

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 954**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2010 PCT/US2010/043242**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2011 WO11017055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2010 E 10738119 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2459224**

54 Título: **Conjugados de proteína de la coagulación sanguínea**

30 Prioridad:

21.05.2010 US 347136 P
27.07.2009 US 228828 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.01.2017

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark, Opfikon, CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

SIEKMANN, JUERGEN;
HAIDER, STEFAN;
ROTTENSTEINER, HANSPETER y
TURECEK, PETER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 597 954 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

Conjugados de proteína de la coagulación sanguínea

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a materiales y métodos para conjugar un ácido polisialico a una proteína de la coagulación sanguínea.

Antecedentes de la invención

10 Los polipéptidos terapéuticos, tales como las proteínas de la coagulación sanguínea, incluyendo el Factor IX (FIX), el Factor VIII (FVIII), el Factor VIIa (FVIIa), el Factor de Von Willebrand (VWF), el Factor FV (FV), el Factor X (FX), el Factor XI (FXI), el Factor XII (FXII), la trombina (FII), la proteína C, la proteína S, tPA, PAI-1, el factor tisular (TF) y la proteasa ADAMTS 13, se degradan rápidamente por enzimas proteolíticas y se neutralizan por anticuerpos. Esto reduce su semivida y su tiempo de circulación, limitando de este modo su eficacia terapéutica. Se necesitan dosis relativamente altas y administraciones frecuentes para obtener y mantener el efecto terapéutico o profiláctico deseado de estas proteínas de la coagulación. Como consecuencia de ello, es difícil obtener una regulación de la dosis adecuada y la necesidad de tener que efectuar administraciones intravenosas frecuentes impone restricciones a la forma de vida de los pacientes.

15 La PEGilación de los fármacos de polipéptidos los protege en la circulación y mejora sus perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos (Harris y Chess, Nat Rev Drug Discov. 2003; 2:214-21). El proceso de PEGilación une unidades repetitivas de polietilenglicol (PEG) a un fármaco de polipéptidos. Las moléculas de PEG tienen un gran volumen hidrodinámico (5-10 veces el tamaño de las proteínas globulares), son altamente solubles en agua e hidratadas, no tóxicas, no inmunogénicas y se aclaran rápidamente del cuerpo. La PEGilación de las moléculas puede dar lugar a una resistencia aumentada de los fármacos a la degradación enzimática, a una semivida *in vivo* aumentada, a una frecuencia de dosificación reducida, a una inmunogenicidad disminuida, a una estabilidad física y térmica aumentada, a una solubilidad aumentada, a una estabilidad en líquidos aumentada y a una agregación reducida. Los primeros fármacos PEGilados fueron aprobados por la FDA a principios de la década de 1990. Desde entonces, la FDA ha aprobado varios fármacos PEGilados para administración oral, inyectable y tópica.

20 El ácido polisialico (PSA), también conocido como ácido colomínico (CA), es un polisacárido de origen natural. Es un homopolímero de ácido N-acetilneuramínico con enlaces α (2 \rightarrow 8) cetosídicos y contiene grupos diol vecinales en su extremo no reductor. Está cargado negativamente y es un componente natural del cuerpo humano. Puede producirse fácilmente en bacterias en grandes cantidades y con características físicas predeterminadas (patente de Estados Unidos n.º 5.846.951). Debido a que el PSA producido por bacterias es química y inmunológicamente idéntico al PSA producido en el cuerpo humano, el PSA bacteriano es no inmunogénico, incluso cuando se acopla a proteínas. A diferencia de algunos polímeros, el PSA es biodegradable. Se ha demostrado que el acoplamiento covalente del ácido colomínico a la catalasa y la asparaginasa aumenta la estabilidad enzimática en presencia de enzimas proteolíticas o plasma sanguíneo. En estudios comparativos *in vivo* con asparaginasa polisialilada y sin modificar reveló que la polisialilación aumentaba la semivida de la enzima (Fernandes y Gregoriadis, Int Biochimica Biophysica Acta 1341:26-34, 1997).

25 La preparación de los conjugados mediante la formación de un enlace covalente entre el polímero soluble en agua y la proteína terapéutica puede llevarse a cabo mediante diversos métodos químicos. Por ejemplo, el acoplamiento de derivados de PEG a péptidos o proteínas es revisado por Roberts y col., (Adv Drug Deliv Rev 2002;54:459-76). Un enfoque para acoplar polímeros solubles en agua a proteínas terapéuticas es la conjugación de los polímeros a través de los restos de hidrato de carbono de la proteína. Los grupos hidroxilo (OH) vecinales de hidratos de carbono en proteínas pueden ser fácilmente oxidados con peryodato de sodio (NaIO₄) para formar grupos aldehído activos (Rothfus et Smith, J Biol Chem 1963; 238: 1402-1410; Posteriormente, el polímero se puede acoplar a los grupos aldehído de los hidratos de carbono mediante el uso de reactivos que contienen, por ejemplo, un grupo hidrazida activo (Wilchek M y Bayer EA, Methods Enzymol 1987; 138: 429-42). Una tecnología más reciente es el uso de reactivos que contienen grupos aminooxi que reaccionan con aldehídos para formar enlaces oxima (documentos WO 96/40662, WO2008/025856).

30 Los ejemplos adicionales que describen la conjugación de un polímero soluble en agua a una proteína terapéutica se describen en el documento WO 06/071801, que enseña la oxidación de restos de hidrato de carbono en el factor de Von Willebrand y el posterior acoplamiento a PEG usando química de hidrazida; la publicación de Estados Unidos n.º 2009/0076237, que enseña la oxidación de rFVIII y el posterior acoplamiento a PEG y otros polímeros solubles en agua (por ejemplo, PSA, HES, dextrano) usando la química de hidrazida; el documento WO 2008/025856, que enseña la oxidación de diferentes factores de coagulación, por ejemplo, rFIX, FVIII y FVIIa, y el posterior acoplamiento a, por ejemplo, PEG, utilizando la química de aminooxi mediante la formación de un enlace oxima; y la patente de Estados Unidos n.º 5.621.039 que enseña la oxidación de FIX y el posterior acoplamiento a PEG usando química de hidrazida.

35 Recientemente, se ha descrito un procedimiento mejorado que comprende oxidación suave con peryodato de ácidos siálicos para generar aldehídos, seguido de la reacción con un grupo aminooxi que contiene el reactivo en presencia

de cantidades catalíticas de anilina (Dirksen A et Dawson PE, Bioconjugate Chem. 2008;19:2543–8; y Zeng Y y col., Nature Methods 2009;6:207–9). La catálisis de anilina acelera drásticamente la unión de la oxima, lo que permite el uso de concentraciones muy bajas del reactivo.

5 A pesar de los procedimientos disponibles de la conjugación de polímeros solubles en agua a proteínas terapéuticas, sigue habiendo una necesidad de desarrollar materiales y procedimientos para conjugar polímeros solubles en agua a proteínas que mejore las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas de la proteína al tiempo que se reducen al mínimo los costes asociados con los diversos reactivos.

Sumario de la invención

10 La presente invención proporciona materiales y procedimientos para conjugar polímeros a proteínas que mejoran las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas de la proteína y reducen al mínimo los costes asociados con los diversos reactivos.

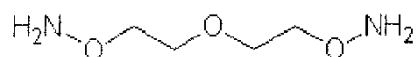
15 En una realización de la invención, un método de conjugación de un polímero soluble en agua a un resto de hidrato de carbono oxidado de una proteína de la coagulación sanguínea comprende poner en contacto el resto de hidrato de carbono oxidado con un polímero activado soluble en agua en condiciones que permiten la conjugación; la proteína de la coagulación sanguínea se selecciona del grupo que consiste en Factor IX (FIX), Factor VIII (FVIII), o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo del mismo; el polímero soluble en agua, que contiene un grupo aminooxi activo, es un ácido polisialico (PSA); y el resto de hidrato de carbono oxidado a través de la incubación con un tampón que comprende un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio (NaIO₄), tetraacetato de plomo (Pb(OAc)₄) y perrutenato de potasio (KRuO₄); en el que se forma un enlace oxima entre el resto de hidrato de carbono oxidado y el grupo aminooxi activo en el polímero soluble en agua.

20 El polímero soluble en agua de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente es PSA. En una realización relacionada, el PSA comprende aproximadamente de 5 a 500 o 10 a 300 unidades de ácido siálico. En otra realización más, la proteína de la coagulación sanguínea de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente es FIX. En otra realización más, la proteína de la coagulación sanguínea de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente es FVIII. En otra realización adicional, se proporciona el procedimiento mencionado anteriormente, en el que el agente oxidante es peryodato de sodio (NaIO₄). En otra realización, el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína de la coagulación sanguínea de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente se encuentra en el péptido de activación de la proteína de la coagulación sanguínea.

25 En otra realización más de la invención, se proporciona el procedimiento mencionado anteriormente, en el que el PSA se prepara a través de una reacción de un enlazador aminooxi activado con PSA oxidado;

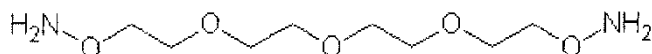
en el que el enlazador aminooxi se selecciona del grupo que consiste en:

un enlazador 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina de fórmula:



y

35 un enlazador 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina de fórmula:



40 en la que el PSA se oxida a través de incubación con un agente oxidante para formar un grupo aldehído terminal en el extremo no reductor del PSA. En otra realización más, se proporciona el procedimiento mencionado anteriormente, en el que el enlazador aminooxi activado comprende 1-50 unidades de etilenglicol. En otra realización más, se proporciona un procedimiento mencionado anteriormente, en el que el enlazador aminooxi es 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina. En una realización relacionada, el agente oxidante es NaIO₄.

En otra realización de la invención, se proporciona el procedimiento mencionado anteriormente en el que el contacto del resto de hidrato de carbono oxidado con el polímero activado soluble en agua se produce en un tampón que comprende un catalizador nucleófilo seleccionado entre el grupo que consiste en derivados de anilina y anilina.

45 En otra realización más de la invención, se proporciona un procedimiento mencionado anteriormente que comprende, además, la etapa de reducir un enlace oxima en la proteína de coagulación sanguínea conjugada a través de la incubación de la proteína de coagulación sanguínea conjugada en un tampón que comprende un compuesto reductor seleccionado del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) y ácido ascórbico (vitamina C). En una realización relacionada el compuesto reductor es cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃).

50 En otra realización de la invención, se proporciona una proteína de coagulación sanguínea modificada producida por un procedimiento mencionado anteriormente.

En otra realización más de la invención, se proporciona un FIX modificado que comprende una molécula de FIX o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo del mismo; y al menos un PSA aminooxi unido a la molécula de FIX, en el que dicho PSA aminooxi está unido al FIX a través de uno o más restos de hidrato de carbono.

5 En el presente documento también se divulga un FVIIa modificado que comprende una molécula de FVIIa o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo del mismo; y al menos un PSA aminooxi unido a la molécula de FVIIa, en el que dicho PSA aminooxi está unido al FVIIa a través de uno o más restos de hidrato de carbono.

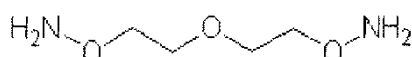
En otra realización más de la invención, se proporciona un FVIII modificado que comprende una molécula de FVIII o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo del mismo; y al menos un PSA aminooxi unido a la molécula de FVIII, en el que dicho PSA aminooxi está unido al FVIII a través de uno o más restos de hidrato de carbono.

10 En el presente documento también se divulga un FIX modificado que comprende una molécula de FIX o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo del mismo; y al menos un PSA aminooxi unido a la molécula de FIX, en el que dicho PSA aminooxi está unido al FIX a través de uno o más restos de hidrato de carbono.

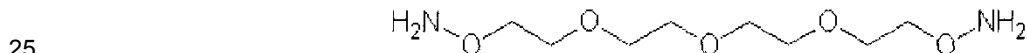
15 En el presente documento también se divulga un FVIIa modificado que comprende una molécula de FVIIa o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo del mismo; y al menos un PEG aminooxi unido a la molécula de FVIIa, en el que dicho PEG aminooxi está unido al FVIIa a través de uno o más restos de hidrato de carbono.

En el presente documento también se divulga un FVIII modificado que comprende una molécula de FVIII o un fragmento, derivado o variante biológicamente activo del mismo; y al menos un PEG aminooxi unido a la molécula de FVIII, en el que dicho PEG aminooxi está unido al FVIII a través de uno o más restos de hidrato de carbono.

20 En otra realización más, se proporciona un polímero soluble en agua que comprende un enlazador aminooxi activo; siendo dicho polímero soluble en agua ácido polisialílico (PSA); dicho enlazador aminooxi activo se selecciona de entre el grupo que consiste en: un enlazador 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina de fórmula:



y un enlazador 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina de fórmula:



En otra realización más, se proporciona el procedimiento mencionado anteriormente, en el que el enlazador aminooxi activado comprende 1-50 unidades de etilenglicol.

Figuras

- La Figura 1 muestra la estructura primaria del factor de coagulación IX.
- 30 La figura 2 muestra el acoplamiento de rFIX oxidado a aminooxi-PSA.
- La Figura 3 muestra la síntesis de los enlazadores diaminoxi solubles en agua 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina y 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina.
- La Figura 4 muestra la preparación de aminooxi-PSA.
- 35 Figura 5 muestra la caracterización analítica del conjugado PSA-rFIX empleando SDS-PAGE y tinción Coomassie.
- Figura 6 muestra la caracterización analítica del conjugado PSA-rFIX empleando la detección con anticuerpos anti-FIX y anti-PSA.
- La Figura 7 muestra la actividad de rFIX nativo y el conjugado PSA-RFIX con relación al tiempo después de las infusiones.
- 40 La Figura 8 muestra los niveles de PSA-rFVIII y de Advate relativos al tiempo tras la infusión.

Descripción detallada de la invención

Las propiedades farmacológicas e inmunológicas de las proteínas terapéuticas se pueden mejorar mediante modificación química y conjugación con compuestos poliméricos tales como polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, ácido polisialílico (PSA), hidratos de carbono, polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, dermatánsulfato, almidón o un derivado de almidón, dextrano, carboximetil-dextrano, óxido de polialquileño (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropileno glicol (PPG), polioxazolina, poliacriloilmorfolina, alcohol polivinílico (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, polietileno-co-anhídrido de ácido

45

maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, poli(1-hidroximetilileno hidroximetilformal) (PHF), y 2-metacrililoiloxi-2'-etiltrimetilamoniofosfato (MPC). Las propiedades de los conjugados resultantes generalmente dependen fuertemente de la estructura y el tamaño del polímero. Por lo tanto, los polímeros con una distribución de tamaño definida y estrecha son generalmente preferidos en la técnica. Los polímeros sintéticos como PEG se pueden fabricar fácilmente con una distribución de tamaño estrecha, mientras que el PSA se puede purificar de una manera tal que tenga como resultado una preparación final de PSA con una distribución de tamaño estrecha. Además, los reactivos de pegilación con cadenas poliméricas definidas y una estrecha distribución de tamaños están en el mercado y disponibles comercialmente a un precio razonable.

La adición de un polímero soluble, tal como a través de polisialilación, es un procedimiento para mejorar las propiedades de una proteína de coagulación sanguínea, tales como FIX, así como otras proteínas de la coagulación (por ejemplo, VWF, FVIIa (véase, por ejemplo, el documento US 2008/0221032A1) y FVIII.

PROTEÍNAS DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA

Como se describe en el presente documento, las proteínas de coagulación sanguínea, incluyendo el factor IX (FIX) y Factor VIII (FVIII) se contemplan en la invención. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "proteína de coagulación sanguínea" se refiere a cualquiera de Factor IX (FIX) y Factor VIII (FVIII) que exhibe actividad biológica que está asociada con la de la proteína de coagulación sanguínea nativa particular.

