

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 767**

51 Int. Cl.:

<b>B01D 15/36</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/61</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/18</b>	(2006.01)
<b>C08B 37/00</b>	(2006.01)
<b>B01D 15/42</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2005 PCT/GB2005/003149**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2006 WO06016161**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2005 E 05794240 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 1789454**

54 Título: **Fraccionamiento de polisacáridos cargados**

30 Prioridad:

**12.08.2004 WO PCT/GB2004/003511**  
**23.02.2005 EP 05251016**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.11.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JAIN, SANJAY;**  
**PAPAIOANNOU, IOANNIS y**  
**LAING, PETER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 640 767 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

## Fraccionamiento de polisacáridos cargados

5 La presente invención se refiere al fraccionamiento de polisacáridos polidispersos y cargados que tienen opcionalmente grupos reactivos, en fracciones de polidispersidad baja (preferentemente  $pd < 1,1$ ). Los polisacáridos fraccionados son útiles para la conjugación a sustratos tales como péptidos, proteínas, fármacos, sistemas de administración de fármacos (p. ej., liposomas), virus, células (p. ej., células animales, microbios, polímeros sintéticos, etc.), o para usar como excipientes o diluyentes en composiciones farmacéuticas.

10 Los ácidos polisialícos (PSA) son polímeros no ramificados de ácido siálico de origen natural, que se producen por ciertas cepas bacterianas y en los mamíferos en ciertas células [Roth y otros, 1993]. Los PSA pueden producirse en varios grados de polimerización: de  $n =$  aproximadamente 80 o más residuos de ácido siálico hasta  $n = 2$  tanto por hidrólisis ácida limitada, como por digestión con neuraminidasas o por fraccionamiento de las formas del polímero natural, derivadas de bacterias o de células. La composición de los diferentes PSA varía, además, de tal manera que existen: I. formas homopoliméricas, es decir, los PSA unidos por enlaces alfa-2,8 que comprenden el polisacárido capsular de *E. coli* cepa K1 y del meningococo del grupo B, que se encuentra, además, en la forma embrionaria de la molécula de adhesión de células neuronales (N-CAM). II. Formas heteropoliméricas, tales como el PSA alternante  $\alpha$ -2,8  $\alpha$ -2,9 de *E. coli* cepa K92 y los polisacáridos del grupo C de *N. meningitidis*. Además, III. copolímeros alternantes que contienen monómeros de ácidos siálicos distintos del ácido siálico tales como los del grupo W135 o el grupo Y de *N. meningitidis*. Los PSA tienen importantes funciones biológicas que incluyen la evasión del sistema inmune y del complemento por las bacterias patogénicas y la regulación de la adhesividad glial de las neuronas inmaduras durante el desarrollo fetal (en donde el polímero tiene una función antiadhesiva) [Muhlenhoff y otros, 1998; Rutishauser, 1989; Troy, 1990, 1992; Cho y Troy, 1994]. No existen receptores conocidos para los PSA en mamíferos. El PSA unido por enlaces  $\alpha$ -2,8 de *E. coli* cepa K1 se conoce, además, como 'ácido colominico' (CA) y se usa (en varias maneras) para ejemplificar la presente invención.

La forma unida por enlaces alfa-2,8 del PSA, entre los polisacáridos bacterianos, es únicamente no inmunogénica (que no induce ni respuestas de células T ni de anticuerpos en sujetos mamíferos) aun cuando se conjuga con una proteína portadora inmunogénica, lo que puede reflejar su existencia como un polímero de mamíferos (así como un polímero bacteriano). Se encuentran formas más cortas del polímero (hasta  $n=4$ ) en los gangliósidos de la superficie celular, que se distribuyen ampliamente en el cuerpo, y se cree que imponen y mantienen efectivamente la tolerancia inmunológica al PSA. En los últimos años, las propiedades biológicas de los PSA, particularmente las del ácido polisialíco homopolimérico unido por enlaces alfa-2,8, se explotaron para modificar las propiedades farmacocinéticas de las proteínas y moléculas de fármacos de bajo peso molecular [Gregoriadis, 2001; Jain y otros, 2003; US-A-5846,9512; WO-A-0187922]. La derivación del PSA de un número de proteínas terapéuticas que incluye la catalasa y la asparaginasa [Fernandes and Gregoriadis, 1996 y 1997] da lugar a mejoras significativas en la vida media en la circulación, y permite, además, que tales proteínas se usen en vista de anticuerpos preexistentes inducidos como una consecuencia indeseable (y a veces inevitable) de la exposición previa a la proteína terapéutica [Fernandes y Gregoriadis, 2001]. En muchos aspectos, las propiedades modificadas de las proteínas polisialiladas son comparables a las proteínas derivatizadas con polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, en cada caso, aumentan la vida media, y las proteínas y péptidos son más estables a la digestión proteolítica, pero la retención de la actividad biológica parece ser mayor con el PSA que con el PEG [Hreczuk-Hirst y otros, 2002]. Además, existen preguntas sobre el uso del PEG con agentes terapéuticos que deben administrarse crónicamente, ya que el PEG sólo es biodegradable muy lentamente [Beranova y otros, 2000] y las formas de alto peso molecular tienden a acumularse en los tejidos [Bendele, y otros, 1998; Convers, y otros, 1997]. Se descubrió que las proteínas PEGiladas generan anticuerpos anti PEG que podrían influir, además, en el tiempo de permanencia del conjugado en la circulación sanguínea [Cheng y otros, 1990]. A pesar de la historia establecida del PEG como un polímero conjugado a productos terapéuticos administrados parenteralmente, será necesario un mejor entendimiento de su inmunotoxicología, farmacología y metabolismo [Hunter y Moghimi, 2002; Brocchini, 2003]. De manera similar existen preocupaciones acerca de la utilidad del PEG en agentes terapéuticos que requieren dosificaciones elevadas, (y por lo tanto altas dosis de PEG), ya que la acumulación de PEG puede conducir a toxicidad. El PSA unido por enlaces alfa 2,8 ofrece por tanto una alternativa atractiva al PEG, que es un polímero biodegradable inmunológicamente "invisible" que naturalmente forma parte del cuerpo humano, y que puede degradarse, a través de neuraminidasas tisulares, hasta el ácido siálico, sacarídico no tóxico.

55 Nuestro grupo describió, en trabajos científicos previos y en patentes concedidas, la utilidad de los PSA naturales en la mejora de las propiedades farmacocinéticas de las proteínas terapéuticas [Gregoriadis, 2001; Fernandes y Gregoriadis, 1996, 1997, 2001; Gregoriadis y otros, 1993, 1998, 2000; Hreczuk-Hirst y otros, 2002; Mital, 2004; Jain y otros, 2003, 2004; US-A-05846,951;. WO-A-0187922]. Ahora, describimos nuevos derivados de PSA, que permiten nuevas composiciones y métodos de producción de proteínas derivatizadas con PSA (y otras formas de agentes terapéuticos).

