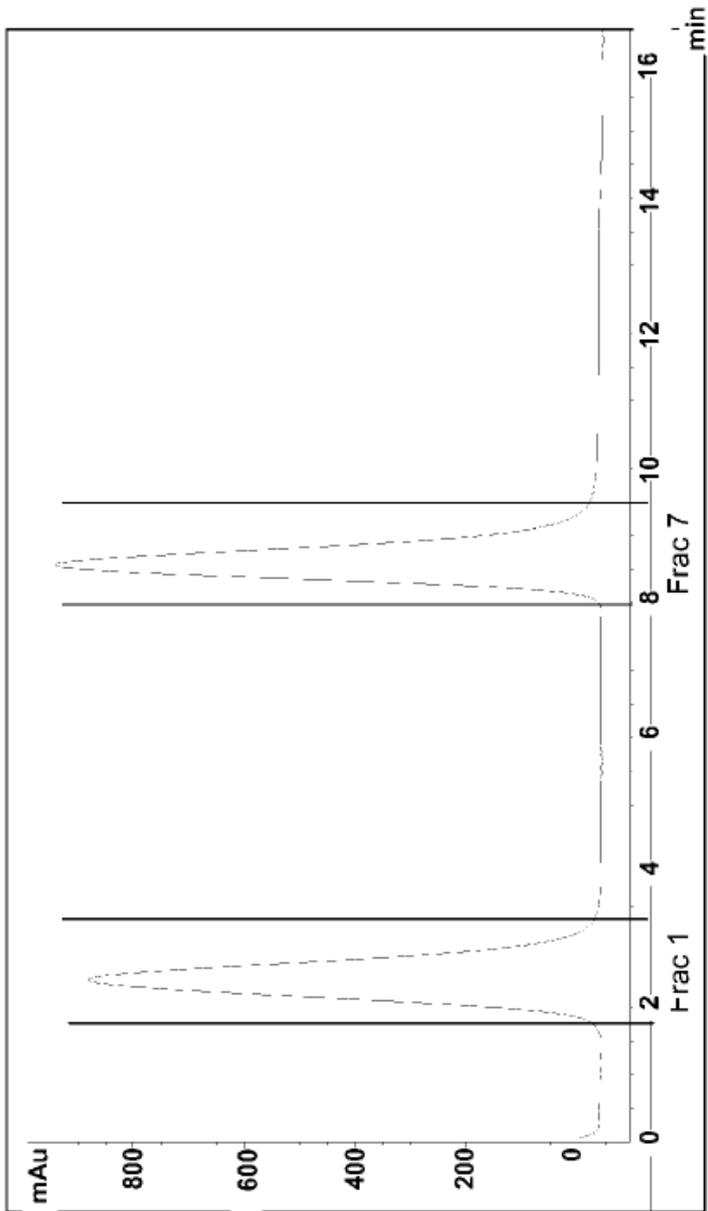


Figura 1 C

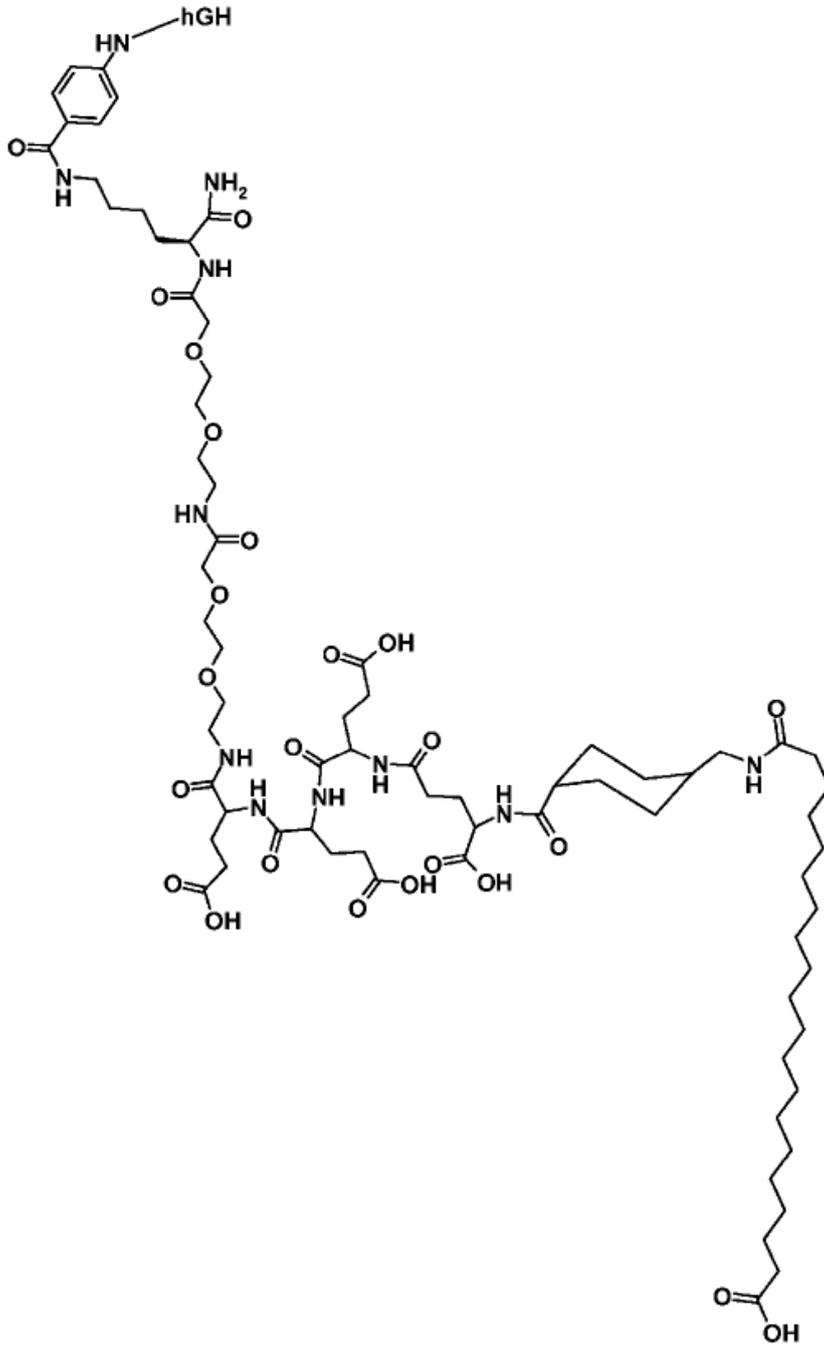


Figura 2 A

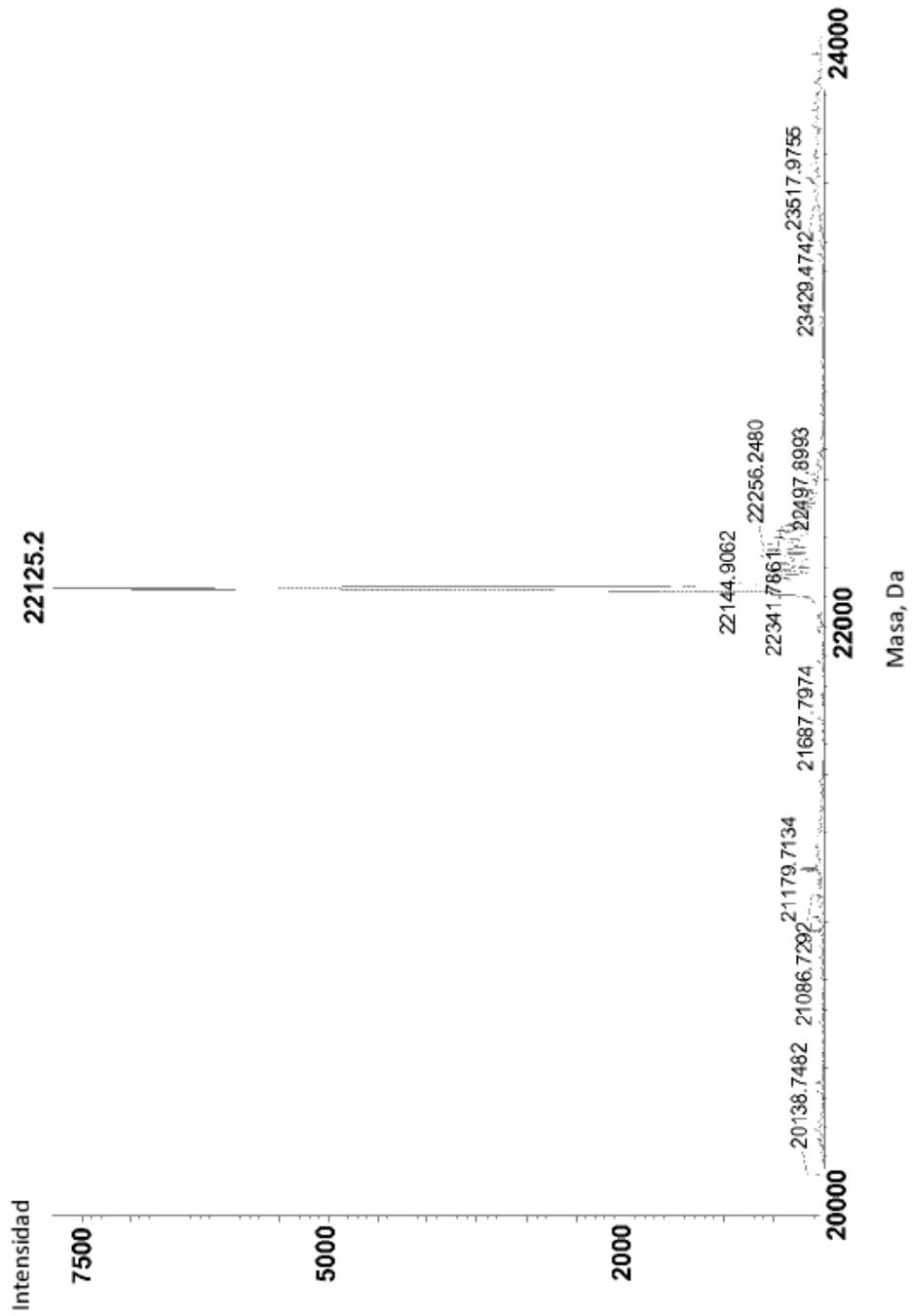
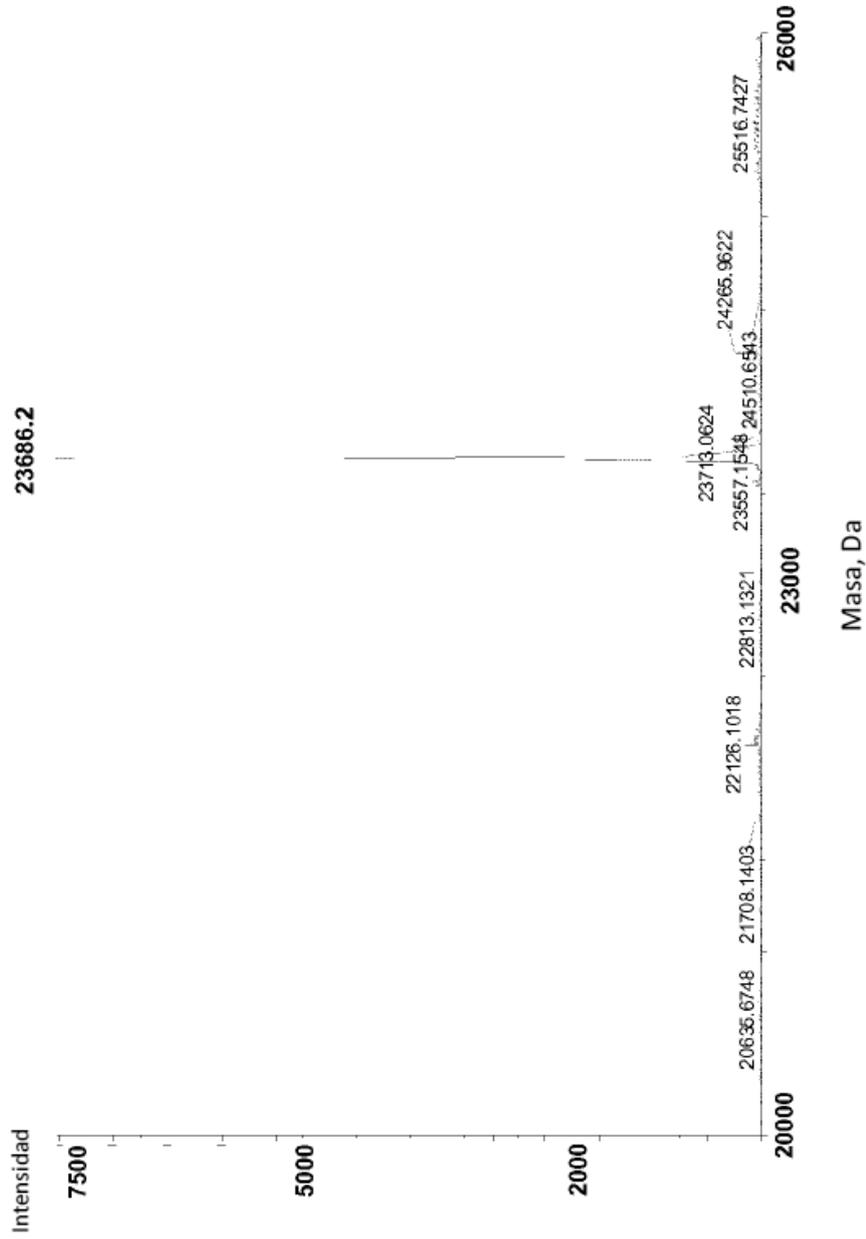