La cascada de la coagulación sanguínea se divide en tres segmentos distintos: las vías intrínsecas, extrínseca y comunes (Schenone y col., Curr Opin Hematol. 2004; 11:272-7). Esta cascada implica una serie de enzimas serina proteasa (cimógenos) y cofactores de proteínas. Cuando se requiere, un precursor de cimógeno inactivo se convierte en la forma activa, que, por lo tanto, convierte la siguiente enzima en la cascada.

La vía intrínseca requiere los factores de coagulación VIII, IX, X, XI, y XII. El inicio de la vía intrínseca se produce cuando la precalicreína, quinínogeno de alto peso molecular, el factor XI (FXI) y el factor XII (FXII) están expuestos a una superficie cargada negativamente. También se requiere iones de calcio y fosfolípidos secretados por las plaquetas.

La vía extrínseca se inicia cuando la luz vascular de los vasos sanguíneos está dañada. El factor tisular de la glicoproteína de membrana se expone y a continuación se une al factor VII en circulación (FVII) ya pequeñas cantidades preexistentes de su forma FVIIa activada. Esta unión facilita la conversión completa de FVII en FVIIa y, posteriormente, en presencia de calcio y fosfolípidos, la conversión del factor IX (FIX) en el factor IXa (FIXa) y del factor X (FX) en el factor Xa (FXa). La asociación de FVIIa con el factor tisular aumenta la actividad proteolítica acercando más los sitios de unión de FVII para el sustrato (FIX y FX) y mediante la inducción de un cambio conformacional, que mejora la actividad enzimática de FVIIa.

La activación de FX es el punto común de las dos vías. Junto con fosfolípidos y calcio, los factores Va (FVa) y Xa convierten la protrombina en trombina (complejo de protrombinasa), que después escinde el fibrinógeno para formar monómeros de fibrina. Los monómeros se polimerizan para formar hebras de fibrina. El factor XIIIa (FXIIIa) une de manera covalente a estas hebras entre sí para formar una malla rígida.

La conversión de FVII en FVIIa también es catalizada por una serie de proteasas, incluyendo trombina, FIXa, FXa, factor XIa (FXIa), y factor XIIa (FXIIa). Para la inhibición de la fase temprana de la cascada, el inhibidor de la vía del factor apunta al complejo del FVIIa/factor tisular/producto de Fxa.

A. Polipéptidos

En un aspecto, el material de partida de la presente invención es una proteína de coagulación sanguínea, que puede derivar de plasma humano, o producirse mediante técnicas de ingeniería recombinante, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4,757,006; la patente de Estados Unidos n.º 5,733,873; la patente de Estados Unidos n.º 5,198,349; la patente de Estados Unidos n.º 5,250,421; la patente de Estados Unidos n.º 5,919,766; y el documento EP 306 968. Como se describe en el presente documento, la expresión proteína de coagulación sanguínea se refiere a cualquier molécula proteica de la coagulación sanguínea que muestra actividad biológica que está asociada con la proteína de coagulación sanguínea nativa. En una realización de la invención, la molécula proteica de la coagulación sanguínea es una proteína de coagulación sanguínea de longitud completa.

Las moléculas proteicas de coagulación sanguínea contempladas incluyen proteínas de longitud completa, precursores de proteínas de longitud completa, subunidades o fragmentos biológicamente activos de proteínas de longitud completa, así como derivados y variantes biológicamente activos de cualquiera de estas formas de proteínas de la coagulación sanguínea. Por lo tanto, la proteína de coagulación sanguínea incluye las que (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos, sobre una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200,

aproximadamente 300, aproximadamente 400, o más aminoácidos, con un polipéptido codificado por un ácido nucleico de referencia o una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento; y/o (2) se unen específicamente a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales, generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de referencia como se describe en el presente documento, un fragmento inmunogénico de la misma, y/o una variante modificada conservadoramente de la misma.

Según la presente invención, la expresión "proteína de coagulación sanguínea recombinante" incluye cualquier proteína de coagulación sanguínea obtenida mediante tecnología del ADN recombinante. En ciertas realizaciones, el término abarca las proteínas como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "proteína de coagulación sanguínea endógena" incluye una proteína de coagulación sanguínea que se origina del mamífero destinado a recibir tratamiento. El término también incluye la proteína de coagulación sanguínea transcrita a partir de un transgén o cualquier otro ADN extraño presente en dicho mamífero. Como se usa en el presente documento, "proteína de coagulación sanguínea exógena" incluye una proteína de coagulación sanguínea que no se origina del mamífero destinado a recibir tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, "proteína de coagulación sanguínea derivada de plasma" o "plasmática" incluye todas las formas de la proteína que se encuentran en la sangre obtenida de un mamífero que tiene la propiedad de participar en la vía de coagulación.

Tal como se usa en el presente documento "derivado biológicamente activo" o "variante biológicamente activa" incluye cualquier derivado o variante de una molécula que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas de dicha molécula, tales como propiedades de unión, y/o la misma base estructural, tales como una estructura principal peptídica o una unidad polimérica base.

Un "análogo", "variante" o "derivado" es un compuesto sustancialmente similar en estructura y que tiene la misma actividad biológica, aunque en ciertos casos en un distinto grado, a una molécula de origen natural. Por ejemplo, una variante polipeptídica se refiere a un polipéptido que comparte estructura sustancialmente similar y que tiene la misma actividad biológica que un polipéptido de referencia. Las variantes o análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos en comparación con el polipéptido de origen natural del que deriva el análogo, en base a una o más mutaciones que implican (i) deleción de uno o más residuos aminoácidos en uno o más extremos del polipéptido y /o una o más regiones internas de la secuencia polipeptídica de origen natural (por ejemplo, fragmentos), (ii) inserción o adición de uno o más aminoácidos en uno o más extremos (típicamente una "adición" o "fusión") del polipéptido y/o una o más regiones internas (generalmente una "inserción") de la secuencia polipeptídica de origen natural o (iii) sustitución de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos en la secuencia polipeptídica de origen natural. A modo de ejemplo, un "derivado" se refiere a un polipéptido que comparte la misma estructura, o una sustancialmente similar, con un polipéptido de referencia que ha sido modificado, por ejemplo, químicamente.

Los polipéptidos variantes o análogos incluyen variantes de inserción, en las que uno o más restos de aminoácidos se añaden a una secuencia de aminoácidos de la proteína de coagulación sanguínea de la invención. Las inserciones se pueden localizar en uno cualquiera o en ambos extremos de la proteína y/o pueden encontrarse dentro de las regiones internas de la secuencia de aminoácidos de la proteína de coagulación sanguínea. Las variantes de inserción con restos adicionales en uno o ambos extremos incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen marcadores de aminoácidos u otras etiquetas de aminoácidos. En un aspecto, la molécula de proteína de coagulación sanguínea contiene opcionalmente una Met en N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa recombinantemente en una célula bacteriana tal como E. coli.

En las variantes de deleción, se eliminan uno o más restos de aminoácidos en un polipéptido de la proteína de coagulación sanguínea tal como se describe en el presente documento. Las deleciones se pueden efectuar en uno o ambos extremos del polipéptido de la proteína de coagulación sanguínea, y/o con la eliminación de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína de coagulación sanguínea. Por tanto, las variantes de deleción incluyen fragmentos de una secuencia polipeptídica de la proteína de coagulación sanguínea.

En las variantes de sustitución, se eliminan uno o más restos de aminoácidos de un polipéptido de la proteína de coagulación sanguínea y se reemplazan con restos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservadora y las sustituciones conservadoras de este tipo se conocen bien en la técnica. De manera alternativa, la presente invención abarca sustituciones que también son no conservadoras. Las sustituciones conservadoras de ejemplo se describen en Lehninger, [Biochemistry, 2ª Edición; Worth Publishers, Inc., New York (1975), pág.71-77] y se exponen inmediatamente a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVADORAS

CADENA LATERAL CARACTERÍSTICA	AMINOÁCIDO
Apolar (hidrófoba):	
A. Alifática	A L I V P
B. Aromática	F W
C. Que contiene azufre	M

(continuación)

CADENA LATERAL CARACTERÍSTICA	AMINOÁCIDO
D. Al límite	G
Polar sin carga:	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q
C. Sulfhidrilo	C
D. Al límite	G
Cargada positivamente (básica)	K R H
Cargada negativamente (ácida)	D E

De manera alternativa, las sustituciones conservadoras de ejemplo exponen inmediatamente a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVADORAS II

RESTO ORIGINAL	SUSTITUCION DE EJEMPLO
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

5

B. Polinucleótidos

Los ácidos nucleicos que codifican una proteína de coagulación sanguínea de la invención incluyen, por ejemplo y sin limitación, genes, pre-ARNm, ARNm, ADNc, variantes polimórficas, alelos, mutantes sintéticos y de origen natural.

- 10 Los polinucleótidos que codifican una proteína de coagulación sanguínea de la invención también incluyen, sin limitación, los que (1) hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de referencia como se describe en el presente documento, y variantes modificadas de forma conservadora de los mismos; (2) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o más de identidad de secuencia de nucleótidos, sobre una región de al menos aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 500, aproximadamente 1000, o más nucleótidos (hasta la secuencia de longitud completa de 1218 nucleótidos de la proteína madura), a una secuencia de ácido nucleico de referencia como se describe en el presente documento. Ejemplos de condiciones de "hibridación rigurosas" incluyen hibridación a 42 °C en 50 % de formamida, 5X SSC, NaPO₄ 20 mM, a pH 6,8; y lavado en 1X SSC a 55 °C durante 30 minutos. Se entiende que se pueden realizar variaciones en estas condiciones a modo de ejemplo sobre la base de la longitud y el contenido de nucleótidos GC de las secuencias que van a hibridar. Las fórmulas estándar en la técnica son adecuadas para determinar las condiciones de hibridación apropiadas. Véase Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) §§ 9,47–9,51.
- 25 Una secuencia de polipéptido o polinucleótido "de origen natural" es típicamente de un mamífero, que incluye, sin limitaciones, un primate, por ejemplo, un ser humano; un roedor, por ejemplo, una rata, un ratón, un hámster; una vaca, un cerdo, un caballo, una oveja o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y las proteínas de la invención pueden ser moléculas recombinantes (por ejemplo, heterólogas y que codifican la secuencia de tipo silvestre o una variante de la misma, o de origen no natural).
- 30 En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos y polinucleótidos mencionados anteriormente se ilustran mediante las siguientes proteínas de la coagulación sanguínea.

Factor VIIa

El FVII (también conocido como factor estable o proconvertina) es una glicoproteína de serina proteasa dependiente de vitamina K con un papel fundamental en la hemostasia y la coagulación (Eigenbrot, *Curr Protein Pept Sci.* 2002;3:287–99).

5 FVII se sintetiza en el hígado y se secreta como una glicoproteína de cadena única de 48 kD. El FVII comparte con todas las glicoproteínas serina proteasa dependientes de vitamina K una estructura de dominio de proteína similar que consiste en un dominio de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) en el extremo amino con 9-12 restos responsables de la interacción de la proteína con las membranas lipídicas, un dominio de serina proteasa en el extremo carboxi (dominio catalítico), y dos dominios de tipo factor de crecimiento epidérmicos que contienen un sitio de unión al ion calcio que media en la interacción con el factor tisular. La gamma-glutamil carboxilasa cataliza la carboxilación de restos de Gla en la porción amino-terminal de la molécula. La carboxilasa es dependiente de una forma reducida de la vitamina K para su acción, que se oxida en la forma epóxido. Se requiere vitamina K epóxido reductasa para convertir la forma epóxido de la vitamina K de nuevo en la forma reducida.

15 La mayor proporción de FVII circula en el plasma en forma de cimógeno y la activación de esta forma da lugar a la escisión del enlace peptídico entre la arginina 152 y la isoleucina 153. El FVIIa activado resultante consiste en una cadena ligera derivada de NH₂ (20 kDa) y una cadena pesada derivada del COOH (30 kDa) unido a través de un único enlace disulfuro (Cys 135 a Cys 262). La cadena ligera contiene el dominio Gla de unión a la membrana, mientras que la cadena pesada contiene el dominio catalítico.

20 La concentración plasmática de FVII determinada por factores genéticos y ambientales es de aproximadamente 0,5 mg/ml (Pinotti y col., *Blood.* 2000; 95:3423–8). Diferentes genotipos de FVII pueden dar lugar a diferencias de varias veces en los niveles medios de FVII. Los niveles plasmáticos de FVII se elevan durante el embarazo en mujeres sanas y también aumentan con la edad y son mayores en las mujeres y en personas con hipertrigliceridemia. El FVII tiene la semivida más corta de todos los factores procoagulantes (3-6 h). La concentración plasmática media de FVIIa es 3,6 ng/ml en individuos sanos y de la semivida en circulación de FVIIa es relativamente larga (2,5 h) en comparación con otros factores de coagulación.

25 La deficiencia hereditaria de FVII es un raro trastorno de la coagulación autosómico recesivo con una prevalencia estimada de 1 caso por cada 500.000 personas en la población general (Acharya y col., *J Thromb Haemost.* 2004;2248–56). La deficiencia adquirida de FVII de inhibidores es también muy rara. También se han comunicado casos con la deficiencia en asociación con medicamentos tales como penicilinas, cefalosporinas, y anticoagulantes orales. Además, se ha informado que la deficiencia de FVII adquirida se produce espontáneamente o con otras afecciones, tales como mieloma, sepsis, anemia aplásica, con terapia con interleucina-2 y globulina antitumoral.

30 Las secuencias de polinucleótidos de polipéptidos de referencia incluyen, por ejemplo, GenBank números de acceso. J02933 para la secuencia genómica, M13232 para el ADNc (Hagen y col., *PNAS* 1986; 83: 2412–6), y P08709 for para la secuencia polipeptídica. Se han descrito diversos polimorfismos del FVII, por ejemplo véase, Sabater-Lleal y col., (*Hum Genet.* 2006; 118:741–51).

Factor IX

35 El FIX es una proteína plasmática dependiente de vitamina K que participa en la vía intrínseca de la coagulación sanguínea mediante la conversión de FX en su forma activa en presencia de iones de calcio, fosfolípidos y FVIIIa. La capacidad catalítica predominante de FIX es como una serina proteasa con especificidad por un enlace particular de arginina-isoleucina en FX. La activación del FIX se produce mediante el FXIa que causa la escisión del péptido de activación de FIX para producir una molécula de FIX activado que comprende dos cadenas mantenidas unidas por uno o más enlaces disulfuro. Los defectos en FIX son la causa de la hemofilia B recesiva ligada al cromosoma X.

45 La hemofilia A y B son enfermedades hereditarias que se caracterizan por deficiencias en los polipéptidos de FVIII y FIX, respectivamente. La causa subyacente de las deficiencias es, frecuentemente, el resultado de mutaciones en los genes de FVIII y FIX, ambos de los cuales están localizados en el cromosoma X. La terapia tradicional para las hemofilias a menudo implica la administración intravenosa de proteínas de la coagulación plasmáticas o semipurificadas agrupadas de individuos normales. Estas preparaciones pueden contaminarse con agentes o virus patógenos, tales como priones infecciosos, VIH, parvovirus, hepatitis A y la hepatitis C. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de agentes terapéuticos que no requieran el uso de suero humano.

50 El nivel de la disminución de la actividad FIX es directamente proporcional a la gravedad de la hemofilia B. El tratamiento actual de la hemofilia B consiste en la sustitución de la proteína deficiente por FIX derivado de plasma o recombinante (el llamado tratamiento o terapia sustitución o reemplazo de FIX).

Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de FIX se pueden encontrar, por ejemplo, en UniProt/Swiss-Prot N° de Acceso P00740, patente de Estados Unidos n.º 6.531.298 y en la Figura 1.

55 Factor VIII

El factor de coagulación VIII (FVIII) circula en el plasma a una concentración muy baja y se une de forma no covalente con el factor de Von Willebrand (VWF). Durante la hemostasia, el FVIII se separa del VWF y actúa como cofactor para la activación de FX mediada por el factor IX activado (FIXa) mediante la mejora de la velocidad de activación en presencia de calcio y fosfolípidos o de las membranas celulares.