60 Se describieron previamente métodos para la unión de polisacáridos a agentes terapéuticos tales como proteínas [Jennings y Lugowski, 1981; US-A-5846,951; WO-A-0187922]. Algunos de estos métodos dependen de la derivatización química del extremo 'no reductor' del polímero para crear un resto aldehído reactivo con la proteína (Fig. 1, 2). El extremo reductor del PSA (y de otros polisacáridos) es sólo débilmente reactivo con proteínas en las condiciones suaves necesarias para preservar la conformación de las proteínas y la integridad química del PSA durante la

conjugación. El extremo no reductor de la unidad terminal de ácido siálico, que contiene dioles vecinales, puede oxidarse fácilmente (y selectivamente) con peryodato para producir un derivado de monoaldehído. Este derivado es mucho más reactivo frente a las proteínas y comprende un elemento adecuadamente reactivo para la unión de proteínas a través de una aminación reductora y otras químicas. Lo describimos anteriormente en US-A-5846,951 y en la patente núm. WO-A-0187922. La reacción se ilustra en las Fig. 1a y 2 en donde;

5

1a) muestra la oxidación del CA (PSA unido por enlaces alfa-2,8 de *E. coli*) con peryodato sódico para formar un aldehído reactivo con proteínas en el extremo no reductor del ácido siálico terminal y

10

2) muestra la reducción selectiva de la base de Schiff con cianoborohidruro sódico ( $\text{NaCNBH}_3$ ) para formar un enlace covalente irreversible estable con el grupo amino proteico.

15

La débil reactividad del extremo reductor puede explotarse con un efecto beneficioso (mediante la destrucción del extremo no reductor, mediante el recubrimiento del extremo reductor y la derivatización con un reticulante difuncional), para evitar así la complejidad del producto descrita en la Fig. 1b mediante el uso del método establecido (Fig. 1a) de aminación reductora de proteínas con CA oxidado con peryodato.

20

Los polímeros disponibles comercialmente (especialmente polímeros naturales, p. ej., ácido colominico (CA), que se usan en la mayoría de los documentos anteriores) se producen a partir de bacterias y son altamente polidispersos. Pueden contener, además, contaminantes bacterianos tales como endotoxinas, sales, etc. Tales materiales pueden no ser adecuados para la producción de agentes terapéuticos derivatizados con PSA destinados a usarse en seres humanos y animales, donde la definición química y molecular de las entidades farmacológicas es de gran importancia debido a los requisitos de seguridad de la ética médica y de las autoridades reguladoras (p. ej., FDA, EMEA).

25

Por lo tanto, solucionamos los problemas anteriores mediante el desarrollo de nuevos métodos para el fraccionamiento de una preparación de polisacárido polidispersa en una serie de fracciones de polidispersidad baja ( $<1,1$  pd) que contiene cada una especies dentro de un intervalo estrecho de pesos moleculares. Estas nuevas preparaciones son particularmente adecuadas para la producción de agentes terapéuticos derivatizados con PSA destinados a usarse en seres humanos y animales, donde la definición química y molecular de las entidades farmacológicas (p. ej., vida media predecible) es de gran importancia debido a los requisitos de seguridad de la ética médica y de las autoridades reguladoras (p. ej., FDA, EMEA).

30

35

Los métodos de cromatografía de intercambio iónico para la separación de mezclas complejas se conocen bien en la técnica. En general la técnica anterior usa la variación en la fuerza iónica para conseguir esta separación. En una solución de electrolitos completamente disociados, la fuerza iónica ( $I$ ) se define como  $I = 0,5 \sum_i C_i Z_i^2$ , en la que  $C_i$  es la concentración de un ion particular, y  $Z_i$  es el número de carga de las especies iónicas.

40

Constantino y otros, describieron un método cromatográfico adecuado para el aislamiento de la fracción de alto peso molecular a partir de una preparación polidispersa de un polisacárido cargado negativamente tal como los antígenos de *Haemophilus influenzae* tipo b y de *Neisseria meningitidis* grupo A y grupo C. El material que se obtuvo todavía contiene especies con un amplio intervalo de pesos moleculares (es decir, permanece altamente polidisperso) pero está libre de oligosacáridos pequeños. La eliminación de los oligosacáridos hace que este material sea más adecuado para su uso en vacunas basadas en polisacáridos. La eliminación de las especies de bajo peso molecular se llevó a cabo, mediante el uso de un proceso de elución en dos etapas. Brevemente Hib (antígeno tipo b de *Haemophilus influenzae*), un polisacárido cargado negativamente, se unió a una resina de intercambio iónico y las especies de bajo peso molecular se eluyeron mediante lavado extensivo con una solución amortiguadora de baja fuerza iónica. Las especies de peso molecular intermedio y alto, que permanecieron unidas en la columna se recuperaron mediante la elución con una solución amortiguadora de alta fuerza iónica.

45

50

Zhang y otros (1997) describieron el uso de cromatografía de intercambio iónico de alto rendimiento para la separación de polímeros de ácido colominico. Se mezclan tres soluciones madre para formar un gradiente lineal que tiene una concentración progresivamente más alta de nitrato sódico.

55

Kim Seung Un y otros (1992) describieron la purificación de aminoácidos monoméricos a partir de una mezcla heterogénea mediante el uso de una elución en gradiente por etapas. La presente invención puede distinguirse de esta descripción por su uso en la separación de polímeros en una mezcla homogénea.

60

La presente invención puede distinguirse de las descripciones de Constantino *et al* y Zhang *et al*, además, por su uso de una elución por etapas en lugar de una de gradiente lineal para purificar una mezcla homogénea de polímeros. Constantino *et al* usan un gran volumen de lavado de fuerza iónica baja para eliminar todas las especies de bajo peso molecular de la columna y después un gran volumen de lavado de fuerza iónica alta para eliminar todas las demás especies de la columna. Esto no da lugar a la separación en fracciones de polidispersidad baja. El uso de un gradiente por etapas de conformidad con la presente invención, con etapas que difieren sólo ligeramente en la fuerza iónica, conduce al aislamiento de fracciones de polidispersidad baja.

65

Ravenscraft y otros, [1999] desarrollaron un proceso para la determinación del peso molecular de oligosacáridos Hib de bajo peso molecular mediante el uso de la cromatografía de intercambio iónico (IEC). El intercambio iónico proporciona

una resolución excelente de oligosacáridos pequeños con valores de DP (grado de polimerización) de 10 o menos. Esto se explotó para separar una mezcla de oligómeros mediante el uso de intercambio iónico en oligómeros individuales. El DP se midió con espectroscopía de masas y los oligosacáridos purificados se utilizaron después como patrones para calibrar una columna de intercambio iónico lo que permitió que se llevara a cabo la determinación del peso molecular de oligosacáridos pequeños mediante el uso de un intercambio iónico analítico.

5

La presente invención genera fracciones de polisacáridos de baja polidispersidad con un buen rendimiento que pueden usarse para proporcionar conjugados proteína-polímero farmacéuticamente útiles. Ninguna de las técnicas anteriores describe técnicas que fraccionen polisacáridos de esta manera.

10

De conformidad con la invención se proporciona un proceso para separar un polisacárido polidisperso cargado iónicamente en fracciones, en el que una solución acuosa del polisacárido polidisperso se pone en contacto con una resina de intercambio iónico en una columna, se somete a una elución selectiva mediante una solución amortiguadora acuosa de elución, y el polisacárido se recupera a partir de las fracciones eluidas, que se caracteriza porque la elución selectiva implica lavar la resina en la columna secuencialmente con al menos tres soluciones amortiguadoras de elución que tienen un pH y/o fuerza iónica constante y diferente y en el que la segunda y las subsecuentes soluciones amortiguadoras tienen un pH y/o una fuerza iónica más alta que las soluciones amortiguadoras de la etapa inmediatamente anterior, y porque las fracciones eluidas tienen cada una un peso molecular promedio diferente y el producto polisacárido que se recupera de las fracciones eluidas tiene una polidispersidad inferior a 1,5 y en donde el producto polisacárido es un polímero o copolímero de ácido siálico.

20

En el proceso, preferentemente todas las soluciones amortiguadoras de elución tienen el mismo pH, pero tienen una fuerza iónica sucesivamente más alta debido a concentraciones crecientes de iones tales como iones de sales de ácidos minerales fuertes y bases minerales fuertes. Preferentemente, la sal es cloruro de sodio. Preferentemente, el aumento de la fuerza iónica es el mismo que el que se produce mediante el aumento de la concentración de NaCl en 5-100 mM, preferentemente 25 mM. Esto corresponde a un aumento en la fuerza iónica de 0,005 a 0,1 M, preferentemente 0,025 M.