Figura 2B



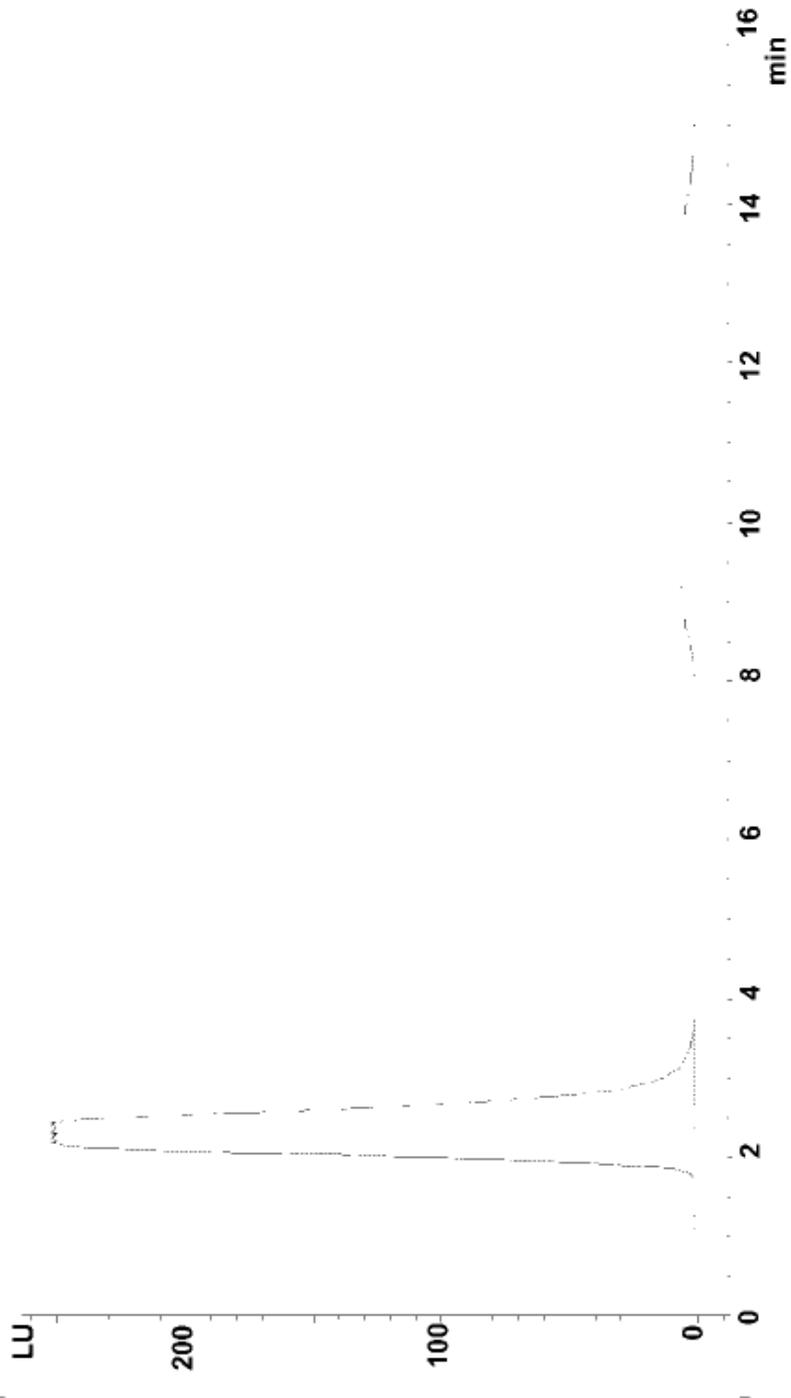


Figura 3 A

Figura 3 B

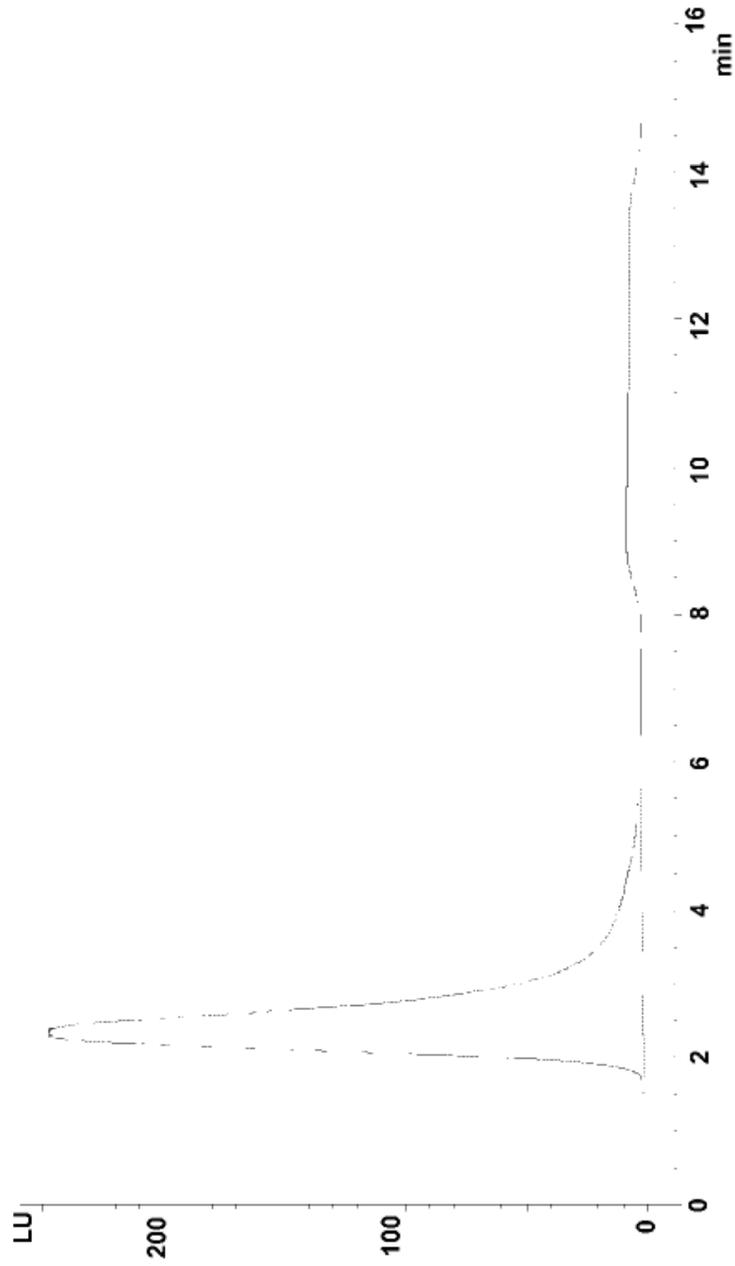
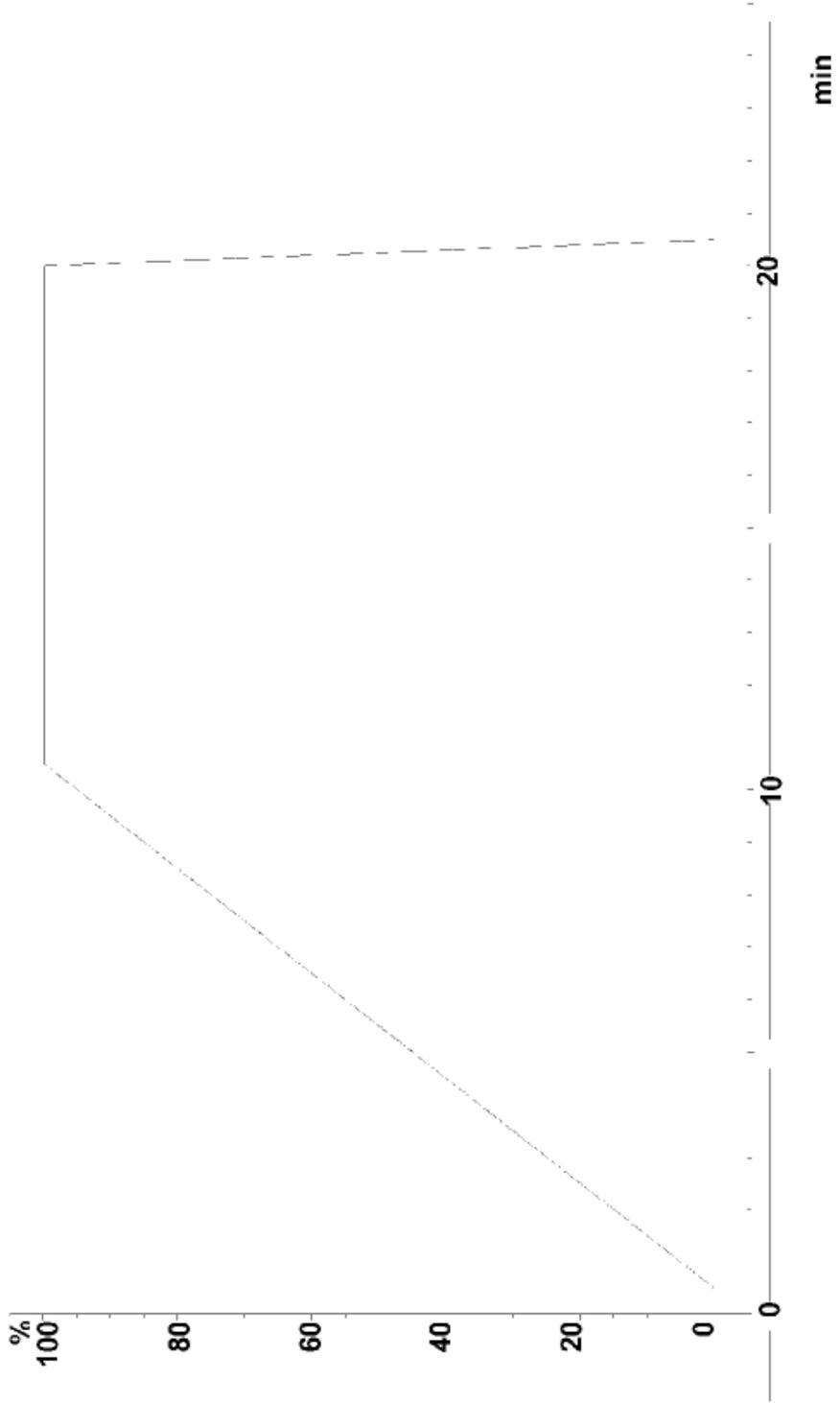
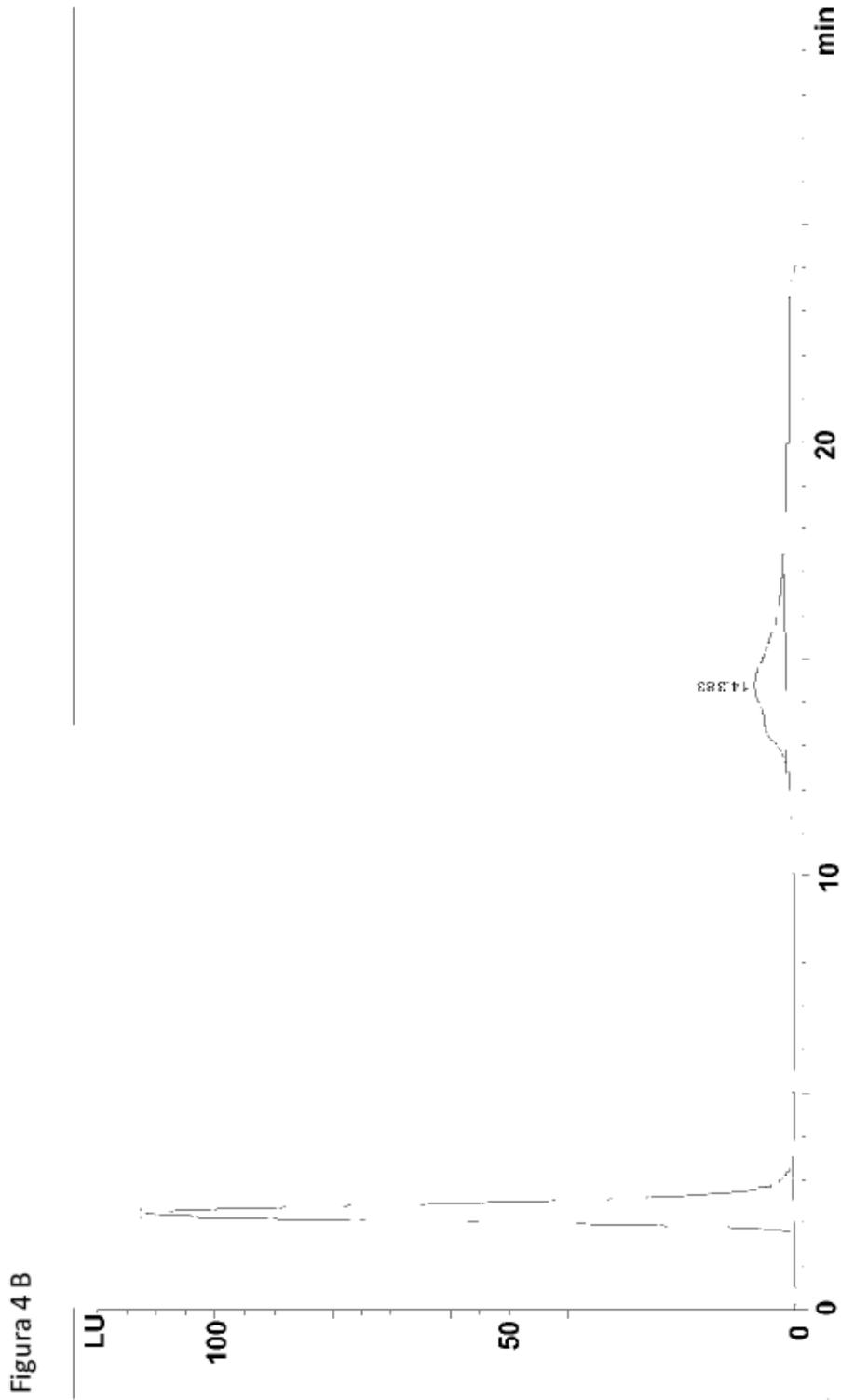
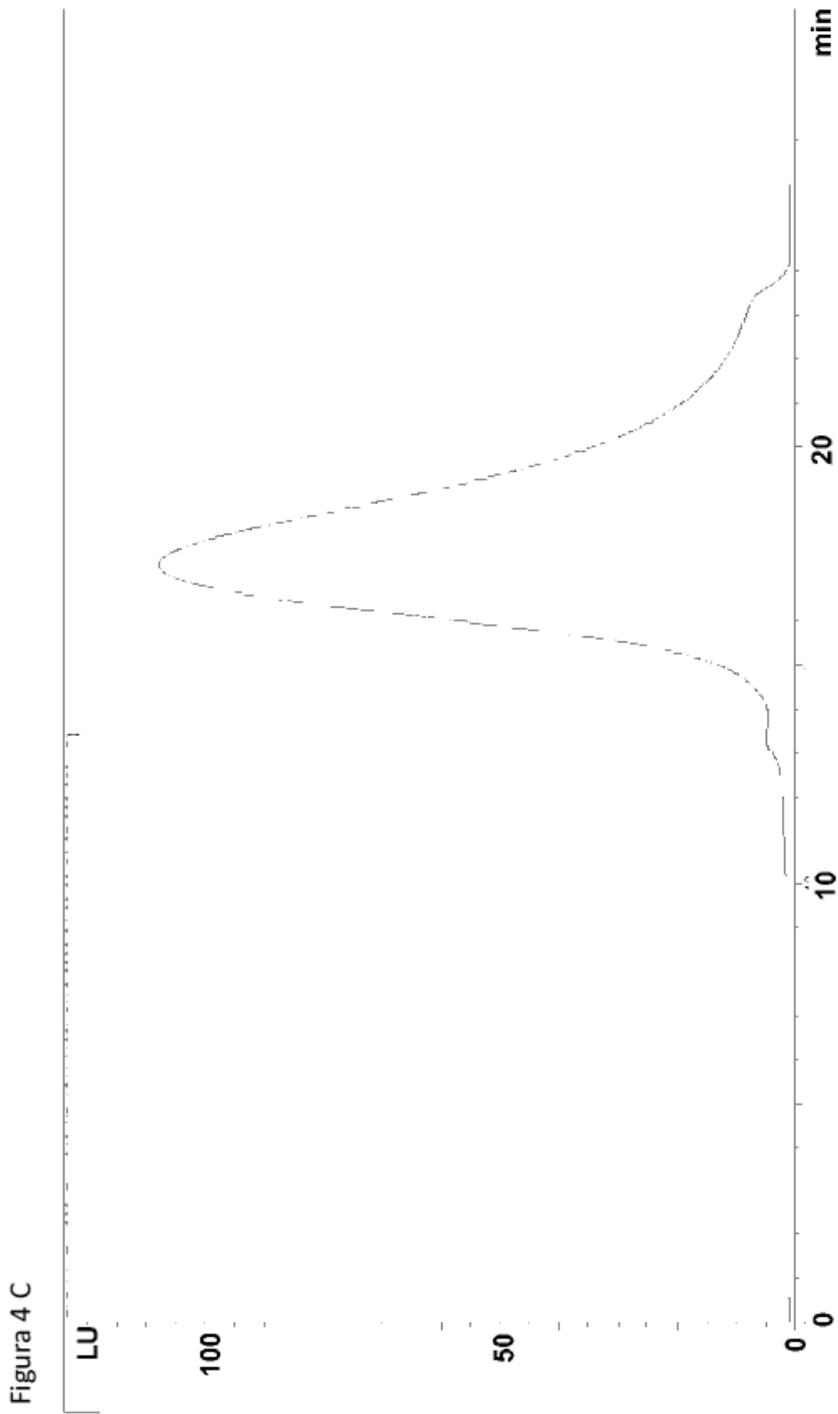