5 El FVIII se sintetiza como un precursor de una sola cadena de aproximadamente 270 a 330 kD con la estructura del dominio A1-A2-B-A3-C1-C2. Cuando purificada a partir de plasma (por ejemplo, "derivado de plasma" o "plasmático"), el FVIII está compuesto por una cadena pesada (A1-A2-B) y una cadena ligera (A3-C1-C2). La masa molecular de la cadena ligera es de 80 kD, mientras que, debido a la proteólisis dentro del dominio B, la cadena pesada está en el intervalo de 90 a 220 kD.

10 El FVIII también se sintetiza como una proteína recombinante para su uso terapéutico en trastornos hemorrágicos. Se han concebido diversos ensayos *in vitro* para determinar la eficacia potencial del FVIII recombinante (rFVIII) como medicamento terapéutico. Estos ensayos imitan los efectos *in vivo* del FVIII endógeno. En el tratamiento con trombina *in vitro* del FVIII da lugar a un rápido aumento y la posterior disminución de su actividad procoagulante, medido mediante ensayos *in vitro*. Esta activación e inactivación coincide con la proteólisis limitada específica tanto en la cadena pesada como en la ligera, que alteran la disponibilidad de diferentes epítomos de unión en el FVIII, por ejemplo, permitiendo que el FVIII se disocie del VWF y se una a una superficie de fosfolípido o altere la capacidad de unión a ciertos anticuerpos monoclonales.

La falta o la disfunción de FVIII se asocian con el trastorno hemorrágico más frecuente, la hemofilia A. El tratamiento de elección para el tratamiento de la hemofilia A es la terapia de reemplazo con concentrados de rFVIII o derivados de plasma. Los pacientes con hemofilia A grave con niveles de FVIII por debajo de 1 %, están, por lo general, en terapia profiláctica con el objetivo de mantener los niveles de FVIII por encima de 1 % entre las dosis. Teniendo en cuenta las semividas promedio de los diversos productos del FVIII en la circulación, este resultado por lo general puede lograrse administrando FVIII de dos a tres veces a la semana.

25 Las secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos de referencia incluyen, por ejemplo, UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8_HUMAN); Gitschier J y col., Characterization of the human Factor VIII gene, *Nature*, 312(5992): 326–30 (1984); Vehar GH y col., Structure of human Factor VIII, *Nature*, 312(5992):337–42 (1984); Thompson AR. Structure and Function of the Factor VIII gene and protein, *Semin Thromb Hemost*, 2003;29;11–29 (2002).

Factor de Von Willebrand

30 El factor de von Willebrand (VWF) es una glicoproteína que circula en el plasma como una serie de multímeros que varían en tamaño desde aproximadamente 500 a 20.000 kD. Las formas multiméricas del VWF están compuestas por subunidades polipeptídicas de 250 kD unidas entre sí por enlaces disulfuro. El VWF participa en la adhesión inicial de las plaquetas al subendotelio de la pared del vaso dañado. Solo los multímeros más grandes presentan actividad hemostática. Se supone que las células endoteliales secretan formas poliméricas grandes del VWF y las formas de VWF que tienen un peso molecular bajo (VWF de bajo peso molecular) surgen de la escisión proteolítica. Los multímeros que tienen masas moleculares grandes se almacenan en los cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales y se liberan tras estimulación.

40 El VWF es sintetizado por las células endoteliales y los megacariocitos como prepro-VWF que consiste en gran medida de dominios repetidos. Tras la escisión del péptido señal, el pro-VWF se dimeriza a través de enlaces disulfuro en su región C-terminal. Los dímeros sirven como protómeros para la multimerización, que está dirigida por enlaces disulfuro entre los extremos terminales libres. El ensamblaje de los multímeros es seguido por la eliminación proteolítica de la secuencia del propéptido (Leyte y col., *Biochem. J.* 274 (1991), 257–261).

45 El producto de traducción principal predicho a partir del ADNc clonado del VWF es un polipéptido precursor de 2813 restos (prepro-VWF). El prepro-VWF consta de un péptido señal de 22 aminoácidos y un propéptido de 741 aminoácidos, comprendiendo el VWF maduro 2050 aminoácidos (Ruggeri Z.A., y Ware, J., *FASEB J.*, 308–316 (1993).

50 Los defectos en VWF son causales a la enfermedad de Von Willebrand (VWD), que se caracteriza por un fenotipo hemorrágico más o menos pronunciado. La VWD de tipo 3 es la forma más grave en la que el VWF falta por completo, y la VWD de tipo 1 se refiere a una pérdida cuantitativa de VWF y su fenotipo puede ser muy leve. La VWD de tipo 2 se refiere a defectos cualitativos del VWF y puede ser tan grave como la VWD de tipo 3. La VWD de tipo 2 tiene muchas subformas, estando algunas asociadas con la pérdida o la disminución de multímeros de alto peso molecular. La enfermedad de Von Willebrand de tipo 2a (VWD-2A) se caracteriza por una pérdida de los dos multímeros intermedios y grandes. La VWD-2B se caracteriza por una pérdida de multímeros de peso molecular más alto. Otras enfermedades y trastornos relacionados con el VWF son conocidas en la técnica.

55 Las secuencias de polinucleótidos y de aminoácidos de prepro-VWF están disponibles en GenBank n.º de acceso NM_000552 y NP_000543, respectivamente.

Otras proteínas de la coagulación sanguínea se describen en la técnica, por ejemplo Mann KG, *Thromb Haemost*, 1999;82:165–74.

C. Producción de proteínas de la coagulación sanguínea

La producción de una proteína de coagulación sanguínea incluye cualquier procedimiento conocido en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante mediante ingeniería genética, (ii) la introducción de ADN recombinante en células procariotas o eucariotas mediante, por ejemplo y sin limitación, transfección, electroporación o microinyección, (iii) el cultivo de dichas células transformadas, (iv) la expresión de la proteína de la coagulación sanguínea, por ejemplo, constitutivamente o después de la inducción, y (v) el aislamiento de dicha proteína de coagulación sanguínea, por ejemplo, del medio de cultivo o mediante la recolección de las células transformadas, a fin de obtener la proteína de coagulación sanguínea purificada.

En otros aspectos, la proteína de coagulación sanguínea se produce mediante la expresión en un sistema de huésped procariótico o eucariótico adecuado caracterizado por la producción de una molécula de proteína de coagulación sanguínea farmacológicamente aceptable. Los ejemplos de células eucariotas son células de mamíferos, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2.

Se usa una amplia diversidad de vectores para la preparación de la proteína de coagulación sanguínea y se seleccionan de vectores de expresión eucariotas y procariotas. Los ejemplos de vectores para la expresión procariota incluyen plásmidos tales como, y sin limitación, pRSET, pET, y pBAD, en el que los promotores utilizados en vectores de expresión procariotas incluyen uno o más de, y sin limitación, lac, trc, trp, recA, o araBAD. Ejemplos de vectores para la expresión eucariota incluyen: (i) para expresión en levaduras, vectores tales como, y sin limitaciones, pAO, pPIC, pYES o pMET, utilizando promotores tales como, y sin limitaciones, AOX1, GAP, GAL1 o AUG1; (ii) para expresión en células de insecto, vectores tales como, y sin limitaciones, pMT, pAc5, pIB, pMIB o pBAC, utilizando promotores tales como, y sin limitaciones, PH, p10, MT, Ac5, OplE2, gp64 o polh, y (iii) para expresión en células de mamífero, vectores tales como, y sin limitaciones, pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3 o pBPV, y vectores derivados de, en un aspecto, sistemas virales tales como, y sin limitaciones, el virus de vacuna, virus adenoasociados, virus del herpes o retrovirus, etc., utilizando promotores tales como, y sin limitaciones, CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y β -actina.

D. Administración

En una realización, una proteína de coagulación sanguínea conjugada de la presente invención se puede administrar mediante inyección, tal como inyección intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

Para administrar las composiciones que comprenden una proteína de coagulación sanguínea conjugada de la presente invención a animales o seres humanos de ensayo, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Las expresiones "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y a composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas, tal como productos de agregación y escisión, y además no producen reacciones alérgicas, u otras reacciones adversas, cuando se administran usando vías bien conocidas en la técnica, como se describe a continuación. "Vehículos farmacéuticamente aceptables" incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos y similares, clínicamente útiles, incluyendo los agentes desvelados anteriormente.

Como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" incluye una dosis adecuada para tratar a un mamífero que tiene un trastorno hemorrágico como se describe en el presente documento.

Las composiciones pueden administrarse por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, por pulverizador mediante Inhalación, por vía vaginal, rectal, o por inyección intracraneal. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intracisternal o técnicas de Infusión. También se contempla la administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, Intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y o implante quirúrgico en un sitio particular. Generalmente, las composiciones carecen esencialmente de pirógenos, así como de otras impurezas que pueden ser perjudiciales para el receptor.

Se pueden llevar a cabo administraciones sencillas o múltiples de las composiciones, de las que los niveles y el patrón de dosis son seleccionados por el médico encargado del tratamiento. Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, como se ha descrito anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el fármaco se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapias previas, el historial clínico del paciente y la respuesta al fármaco, y el juicio del médico encargado.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína de coagulación sanguínea como se define en el presente documento. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un vehículo, diluyente, sal tampón o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede usarse para tratar los trastornos hemorrágicos definidos anteriormente. La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una solución o un producto liofilizado. Las soluciones de la composición farmacéutica pueden someterse a cualquier proceso de liofilización adecuado.

Como un aspecto adicional, la invención incluye kits que comprenden una composición de la invención envasada de manera que facilite su uso para la administración a los sujetos. En una realización, dicho kit incluye un compuesto o una composición descritos en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende una proteína de coagulación sanguínea conjugada), envasada en un envase, tal como un frasco o un vaso sellado, con una etiqueta fijada al envase o incluida en el envasado que describa el uso del compuesto o de la composición al llevar a cabo el procedimiento. En una realización, el kit contiene un primer envase que tiene una composición que comprende una proteína de coagulación sanguínea conjugada y un segundo envase que tiene una solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición del primer envase. En un aspecto, el compuesto o la composición se envasan en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir adicionalmente un dispositivo adecuado para administrar la composición de acuerdo con una vía de administración específica. Preferentemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la composición proteica o peptídica terapéutica.

POLÍMEROS SOLUBLES EN AGUA

En un aspecto, una molécula derivada de proteína de coagulación sanguínea (es decir, una proteína de coagulación sanguínea conjugada) proporcionada está unida a un ácido polisialico (PSA). En una realización de la invención, el polímero soluble en agua consiste en molécula de ácido siálico que tiene un intervalo de peso molecular de 350 a 120.000, de 500 a 100.000, de 1000 a 80.000, de 1.500 a 60.000, de 2.000 a 45.000 Da, de 3.000 a 35.000 Da, y de 5.000 a 25.000 Da. El acoplamiento del polímero soluble en agua se puede llevar a cabo mediante acoplamiento directo a la proteína o a través de moléculas enlazadoras. Un ejemplo de un enlazador químico es MBPH (4 [4-N-maleimidofenil] ácido butírico hidrazida) que contiene una hidrazida selectiva de hidratos de carbono y un grupo maleimida reactivo con sulfhidrilo (Chamow y col., J Biol Chem 1992;267:15916–22). Otros enlazadores de ejemplo y preferidos se describen a continuación.

En una realización, el derivado retiene la actividad funcional completa de los productos de proteína de coagulación sanguínea terapéuticos nativos y proporciona una semivida prolongada *in vivo*, en comparación con los productos de proteína de coagulación sanguínea terapéuticos nativos. En otra realización, el derivado retiene al menos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, o 150 por ciento (%) de actividad biológica relativa a la proteína de coagulación sanguínea nativa. En un aspecto relacionado, las actividades biológicas de del derivado y la proteína de coagulación sanguínea nativa se determinan mediante las relaciones de la actividad cromogénica con respecto al valor del antígeno del factor de coagulación sanguínea (factor de coagulación sanguínea: Chr: factor de coagulación sanguínea:Ag). En otra realización más de la invención, la semivida de la construcción disminuye o aumenta 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 veces en relación con la semivida *in vivo* de la proteína de coagulación sanguínea nativa.

A. Ácido siálico y PSA

Como se usa en el presente documento, "restos de ácido siálico" incluye monómeros o polímeros de ácido siálico ("polisacáridos") que son solubles en una solución o suspensión acuosa y que tienen poco o ningún impacto negativo, tales como efectos secundarios, para los mamíferos tras la administración del conjugado de la proteína de coagulación sanguínea-PSA en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Los polímeros se caracterizan, en un aspecto, por tener de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, o 500 unidades de ácido siálico. Ciertos aspectos, diferentes unidades de ácido siálico se combinan en una cadena.

En una realización de la invención, la porción de ácido siálico del compuesto polisacárido es muy hidrófila, y en otra realización, el compuesto entero es altamente hidrófilo. La hidrofiliía la confieren principalmente los grupos carboxilo que cuelgan de las unidades de ácido siálico, así como los grupos hidroxilo. La unidad de sacárido puede contener otros grupos funcionales, tales como grupos amina, hidroxilo o sulfato, o combinaciones de los mismos. Estos grupos pueden estar presentes en compuestos sacáridos de origen natural o introducirse en compuestos polisacáridos derivados.

El PSA de polímero de origen natural está disponible como una preparación polidispersa que muestra una amplia distribución de tamaño (por ejemplo, Sigma C-5762) y alta polidispersidad (PD). Debido a que los polisacáridos se producen por lo general en las bacterias portadoras del riesgo inherente de copurificar endotoxinas, la purificación de las cadenas de polímero de ácido siálico largas puede aumentar la probabilidad de aumentar el contenido de endotoxina. Las moléculas de PSA cortas con 1-4 unidades de ácido siálico también se pueden preparar sintéticamente (Kang SH y col., Chem Commun. 2000;227–8; Ress DK y Linhardt RJ, Current Organic Synthesis. 2004;1:31–46), minimizando así el riesgo de altos niveles de endotoxina. Sin embargo, ahora se pueden fabricar preparaciones de PSA con una distribución de tamaño estrecha y baja polidispersidad, que también están exentas de endotoxinas. Los compuestos polisacáridos de uso particular para la invención son, en un aspecto, los producidos por bacterias. Algunos de estos polisacáridos de origen natural se conocen como glicolípidos. En una realización, los compuestos polisacáridos carecen sustancialmente de unidades de galactosa terminales.

B. Polietilenglicol (PEG) y pegilación

En el presente documento también se divulgan el factor de coagulación sanguínea, por ejemplo, FVIII, FVIIa, FIX, u otras moléculas de factores de coagulación sanguínea que se conjugan con un polímero soluble en agua por cualquiera de una diversidad de procedimientos químicos (Roberts JM y col., *Advan Drug Delivery Rev* 2002;54:459–76). Por ejemplo, la modificación de FVIII, FVIIa, o FIX mediante la conjugación de PEG a los grupos amino libres de la proteína usando ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) también se da a conocer En el presente documento también se divulga el acoplamiento de PEG a grupos SH libres usando química de maleimida o el acoplamiento de PEG hidrazida o PEG aminas a restos de hidratos de carbono de los factores FVIII, FVIIa o FIX después de la oxidación previa.

De acuerdo con la divulgación, la conjugación se puede realizar mediante acoplamiento directo (o acoplamiento a través de sistemas enlazadores) del polímero soluble en agua con el factor de coagulación sanguínea, por ejemplo, FVIII, FVIIa, o FIX, bajo la formación de enlaces estables. Además, se pueden usar sistemas de enlazadores degradables, liberables o hidrolizables (Tsubery y col., *J Biol Chem* 2004;279:38118–24/Greenwald y col., *J Med Chem* 1999;42:3657–67/Zhao y col., *Bioconj Chem* 2006;17:341–51/documento WO2006/138572A2/documento US7259224B2/documento US7060259B2).