25

Alternativamente, las soluciones amortiguadoras de elución pueden tener valores de pH sucesivamente más altos. Preferentemente, la diferencia entre el pH de cada eluyente es la misma y preferentemente es de 0,2 unidades de pH. El pH de cada solución amortiguadora está preferentemente en el intervalo de 7,4-13. Típicamente, la primera solución amortiguadora de elución tendrá un pH de aproximadamente 7,4 y se usarán al menos 5 etapas de elución en el proceso. Idealmente, la fuerza iónica de todos los amortiguadores de elución será menor que 25 M. La concentración de iones hidrógeno e hidroxilo en los amortiguadores es tan baja que su contribución a la fuerza iónica total de la solución es despreciable.

35

Un aumento en la fuerza iónica y del pH pueden usarse en tándem en el proceso de fraccionamiento. Alternativamente, la elución por pH puede usarse inicialmente en una serie de etapas para elevar el pH de 7,4 a al menos 8,8, y después puede comenzar la elución por fuerza iónica. Como alternativa, puede realizarse el aumento de pH después de un gradiente salino corto, pero esto requiere un pH inicial superior a 7,4. Un intervalo de pH bajo (aproximadamente 4) puede permitir el fraccionamiento cuando se usa una columna de intercambio iónico fuerte. Sin embargo, puesto que muchos polisacáridos no son estables a este pH, el pH de las fracciones eluidas debe en este caso ajustarse inmediatamente a aproximadamente 7,4.

40

Preferentemente, las soluciones amortiguadoras de elución contienen una base, que es preferentemente trietanolamina.

45

Es posible que haya una etapa de lavado inicial, en la que se lava a través de la columna una solución amortiguadora de elución de baja concentración iónica. Por ejemplo, tal etapa de lavado inicial puede llevarse a cabo con una solución amortiguadora que tiene una concentración de sal menor en más de 100 mM en concentración de sal que la primera de las tres soluciones amortiguadoras de elución esenciales que se usan en el proceso. Dicha etapa inicial puede eliminar contaminantes de bajo peso molecular u otros contaminantes que son subproductos de procesos de recuperación para materiales naturales. Dicha etapa de lavado inicial puede implicar un volumen de al menos 1, preferentemente de al menos 1,5 volúmenes de columna, con base en el volumen de la columna de resina de intercambio iónico. Debe observarse que una columna de resina de intercambio iónico puede tener un diámetro de la sección transversal que es mayor que la altura o puede, como en una columna convencional, tener una altura que sea mayor que el diámetro de la sección transversal. El volumen puede estar en el intervalo de 1 a 5000 ml. La altura de la columna puede estar en el intervalo de 1 cm a 5000 cm. El área de la sección transversal puede estar en el intervalo de 1 a 5000 cm<sup>2</sup>. La sección transversal puede ser de cualquier forma pero es preferentemente redonda.

50

55

Se encontró que se prefiere para cada una de las etapas de elución esenciales usar al menos 1,0, preferentemente al menos 1,25 y lo la máxima preferencia al menos 1,5 volúmenes de columna de la solución amortiguadora de elución respectiva. Preferentemente no se usan más de 3 volúmenes de columna de solución amortiguadora de elución. La tasa de flujo para una matriz de 75 ml es preferentemente 7 ml/minuto.

60

El proceso de la invención comprende, preferentemente, al menos 5, por ejemplo, tanto como 20 o, generalmente en el intervalo de 6 a 12, etapas secuenciales de elución con las soluciones amortiguadoras de elución de fuerza iónica

65

sucesivamente creciente. La fuerza iónica en la primera de estas etapas esenciales está generalmente en el intervalo de 1 mM a 1 M. Se requerirán concentraciones iónicas más débiles para los contraiones más fuertes, tales como el sulfato, que para el cloruro.

- 5 Preferentemente, la fuerza iónica de una solución amortiguadora de elución se varía mediante la variación del nivel de una sal de un ácido mineral fuerte y una base mineral fuerte, preferentemente cloruro de sodio.

10 Con respecto a las etapas de recuperación, éstas implican generalmente etapas en las que el polisacárido se aísla de la sal, por ejemplo, mediante el uso de membranas, por ejemplo, de membranas de ultrafiltración. Dichas etapas pueden permitir la concentración de los polisacáridos para formar soluciones más altamente concentradas. Dichas soluciones pueden someterse a etapas adicionales de tratamiento con membrana, por ejemplo, sucesivas filtraciones u otras etapas de filtración. La solución amortiguadora de elución puede contener un ácido o base volátil y en este caso la recuperación implica la volatilización del ácido o base volátil de las fracciones eluidas. Aunque es posible recuperar el polisacárido a partir de soluciones acuosas mediante técnicas de precipitación, por ejemplo, que implican no solventes para los polisacáridos, se prefiere que no se utilicen tales solventes, ya que esto puede hacer más difícil el aislamiento final de los respectivos solventes. Consecuentemente la etapa final de recuperación implica preferentemente la evaporación del agua y, preferentemente, de los restantes componentes de la solución amortiguadora volátiles que quedan de las etapas de elución. En un caso preferido en donde está presente la trietanolamina, tanto el catión trietanolamina como el anión acetato son volátiles y pueden eliminarse fácilmente bajo vacío.

20 El polisacárido puede aislarse finalmente de la solución mediante secado, preferentemente bajo presión reducida. Esto se realiza preferentemente por liofilización.

25 La precipitación, preferentemente con el uso de un no solvente, puede llevarse a cabo como etapa preliminar al fraccionamiento para eliminar una porción de la población y disminuir la polidispersidad de las fracciones de peso molecular más alto. Preferentemente, se usa la precipitación diferencial con etanol.

30 La invención que se describe en la presente descripción es el uso de una estrategia de gradiente por etapas, que proporciona la eliminación por etapas (y posterior recolección) de especies de peso molecular progresivamente más elevado a partir de una población polimérica polidispersa unida a una resina de intercambio iónico. La resina de intercambio iónico puede ser cualquier medio de intercambio aniónico o catiónico fuerte o débil. El uso de un lavado de cualquier fuerza iónica dada eluirá una población compleja de especies de la columna. Mediante el uso de una serie de lavados cortos en tándem, cada etapa eluye una parte de la población que se eluiría en la siguiente etapa, de modo que en cada punto sólo se eluye una pequeña población, lo que facilita el fraccionamiento de las preparaciones polidispersas en fracciones con estrechas polidispersidad. Este proceso también puede facilitar la eliminación de impurezas, p. ej., sal, endotoxina, etc.