Figura 4 A







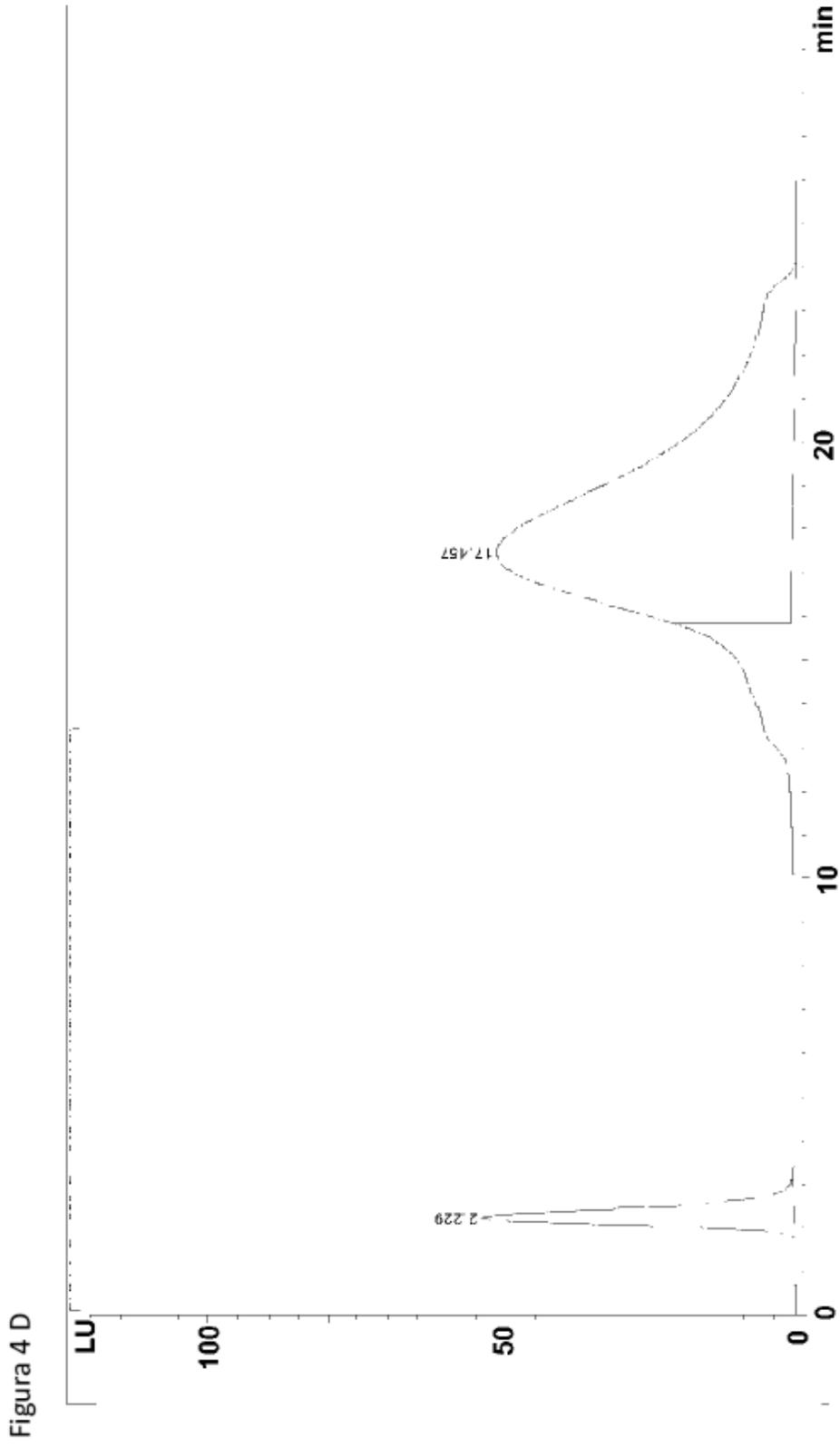


Figure 5 A

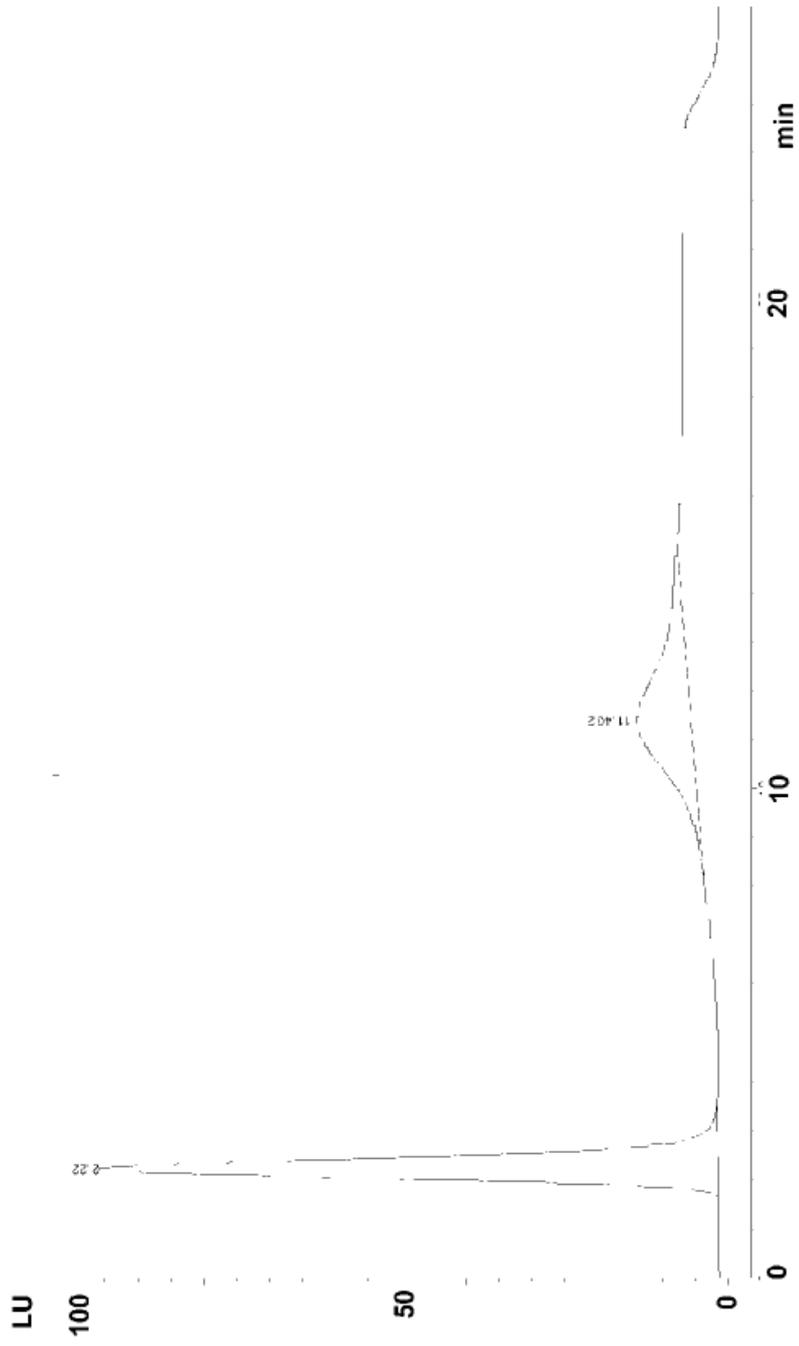


Figura 5 B

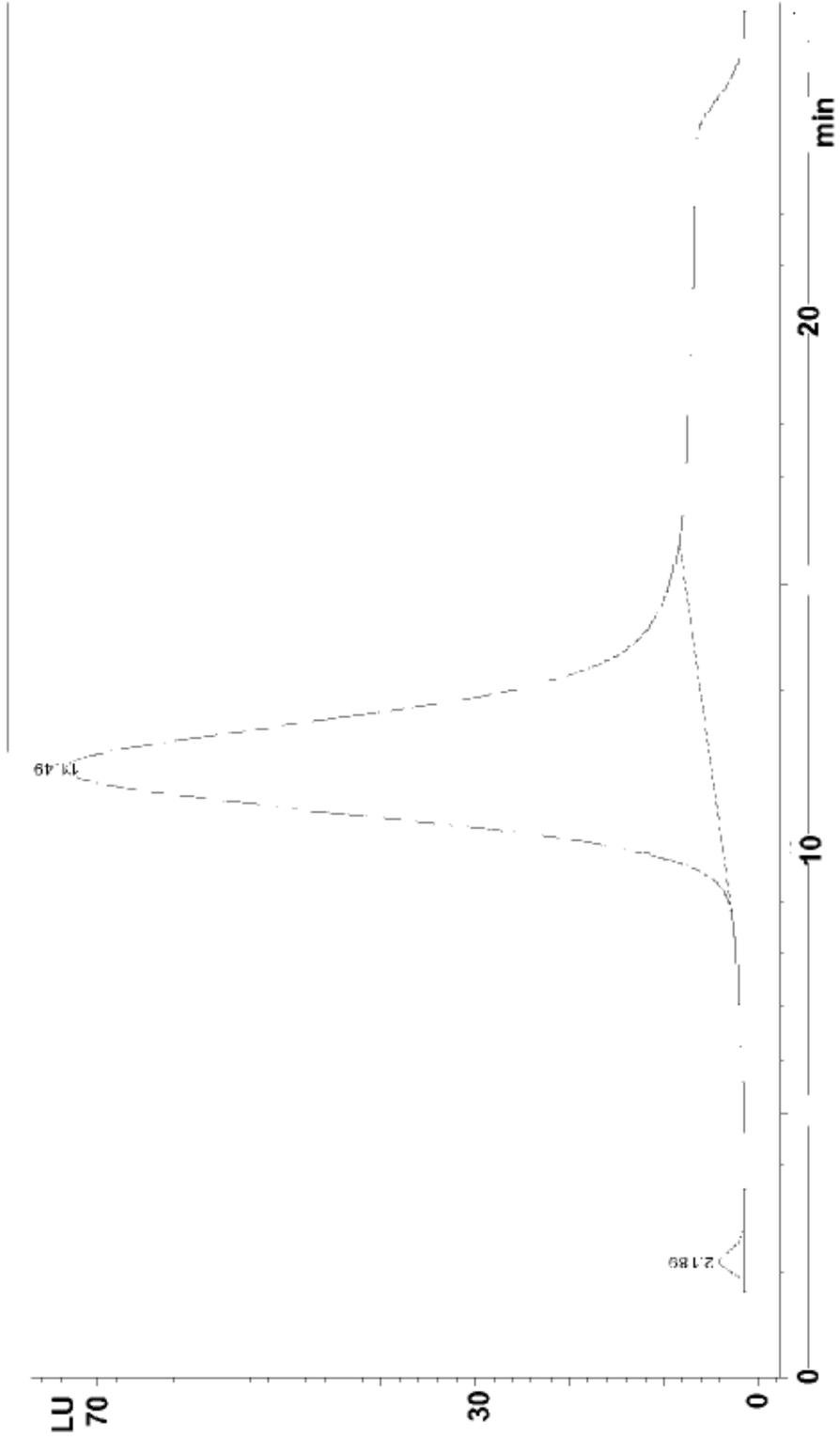
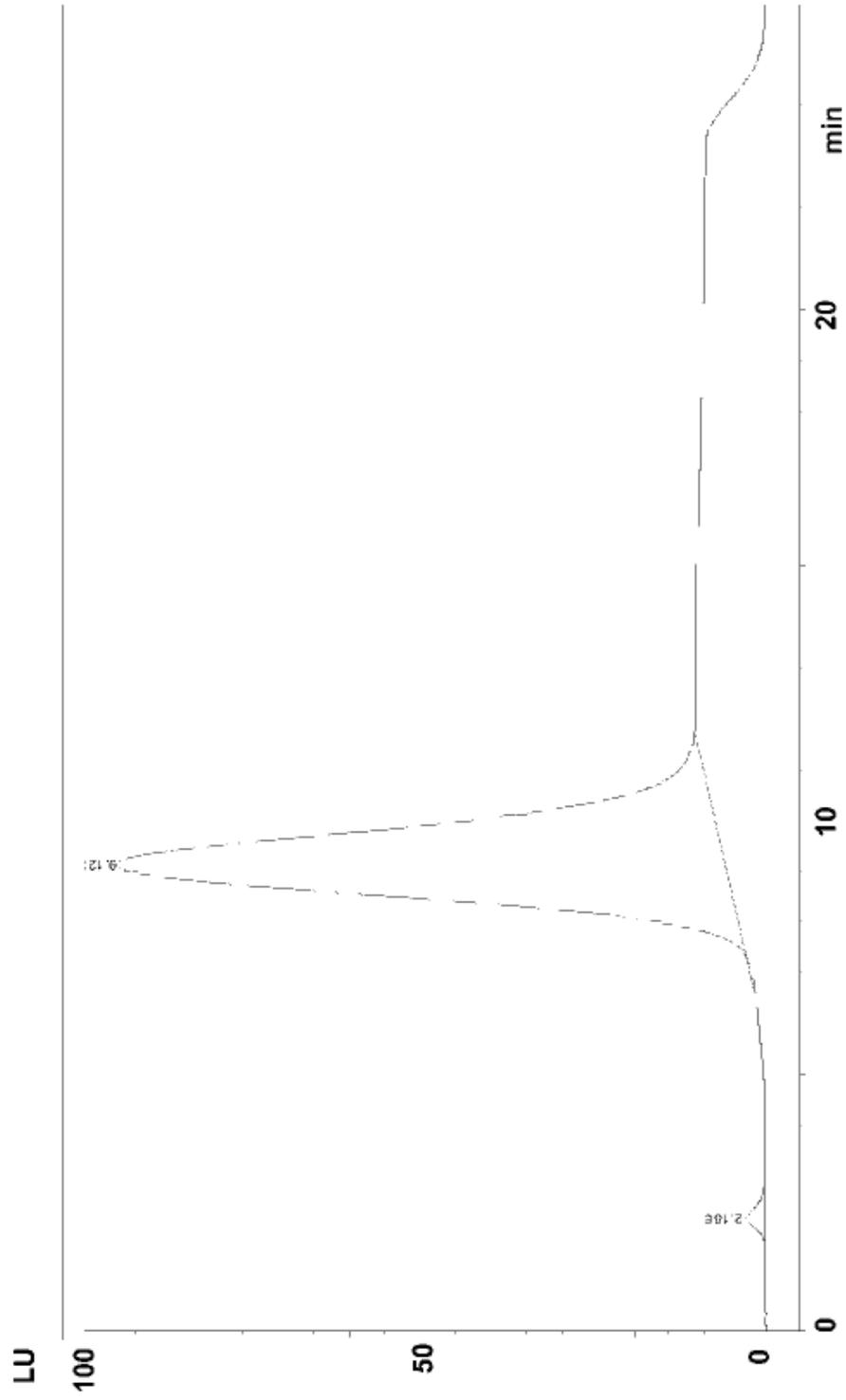
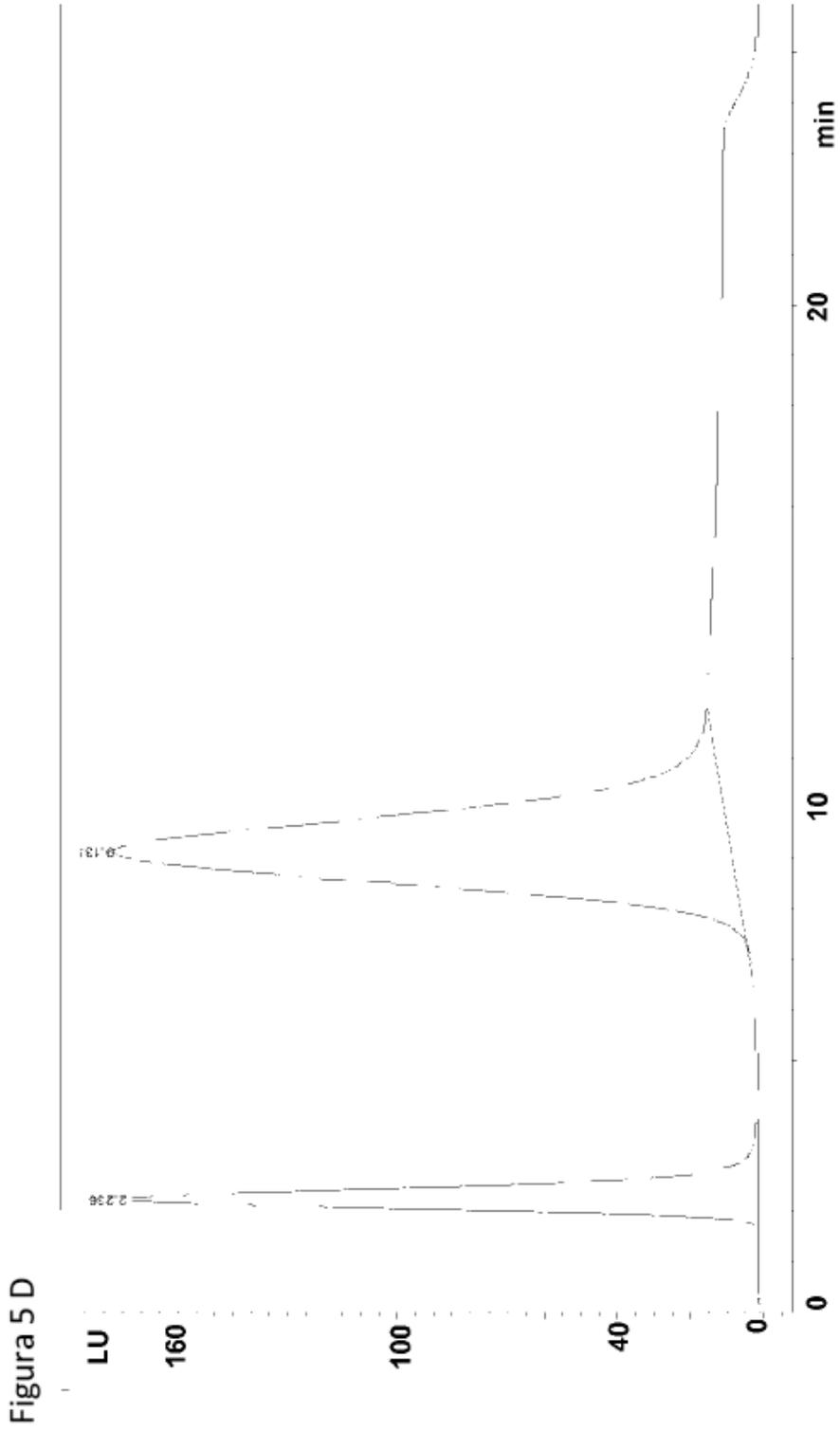