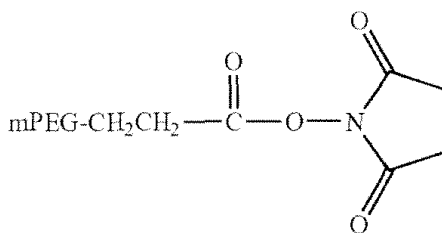
De acuerdo con la divulgación, un factor de coagulación sanguínea, por ejemplo, FVIII, FVIIa, o FIX, se modifica mediante restos de lisina mediante el uso de derivados de polietilenglicol que contienen un éster activo de N-hidroxisuccinimida (NHS), tal como succinato de succinimidilo, glutarato de succinimidilo o propionato de succinimidilo. Estos derivados reaccionan con los restos de lisina de FVIII, FVIIa, en condiciones suaves mediante la formación de un enlace amida estable. La longitud de cadena del derivado de PEG es de 5.000 Da. Otros derivados de PEG con longitudes de cadena de 500 a 2.000 Da, de 2.000 a 5.000 Da, mayor que 5.000 hasta 10.000 Da o mayor que 10.000 hasta 20.000 Da, se pueden utilizar, incluyendo estructuras lineales y ramificadas.

Los procedimientos alternativos para la PEGilación de grupos amino son, sin limitación, la conjugación química con carbonatos de PEG mediante la formación de enlaces de uretano, o la reacción con aldehídos o cetonas por aminación reductora formando enlaces amida secundaria.

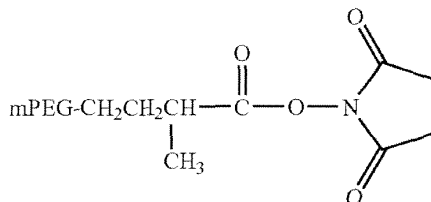
Según la divulgación de un factor de coagulación sanguínea, por ejemplo, FVIII, FVIIa, FIX, u otro factor de coagulación sanguínea, la molécula se modifica químicamente utilizando derivados de PEG que están disponibles comercialmente. Estos derivados de PEG en aspectos alternativos tienen estructuras lineales o ramificadas. Ejemplos de derivados de PEG que contienen grupos NHS se enumeran a continuación.

Los siguientes derivados de PEG son ejemplos no limitantes de los disponibles comercialmente en Nektar Therapeutics (Huntsville, Ala.; véase www.nektar.com/PEG catálogo de reactivos; Nektar Advanced PEGylation, lista de precios 2005–2006):

mPEG–propionato de succinimidilo (mPEG–SPA)

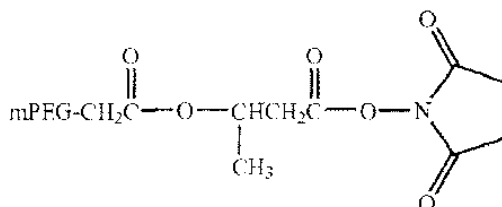


mPEG– α -metilbutanoato de succinimidilo (mPEG–SMB)



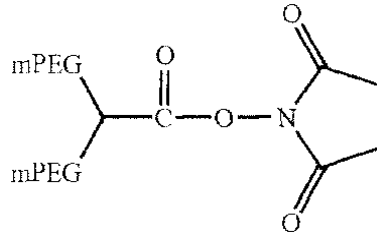
35

mPEG–CM–HBA–NHS (CM=carboximetilo; HBA=ácido hidroxibutírico)



Estructura de un derivado de PEG ramificado (Nektar Therapeutics):

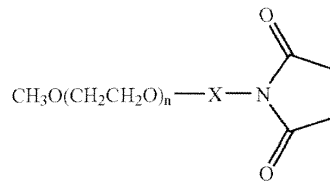
PEG de N-Hidroxisuccinimida ramificada (mPEG2-NHS)



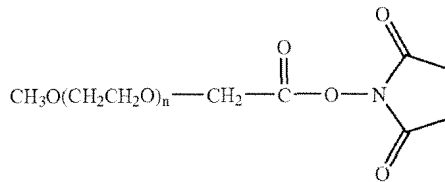
Este reactivo con estructura ramificada se describe con más detalle en Kozlowski y col., (BioDrugs 2001;5:419–29).

- 5 Otros ejemplos no limitantes de derivados de PEG están comercialmente disponibles en NOF Corporation (Tokio, Japón, véase www.nof.co.jp/english: Catálogo 25).

Estructura General de los derivados de PEG Lineales (NOF Corp):

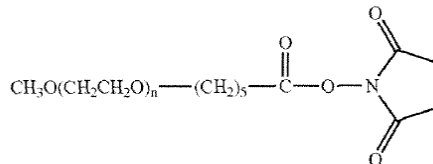


X=carboximetilo

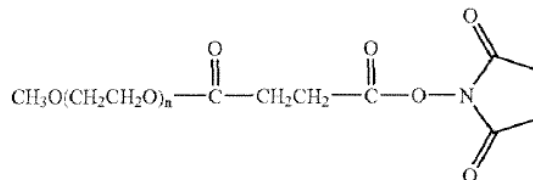


10

X=carboxipentilo



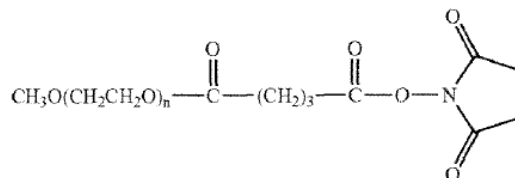
x=succinato



15

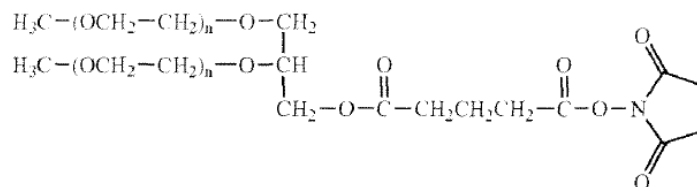
mPEG Succinato de succinimidilo

x=glutarato

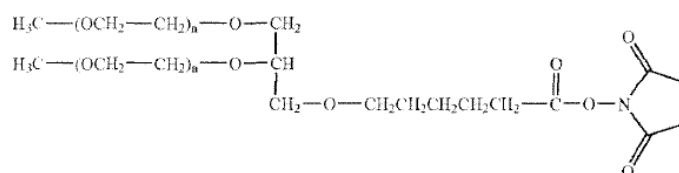


mPEG Glutarato de succinimidilo

Estructuras de derivados de PEG ramificados (NOF Corp.): 2,3-Bis(metilpolioxi-etilen-oxi)-1-(1,5-dioxo-5-succinimidiloxi, pentiloxi)propano



5 2,3-Bis(metilpolioxi-etilen-oxi)-1-(succinimidilcarboxipentiloxi)propano



Estos derivados de propano muestran un esqueleto de glicerol con un patrón de sustitución 1,2. Los derivados de PEG ramificados basados en estructuras de glicerol con sustitución 1,3 u otras estructuras ramificadas se describen en el documento US23/143596A1.

- 10 Los derivados de PEG degradables (por ejemplo, enlazadores hidrolizables) se describen en Tsubery y col., (J Biol Chem 2004;279:38118–24) y Shechter y col., (documento WO04089280A3)

Los FVIII, FVIIa, FIX pegilados, u otro factor de coagulación sanguínea según la divulgación, exhiben una actividad funcional completa, combinada con una semivida *in vivo* prolongada. Además, los rFVIII, FVIIa, FIX, pegilados, u otro factor de coagulación sanguínea, parecen ser más resistentes frente a la inactivación de protrombina.

15 **C. Procedimientos de fijación**

Una proteína de coagulación sanguínea puede unirse covalentemente a un compuesto polisacárido mediante diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. De acuerdo con la divulgación, restos de ácidos siálicos se unen a una proteína de coagulación sanguínea, por ejemplo, FIX, FVIII, FVIIa o VWF, mediante el procedimiento descrito en la patente de Estados Unidos n.º 4.356.170.

- 20 También se conocen otras técnicas para acoplamiento del PSA a los polipéptidos. Por ejemplo, la publicación de Estados Unidos n.º 2007/0282096 describe la conjugación de una amina o derivado de hidrazida de, por ejemplo, PSA, a las proteínas. En adición, la publicación de Estados Unidos n.º 2007/0191597 describe derivados de PSA que contienen un grupo aldehído para la reacción con los sustratos (por ejemplo, proteínas) en el extremo reductor.

- 25 Varios procedimientos se divulgan en la columna 7, línea 15, hasta la columna 8, línea 5 de la patente de Estados Unidos n.º 5.846.951. Las técnicas de ejemplo incluyen la unión a través de un enlace peptídico entre un grupo carboxilo en uno de o bien la proteína de coagulación sanguínea o bien el polisacárido y un grupo amino de la proteína de coagulación sanguínea o polisacárido, o un enlace éster entre un grupo carboxilo de la proteína de coagulación sanguínea o polisacárido y un grupo hidroxilo de la proteína de coagulación sanguínea o polisacárido.
- 30 Otro enlace por el cual la proteína de coagulación sanguínea está unida covalentemente al compuesto polisacárido es a través de una base de Schiff, entre un grupo amino libre en la proteína de coagulación sanguínea que se hace reaccionar con un grupo aldehído formado en el extremo no reductor del polisacárido por oxidación con peryodato (Jennings HJ y Lugowski C, J Immunol. 1981;127:1011–8; Fernandes AI y Gregoriadis G, Biochim Biophys Acta. 1997;1341:26–34). La base de Schiff es generada está, en un aspecto, estabilizada mediante reducción específica con NaCNBH₃ para formar una amina secundaria. Un enfoque alternativo es la generación de grupos amino terminales libres en el PSA por aminación reductora con NH₄Cl después de la oxidación previa. Los reactivos bifuncionales se pueden utilizar para unir dos grupos amino o dos grupos hidroxilo. Por ejemplo, el PSA que contiene un grupo amino está acoplado a grupos amino de la proteína con reactivos como BS3 (Bis(sulfosuccinimidil)suberato/Pierce, Rockford, IL). Además, se usan reactivos de reticulación heterobifuncionales como Sulfo-EMCS éster de (N-ε-maleimidocaproyloxi)/Pierce), por ejemplo, para enlazar grupos amino y tiol.

- 40 En otro enfoque, se prepara una PSA hidrazida y se acopla al resto de hidrato de carbono de la proteína después de la oxidación previa y la generación de funciones aldehído.

Como se describió anteriormente, un grupo amina libre de la proteína terapéutica reacciona con el grupo 1-carboxilo

del resto de ácido siálico para formar un enlace peptídico o se forma un enlace éster entre el grupo de ácido 1-carboxílico y un grupo hidroxilo u otro grupo activo adecuado en una proteína de coagulación sanguínea. Como alternativa, un grupo carboxilo forma un enlace peptídico con el grupo 5-amino desacetilado, o un grupo aldehído de una molécula de una proteína de coagulación sanguínea forma una base de Schiff con el grupo 5-amino N-desacetilado de un residuo de ácido siálico.

En diversas realizaciones, la proteína de coagulación sanguínea está unida a, o asociada con, el compuesto polisacárido en cantidades estequiométricas (por ejemplo, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9, o 1:10, etc.). En diversas realizaciones, 1-6, 7-12 o 13-20 polisacáridos están unidos a la proteína de la coagulación sanguínea. En otras realizaciones más, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más polisacáridos están unidos a la proteína de coagulación sanguínea.

En diversas realizaciones, la proteína de coagulación sanguínea se modifica para introducir sitios de glicosilación (es decir, sitios distintos de los sitios de glicosilación nativos). Tal modificación puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar de biología molecular conocidas en la materia. Por otra parte, la proteína de coagulación sanguínea, antes de la conjugación a un polímero soluble en agua a través de uno o más restos de hidratos de carbono, pueden estar glicosilados *in vivo* o *in vitro*. Estos sitios glicosilados pueden servir como dianas para la conjugación de las proteínas con polímeros solubles en agua (solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20090028822, solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0093399, solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0081188, solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0254836, solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0111279 y DeFrees S. y col., *Glycobiology*, 2006, 16, 9, 833-43).

D. Enlace aminooxi

Según la invención, la reacción de hidroxilamina o derivados de hidroxilamina con aldehídos (por ejemplo, en un resto de hidrato de carbono después de la oxidación mediante peryodato de sodio) para formar un grupo oxima se aplica a la preparación de conjugados de la proteína de coagulación sanguínea. Por ejemplo, una glicoproteína (por ejemplo, una proteína de coagulación sanguínea según la presente invención) se oxida primero con un agente oxidante tal como peryodato de sodio (NaIO_4) (Rothfus JA et Smith EL., *J Biol Chem* 1963, 238, 1402-10; and Van Lenten L y Ashwell G., *J Biol Chem* 1971, 246, 1889-94). La oxidación con peryodato de glicoproteínas se basa en la reacción de Malaprade clásica descrita en 1928, la oxidación de los dioles vecinales con peryodato para formar un grupo aldehído activo (Malaprade L., *Analytical application*, *Bull Soc Chim France*, 1928, 43, 683-96). Ejemplos adicionales de tal agente oxidante son tetraacetato de plomo ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$), acetato de manganeso ($\text{MnO}(\text{Ac})_3$), acetato de cobalto ($\text{Co}(\text{OAc})_2$), acetato de talio (TlOAc), sulfato de cerio ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) (documento US 4.367.309) o perrutenato de potasio (KRuO_4) (Marko y col., *J Am Chem Soc* 1997, 119, 12661-2). Por "agente oxidante" se quiere decir un compuesto oxidante suave que es capaz de oxidar dioles vecinales en hidrato de carbonos, lo que genera grupos aldehído activos en condiciones de reacción fisiológicas.

La segunda etapa es el acoplamiento del polímero que contiene un grupo aminooxi al resto de hidrato de carbono oxidado para formar un enlace oxima. En una realización de la invención, esta etapa puede llevarse a cabo en presencia de cantidades catalíticas del catalizador nucleofílico anilina o derivados de anilina (Dirksen A et Dawson PE, *Bioconjugate Chem.* 2008; Zeng Y y col., *Nature Methods* 2009;6:207-9). La catálisis de anilina acelera drásticamente la unión de la oxima, lo que permite el uso de concentraciones muy bajas de los reactivos. En otra realización de la invención, el enlace oxima se estabiliza mediante reducción con NaCNBH_3 para formar un enlace alcoxiamina (Figura 2).

En una realización de la invención, las etapas de reacción para conjugar un polímero soluble en agua a una proteína de coagulación sanguínea se llevan a cabo por separado y de forma secuencial (es decir, los materiales de partida (por ejemplo, proteína de coagulación sanguínea, el polímero soluble en agua, etc), los reactivos (por ejemplo, agentes oxidantes, anilina, etc) y los productos de reacción (por ejemplo, hidrato de carbono oxidado de una proteína de coagulación sanguínea, polímeros soluble en agua de aminooxi activado, etc) se separan entre las etapas de reacción individuales).

Información adicional sobre la tecnología de aminooxi se puede encontrar en las siguientes referencias: Documento EP 1681303A1 (Eritropoyetina HASilada); documento WO 2005/014024 (conjugados de un polímero y una proteína unidos por un grupo de enlace oxima); documento WO96/40662 (compuestos enlazadores que contienen aminooxi y su aplicación en conjugados); documento WO 2008/025856 (proteínas modificadas); Peri F y col., *Tetrahedron* 1998, 54, 12269-78; Kubler-Kielb J et. Pozsgay V., *J Org Chem* 2005, 70, 6887-90; Lees A y col., *Vaccine* 2006, 24(6), 716-29; and Heredia KL y col., *Macromolecules* 2007, 40(14), 4772-9.