40 En IEC, las moléculas no permanecen absolutamente inmóviles a bajas concentraciones de sal. Se mueven muy lentamente como bandas. Su velocidad depende de la constante de unión de una molécula a la columna, que varía con la fuerza iónica. Cuando la constante de unión es, por ejemplo, media, una banda se desplazará relativamente lentamente a través de la columna y se ensanchará hasta cierto punto. Cuando la constante de unión es débil la banda se moverá muy rápidamente pero con un ensanchamiento insignificante. Cuando la constante de unión es fuerte, la banda se moverá muy lentamente, principalmente mediante el ensanchamiento. Un gradiente lineal impide el ensanchamiento, y da bandas estrechas y picos bien definidos. Un gradiente por etapas, por otra parte eluye las moléculas que a la concentración particular tienen una constante de unión baja como una banda estrecha y eluye aquellas que tienen una constante de unión intermedia como una banda difusa (que es probable que se traslade a la siguiente fracción). Las moléculas que tienen una alta constante de unión exhibirán poco movimiento y serán generalmente anchas. El resultado es que cada etapa produce un pico que sube muy rápidamente y luego declina lentamente y produce una cola. El comportamiento de esta manera de los gradientes por etapas se documenta bien. La elevación del pico contiene más especies con una constante de unión baja y la cola contiene más especies con la constante de unión intermedia (que también se transportarán a la siguiente fracción). Cuanto más larga es cada etapa, más hace que las especies que tienen una constante de unión intermedia se ensanchen y eventualmente algunas se eluyen, lo que enriquece lo que queda en la columna de especies más altas. Así un gradiente por etapas eluye, además, las especies, que en un gradiente lineal bajarían a una mayor fuerza iónica y causarían un cierto desplazamiento incluso de las bandas mucho más altas. Aunque esto no facilita la resolución, es ventajoso para el fraccionamiento. Si dos especies tienen una constante de unión muy cercana un gradiente por etapas puede permitir la purificación o enriquecimiento de la especie con la constante de unión más alta. La primera etapa eluye ambas especies, pero preferentemente la que tiene la constante de unión más baja. La segunda etapa eluye ambas especies pero como la mayoría de las especies de constantes de unión baja ya se eliminaron en la etapa anterior, la mayor parte de la fracción es la especie de constante de unión alta. Por lo tanto un gradiente por etapas, aunque no puede separar completamente especies con constantes de unión similares, puede resultar en un enriquecimiento significativo de la que tiene la constante de unión más alta.

65 Al tomar el CA como ejemplo, la constante de unión es el resultado de la carga promedio de la molécula. La diferencia en las constantes de unión depende de la diferencia de carga entre las diferentes especies. La relación de carga entre una especie con 41 cargas y una especie con 40 cargas es mucho menor que la de una especie con 11 cargas y una

con 10 cargas. A medida que la cantidad de cargas (y por lo tanto) de monómeros aumenta la diferencia entre las constantes de unión disminuye. A pesos moleculares mayores se vuelve prácticamente insignificante.

Por lo tanto un gradiente lineal da como resultado una buena resolución para las especies de bajo peso molecular, pero a medida que aumenta el peso molecular (y por tanto la carga), disminuye la resolución. La estrategia de gradiente por etapas, por el contrario, eluye más de las especies de peso molecular inferior que de las especies con peso molecular más alto con cada lavado. Así el gradiente por etapas produce fracciones menos dispersas hacia el extremo más alto del intervalo de pesos moleculares y más fracciones dispersas en el centro y comienzo del intervalo.

Varios parámetros pueden afectar la separación.

1) pH: La carga del polímero depende del pH; la disminución del pH reducirá la carga y podría permitir una mejor resolución en el extremo más alto del intervalo de pesos moleculares.

2) Volumen de la etapa de lavado: Cuanto mayor sea el lavado menor será lo que se recuperará de las especies de peso molecular más alto, pero menor será su polidispersidad.

3) Número de etapas: El número de etapas, además, es un parámetro importante. Saltarse las primeras etapas puede resultar en una disminución en el tamaño promedio que se obtiene en cada fracción y en un aumento en la polidispersidad que se hace cada vez menos y menos pronunciada a medida que aumenta el peso molecular. Si se usan más etapas puede aumentar la resolución de la mayoría de las fracciones, pero disminuirá la cantidad promedio de CA en cada fracción.

4) Temperatura. Una temperatura más baja aumenta la fuerza de la unión y puede disminuir el tamaño de las especies que bajan en cada fracción.

En la invención el polisacárido polidisperso puede ser un polisacárido natural, un producto de la hidrólisis de este o un derivado funcionalizado de cualquiera de estos. La invención es de particular utilidad en la separación de polisacáridos naturales tales como polisacáridos bacterianos, por ejemplo, antígenos polisacáridos. La invención es de particular utilidad en la separación de polímeros y copolímeros de ácido siálico, por ejemplo, poli(ácido siálico unido por enlaces 2,8), poli(ácido siálico unido por enlaces 2,9) o un PSA unido por enlaces alternantes 2,8-2,9. Preferentemente, el polisacárido es ácido colominico (CA) o un derivado oxidado, reducido, aminado y/o de hidrazida de este.

La polidispersidad del peso molecular (es decir, el peso molecular promedio en peso dividido por el número de peso molecular promedio) del polisacárido polidisperso debe ser al menos 1,1, preferentemente al menos 2,0. Encontramos que el proceso tiene una utilidad particular cuando el peso molecular promedio en peso del polisacárido polidisperso es de al menos 1 kDa, preferentemente de al menos 10 kDa, y preferentemente de al menos 100 kDa.

El proceso es útil para producir fracciones de polisacárido de polidispersidad muy baja. Por ejemplo, el polisacárido producto que se recupera de las fracciones eluidas tiene polidispersidad de menos de 1,5, con la máxima preferencia de menos de 1,25, por ejemplo, 1,1 o incluso menor. Encontramos que es posible conseguir polidispersidades de hasta aproximadamente 1,01.

Preferentemente, el material de partida polisacárido tiene al menos 1, con mayor preferencia al menos 5, con mayor preferencia al menos 10, por ejemplo, al menos 50 unidades sacáridas. Preferentemente, el polisacárido es ácido polisialico (PSA) que comprende unidades de ácido siálico unidas entre sí por enlaces  $\alpha$  (2,8) o  $\alpha$  (2,9).

No existe un límite superior particular sobre el tamaño de los polisacáridos polidispersos a fraccionar. Sin embargo, en el caso del PSA, encontramos que la mayoría de los polímeros de utilidad tienen un peso molecular promedio en peso de hasta 150 kDa.

El PSA puede derivarse de cualquier fuente, preferentemente de una fuente natural tal como una fuente bacteriana, p. ej., E. coli K1 o K92, meningococos del grupo B, o incluso leche de vaca o N-CAM. El polímero de ácido siálico puede ser un polímero heteropolimérico tal como el del N. meningitidis del grupo 135 o del grupo V, o puede sintetizarse. El PSA puede estar en forma de una sal o del ácido libre. Puede estar en una forma hidrolizada, de manera que el peso molecular se reduce después de la recuperación a partir de una fuente bacteriana. El PSA puede ser un material que tenga una amplia distribución de pesos moleculares tales como que tenga una polidispersidad de más de 1,3, por ejemplo, tanto como 2 o más. Preferentemente, la polidispersidad del peso molecular es inferior a 1,2, por ejemplo, tan baja como 1,01.

La siguiente descripción describe las modalidades preferidas del proceso de la presente invención que se lleva a cabo sobre el PSA polisacárido para el que la invención es de particular utilidad.

Una población de PSA que tienen una amplia distribución de pesos moleculares puede fraccionarse en fracciones con polidispersidades inferiores, es decir, en fracciones con diferentes pesos moleculares promedios. El fraccionamiento es preferentemente por cromatografía de intercambio aniónico, mediante el uso para la elución de una solución amortiguadora básica adecuada. Cuando el polisacárido tiene grupos de ácido carboxílico el intercambio de aniones es particularmente deseable. Encontramos un medio de intercambio aniónico adecuado; un medio preparativo tal como un material de intercambio iónico fuerte basado en agarosa activada, que tiene grupos pendientes de iones de amonio

cuaternario (es decir, una base fuerte). La elección del medio dependerá de si el pH o la fuerza iónica es el medio para el fraccionamiento, y será evidente para un experto en la técnica. La solución amortiguadora de elución no es reactiva y preferentemente es volátil de manera que el producto deseado pueda recuperarse de la base en cada fracción por evaporación. Ejemplos adecuados son las aminas, tales como trietanolamina. La recuperación puede ser, por ejemplo, por liofilización. El método de fraccionamiento es adecuado para un material de partida de PSA así como para sus derivados. Así la técnica puede aplicarse antes o después de las etapas esenciales del proceso sobre las invenciones relacionadas descritas en la solicitud PCT/GB04/03488, que se presentó incluso en la misma fecha de la presente (referencia del agente: HMJ03917) y la solicitud que se presentó incluso en la misma fecha de la presente (referencia del agente: HMJ03871), en las que se describen diversas reacciones de derivatización que se llevaron a cabo sobre ácidos polisialícos y compuestos intermedios formados en estos.