Figura 5 C





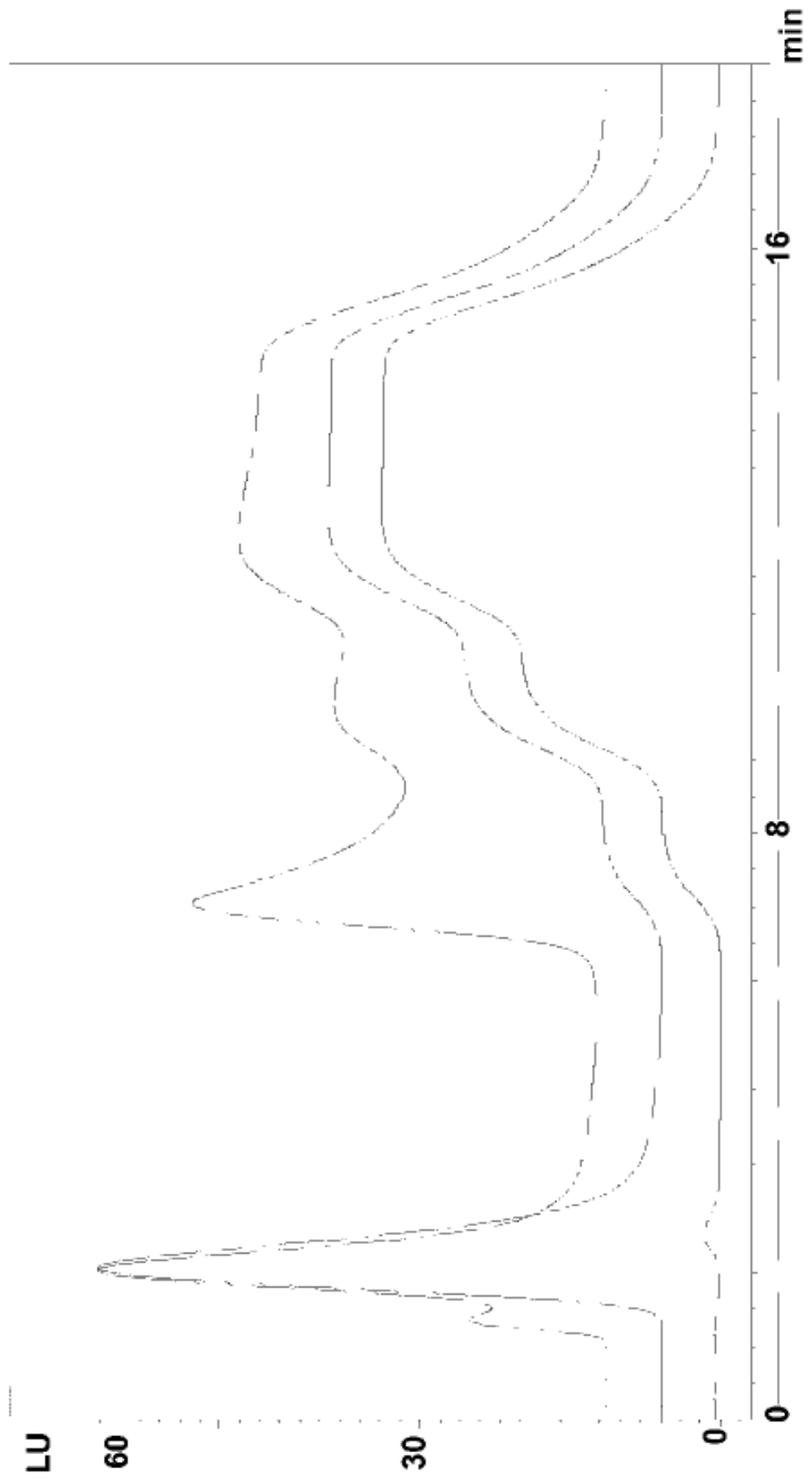


Figura 6 A

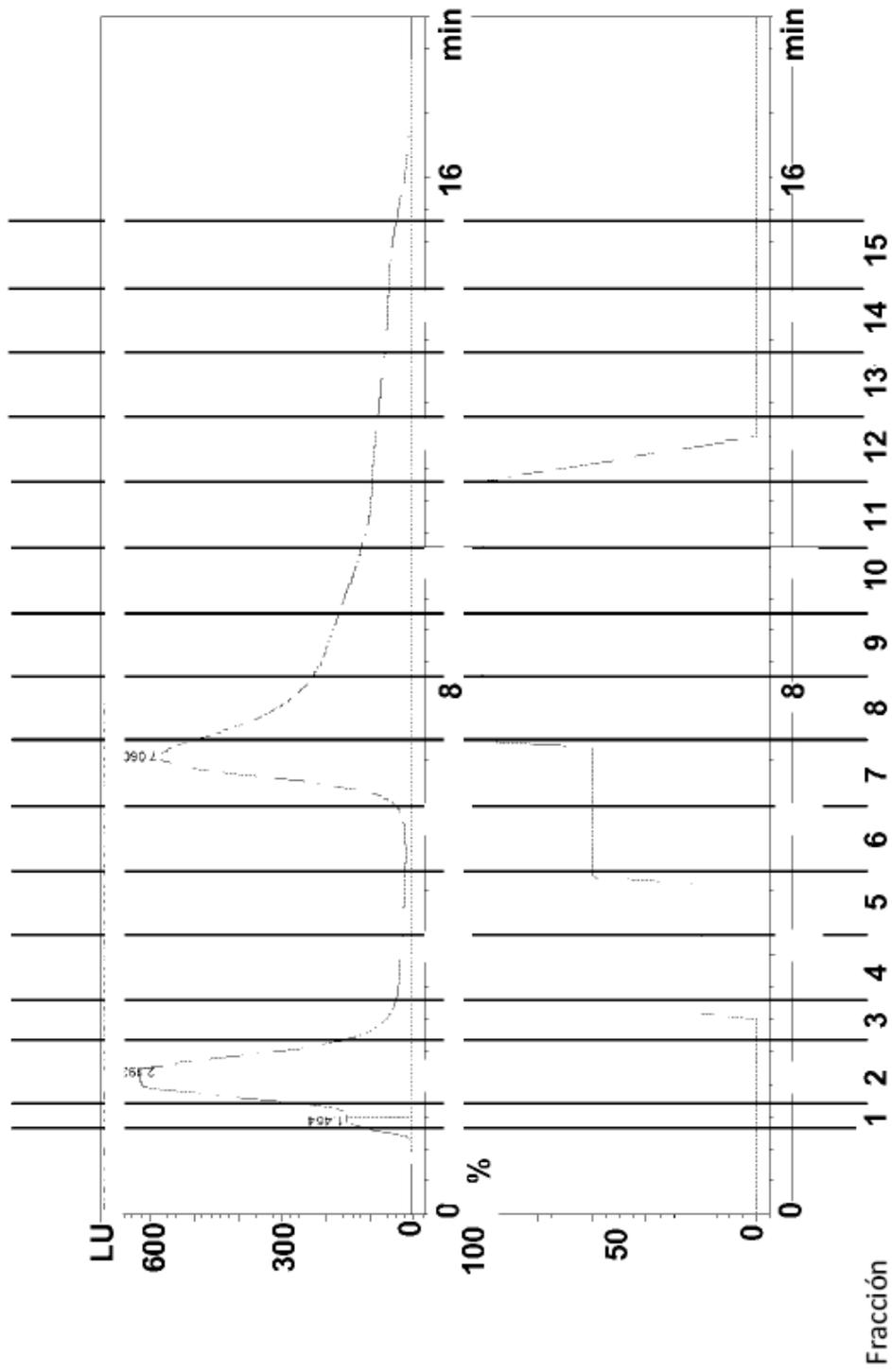


Figura 6 B

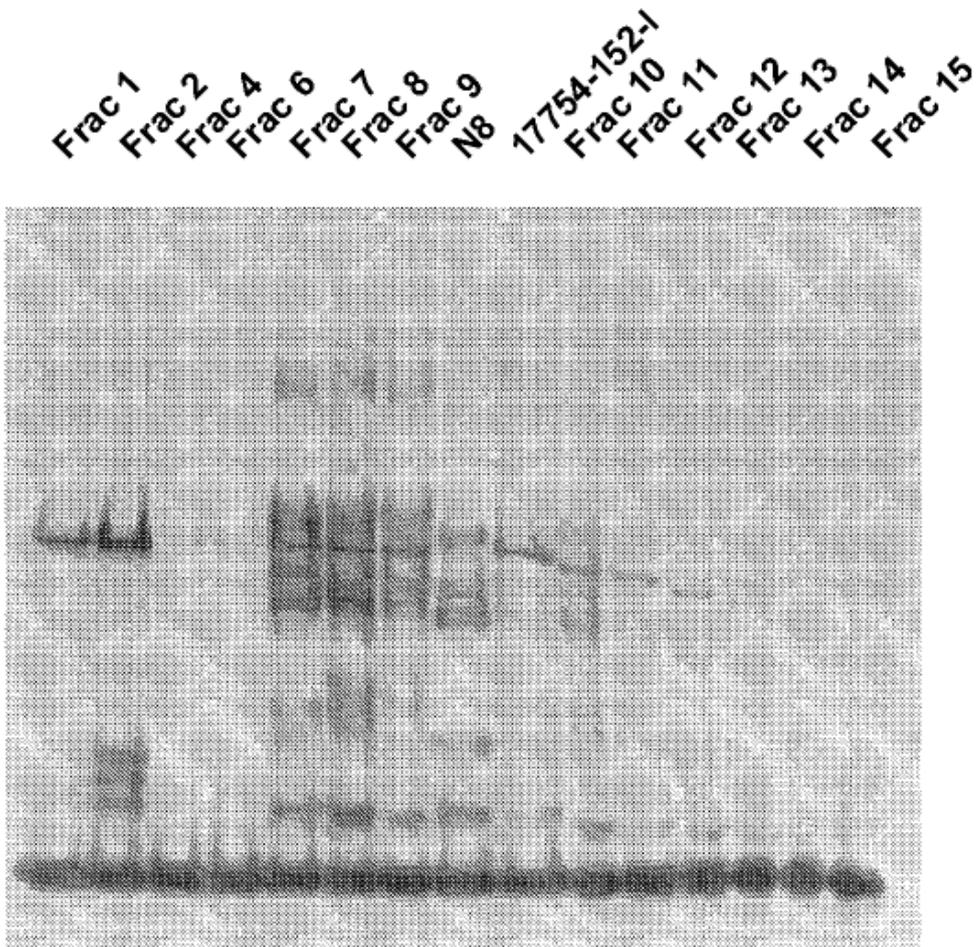
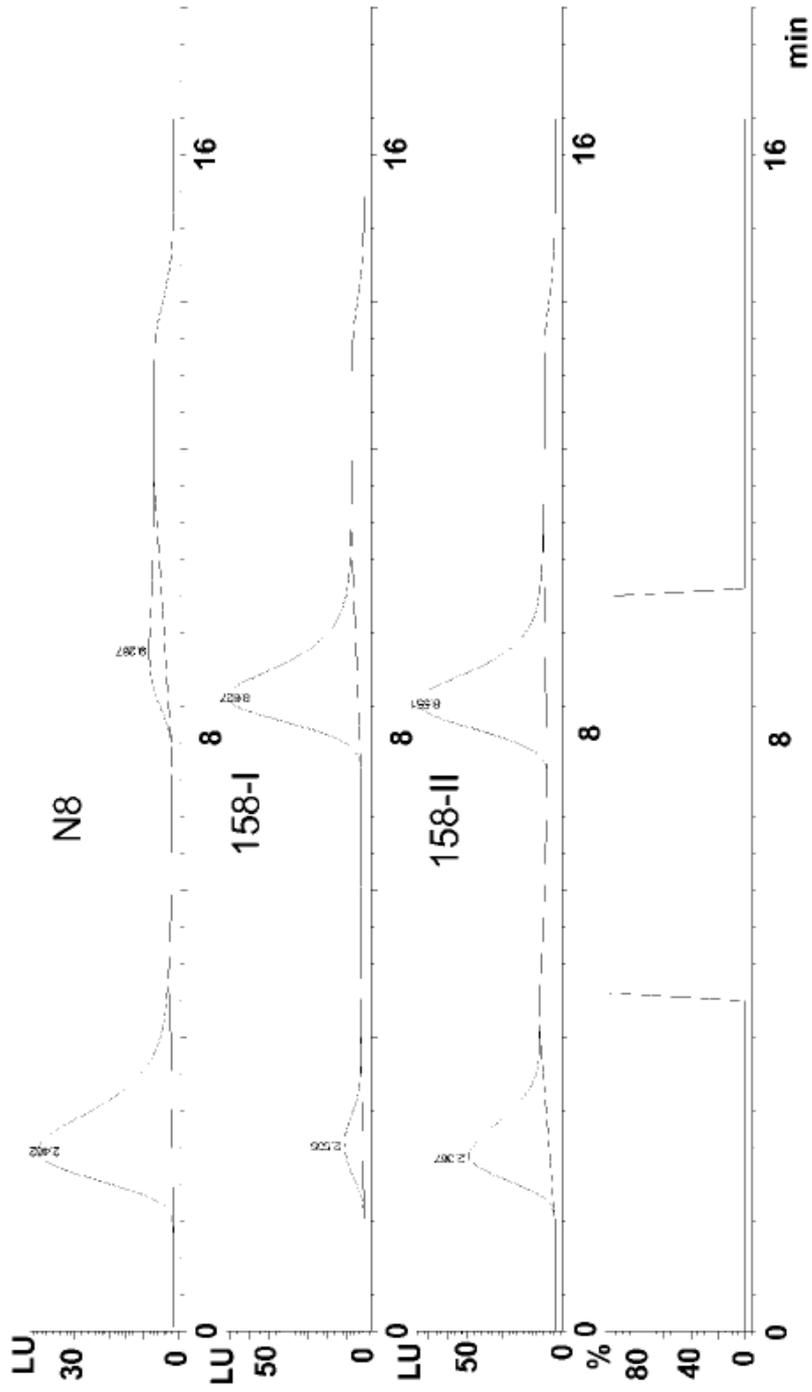