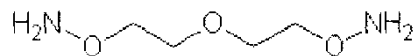
En diversas realizaciones de la invención, el polímero soluble en agua que se une de acuerdo con la tecnología aminooxi descrita en el presente documento a un resto de hidrato de carbono oxidado de una proteína de coagulación sanguínea (FVIII o FIX) es un ácido polisialílico (PSA).

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación del enlazador homobifuncional NH₂[OCH₂CH₂]₂ONH₂

El enlazador homobifuncional NH₂[OCH₂CH₂]₂ONH₂

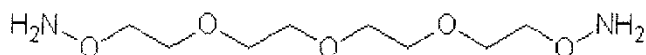


- 5 (3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina) que contiene dos grupos aminooxi activos se sintetizó según Boturny y col., (Tetrahedron 1997;53:5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas empleando una síntesis de Gabriel de aminas primarias (Figura 3). En la primera etapa, se hizo reaccionar una molécula de 2,2-clorodietiléter con dos moléculas de endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en dimetilformamida (DMF). El producto homobifuncional deseado se preparó a partir del intermedio resultante mediante hidrazinólisis en etanol.

Ejemplo 2

- 10 Preparación del enlazador homobifuncional NH₂[OCH₂CH₂]₄ONH₂

El enlazador homobifuncional NH₂[OCH₂CH₂]₄ONH₂



- 15 (3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina) que contiene dos grupos aminooxi activos se sintetizó según Boturny y col., (Tetrahedron 1997;53:5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas empleando una síntesis de Gabriel de aminas primarias (Figura 3). En la primera etapa, se hizo reaccionar una molécula de bis-(2-(2-cloretoxi)-etil)-éter con dos moléculas de endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en DMF. El producto homobifuncional deseado se preparó a partir del intermedio resultante mediante hidrazinólisis en etanol.

Ejemplo 3Preparación de aminooxi-PSA

- 20 500 mg de PSA oxidado (PM = 18,8 kD) obtenido del Serum Institute of India (Pune, India) se disolvieron en 8 ml de tampón de acetato sódico 50 mM, a pH 5,5. A continuación, se añadieron 100 mg de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina. Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadieron 44 mg de cianoborohidruro de sodio. Después de agitar durante otras 4 horas a 4 °C, la mezcla de reacción se cargó en un casete de diálisis - Slide-A-Lyzer (Pierce, Rockford, IL) (membrana de 3,5 kD, celulosa regenerada) y se dializó frente a PBS a pH 7,2
- 25 durante 4 días. El producto se congeló a -80 °C. La preparación del aminooxi-PSA de acuerdo con este procedimiento se ilustra en la Figura 4.

Procedimiento alternativo para la preparación de aminooxi PSA

- 30 1.000 mg de PSA oxidado (PM = 20 kD) obtenido del Serum Institute of India (Pune, India) se disolvieron en 16 ml de tampón fosfato 50 mM, a pH 6,0. A continuación, se añadieron 170 mg de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina a la mezcla de reacción. Después de agitar durante 2 horas a T.A., se añadieron 78,5 mg de cianoborohidruro de sodio y la reacción se realizó durante 18 horas durante la noche. Después, la mezcla de reacción se sometió a un procedimiento de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) utilizando una membrana con un corte de 5 kD hecha de celulosa regenerada (Millipore).

Ejemplo 4

- 35 Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFIX y purificación del conjugado

- A 12,6 mg de rFIX, disuelto en 6,3 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, a pH 6,0, se añadieron 289 µl de una solución de peryodato de sodio acuoso (10 mM). La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1 hora a 4 °C y se inactivó durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 6,5 µl de glicerol 1 M. Los contaminantes de bajo peso molecular se retiraron mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) empleando concentradores Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) (membrana de 30 kD, celulosa regenerada). Después se añadieron 43 mg de aminooxi-PSA a la fracción retenida por UF/DF y la mezcla se agitó durante 18 horas a 4 °C. El reactivo de PSA en exceso se retiró mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). La conductividad de la mezcla de reacción enfriada se elevó a 180 mS/cm y se cargó en una columna de 5 ml HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC (1,6 x 2,5 cm), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro sódico 3 M, cloruro cálcico 6,7 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. El conjugado se eluyó en 2,4 volúmenes de columna (VC) con HEPES 50 mM, cloruro cálcico 6,7 mM, 0,005 % de Tween 80, a pH 7,4 a un caudal de 5 ml/min. La preparación se caracterizó analíticamente mediante la medición de la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica de FIX. Para el conjugado PSA-RFIX se determinó una actividad específica de 80,2 UI/ mg de proteína (56,4 % en comparación con rFIX nativo). Los resultados se resumen en la Tabla 1.

50

Tabla 1

Artículo	BCA [mg/ ml]	FIX:Chrom [UI/ ml]	Actividad específica [IU FIX:Chrom/ mg de BCA]	Actividad específica [%]
rFIX	8,58	1221	142,3	100
PSA-rFIX	1,15	92,2	80,2	56,4

La caracterización analítica del conjugado PSA-rFIX mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie se ilustra en la Figura 5. Una SDS-PAGE seguida de transferencia Western empleando anticuerpos anti-FIX y anti-PSA se muestra en la Figura 6.

Ejemplo 5

5 Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFIX en presencia de anilina como catalizador nucleofílico

A 3,0 mg de rFIX, disuelto en 1,4 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, a pH 6,0, se añadieron 14,1 µl de una solución de peryodato de sodio acuoso (10 mM). La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1 hora a 4 °C y se inactivó durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 1,5 µl de glicerol 1 M. Los contaminantes de bajo peso molecular se retiraron por medio de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) empleando columnas de desalado PD-10 (GE Healthcare, Fairfield, CT). 1,2 mg de rFIX oxidado, disueltos en 1,33 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, a pH 6,0 se mezclaron con 70 µl de anilina (solución madre acuosa 200 mM) y se agitó durante 45 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 4,0 mg de aminooxi-PSA y la mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y otras 16 horas a 4 °C. Se tomaron muestras después de 1 hora, después de 2 horas y al final de la reacción después de 18 horas. A continuación, el exceso de reactivo de PSA y el RFIX libre se retiraron por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción enfriada se elevó a 180 mS/ cm y se cargó en una columna de 5 ml HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC (1,6 x 2,5 cm), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro sódico 3 M, cloruro cálcico 6,7 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. El conjugado se eluyó con un gradiente lineal con HEPES 50 mM, cloruro cálcico 6,7 mM, 0,005 % de Tween 80, a pH 7,4 en 20 VC con un caudal de 5 ml/min.

20 Ejemplo 6

Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFIX y reducción con NaCNBH₃

A 10,5 mg de rFIX, disuelto en 5,25 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, a pH 6,0, se añadieron 53 µl de una solución de peryodato de sodio acuoso (10 mM). La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1 hora a 4 °C y se inactivó durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 5,3 µl de glicerol 1 M. Los contaminantes de bajo peso molecular se retiraron mediante UF/DF empleando concentradores Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) (membrana de 30 kD, celulosa regenerada) a continuación se añadieron 35,9 mg de aminooxi-PSA a la fracción retenida por UF/DF y la mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 53 µl de una solución de cianoborohidruro de sodio acuoso (5 M) y la reacción se dejó proceder durante otras 16 horas. A continuación, se retiró el reactivo de PSA en exceso por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción enfriada se elevó a 180 mS/ cm y se cargó en una columna de 5 ml HiTrap Butyl FF HIC (GE Healthcare, Fairfield, CT) (1,6 x 2,5 cm), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro sódico 3 M, cloruro cálcico 6,7 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. El conjugado se eluyó con 2,4 VC con HEPES 50 mM, cloruro cálcico 6,7 mM, 0,005 % de Tween 80, a pH 7,4 en 7,4 VC con un caudal de 5 ml/min.

Ejemplo 7

35 Acoplamiento de aminooxi-PSA (enlazador: NH₂[OCH₂CH₂]₄ONH₂) A rFIX y purificación del conjugado

A 5,6 mg de rFIX, disuelto en 2,8 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, a pH 6,0, se añadieron 102 µl de una solución de peryodato de sodio acuoso (10 mM). La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1 hora a 4 °C y se inactivó durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 2,9 µl de glicerol 1 M. Los contaminantes de bajo peso molecular se retiraron mediante UF/DF empleando concentradores Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) (membrana de 30 kD, celulosa regenerada). Después, se añadieron 19 mg de aminooxi-PSA a la fracción retenida por UF/DF y la mezcla se agitó durante 18 horas a 4 °C. El reactivo de PSA en exceso se retiró mediante HIC. La conductividad de la mezcla de reacción enfriada se elevó a 180 mS/ cm y se cargó en una columna de 5 ml HiTrap Butyl FF HIC (GE Healthcare, Fairfield, CT) (1,6 x 2,5 cm), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro sódico 3 M, cloruro cálcico 6,7 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. El conjugado se eluyó con 2,4 VC con HEPES 50 mM, cloruro cálcico 6,7 mM, 0,005 % de Tween 80, a pH 7,4 en 7,4 VC con un caudal de 5 ml/min.

Ejemplo 8

Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFVIII

A 11 mg de rFVIII, disuelto en 11 ml de tampón Hepes a pH 6 (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, 0,01 % de Tween) se añadieron 57 µl de peryodato de sodio 10 mM. La mezcla se agitó en la oscuridad durante 30 minutos a 4

°C y se inactivó durante 30 minutos a 4 °C mediante la adición de 107 µl de una solución de glicerol 1 M. Después, se añadieron 19,8 mg de aminooxi-PSA se añadió (18,8 kD) y la mezcla se agitó durante la noche a 4 °C. La fuerza iónica se incrementó mediante la adición de un tampón que contiene acetato de amonio 8M (acetato de amonio 8M, Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 350 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9) para obtener una concentración final de 2,5 M de acetato de amonio. A continuación, la mezcla de reacción se cargó en una columna HiTrap butilo FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) que se equilibró con tampón de equilibrio (acetato de amonio 2,5 M, Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaCl 350 mM, 0,01 % de Tween 80, pH 6,9). El producto se eluyó con tampón de elución (Hepes 50 mM, CaCl₂ 5 mM, 0,01 % de Tween 80 a pH 7,4), y el eluato se concentró por filtración centrífuga usando dispositivos de Vivaspin (Sartorius, Goettingen, Alemania) con 30.000 MWCO.

10 Ejemplo 9

Estudios FC en ratones con hemofilia

En ratones deficientes en FIX se inyectó rFIX o PSA-rFIX (preparados de acuerdo con el Ejemplo 4) en tampón de formulación (histidina 10 mM, glicina 260 mM, sacarosa 29 mM, 0,005 % de Tween 80, a pH 6,8) en un volumen de dosis de 10 ml/kg peso corporal. Los grupos de 6 ratones fueron sacrificados 5 minutos, 3 horas, 9, 16, 24 y 48 horas después de la inyección de la sustancia y la sangre se extrajo por punción cardíaca. El plasma con citrato se preparó y se almacenó congelado hasta el análisis de la actividad de FIX.

La actividad de FIX se determinó con un ensayo cromogénico FIX (ensayo Biophen FIX Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, Francia) y se construyeron curvas de eliminación (Figura 7). Las dosis reales de actividad de FIX fueron 123A UI FIX/kg para PSA-rFIX y 143 UI FIX/kg para rFIX. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon con el programa R (The R Foundation for Statistical Computing, 2008). La recuperación *In vivo* fue del 13 % para rFIX y 29 % para PSA-rFIX. La AUC ajustada por dosis para PSA-rFIX aumentó 6,4 veces respecto a rFIX, la semivida terminal aumentó por un factor de 1,2 y TMR fue de 1,7 veces más largos para PSA-rFIX en comparación con rFIX (Tabla 2).

Tabla 2

Artículo	Recuperación <i>in vivo</i> [%]	AUC [(UI/ml)/(IU/kg)]	Factor de aumento	HL terminal [h]	Factor de aumento	TMR [h]	Factor de aumento
rFIX	13	0,0100	= 1	8,0	= 1	7,3	= 1
PSA-rFIX	29	0,0650	6,4x	9,6	1,2x	12,3	1,7x

25

Ejemplo 10

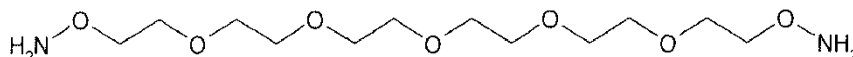
Polisialilación de proteínas de la coagulación sanguínea

En diversos aspectos de la invención, la polisialilación anterior como se describe en los Ejemplos 5, 6 y 9 con aminooxi-PSA se repite con FVIII.

30 Ejemplo 11

Preparación del enlazador homobifuncional NH₂[OCH₂CH₂]₆ONH₂

El enlazador homobifuncional NH₂[OCH₂CH₂]₆ONH₂



(3,6,9,12,15-penatoxa-heptadecano-1,17-dioxiamina) que contiene dos grupos aminooxi activos se sintetizó según Boturny y col., (Tetrahedron 1997;53:5485-92) en una reacción orgánica de dos etapas empleando una síntesis de Gabriel de aminas primarias. En la primera etapa, se hizo reaccionar una molécula de 2-dicloruro de hexaetilenglicol con dos moléculas de endo-N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida en DMF. El producto homobifuncional deseado se preparó a partir del intermedio resultante mediante hidrazinólisis en etanol.

40 Ejemplo 12

Polisialilación de rFIX empleando un sistema enlazador de maleimido/aminooxi

A. Preparación del reactivo de modificación

Un reactivo de aminooxi-PSA se prepara mediante el uso de un sistema enlazador de maleimido/aminooxi (Toyokuni y col., Bioconjugate Chem 2003; 14, 1253-9). El PSA-SH (20 kD) que contiene un grupo SH libre terminal se prepara utilizando un procedimiento de dos etapas: a) Preparación de PSA-NH₂ mediante aminación reductora de

PSA oxidado con NH₄Cl según el documento WO05016973A1 y b) introducción de un grupo sulfhidrilo mediante la reacción del grupo amino primario terminal con 2-iminotiolano (reactivo de Traut/Pierce, Rockford, IL) como se describe en el documento US7645860. El PSA-SH se acopla al grupo maleimido del enlazador a pH 7,5 en tampón PBS usando un exceso molar de 10 veces del enlazador y una concentración de PSA-SH de 50 mg/ml. Se incubó la mezcla de reacción durante 2 horas con agitación suave a temperatura ambiente. Después se retira el reactivo enlazador de exceso y el aminooxi-PSA se intercambia con tampón en tampón de oxidación (fosfato de sodio 50 mM, a pH 6,0) por diafiltración. El tampón se intercambia 25 veces usando una membrana de celulosa regenerada Pellicon XL5kD (Millipore, Billerica, MA).

B. Modificación de rFIX después de la oxidación previa con NaIO₄

rFIX se oxida en tampón fosfato de sodio 50 mM, a pH 6,0 empleando peryodato de sodio 100 µM en el tampón. La mezcla se agitó en la oscuridad durante 1 hora a 4 °C y se inactivó durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de glicerol a una concentración final de 5 mM. Los contaminantes de bajo peso molecular se retiraron por medio de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) empleando columnas de desalado PD-10 (GE Healthcare, Fairfield, CT). Después, el rFIX oxidado se enriqueció con anilina para obtener una concentración final de 10 mM y se mezcla con el reactivo aminooxi-PSA para lograr un exceso molar de 5 veces de PSA. Se incubó la mezcla de reacción durante 2 horas con agitación suave en oscuridad a temperatura ambiente.

C. Purificación de los conjugados

El exceso de reactivo de PSA y rFIX libre se elimina por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción se eleva a 180 mS/cm y se carga en una columna rellena con 48 ml de butilo - Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 6,7 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. A continuación, el conjugado se eluye con un gradiente lineal de tampón de elución al 60 % (50 mM) Hepes, cloruro de calcio 6,7 mM, pH 7,4) en 40 VC. Por último, las fracciones que contienen PSA-rFIX se recogen y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana de 30 kD hecha de celulosa regenerada (Millipore). La preparación se caracteriza analíticamente mediante la medición de la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica de FIX. Para los conjugados PSA-rFIX preparados con ambas variantes se determina una actividad específica de > 50 % en comparación con el rFIX nativo.