Se cree que esta es la primera vez que se aplica la IEC a los polisacáridos iónicos fraccionados con pesos moleculares por encima de aproximadamente 5 kDa, especialmente PSA de tales pesos moleculares.

De conformidad con un aspecto adicional de esta descripción se proporciona un proceso para fraccionar una población de un polisacárido iónico con un peso molecular superior a 5 kDa mediante el uso de IEC mediante el uso en la solución amortiguadora de elución de una base o ácido que es preferentemente volátil.

Preferentemente, el polisacárido tiene grupos de ácido carboxílico y el intercambio iónico es intercambio aniónico. Preferentemente, la solución amortiguadora de elución contiene una amina, con mayor preferencia trietanolamina. Con la máxima preferencia, los polisacáridos se recuperan de las fracciones por secado, preferentemente bajo presión reducida, con la máxima preferencia por liofilización.

Este método puede aplicarse para el fraccionamiento de GA que tiene restos reactivos que son estables en agua (maleimida o yodoacetato, etc.) y otros polímeros cargados naturales (p. ej., sulfato de dextrano) y sintéticos (p. ej., ácido poliglútamico, polilisina, ácido hialurónico). La cromatografía de intercambio de cationes y aniones puede usarse, además, para el fraccionamiento de polímeros cargados mediante el uso de gradientes de sal o pH.

Se cree que es también la primera vez que se utiliza IEC para separar polisacáridos iónicos en combinación con técnicas de precipitación y/o métodos de ultrafiltración.

El método por IEC puede eliminar subproductos tales como endotoxinas que permanecen en los PSA y GA comercialmente disponibles.

La cromatografía de interacción hidrófoba y de par iónico pueden usarse, además, para el fraccionamiento de polímeros y de conjugados proteína-polímero.

En la descripción se proporciona un nuevo proceso para producir una serie de preparaciones (fracciones) de polidispersidad estrecha ( $pd < 1,1$ ) de un polisacárido, preferentemente, un compuesto de PSA (nativo o activado), en el que el material de partida de alta polidispersidad cargado negativamente se une a una resina de intercambio aniónico y las fracciones se eluyen con lavados cortos cada uno con una fuerza iónica progresivamente más alta.

En una modalidad alternativa, los polímeros dispersos anchos cargados negativa y positivamente y los conjugados proteína-polisacárido pueden fraccionarse por cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, respectivamente.

De conformidad con otro aspecto de la descripción se proporciona un nuevo proceso en el que una molécula polisialilada, en la que el producto es polidisperso debido a la polidispersidad del material de partida del ácido polisialíco conjugado con la macromolécula, se fracciona en preparaciones de polidispersidad estrecha mediante el uso de la misma estrategia de gradiente por etapas y de IEC como se describió anteriormente.

En el proceso los parámetros (p. ej., cantidad de matriz que se usa, cantidad cargada de la muestra, temperatura, tasa de flujo, gradientes, etc.) se optimizan preferentemente para el fraccionamiento de una macromolécula polisialilada (por ejemplo), donde el producto es polidisperso debido a la polidispersidad del material de partida del PSA conjugado con la macromolécula, se fracciona en preparaciones de polidispersidad estrecha mediante el uso de la misma estrategia de gradiente por etapas y de IEC como describió anteriormente. Estas etapas se llevan a cabo en condiciones tales de manera que no existe sustancialmente ninguna escisión intermedia de la cadena principal de un material de partida de cadena larga (polimérico), es decir que no debe producirse una reducción sustancial del peso molecular.

Los polisacáridos dispersos estrechos pueden usarse para generar grupos activos. Por ejemplo, los grupos aldehído son adecuados para conjugar a sustratos que contienen grupos amina o a compuestos de hidrazina. Se describen procesos en los que el producto activado de una etapa de oxidación se conjuga subsecuentemente con el compuesto sustrato. Preferentemente, la reacción de conjugación (como se describe en nuestras publicaciones anteriores que se mencionan anteriormente) implica la conjugación del PSA con una amina para formar una base de Schiff, seguido preferentemente por una reducción para formar un resto de amina secundaria. El proceso tiene un valor particular para la derivatización de proteínas, de las cuales el grupo amina es adecuadamente el grupo amina épsilon de un grupo lisina o el grupo amino N-terminal. El proceso es de particular valor para derivatizar agentes terapéuticamente activos de

proteínas o péptidos, tales como citocinas, hormonas de crecimiento, enzimas, hormonas, anticuerpos o fragmentos. Las Figuras 1 y 2 muestran esquemas de reacción para tales reacciones, en donde el polisacárido es PSA.

5 Alternativamente, el proceso puede usarse para derivatizar sistemas de suministro de fármacos, tales como liposomas, por ejemplo, mediante la reacción del aldehído con un grupo amina de un componente que forma liposomas. Otros sistemas de suministro de fármacos se describen en nuestro caso anterior US-A-5846951. Otros materiales que pueden derivatizarse incluyen virus, microbios, células, que incluyen células animales y polímeros sintéticos.

10 Alternativamente, el sustrato puede tener un grupo hidrazina, en cuyo caso el producto es una hidrazona. Esto puede reducirse si se desea, para obtener una estabilidad adicional, a una hidrazida de alquilo.

15 La derivatización de sistemas de administración de fármacos y proteínas puede dar como resultado una vida media aumentada, una estabilidad mejorada, una inmunogenicidad reducida, y/o el control de la solubilidad y por lo tanto de la biodisponibilidad y las propiedades farmacocinéticas, o pueden mejorar los principios activos de solubilidad o la viscosidad de las soluciones que contienen el activo derivatizado.

20 Preferentemente, los compuestos polisacáridos recuperados a partir de las fracciones eluidas comprenden unidades de ácido siálico, con mayor preferencia consisten en unidades de ácido siálico. Con mayor preferencia, los polisacáridos tienen de 1-1000 unidades de ácido siálico, por ejemplo, 10-500, con mayor preferencia de 10 a 50 unidades de ácido siálico. Las fracciones eluidas pueden consistir en monómeros, dímeros, o polímeros más grandes. Preferentemente, la polidispersidad de una fracción será menor que 1,26, idealmente menor que 1,2, e idealmente en el intervalo de 1,01 a 1,10.

25 Se cree que esta es la primera vez que se aisló un ácido polisiálico, particularmente CA, que tiene una polidispersidad del peso molecular inferior a 1,26. En consecuencia, un aspecto adicional de la presente invención proporciona un ácido polisiálico que tiene una polidispersidad de peso molecular de menos de 1,26, preferentemente de no más de 1,2, con la máxima preferencia en el intervalo de 1,01 a 1,10. El ácido polisiálico puede ser CA, o un derivado oxidado, reducido, animado y/o de hidrazida de este. Preferentemente, el ácido polisiálico tiene un peso molecular de al menos 5 kDa, preferentemente de al menos 10 kDa.