Figura 7



*Figura 8*

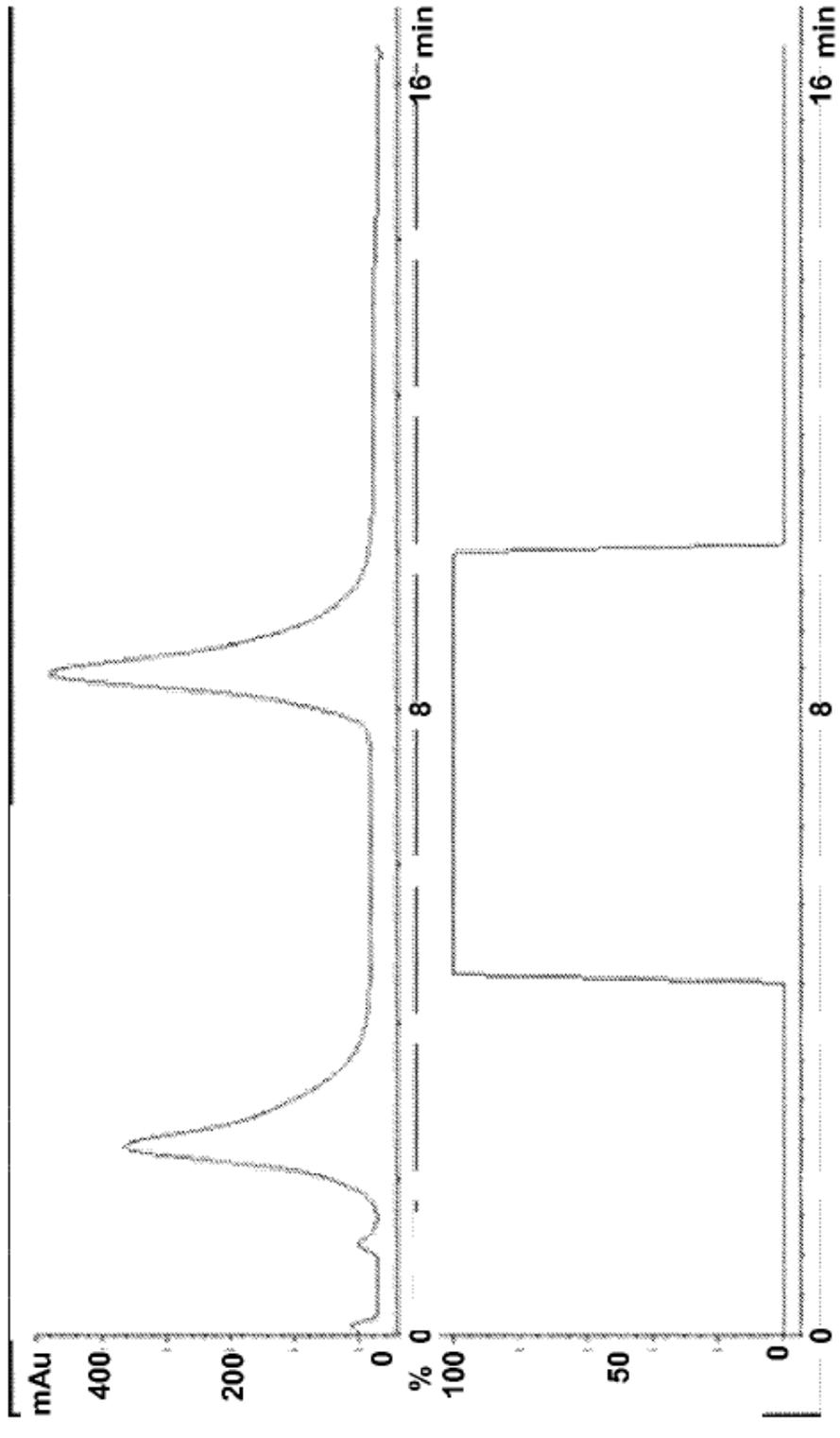


Figura 9 A

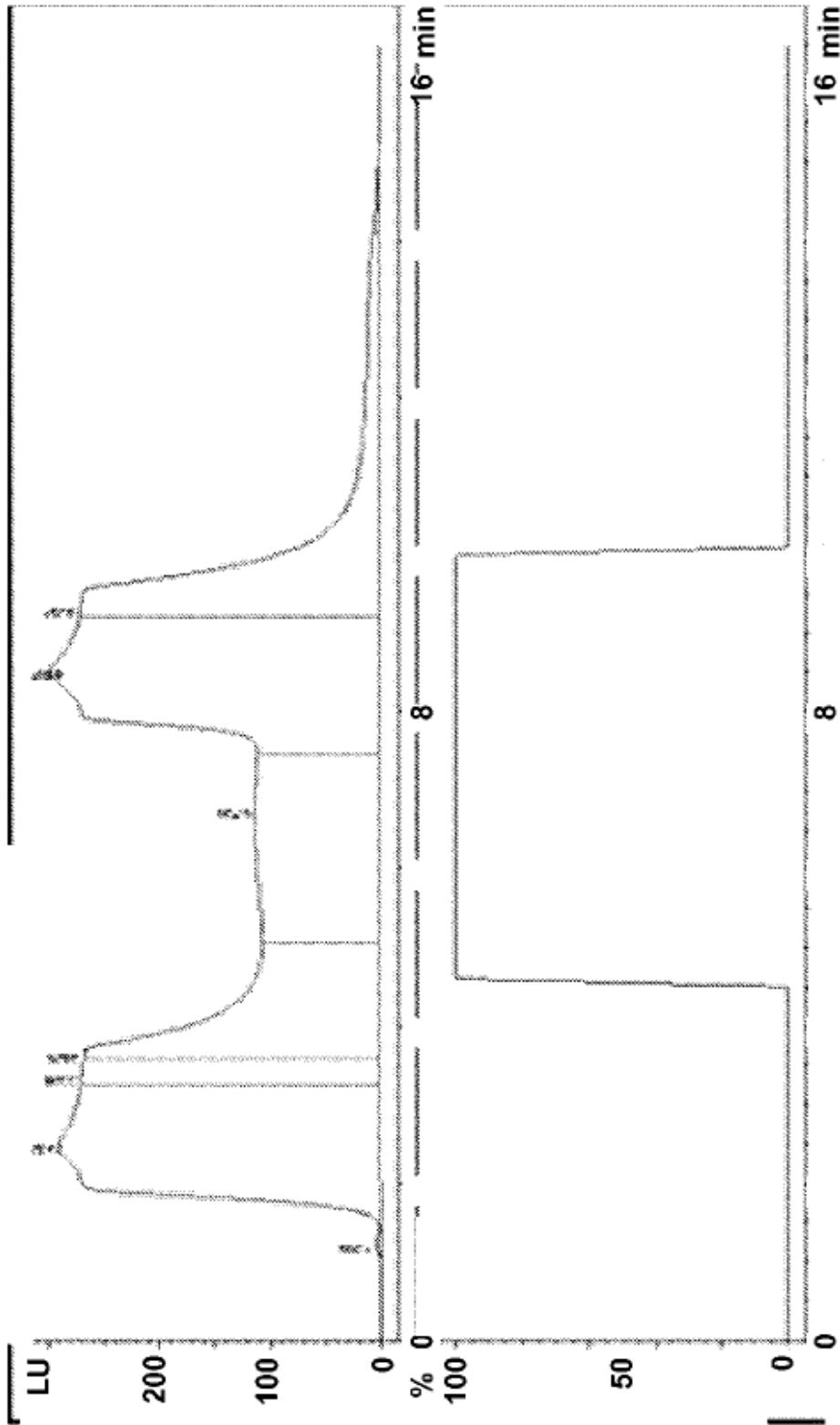
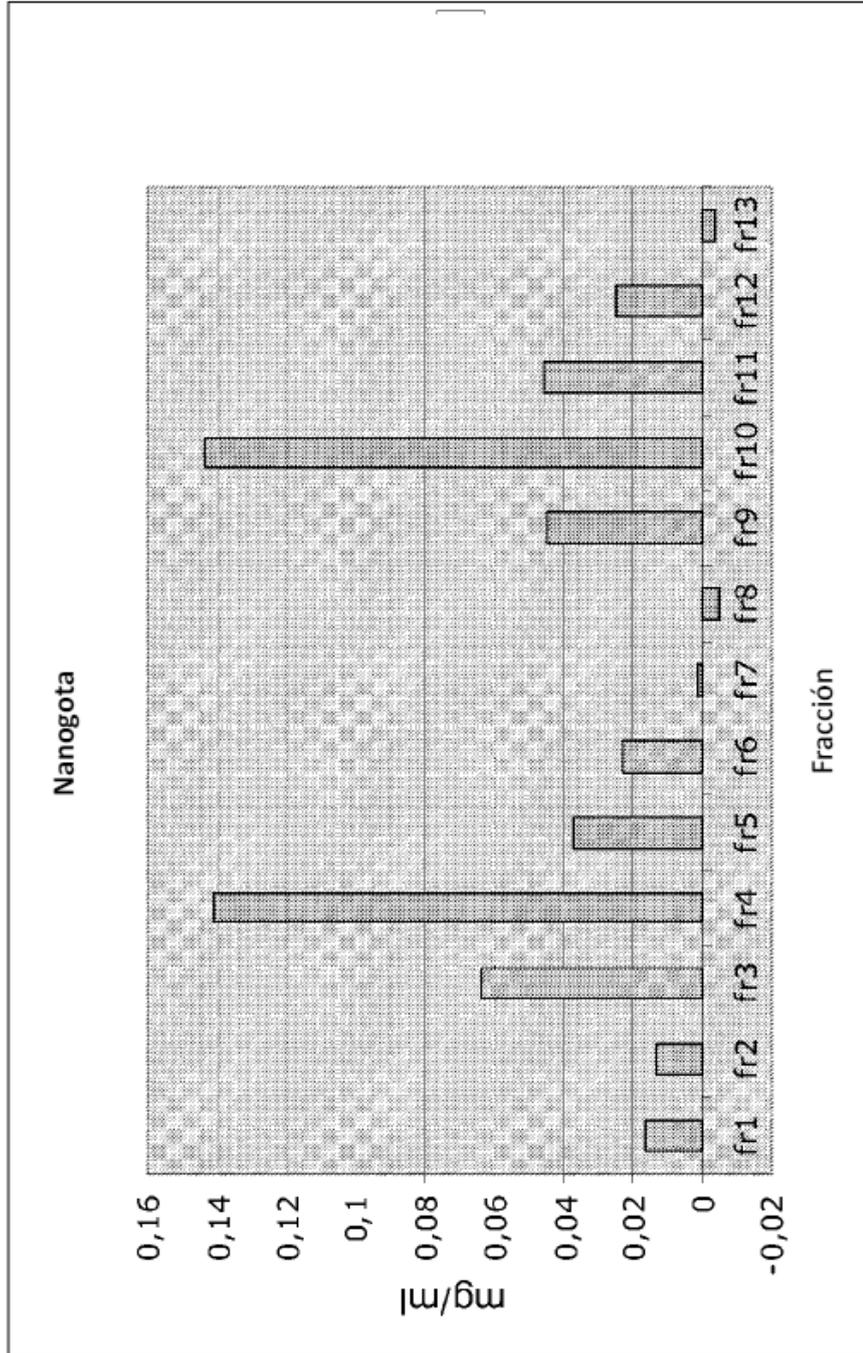
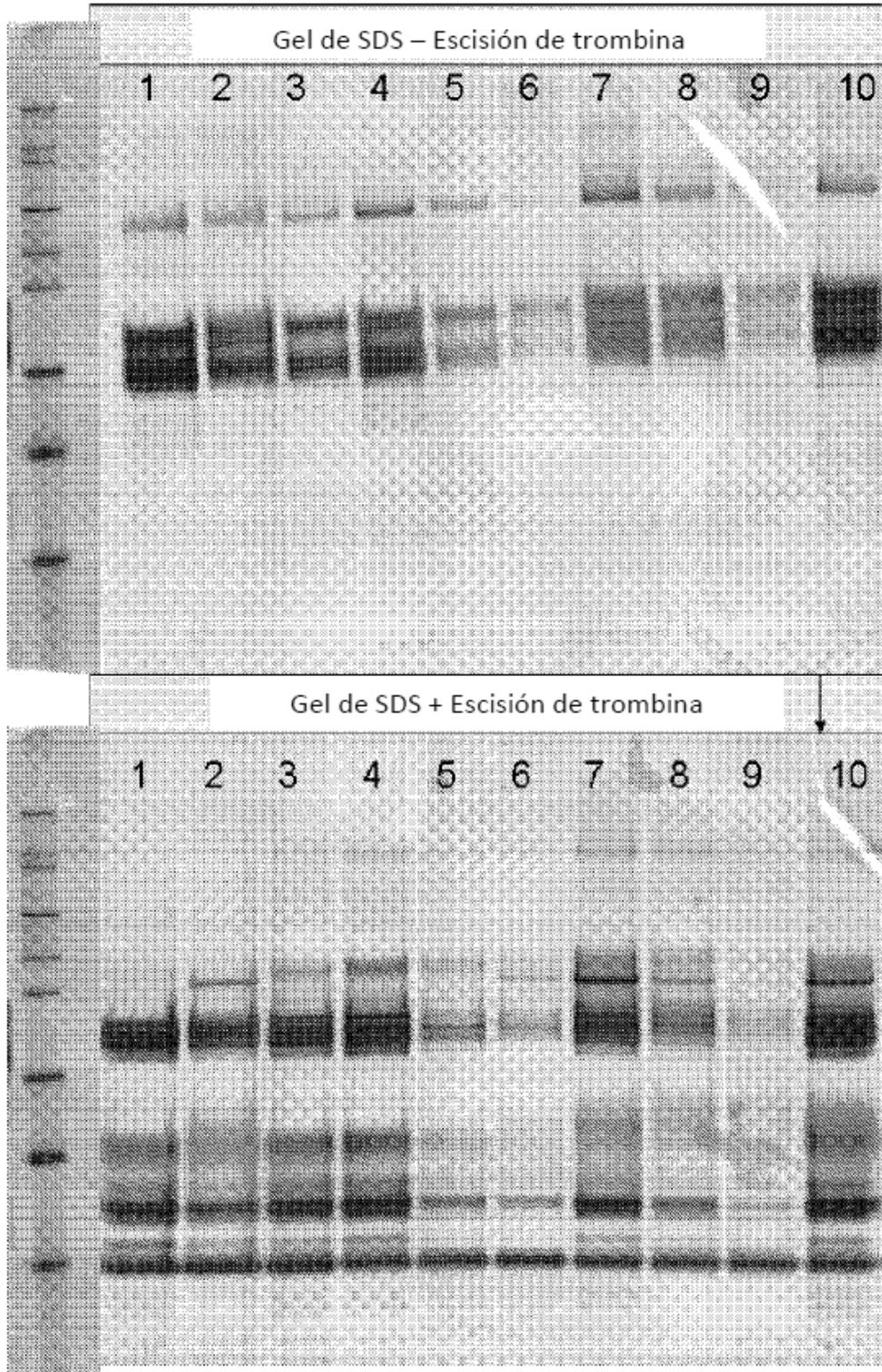