Ejemplo 13

Preparación de reactivo aminooxi-PSA

Un reactivo aminooxi - PSA se preparó de acuerdo con el Ejemplo 3. El producto final se sometió a diafiltración frente a tampón, pH 7,2 (Hepes 50 mM) utilizando una membrana de 5 kD (celulosa regenerada, Millipore), se congeló a -80 °C y se liofilizó. Después de liofilización, el reactivo se disolvió en el volumen apropiado de agua y se usó para la preparación de conjugados de PSA-proteína a través de la modificación con hidrato de carbonos.

Ejemplo 14

Farmacocinética de rFVIII polisialilado en un modelo de ratón defectivo deficiente en FVIII

Se preparó un conjugado PSA-FVIII de acuerdo Ejemplo 8. El conjugado mostró una actividad específica de 6.237 UI/mg (la actividad de FVIII determinada mediante el ensayo cromogénico; la proteína total determinada por el ensayo de Bradford) y tenía un grado de polisialilación 6,7 (PSA mol por mol FVIII) tal como se mide por el ensayo de resorcinol (Svennerholm L, Biochim Biophys Acta 1957; 24: 604–11).

Ratones deficientes en FVIII se describen con detalle en Bi y col., (Nat Genet 1995;10:119–21) se utilizaron como modelo de hemofilia A humana grave. Grupos de 6 ratones recibieron una inyección en bolo (200 UI de FVIII/kg) a través de la vena de la cola con PSA-rFVIII preparado según el ejemplo 8 o rFVIII nativo (ADVATE, Baxter Healthcare Corporation) en una dosis de 200 UI de FVIII/kg de peso corporal. El plasma citrato mediante punción cardiaca después de la anestesia se preparó a partir de los grupos respectivos 5 minutos, 3, 6, 9, 16, 24, 32 y 42 horas después de la inyección. Los niveles de actividad de FVIII se midieron en muestras de plasma mediante el uso del ensayo cromogénico. Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 3 y se ilustran en la Figura 8. Todos los cálculos se realizaron con el programa R versión 2.10.1 (A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.<http://www.R-project.org>). Como resultado, el tiempo medio de residencia (TMR) aumentó de 5,4 horas (Advate control) a 11,1 horas para el conjugado PSA-rFVIII.

Tabla 3:

Artículo	Recuperación <i>in vivo</i> RIV %	AUC 0–24 (UI/ml.h)/UI/kg	Semivida terminal (h)	Tiempo de residencia media TMR (h)	Aclaramiento CL (ml/h/kg)
----------	-----------------------------------	--------------------------	-----------------------	------------------------------------	---------------------------

PSA-rFVIII	71	0,161	7,2	11,1	6,0
rFVIII control (Advate)	58	0,054	4,4	5,4	17,1

Ejemplo 15Síntesis detallada del reactivo aminooxi-PSA

5 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina se sintetizó según Botyryn y col., (Tetrahedron 1997; 53: 5485-92) en una síntesis orgánica de dos etapas como se describe en el Ejemplo 1.

Etapas 1:

10 A una solución de endo-N-hidroxi-5-norboneno-2,3-dicarboxiimida (59,0 g; 1,00 eq) en 700 ml de N, N-dimetilformamida anhidra se añadieron K₂CO₃ (45,51 g; 1,00 eq) y 2,2-diclorodietiléter (15,84 ml; 0,41 eq). La mezcla de reacción se agitó durante 22 horas a 50 °C. La mezcla se evaporó hasta sequedad a presión reducida. El residuo se suspendió en 2 l de diclorometano y se extrajo dos veces con solución de NaCl acuoso saturado (cada 1 l). La capa de diclorometano se secó sobre Na₂SO₄ y después se evaporó hasta sequedad a presión reducida y se secó a alto vacío para dar 64,5 g de 3-oxapentano-1,5-dioxi-endo-2',3'-dicarboxidiimidenorborneno como un blanco sólido de color blanco amarillento (intermedio 1).

Etapas 2:

15 A una solución del intermedio 1 (64,25 g; 1,00 eq) en 800 ml de etanol anhidro, se añadieron 31,0 ml de hidrato de hidrazina (4,26 eq). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. La mezcla se concentró a la mitad del volumen de partida por evaporación del disolvente a presión reducida. El precipitado se retiró por filtración. La capa de etanol restante se evaporó hasta sequedad a presión reducida. El residuo que contiene el producto en bruto 3-oxa-pentano -1,5-dioxiamina se secó al vacío, para dar 46,3 g. El producto en bruto se purificó adicionalmente por cromatografía en columna (gel de sílice 60; elución isocrática con una mezcla de diclorometano/metanol, 9 + 1) para dar 11,7 g del producto final puro 3-oxa-pentano -1,5-dioxiamina.

20

Ejemplo de referencia 16Polisialilación de rFIX usando PSA hidrazida

25 rFIX se polisialilada mediante el uso de un reactivo de PSA hidrazida, que se preparó por reacción de PSA oxidado con dihidrazida de ácido adípico (ADH).

Etapas 1: Preparación de PSA hidrazida

30 500 mg de PSA oxidado (PM = 20 kD) obtenido del Serum Institute of India (Pune, India) se disolvieron en 8 ml de tampón de acetato sódico 50 mM, a pH 5,5. A continuación, se añadieron 100 mg de ácido adípico dihidrazida (ADH). La solución se agitó suavemente durante 2 horas. A continuación, se añadieron 44 mg de cianoborohidruro de sodio. Después, la reacción se incubó durante otras 4 horas a 4 °C, la mezcla de reacción se cargó en un casete de diálisis -Slide-A-Lyzer (Pierce, Rockford, IL) (membrana de 3,5 kD, celulosa regenerada) y se dializó frente a PBS a pH 7,2 durante 4 días. El producto se congeló a -80 °C.

Etapas 2: Reacción de PSA hidrazida con rFIX y purificación del conjugado

35 El rFIX se polisialilada mediante el uso de un reactivo de PSA hidrazida tal como se describe en la etapa 1. El rFIX (concentración 1 mg/ml) se oxida con NaIO₄ (concentración: 80 µM) durante 1 hora a 4 °C en oscuridad en agitación suave. La reacción se detiene mediante la adición de glicerol y el rFIX oxidado se somete a UF/DF mediante el uso de una membrana de 30 kD hecha de celulosa regenerada (Vivaspin). El rFIX oxidado se polisialilada luego a pH 6,5 usando un exceso molar de 200 veces de reactivo y una concentración de proteína de 1 mg/ml. El rFIX y el reactivo polisialilación se incuban durante 2 horas con agitación suave en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, el conjugado PSA-rFIX se purifica por HIC. La conductividad de la mezcla de reacción se eleva a 130 mS/cm mediante la adición de un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, NaCl 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8M, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9) y se carga sobre una columna HiTrap butilo FF (5 ml, GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. Posteriormente, el conjugado se eluye con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 7,4. Por último, las fracciones que contienen PSA-rFIX se recogen y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana de 30 kD hecha de celulosa regenerada (Vivaspin). Para el conjugado de PEG-rFIX, se determina una actividad específica de > 50% en comparación con el rFIX nativo (ensayo cromogénico).

45

Ejemplo de referencia 17

50 Polisialilación de rFIX usando PSA hidrazida en presencia de anilina como catalizador nucleofílico

Se disuelven 123 mg de rFIX en 60 ml de tampón fosfato (NaPO_4 50 mM, pH 6,5). A continuación, se añaden 1,2 ml de una solución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y la mezcla se incuba durante 1 hora en oscuridad a 4 °C con agitación suave. Posteriormente, la reacción se inactiva durante 15 minutos a T.A. mediante la adición de 600 μl de solución acuosa de glicerol 1M. La mezcla se somete posteriormente a UF/DF empleando una membrana Pellicon XL Ultracel 30 kD.

La fracción retenida de UF/DF (63,4 ml), que contiene rFIX oxidado, se diluye adicionalmente con 59,6 ml de tampón de fosfato (NaPO_4 50 mM, pH 6,0) y se mezcla con 6,5 ml de una solución acuosa de anilina (200 mM) y se incuba durante 30 minutos a TA. A continuación, se añaden 12,3 ml del reactivo de PSA-hidrazida (preparado según el Ejemplo 16) para dar un exceso molar por 5 del reactivo. Esta mezcla se incuba durante 2 horas a T.A. en oscuridad con agitación suave.

El exceso del reactivo de PSA-hidrazida y rFIX libre se retira por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción se eleva a 180 mS/cm y se carga en una columna rellena con 48 ml de butilo - Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, cloruro de sodio 3 M, cloruro de calcio 6,7 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. A continuación, el conjugado se eluye con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 7,4. Por último, las fracciones que contienen PSA-rFIX se recogen y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana de 30 kD hecha de celulosa regenerada (Millipore). La preparación se caracteriza analíticamente mediante la medición de la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica de FIX. Para el conjugado de PSA-rFIX se determina una actividad específica de > 50% en comparación con el rFIX nativo.

Ejemplo 18

20 Polisialilación de rFIX y purificación utilizando un procedimiento de dos etapas

Se disolvieron 140 mg de rFIX en 62 ml de tampón fosfato (NaPO_4 50 mM, pH 6,0). Después, se añadieron 1,92 ml de una solución acuosa de peryodato de sodio (10 mM) y la mezcla se incubó durante 1 h en oscuridad a 4 °C con agitación suave y se inactivó durante 15 minutos a T.A. mediante la adición de 64 μl de una solución acuosa de glicerol 1M. Después, la mezcla se sometió a UF/DF empleando una membrana Pellicon XL Ultracel 30 kD.

25 La fracción retenida de UF/DF (69,4 ml), que contiene rFIX oxidado, se diluyó adicionalmente con 73,8 ml de tampón de fosfato (NaPO_4 50 mM, pH 6,0) y se mezcló con 8,2 ml de una solución acuosa de anilina (200 mM) y se incuba durante 30 minutos a TA. A continuación, se añadieron 12,3 ml del reactivo de aminooxi (preparado según el Ejemplo 3) para dar un exceso molar por 2,5 del reactivo. Esta mezcla se incubó durante 2,5 horas a T.A. en oscuridad con agitación suave.

30 El rFIX libre se retira por medio de cromatografía de intercambio aniónico (CIA). La mezcla de reacción se diluye con 20 ml de tampón A (Hepes 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,5) y se carga en una columna de Q-Sepharose FF 26/10 (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con tampón A. A continuación, la columna se eluye con Tampón B (Hepes 50 mM, NaCl 1 M, CaCl_2 5 mM, pH 7,5). El rFIX libre eluye a una conductividad de entre 12 - 25 mS/cm y el conjugado entre 27 - 45 mS/cm. La conductividad de las fracciones que contienen el conjugado se eleva posteriormente a 190 mS/cm mediante la adición de tampón C (Hepes 50 mM, NaCl 5 M, CaCl_2 5 mM, pH 6,9) y se carga en una columna de butil Sepharose FF 26/10 (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Tampón D (Hepes 50 mM, NaCl 3 M, CaCl_2 5 mM, pH 6,9). El reactivo de PSA libre se lava en 5 VC de Tampón D. A continuación, el conjugado se eluye con 100 % de tampón E (Hepes 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 7,4). Las fracciones que contienen el conjugado se concentran mediante UF/DF utilizando una membrana de 10 kD hecha de celulosa regenerada (88 cm^2 , corte de 10 kD/Millipore). La etapa de diafiltración final se lleva a cabo frente a tampón de histidina, pH 7,2 que contiene NaCl 150 mM y CaCl_2 5 mM. La preparación se caracteriza analíticamente mediante la medición de la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica de FIX. Para el conjugado de PSA-rFIX se determina una actividad específica de > 50% en comparación con el rFIX nativo.

Ejemplo de referencia 19

45 Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFVIIa y purificación del conjugado

Una solución de 10 mg de rFVIIa en 5 ml de tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) se mezcla con una solución acuosa de NaIO_4 (concentración final: 100 μM) y se incuba durante 1 hora a 4 °C con agitación suave en oscuridad y se inactiva mediante la adición de una solución acuosa de cisteína (concentración final: 1 mM) durante 15 minutos. La mezcla de reacción se somete después a UF/DF. A la fracción retenida (10 ml) se añade un exceso molar de 30 veces del reactivo aminooxi (preparado según el Ejemplo 1). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave. El exceso de reactivo de aminooxi se retira mediante HIC. La conductividad de la mezcla de reacción se eleva a 130 mS/cm mediante la adición de un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, NaCl 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8M, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9) y se carga sobre una columna HiTrap butilo FF (5 ml, GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. Posteriormente, el conjugado se eluye con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 7,4 mediante un gradiente lineal de tampón de elución al 100 % en 20 VC. Por último, las fracciones que contienen PSA-rFVIIa se recogen y se

someten a UF/DF mediante el uso de una membrana de 30 kD hecha de celulosa regenerada (Vivaspin). La preparación se caracteriza analíticamente mediante la medición de la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica del FVIIa (ensayo Staclot, Diagnostica Stago, Asnières, Francia) y muestra una actividad específica de > 20 % en comparación con el material de partida rFVIIa.

5 Ejemplo de referencia 20

Acoplamiento de aminooxi-PSA a rFVIIa en presencia de anilina como catalizador nucleofílico

A 3,0 mg de rFVIIa, disuelto en 1,4 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, a pH 6,0, se añadieron 14,1 µl de una solución de peryodato de sodio acuoso (10 mM). La mezcla se agita en la oscuridad durante 1 hora a 4 °C y se inactivó durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 1,5 µl de glicerol 1 M. Los contaminantes de bajo peso molecular se retiran por medio de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) empleando columnas de desalado PD-10 (GE Healthcare, Fairfield, CT). 3 mg de rFVIIa oxidado, disueltos en 3 ml de tampón de acetato de sodio 50 mM, a pH 6,0 se mezclan con anilina (un catalizador nucleofílico, concentración final: 10 mM) y se agitan durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añade aminooxi-PSA para dar un exceso molar de 5 veces y la mezcla se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, el exceso de reactivo de PSA se retira por medio de HIC. La conductividad de la mezcla de reacción enfriada se eleva a 180 mS/cm y se cargó en una columna de 5 ml HiTrap Butyl FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) HIC (1,6 x 2,5 cm), preequilibrada con HEPES 50 mM, cloruro sódico 3 M, cloruro cálcico 6,7 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. El conjugado se eluye con un gradiente lineal con HEPES 50 mM, cloruro cálcico 6,7 mM, 0,005 % de Tween 80, a pH 7,4 en 20 VC con un caudal de 5 ml/min.

20 Ejemplo de referencia 21

Preparación de un reactivo aminooxi-PEG

Un PEG-aldehído ramificado (PM 40 kD) se utiliza para el acoplamiento con el enlazador diaminoxi, que se prepara como se describe en el Ejemplo 1. Este reactivo PEG-aldehído está disponible en NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). 500 mg de PEG-aldehído se disuelven en 8 ml de tampón acetato de sodio 50 mM, a pH 5,5. A continuación, se añaden 100 mg de 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina. Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, se añaden 44 mg de cianoborohidruro de sodio. Después de agitar durante otras 4 horas a 4 °C, la mezcla de reacción se carga en un casete de diálisis -Slide-A-Lyzer (Pierce, Rockford, IL) (membrana de 3,5 kD, celulosa regenerada) y se dializó frente a PBS a pH 7,2 durante 4 días. El producto se congela a -80 °C.