30 El proceso de fraccionamiento que describimos aquí es linealmente escalable y reproducible. Es adecuado para la producción a escala industrial y para el control de la polidispersidad del CA. La tecnología de fraccionamiento, descrita aquí, permite el fraccionamiento del AC, así como de otros polisacáridos (preferentemente cargados), conjugados de proteína-polímero y vacunas que se preparan con una longitud de cadena polimérica homogénea (monodispersada).

35 La Figura 1a es un esquema de reacción que muestra la preparación del CA monofuncional;  
La Figura 1b es un esquema de reacción que muestra la preparación de productos mediante el uso de métodos de conjugación originales;

40 La Figura 2 es un esquema de reacción que muestra la preparación de conjugados proteína-CA;

La Figura 3 muestra los resultados de la Cromatografía de Permeación en Gel del CA;

La Figura 4 muestra el % de población de diferentes fracciones de CA;

La Figura 5 muestra una página nativa típica del CA con pesos moleculares;

La Figura 6 muestra la PAGE nativa del CA (22,7KDa, pd 1,34);

La Figura 7 muestra un cromatograma típico para fracciones de CA;

45 La Figura 8 muestra las muestras de CA de diferentes etapas de fraccionamiento;

La Figura 9 muestra la carga de diferentes cantidades de muestras de CA;

La Figura 10 muestra el fraccionamiento del CA (150 mg de CA, matriz de 5 ml);

La Figura 11 muestra el fraccionamiento del CA (200 mg; 5 ml);

La Figura 12 muestra el fraccionamiento del CA-NH<sub>2</sub>;

50 La Figura 13 muestra la cromatografía de intercambio aniónico del CA oxidado (22,7KDa);

La Figura 14 muestra la cromatografía de intercambio aniónico del CA monofuncional;

La Figura 15 muestra la SDS PAGE para la preparación de conjugados de proteína-polímero con un polímero disperso ancho y estrecho;

55 La Figura 16 muestra los resultados de la PAGE nativa para el fraccionamiento del CA mediante cromatografía de intercambio aniónico frente a la filtración;

La Figura 17 muestra el fraccionamiento del CA por precipitación con etanol;

La Figura 18 muestra el fraccionamiento del CA por ultrafiltración;

La Figura 19 muestra la cromatografía de intercambio aniónico de conjugados GH-CA;

La Figura 20 muestra la caracterización del CA (35KDa) por NMR;

60 La Figura 21 muestra el % de población del fraccionamiento por IEC a gran escala del CA (39 kDa; pd 1,4);

La Figura 22 muestra la PAGE nativa de fracciones por IEC del CA (39 kDa; 12,5 g);

La Figura 23 muestra el porcentaje de población de fraccionamiento por IEC a pequeña escala del CA (39 kDa; pd 1,4);

La Figura 24 muestra la PAGE nativa de fracciones por IEC del CA (39 kDa; 200mg);

La Figura 25 muestra un cromatograma de GPC típico para un CA disperso estrecho;

65 La Figura 26 muestra la optimización del análisis por PAGE nativa del CA;

La Figura 27 muestra la PAGE nativa de fracciones del CA de la IEC;

La Figura 28 muestra las PAGE nativas de fracciones por IEC del CA (22,7 kDa) mediante el uso de una fuerza iónica creciente de trietanolamina;

La Figura 29 muestra la PAGE nativa del fraccionamiento por Q FF del CA (22,7 kDa) mediante el uso del aumento de la fuerza iónica del acetato de trietanolamina; y

5 La Figura 30 muestra la PAGE nativa del fraccionamiento por DEAE del CA (22,7 kDa) mediante el uso de un sistema de gradiente de pH.

La invención se ilustra adicionalmente en los ejemplos adjuntos.

10 Ejemplos

#### Materiales

15 El carbonato de amonio, etilenglicol, PEG (8kDa), cianoborohidruro sódico (> 98 % puro), metaperyodato sódico, trietanolamina, cloruro sódico, nitrato de sodio, azida sódica, comprimidos de PBS y los marcadores de peso molecular se obtuvieron de Sigma Chemical Laboratory, Reino Unido. El CA que se usó, PSA lineal unido por enlaces alfa-(2→8) de *E. coli*/K1 (22,7 kDa de promedio, polidispersidad alta de 1,34; 39 kDa, p.d. 1,4; 11 kDa, p.d. 1,27) fue de Camida, Irlanda. Otros materiales incluyeron la 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4 DNPH) (Aldrich Chemical Company, Reino Unido), tubos de diálisis (límites de corte de 3,5 kDa y 10 kDa, Medicell International Limited, Reino Unido), Sefarosa SP HiTrap, 20 columnas PD-10 (Pharmacia, Reino Unido), geles de poli(acrilamida Tris-glicina (4-20 %), solución amortiguadora de corrida Tris-glicina sodio dodecilsulfato y solución amortiguadora de carga (Novex, Reino Unido), Sefarosa Q FF y DEAE (Amersham Biosciences, Reino Unido), geles de poli(acrilamida Tris-Borato-EDTA (TBE) (4-20 % y 20 %), solución amortiguadora TBE y solución amortiguadora de carga (Invitrogen, Reino Unido). Se obtuvo agua desionizada de una unidad de purificación de agua Elgastat Option 4 (Elga Limited, Reino Unido). Todos los reactivos usados fueron 25 de grado analítico. Se usó un lector de placas (Dynex Technologies, Reino Unido) para las determinaciones espectrofotométricas en los ensayos de proteínas o CA.

#### Métodos

30 Determinación de proteínas y ácido colominico

La estimación cuantitativa del PSA (como ácido siálico) se llevó a cabo por el método de resorcinol [Svennerholm 1957] como se describe en otro lugar [Gregoriadis y otros, 1993; Fernandes y Gregoriadis, 1996, 1997]. La proteína se midió 35 mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA).

Ejemplo 1: Preparación de PSA monofuncional:

#### 1a Activación de CA

40 La solución recién preparada de metaperyodato sódico 0,02 M ( $\text{NaIO}_4$ ; exceso molar de 6 veces respecto al CA) se mezcló con CA a 20 °C y la mezcla de reacción se agitó magnéticamente durante 15 min en la oscuridad. El CA oxidado se precipitó con etanol al 70 % (concentración final) y por centrifugación de la mezcla a 3000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se retiró y el sedimento se disolvió en una cantidad mínima de agua desionizada. El CA se precipitó de nuevo con etanol al 70 % y después se centrifugó a 12.000 g. El sedimento se disolvió en una cantidad mínima de agua, 45 se liofilizó y se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior (Figura 1; etapa 1).

#### 1b Reducción de CA

50 El CA oxidado (CAO: 22,7 kDa) se redujo en presencia de borohidruro sódico. El borohidruro sódico 15 mM recién preparado ( $\text{NaBH}_4$ ; en  $\text{NaOH}$  0,1 M diluido a pH 8-8,5 por dilución con solución diluida de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  se mezcló con CAO (100 mg CA/ml) a 20 °C y la mezcla de reacción se agitó por hasta 2 horas en la oscuridad. El pH se redujo a 7 por la finalización de la reacción. El CA oxidado/reducido (CAOR) se dializó (valor de corte de peso molecular de 3,5 kDa para tubos de diálisis) contra solución amortiguadora de carbonato de amonio al 0,01 % a pH 7 a 4 °C. Se usó la ultracentrifugación para concentrar la solución de CAOR del tubo de diálisis. El filtrado se liofilizó y se almacenó a 4 °C 55 hasta que se requiriera nuevamente. La determinación de cualquier contenido de aldehído se determinó como se describe en la "determinación de la oxidación de CA" (Figura 1; etapa 2).