Figura 9 B

Figura 10 A





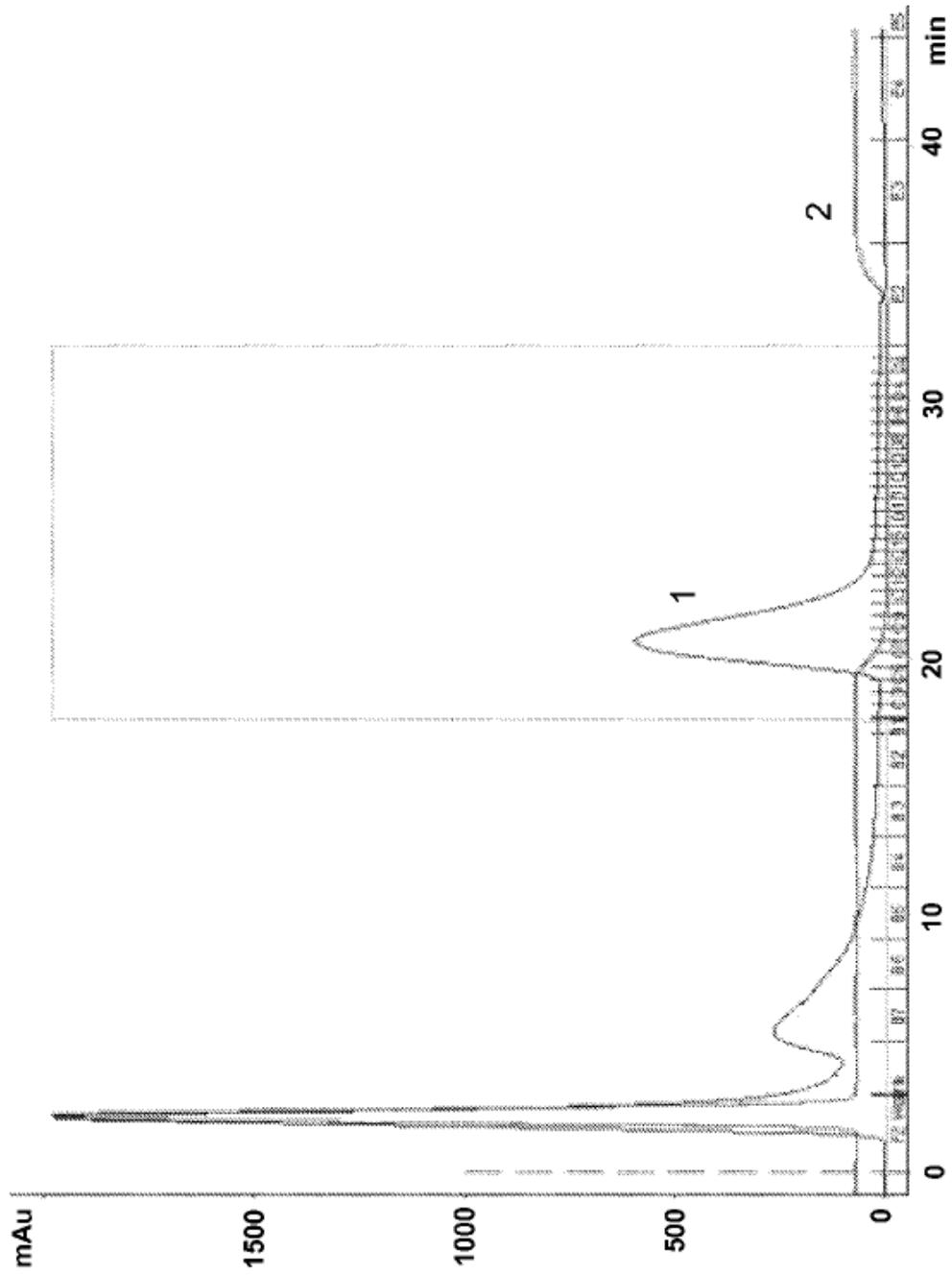


Figura 11 A

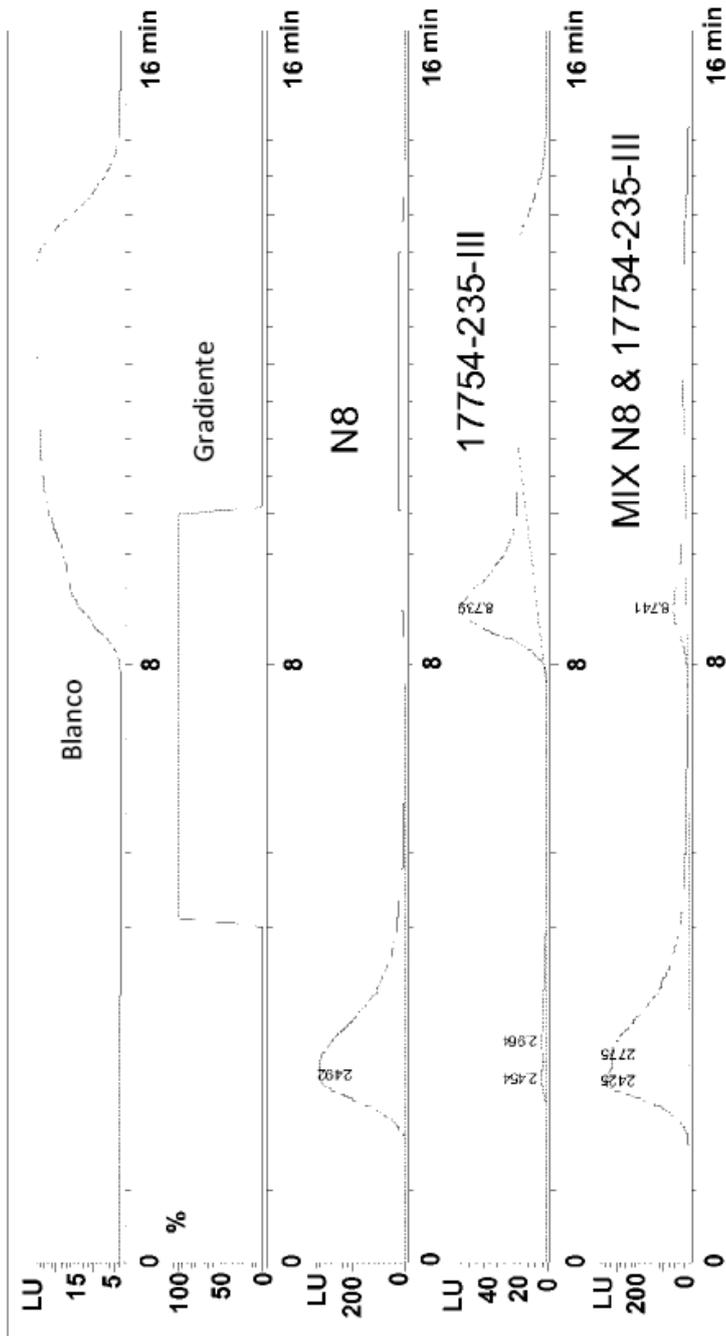
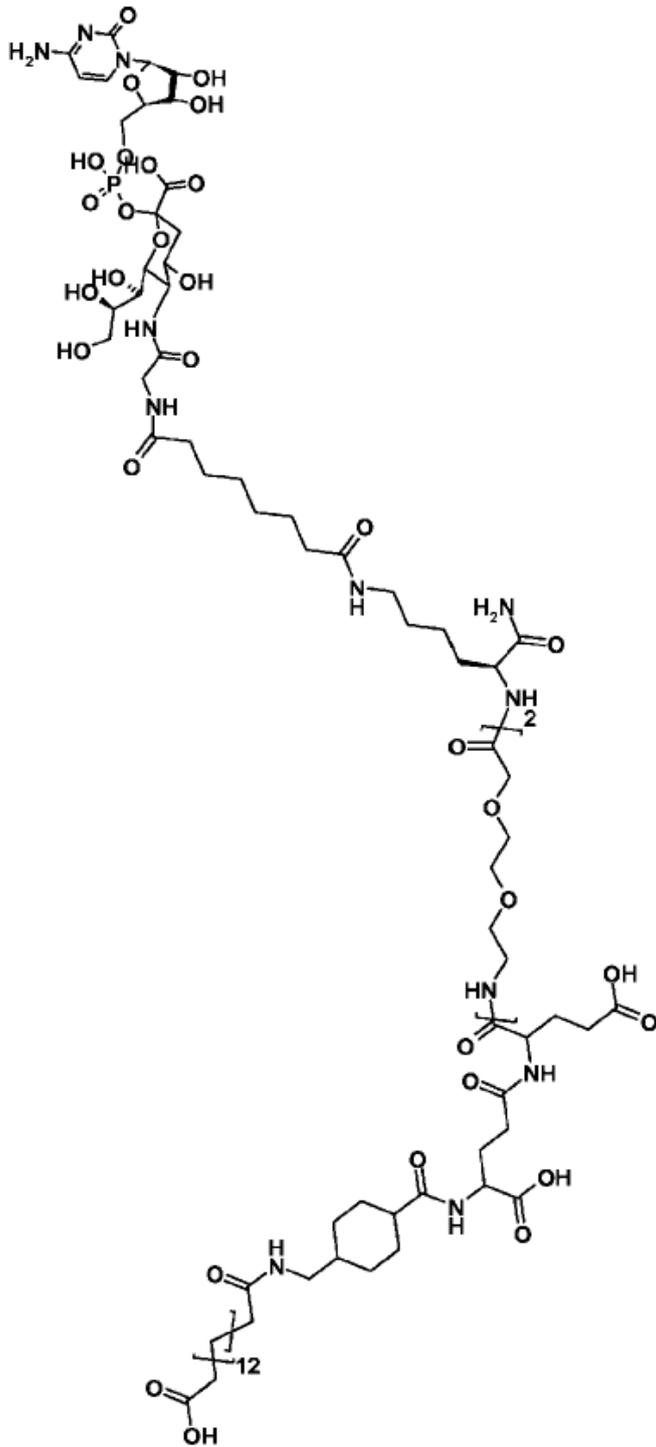