Ejemplo de referencia 22

PEGilación de rFIX con un reactivo aminooxi PEG

El rFIX se pegila mediante el uso de un reactivo lineal de PEGilación de 20 kD que contiene un grupo aminooxi. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright® CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). El rFIX se oxida a una concentración de proteína de 2 mg/ml con NaIO₄ (concentración final: 100 µM) durante 1 hora en agitación suave en oscuridad a 4 °C en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro sódico 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se inactiva mediante la adición de una solución acuosa de glicerol (concentración final: 1 mM) durante 15 minutos. La mezcla de reacción se somete después a UF/DF. A la fracción retenida se añade un exceso molar de 3 veces de reactivo aminooxi y anilina (un catalizador nucleofílico, concentración final: 10 mM). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave. Por último, el conjugado de PEG-rFIX se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico sobre Q-Sepharose FF. 1,5 mg de proteína/ml de gel se cargan en la columna preequilibrada con Tris 50 mM, pH 8,0. El conjugado se eluye con Tris 50 mM y cloruro de sodio 1 M, a pH 8,0 en 20 VC y luego se somete a UF/DF utilizando una membrana de 30 kD. La preparación se caracteriza analíticamente mediante la medición de la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica de FIX. Para el conjugado de PEG-rFIX se determina una actividad específica de > 75 % en comparación con el rFIX nativo.

45 Ejemplo de referencia 23

PEGilación de rFVIII con un reactivo aminooxi PEG

El rFVIII se pegila mediante el uso de un reactivo lineal de PEGilación de 20 kD que contiene un grupo aminooxi. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright® CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). El rFVIII se oxida a una concentración de proteína de 1 mg/ml con NaIO₄ (concentración final: 100 µM) durante 1 hora en agitación suave en oscuridad a 4 °C en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro sódico 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se inactiva mediante la adición de una solución acuosa de cisteína (concentración final: 1 mM) durante 15 minutos. La mezcla de reacción se somete después a UF/DF. A la fracción retenida se añade un exceso molar de 20 veces de reactivo aminooxi y anilina (un catalizador nucleofílico, concentración final: 10 mM). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave. Por último, el conjugado de PEG-rFVIII se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico sobre Q-Sepharose FF. 1,5 mg de proteína/ml de gel se carga en la columna preequilibrada con tampón Hepes 50 mM, pH 7,4 que contiene CaCl₂ 5

mM. El conjugado se eluye con tampón Hepes 50 mM que contiene CaCl_2 5 mM y cloruro de sodio 500 mM, a pH 7,4 y después se somete a UF/DF utilizando una membrana de 30 kD. La caracterización analítica del conjugado mediante ensayo cromogénico del FVIII y la determinación de la proteína total (ensayo BCA) muestra una actividad específica de > 60 % en comparación con el material de partida rFVIII.

5 Ejemplo de referencia 24

PEGilación de rFVIIa con un reactivo aminooxi PEG

El rFVIIa se pega mediante el uso de un reactivo lineal de PEGilación de 20 kD que contiene un grupo aminooxi. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright® CA de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). El rFVIIa se oxida a una concentración de proteína de 2 mg/ml con NaIO_4 (concentración final: 100 μM) durante 1 hora en agitación suave en oscuridad a 4 °C en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro sódico 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se inactiva mediante la adición de una solución acuosa de glicerol (concentración final: 1 mM) durante 15 minutos. La mezcla de reacción se somete después a UF/DF. A la fracción retenida se añade un exceso molar de 5 veces de reactivo aminooxi y anilina (un catalizador nucleofílico, concentración final: 10 mM). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave. Por último, el conjugado de PEG-rFVIIa se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico sobre Q-Sepharose FF. 1,5 mg de proteína/ml de gel se cargan en la columna preequilibrada con tampón Hepes 20 mM que contiene CaCl_2 1 mM a pH 1. El conjugado se eluye con tampón Hepes 20 mM que contiene CaCl_2 1 mM y cloruro sódico 500 mM a pH 7,4 y luego se somete a UF/DF utilizando una membrana de 30 kD. La caracterización analítica del conjugado mediante la medición de la actividad del FVIIa (ensayo Staclot, Diagnostica Stago, Asnières, Francia) y de proteína total (ensayo BCA) muestra una actividad específica de > 25 % en comparación con el material de partida rFVIIa.

Ejemplo de referencia 25

PEGilación de rFIX con un reactivo PEG-hidrazida

El rFIX se pega mediante el uso de un reactivo lineal de PEGilación de 20 kD que contiene un grupo hidrazida. Un ejemplo de este tipo de reactivo es la serie Sunbright® HZ de NOF (NOF Corp., Tokio, Japón). El rFIX se oxida a una concentración de proteína de 2 mg/ml con NaIO_4 (concentración final: 100 μM) durante 1 hora en agitación suave en oscuridad a 4 °C en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro sódico 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se inactiva mediante la adición de una solución acuosa de glicerol (concentración final: 1 mM) durante 15 minutos. La mezcla de reacción se somete después a UF/DF. A la fracción retenida se añade un exceso molar de 50 veces de reactivo hidrazida y anilina (un catalizador nucleofílico, concentración final: 10 mM). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave. Por último, el conjugado de PEG-rFIX se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico sobre Q-Sepharose FF. La mezcla de reacción se carga en la columna (1,5 mg de proteína/ml de gel), que está preequilibrada con tampón Tris 50 mM, pH 8,0. El conjugado se eluye con 20 VC de tampón Tris a pH 8,0 (Tris 50 mM, NaCl 1 M) y luego se somete a UF/DF utilizando una membrana de 30 kD. La preparación se caracteriza analíticamente mediante la medición de la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica de FIX. Para el conjugado de PEG-rFIX, se determina una actividad específica de > 50% en comparación con el rFIX nativo (ensayo cromogénico).

Ejemplo 26

Polisialilación de rFVIII en presencia de anilina 2 mM

El rFVIII se transfiere al tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, pH 6), se diluye a una concentración de proteína de 1 mg/ml y se oxida con NaIO_4 (concentración final: 100 μM) durante 1 hora en agitación suave en oscuridad a 4 °C en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro sódico 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se inactiva mediante la adición de una solución acuosa de cisteína (concentración final: 1 mM) durante 15 minutos. La mezcla de reacción se somete después a UF/DF. A la fracción retenida se añade un exceso molar de 20 veces de reactivo aminooxi y anilina (un catalizador nucleofílico, concentración final: 2 mM). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave. El exceso de reactivo de aminooxi se retira mediante HIC. La conductividad de la mezcla de reacción se eleva a 130 mS/cm mediante la adición de un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8M, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9) y se carga sobre una columna rellena con 43 ml de butil Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. Posteriormente, el conjugado se eluye con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 7,4. Por último, las fracciones que contienen PSA-rFIX se recogen y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana de 30 kD hecha de celulosa regenerada (Millipore, Billerica, MA). La preparación se caracteriza analíticamente mediante la medición de la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica de FVIII. Para el conjugado de PSA-rFVIII se determina una actividad específica de > 80 % en comparación con el rFVIII nativo.

Ejemplo 27

Polisialilación de rFVIII en presencia de anilina 10 mM

5 El rFVIII se transfiere al tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, pH 6), se diluye a una concentración de proteína de 1 mg/ml y se oxida con NaIO₄ (concentración final: 100 µM) durante 1 hora en agitación suave en oscuridad a 4 °C en tampón de reacción (Hepes 50 mM, cloruro sódico 150 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,0) y se inactiva mediante la adición de una solución acuosa de cisteína (concentración final: 1 mM) durante 15 minutos. La mezcla de reacción se somete después a UF/DF. A la fracción retenida se añade un exceso molar de 20 veces de reactivo aminooxi y anilina (un catalizador nucleofílico, concentración final: 10 mM). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad con agitación suave. El exceso de reactivo de aminooxi se retira mediante HIC. La conductividad de la mezcla de reacción se eleva a 130 mS/cm mediante la adición de un tampón que contiene acetato de amonio (Hepes 50 mM, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, acetato de amonio 8M, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9) y se carga sobre una columna rellena con 43 ml de butil Sepharose FF (GE Healthcare, Fairfield, CT) preequilibrada con Hepes 50 mM, acetato de amonio 2,5 M, cloruro de sodio 350 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 6,9. Posteriormente, el conjugado se eluye con Hepes 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, 0,01 % de Tween 80, a pH 7,4. Por último, las fracciones que contienen PSA-rFIX se recogen y se someten a UF/DF mediante el uso de una membrana de 30 kD hecha de celulosa regenerada (Millipore, Billerica, MA). La preparación se caracteriza analíticamente mediante la medición de la proteína total (BCA) y la actividad cromogénica de FVIII. Para el conjugado de PSA-rFVIII se determina una actividad específica de > 80 % en comparación con el rFVIII nativo.

20 **Ejemplo de referencia 28**PEGilación de una proteína de coagulación sanguínea utilizando PEG ramificado

La PEGilación de una proteína de coagulación sanguínea (tal como FIX, FVIII y FVIIa, como se describe en los Ejemplos 22-25) se puede extender a un reactivo de PEGilación ramificado o lineal como se describe en el Ejemplo 21, que está constituido por un aldehído y un enlazador adecuado que contiene un grupo aminooxi activo.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Baxter International Inc. Baxter Healthcare S.A.

<120> CONJUGADOS DE PROTEÍNAS DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA

<130> 31315/44855A PCT

30 <140> PCT/US2010/43242

<141> 26-07-2010

<150> 61/228.828

<151> 27-07-2008

<150> 61/347.136

<151> 21-05-2010

35 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 422

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 597 954 T3

Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val
 1 5 10 15
 Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu
 20 25 30
 Glu Pro Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Lys Thr Thr Glu Phe Trp
 35 40 45
 Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn
 50 55 60
 Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro
 65 70 75 80
 Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile
 85 90 95
 Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys
 100 105 110
 Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys
 115 120 125
 Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser
 130 135 140

ES 2 597 954 T3

Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp
145 150 155 160

Tyr Val Asn Pro Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln
165 170 175

Gly Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp
180 185 190

Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val
195 200 205

Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr
210 215 220

Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly
225 230 235 240

Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val
245 250 255

Ile Arg Ala Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys
260 265 270

Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu
275 280 285

Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn
290 295 300

Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val
305 310 315 320

Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro
325 330 335

Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr
340 345 350

Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys
355 360 365

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser
370 375 380

Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly
385 390 395 400

Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys

405

410

415

Glu Lys Thr Lys Leu Thr
420

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de conjugación de un ácido polisialílico (PSA), que contiene un grupo aminooxi activo, a un resto de hidrato de carbono oxidado de una proteína de coagulación sanguínea, que comprende poner en contacto el resto de hidrato de carbono oxidado con un PSA activado en condiciones que permitan la conjugación;
- 5 en el que dicha proteína de coagulación sanguínea tiene actividad biológica del Factor IX (FIX) o actividad biológica del Factor VIII (FVIII);
 en el que dicho resto de hidrato de carbono se oxida a través de incubación con un tampón que comprende un agente oxidante seleccionado del grupo que consiste en peryodato de sodio (NaIO_4), tetraacetato de plomo ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$) y perrutenato de potasio (KRuO_4); y
- 10 el que un enlace oxima se forma entre el resto de hidrato de carbono oxidado y el grupo aminooxi activo en el PSA.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido polisialílico (PSA) está comprendido de aproximadamente 10 - 300 unidades de ácido siálico.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente oxidante es peryodato de sodio (NaIO_4).
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el resto de hidrato de carbono oxidado de la proteína de coagulación sanguínea se encuentra en el péptido de activación de la proteína de coagulación sanguínea.
- 15 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido polisialílico (PSA) se prepara haciendo reaccionar un enlazador aminooxi activado con PSA oxidado;
- en el que el enlazador aminooxi se selecciona del grupo que consiste en:
- 20 a) un enlazador 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina de fórmula:
- $$\text{H}_2\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{NH}_2$$
- y
- b) un enlazador 3,6,9-trioxa-undecano-1,11-dioxiamina de fórmula:
- $$\text{H}_2\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{NH}_2$$
- 25 en la que el PSA se oxida a través de incubación con un agente oxidante para formar un grupo aldehído terminal en el extremo no reductor del PSA.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el enlazador aminooxi es 3-oxa-pentano-1,5-dioxiamina.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el agente oxidante es peryodato de sodio (NaIO_4).
- 30 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la puesta en contacto del resto de hidrato de carbono oxidado con el grupo aminooxi activo del ácido polisialílico (PSA) se produce en un tampón que comprende un catalizador nucleófilo seleccionado del grupo que consiste en anilina y derivados de anilina.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa de reducir un enlace oxima en la proteína de coagulación sanguínea conjugada mediante la incubación de la proteína de coagulación sanguínea conjugada en un tampón que comprende un compuesto reductor seleccionado del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3) y ácido ascórbico (vitamina C).
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el compuesto reductor es cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3).
- 40 11. Una proteína de coagulación sanguínea modificada producida por el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
12. Una proteína de coagulación sanguínea modificada que comprende:
- (a) una proteína de coagulación sanguínea que tiene actividad biológica del Factor IX (FIX) o actividad biológica del Factor VIII (FVIII); y
- 45 (b) al menos un PSA aminooxi unido a la proteína de coagulación sanguínea de (a), en el que dicho aminooxi PSA se une a la proteína de coagulación sanguínea a través de uno o más restos de hidrato de carbono.