#### 1c Reoxidación de CA

60 Después de la confirmación de que no había contenido de aldehído, el CAOR se oxidó de nuevo como se informó bajo la activación de CA excepto que se incubó el CAOR con solución de peryodato durante un tiempo más largo (hasta 1 h). El grado de oxidación en el producto CAORO se midió también en el polvo liofilizado que se obtuvo de esta etapa (Figura 1, etapa 3).

65 1d Determinación del estado de oxidación del CA y derivados

La estimación cualitativa del grado de oxidación del ácido colominico se llevó a cabo con 2,4 DNPH, que produce 2,4 dinitrofenil-hidrazonas escasamente solubles en interacción con compuestos carbonilo. Se añadieron al reactivo 2,4-DNPH (1,0 ml), no oxidado (CA), oxidado (CAO), reducido (CAOR) y reoxidado (CAORO) (5 mg cada uno), las soluciones se agitaron y después se permitió que permanecieran a 37 °C hasta que se observó un precipitado cristalino [Shriner y otros, 1980]. El grado (cuantitativo) de oxidación de CA se midió con un método [Park y Johnson, 1949] basado en la reducción de los iones de ferricianuro en solución alcalina a ferrocianuro férrico (azul persa), que se mide después a 630 nm. En este caso, la glucosa se usó como un estándar.

#### 1e Preparación de CA-NH<sub>2</sub>

Se disolvió CAO a (10-100 mg/ml) en 2 ml de agua desionizada con un exceso molar de 300 veces de NH<sub>4</sub>Cl, en un tubo de 50 ml y después se añadió NaCNBH<sub>4</sub> (Stock 5 M en NaOH 1 N (ac), a una concentración final de 5 mg/ml. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente por 3 días. Se estableció, además, una reacción de control con ácido colominico en lugar de CAO. El producto derivado de amina del ácido colínico se precipitó mediante la adición de 5 ml de etanol enfriado con hielo. El precipitado se recuperó por centrifugación a 4000 rpm, 30 minutos, temperatura ambiente en una centrífuga de sobremesa. El sedimento se mantuvo y se resuspendió en 2 ml de agua desionizada, después se precipitó de nuevo con 5 ml de etanol enfriado con hielo en un tubo de ultracentrífuga de 10 ml. El precipitado se recogió por centrifugación a 30.000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió de nuevo en 2 ml de agua desionizada y se liofilizó.

#### 1f Ensayo de contenido de amina

El ensayo TNBS (ácido picrilosulfónico, es decir, ácido 2, 4, 6-tri-nitro-benceno sulfónico) se usó para determinar la cantidad de grupos amino presentes en el producto [Satake y otros, 1960]. En el pocillo de una placa de microtitulación se añadió TNBS (0,5 µl de TNBS 15 mM) a 90 µl de solución amortiguadora borato 0,1 M, pH 9,5. A esto se añadieron 10 µl de una solución de 50 mg/ml de CA-amida. Se dejó reposar la placa por 20 minutos a temperatura ambiente antes de leer la absorbancia a 405 nm. La glicina se usó como un estándar, en un intervalo de concentración de 0,1 a 1 mM. Grupos amina primaria TNBS trinitrofenilatos. Se detecta el aducto de TNP de la amina. La prueba del producto purificado con una precipitación doble de etanol en frío mediante el uso del ensayo de TNBS mostró una conversión cercana al 90 %.

#### 1g Preparación del polímero de maleimida (CA-M)

El CAORO sintetizado en el Ejemplo 1 c anterior reaccionó con 5 equivalentes molares de hidrazida de ácido N-[β-maleimidopropiónico] en acetato sódico 0,1 M por 2 h a 20 °C. El producto hidrazona se precipitó en etanol, se resuspendió en acetato sódico y se precipitó de nuevo en etanol, se volvió a disolver en agua y se liofilizó. El producto es útil para la conjugación sitio específica a los grupos tiol de los restos de cisteína en proteínas y péptidos.

#### 1h Cromatografía de Permeación en Gel

Las muestras de CA (CA, CAO, CAOR y CAORO) se disolvieron en NaNO<sub>3</sub>(0,2M), CH<sub>3</sub>CN (10 %; 5 mg/ml) y se cromatografiaron en columnas 2x GMPW<sub>XL</sub> con detección mediante índice de refracción (sistema de GPC: bomba de solvente de GPC VE1121, detector de RI VE3580 y comparación con el software Trisec 3 (Viscotek Europe Ltd). Las muestras (5 mg/ml) se filtraron sobre una membrana de nylon de 0,45 µm y se corrieron a 0,7 cm/min con NaNO<sub>3</sub> 0,2 M y CH<sub>3</sub>CN (10 %) como la fase móvil (Figura 3).

#### Resultados del Ejemplo 1: Preparación de PSA monofuncional

La integridad de los residuos internos de Neu5Ac unidos por enlace alfa-2,8 después del tratamiento con peryoduro y borohidruro se analizó mediante GPC y los cromatogramas obtenidos para el CAO oxidado (CAO), oxidado reducido (CAOR), doblemente oxidado (CAORO), CA amino (CA-NH<sub>2</sub>) se compararon con los del CA nativo. Se encontró (Fig. 3) que el CA oxidado (CAO) (15 minutos), reducido (CAOR), doblemente oxidado (1 h) (CAORO) y nativo exhiben perfiles de elución casi idénticos, sin evidencia de que las etapas de oxidación y reducción sucesivas den lugar a una fragmentación significativa de la cadena polimérica. Los picos pequeños son indicativos de sales de la solución amortiguadora.

Los resultados del ensayo cuantitativo de los intermediarios de CA en el proceso de oxidación doble mediante el uso de ferricianuro fueron consistentes con los resultados de las pruebas cualitativas que se realizaron con 2,4 DNPH que dieron un precipitado amarillo tenue con el CA nativo, y de color amarillo intenso con las formas que contenían aldehído del polímero, para dar como resultado un precipitado amarillo intenso después de diez minutos de reacción a temperatura ambiente.

Se encontró que el contenido de aminación del polímero era del 85 % mediante el ensayo de ácido 2,4,6-tri-nitro-benceno sulfónico (TNBS). El derivado de aldehído de PSA podría someterse a reacción, además, con un compuesto de unión que tiene un resto hidrazida y un resto N-maleimida para formar una hidrazona estable que tiene una

maleimida activa funcionalmente útil para reaccionar con un grupo tiol. Se encontró que el contenido de maleimida del polímero era del 95 % mediante el ensayo de maleimida.

Ejemplo 2 - Fraccionamiento del Ácido Colominico por IEC (CA, 22,7 kDa, pd 1,34)

2.1 Fraccionamiento a gran escala

Se cargó una columna XK50 (Amersham Biosciences, Reino Unido) con 900 ml de Sefarosa Q FF (Amersham Biosciences) y se equilibró con 3 volúmenes de columna de solución amortiguadora de lavado (trietanolamina 20 mM, pH 7,4) a una tasa de flujo de 50 ml/min. Se cargó CA (25 gramos en 200 ml de solución amortiguadora de lavado) en la columna a 50 ml por minuto a través de un orificio de jeringa. Esto se siguió por el lavado de la columna con 1,5 volúmenes de columna (1350 ml) de solución amortiguadora de lavado.

El CA unido se eluyó con 1,5 volúmenes de columna de diferentes soluciones amortiguadoras de elución (solución amortiguadora de trietanolamina, 20 mM, pH 7,4, con NaCl de 0mM a 475 mM en etapas de NaCl 25 mM) y finalmente con NaCl 1000 mM en la misma solución amortiguadora para eliminar todos los CA residuales y otros residuos (si los hay). La tasa de flujo fue de 7 ml/minuto.