Figura 11 B



*Figura 11 C*

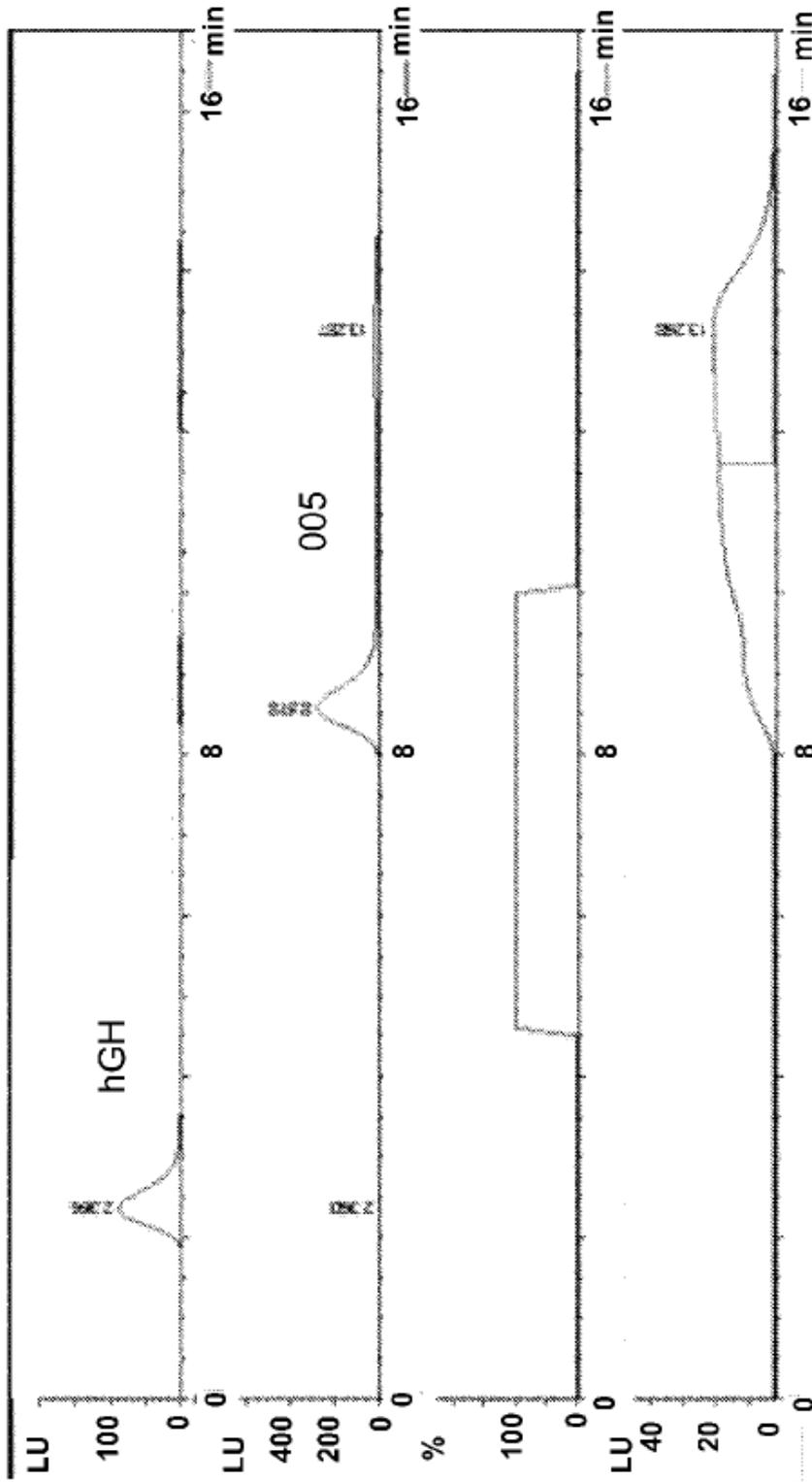


Figura 12 A

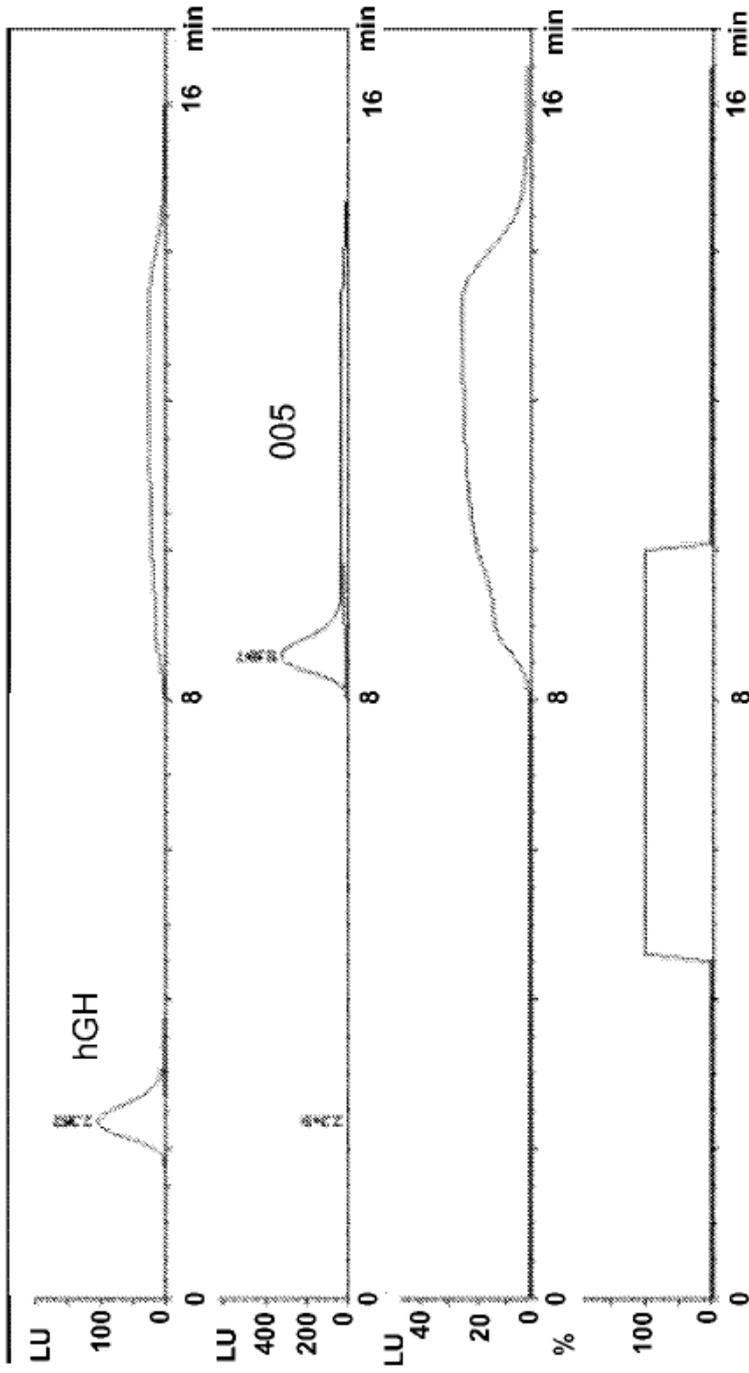


Figura 12 B

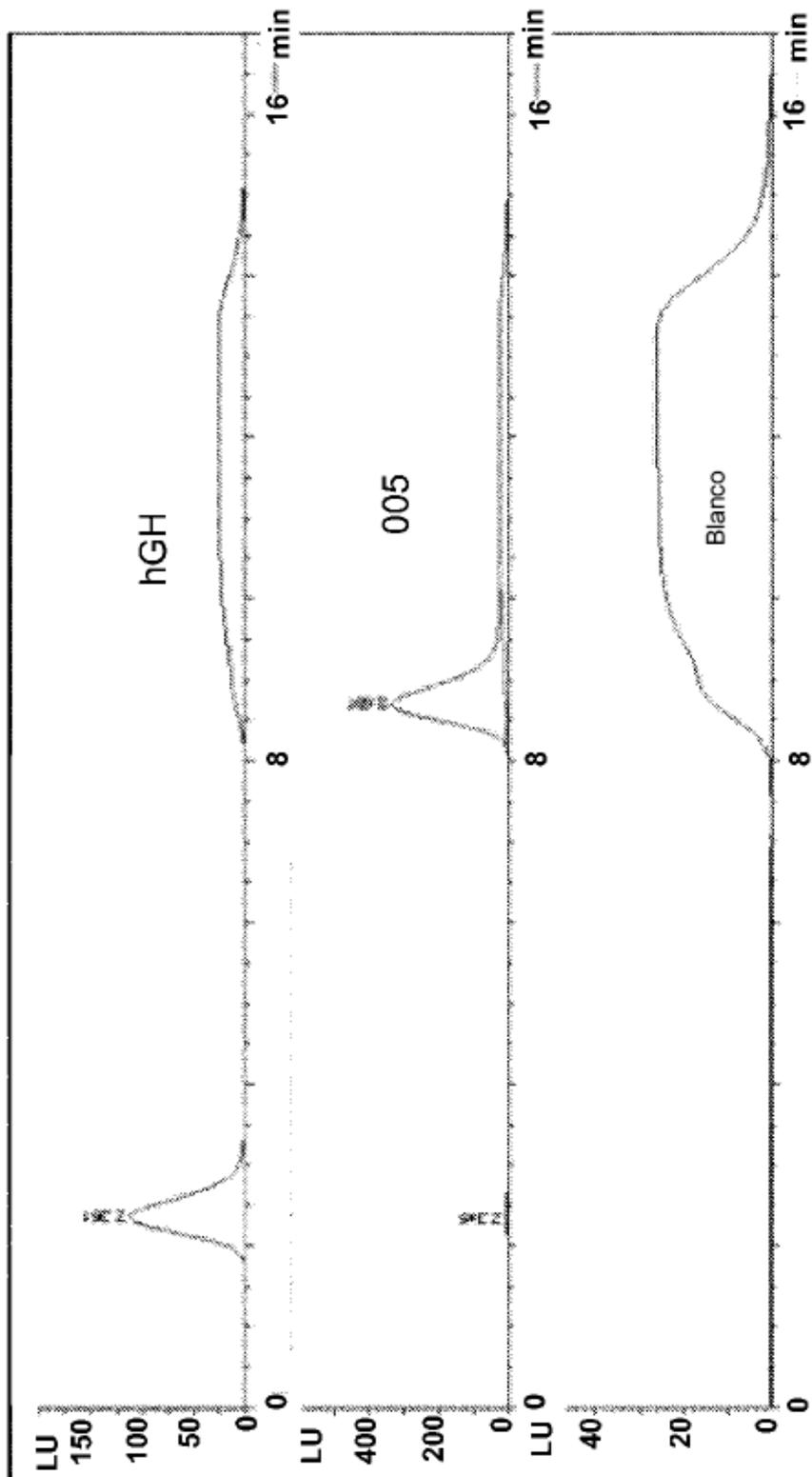


Figura 12C