Figura 1

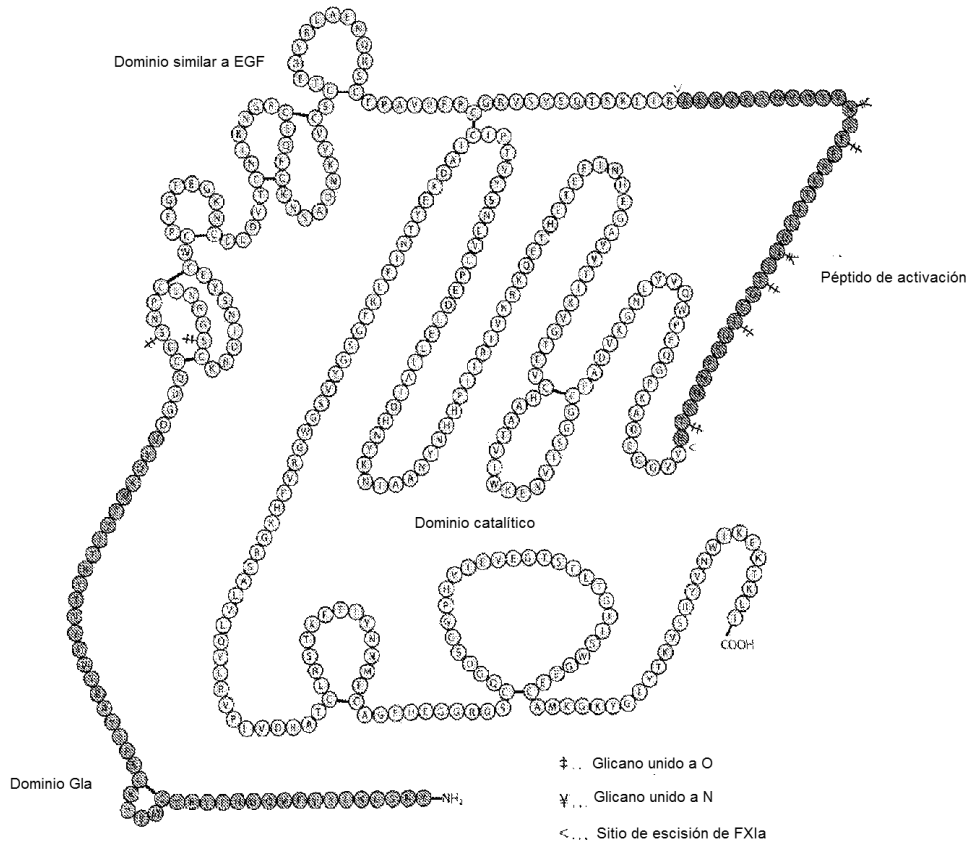


Figura 2

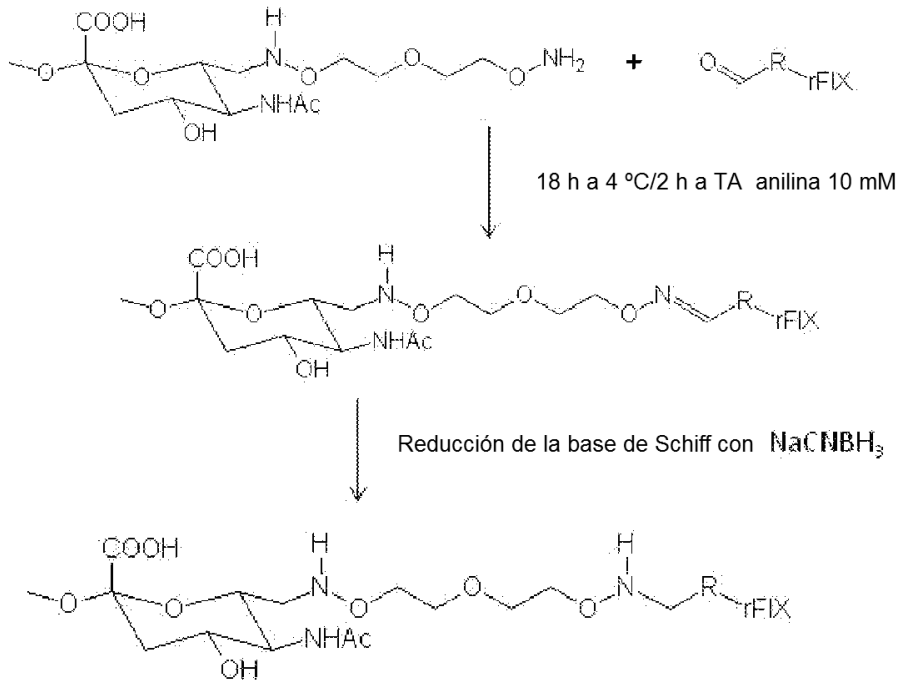


Figura 3

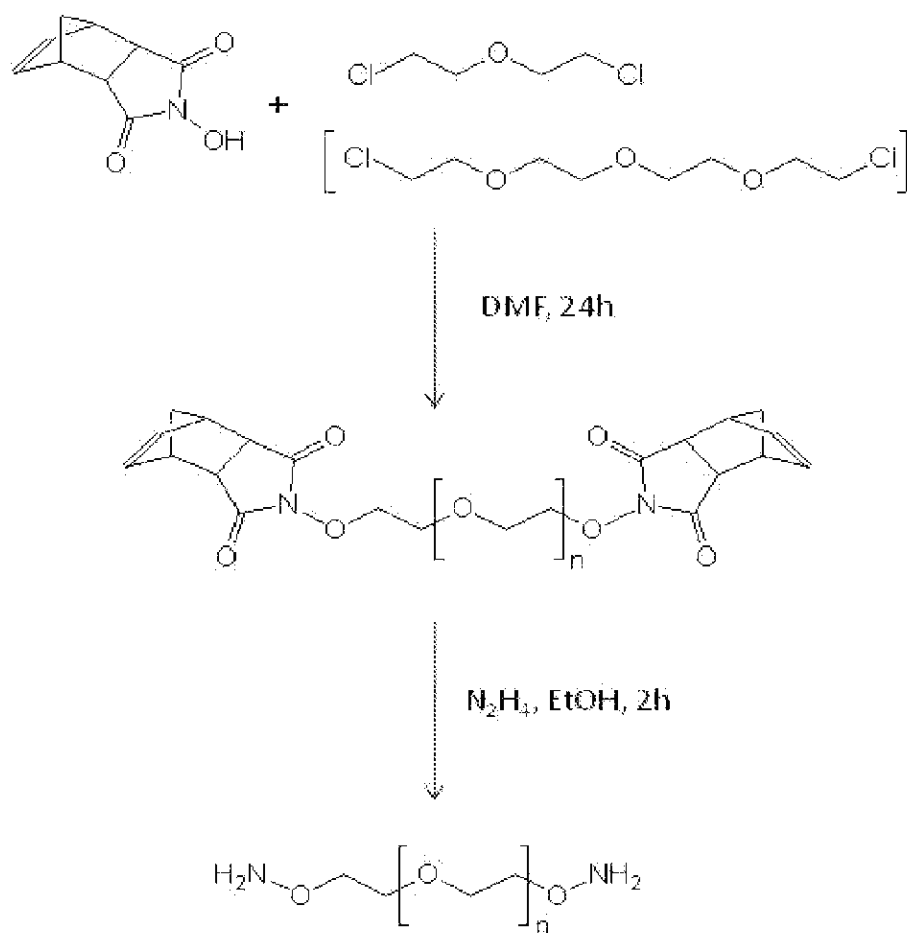
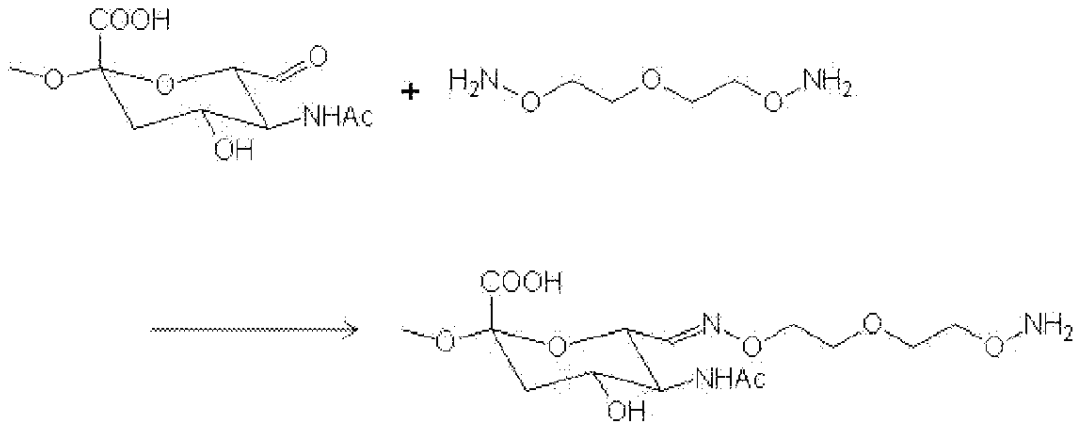


Figura 4



Etapa de reducción para estabilizar
Base de Schiff:

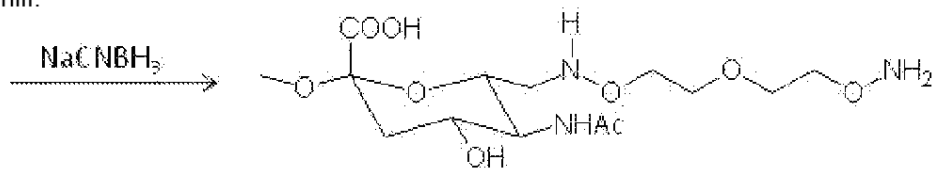


Figura 5

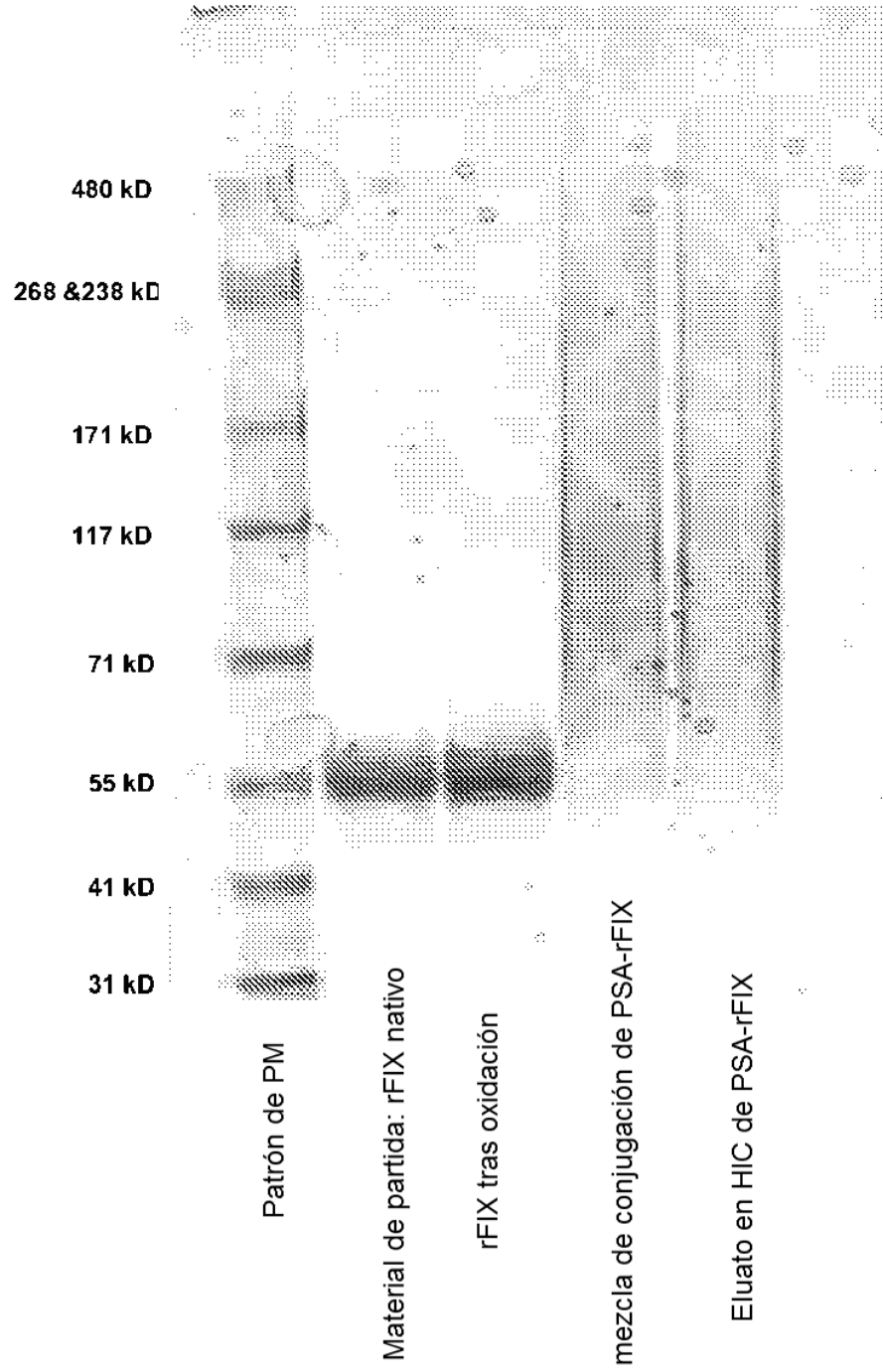


Figura 6

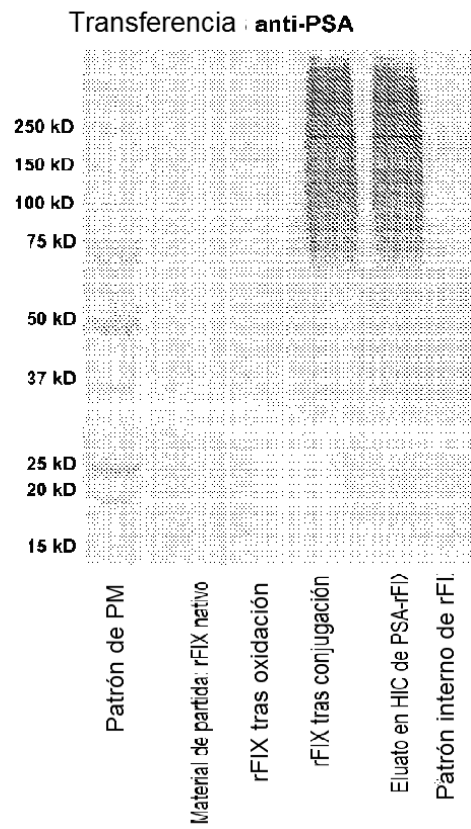
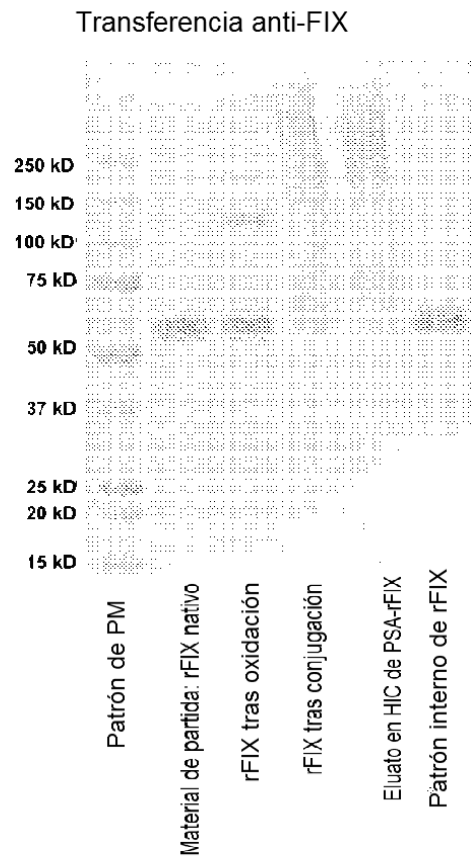


Figura 7

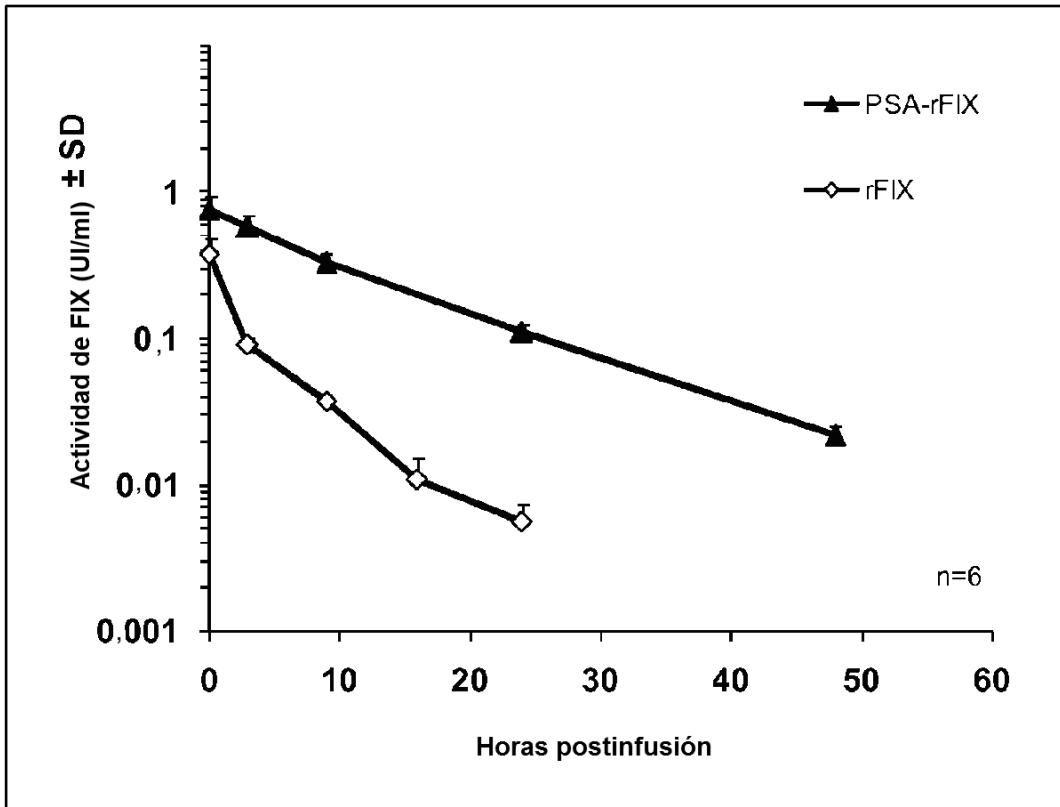


Figura 8