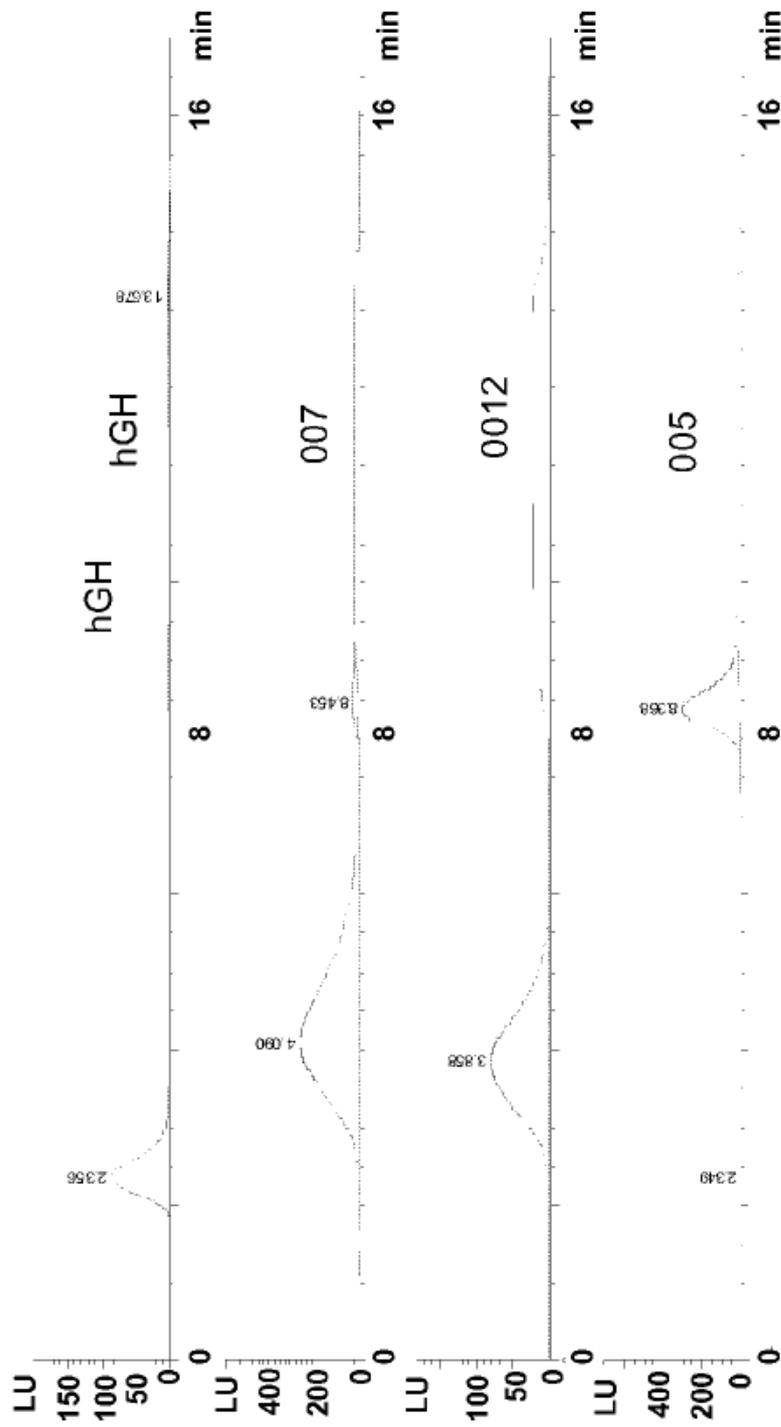


Figura 13 A

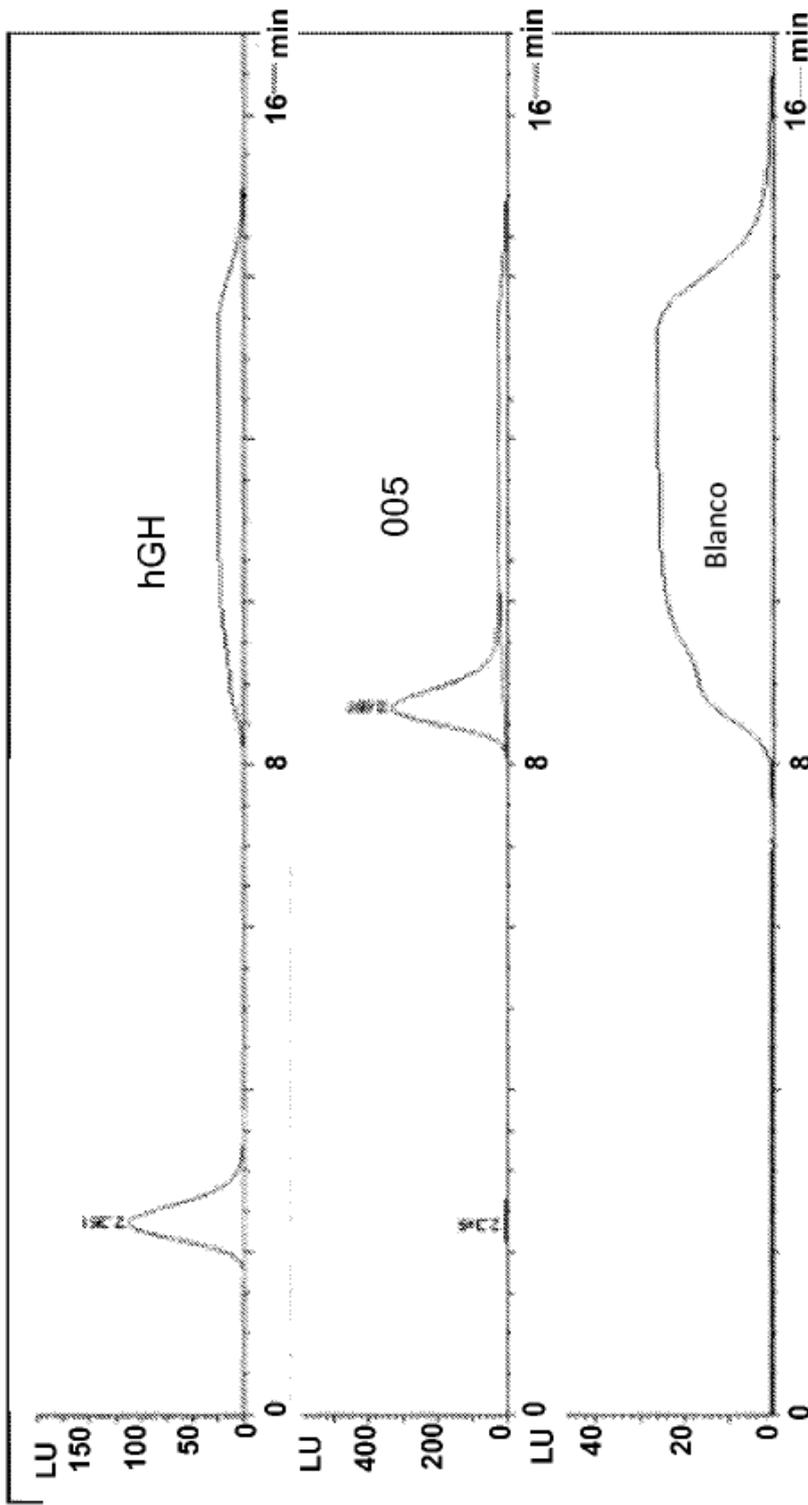


Figura 13 B

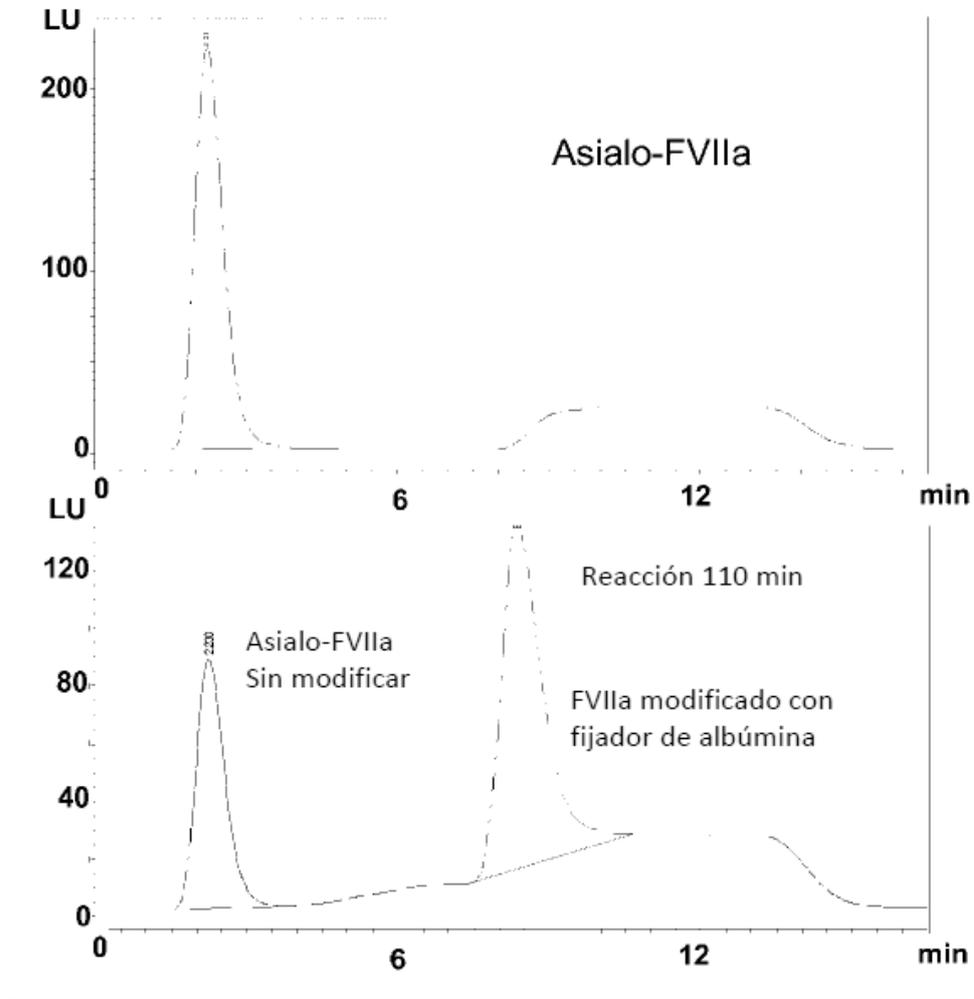


Figura 14

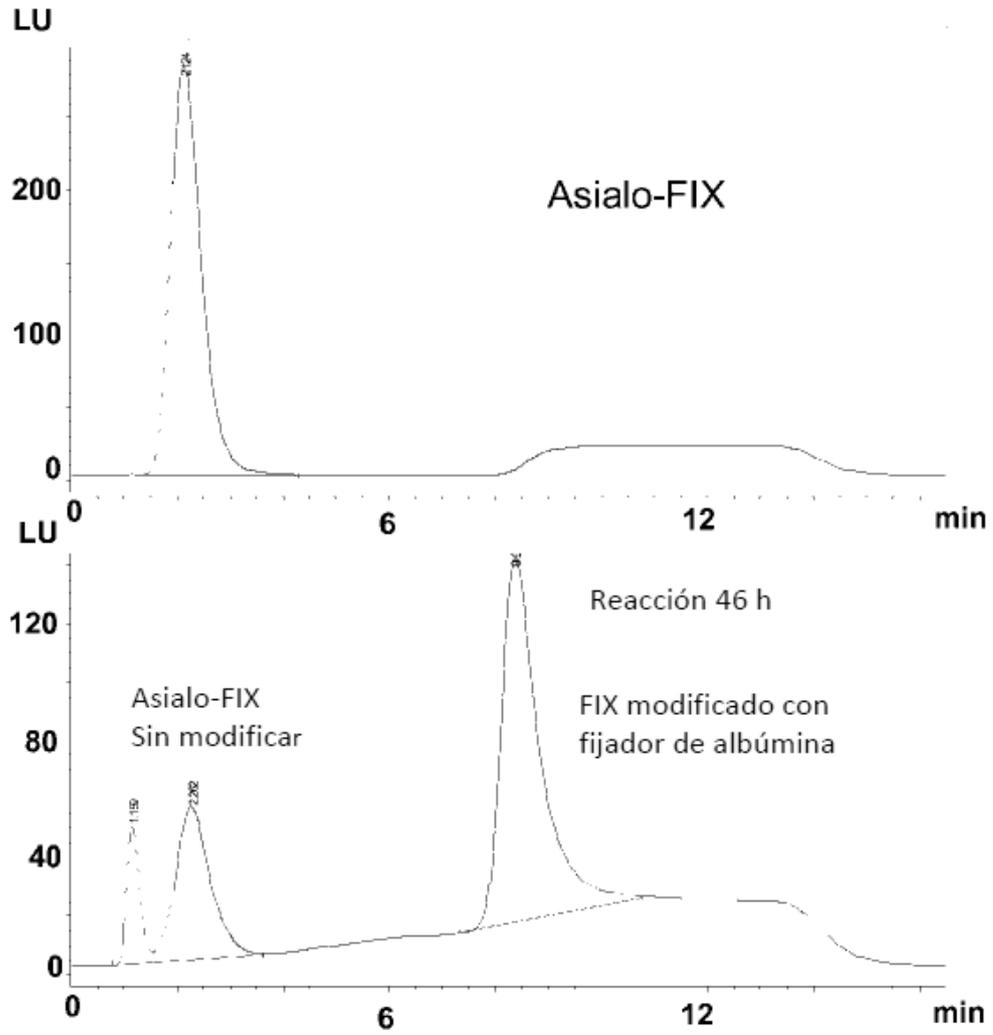


Figura 15