Las muestras se concentraron hasta 20 ml mediante ultrafiltración a alta presión sobre una membrana de 3-10 kDa (Vivascience, Reino Unido). Estas muestras se intercambiaron en solución amortiguadora en agua desionizada mediante ultrafiltración repetida a 4 °C. Las muestras se analizaron respecto al peso molecular promedio y otros parámetros mediante GPC (como se describe en el ejemplo 1h) y PAGE nativa (teñida con azul alciano) [Tabla 1 y 2; Figura 4, 5, 6].

Ejemplo 2.2: Fraccionamiento a escala media y menor

Las siguientes muestras se fraccionaron mediante el uso de un sistema de lavado y gradiente idéntico a una escala más pequeña (matriz de 1-75 ml; 0,2-3 gramos de ácido colominico):

El CA (CA, 22,7 kDa, pd 1,34; CA, 39 KDa, pd 1,4), CAO (CAO, 22,7 kDa, pd 1,34), monofuncional (CAORO, 22,7 kDa; pd 1,34), CA-NH<sub>2</sub> (22,7 kDa, pd 1,34), CAM (como en el ejemplo 1g) producidos se controlaron en todo momento.

Las fracciones estrechas de CA que se produjeron mediante el uso del proceso anterior se oxidaron con peryodato 20 mM y se analizaron mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) y PAGE nativa respecto a la alteración grave del polímero (Fig. 7, 8).

Resultados del Ejemplo 2: Fraccionamiento a gran, mediana y pequeña escala

El CA y sus derivados (22,7 kDa) se fraccionaron exitosamente en varias especies estrechas con una polidispersidad inferior a 1,1 con m.w. promedios de hasta 46 kDa con diferentes % de poblaciones (Tablas 1- 2 y Figuras 4-8). La Tabla 1 muestra los resultados del fraccionamiento del material de 22,7 kDa a una escala de 75 ml. La Figura 7 muestra los resultados de la GPC y las Figuras 4-6 son PAGE nativas de fracciones de CA.

Tabla 1: IEC (22,7KDa; 75 ml de matriz; 3g de CA)

Las soluciones amortiguadoras de elución (en solución amortiguadora de Trietanolamina 20 mM, + NaCl mM, pH 7,4)	P.M.	Pd	% de Población
325 mM	12586	1,091	77,4 %
350 mM	20884	1,037	3,2 %
375 mM	25542	1,014	5,0 %
400 mM	28408	1,024	4,4 %
425 mM	*	*	7,4 %
450 mM	43760	1,032	2,3 %
475 mM	42921	1,096	0,2 %
*Sin realizar			

Tabla 2: Cromatografía de intercambio aniónico de CA(22,7kDa; pd 1,34): Gran Escala (matriz 900)

Muestra	(en solución amortiguadora Triethanolmine 20mM, + NaCl mM, pH 7,4)	P.M. (Pd) lote de 12,5 g	P.M. (Pd) lote de 12,5 g
5	350 mM	15490 (1,008)	10,470 (1,173)
	375 mM	19960 (1,010)	24659 (1,019)
10	400 mM	25829 (1,019)	29573 (1,018)
	425 mM	33763 (1,023)	34160 (1,011)
	450 mM	46880 (1,058)	44400 (1,013)
15	475 mM	-	28500 (1,376)
	400+425 mM (mezclados)	26418 (1,082)	-

Este proceso fue escalable de 1 ml a 900 ml de matriz con el perfil de fraccionamiento casi idéntico en cada escala (no todos los resultados se muestran).

El fraccionamiento del polímero más grande (CA, 39kDa, pd 1,4) produjo especies de hasta 90 kDa. Este proceso puede usarse exitosamente para el fraccionamiento de lotes incluso grandes del polímero. La Figura 8 muestra los resultados de la PAGE nativa para las 3 muestras de CA de conformidad con se suministran y para las fracciones separadas por intercambio iónico que se analizan como en la Tabla 3. Los resultados de la PAGE muestran que las fracciones de intercambio iónico están dispersas estrechamente. Esto es coherente con los datos de GPC que se muestran en la Fig. 7, que muestra los resultados para 3 de las fracciones separadas del CA de 22,7 kDa (Tabla 3).

Tabla 3

Muestra	PM	Mn	PD
1	18727	15016	1,25 (CA original)
2	27677	25095	1,10 (CA fraccionado)
3	40950	40279	1,02 (CA fraccionado)

El material de 22,7 kDa se separa a mayor escala. Mediante el uso de GPC se analizan las fracciones de intercambio iónico.

Todas las fracciones estrechas se oxidaron con peryodato 20 mM y las muestras que se tomaron de diferentes etapas del proceso de producción y se analizaron por GPC y PAGE nativa no mostraron ningún cambio en el peso molecular y la polidispersidad. Los datos de algunas de las muestras se muestran en la Fig. 8.

#### Ejemplo 3 Factores que afectan al fraccionamiento de CA

Los diversos factores que afectan al fraccionamiento de CA (p. ej., volumen de lavado, etc.) se estudiaron [Fig. 7 -14].

Resultados del ejemplo 3: Factores que afectan al fraccionamiento de CA

Se estudiaron los diversos factores que influyen en el fraccionamiento de CA. Los estudios de unión se realizaron mediante la carga de 50, 100, 150 y 200 mg de CA en la columna (matriz de 5 ml). Mediante el uso de 200 mg de CA, más del 99 % de CA se unió a la columna (Figura 9). Cuando la columna se lavó con un volumen de columna de solución amortiguadora de elución, por gradiente por etapas, se encontró que la polidispersidad del polímero era más de 1,1 (Fig. 11). El lavado de la columna con 1,5 volúmenes de columna generó fracciones CA con polidispersidades menores que 1,1 (Figura 10).

El amino CA (CA-NH<sub>2</sub>; Fig. 12), CA oxidado (Fig. 13) y CA monofuncional podrían fraccionarse exitosamente en las fracciones con polidispersidad 1,1.

#### Ejemplo 4 Síntesis de conjugados de hormona de crecimiento (GH)-CA (dispersos anchos y estrechos)

Se usaron CAO (22,7 kDa) y CAO disperso estrecho (27,7 kDa pd = 1,09; 40,9 kDa pd = 1,02) que se prepararon en el Ejemplo de referencia 2 para la preparación de conjugados de GH.

## Preparación de conjugados hormona de crecimiento-CA

La hormona de crecimiento se disolvió en PBS 0,15 M (pH 7,4) y se unió covalentemente a CA diferentes (CAO y NCAO). Se añadieron individualmente diferentes CA (CAO, 22 kDa; NCA, 27,7 kDa y 40,9 kDa) a la GH (2 mg) en relaciones molares CA:GH (12,5:1), se añadió cianoborohidruro sódico a una concentración final de 4 mg/ml. Las mezclas de reacción se sellaron y se agitaron magnéticamente por 24 horas a  $35 \pm 24$  °C. Las mezclas se sometieron después a una precipitación con sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mediante la adición de la sal lentamente mientras se agitaba continuamente, para conseguir 70 % p/v de saturación, se agitó durante 1 h a 4 °C, después se centrifugó (5000 xg) por 15 min y los sedimentos se resuspendieron en una solución saturada de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se volvió a girar por 15 min (5000 xg). Los precipitados recuperados se volvieron a disolver en 1 ml de PBS pH 7,4 y se dializaron extensamente (24 h) a 4 °C contra la misma solución amortiguadora. Los controles incluyeron someter la proteína nativa al proceso de conjugación en presencia de AC no oxidado o en ausencia de CA. La agitación se mantuvo al mínimo para evitar la desnaturalización concomitante de la proteína. La GH polisialilada se caracterizó por SDS-PAGE. La GH polisialilada se pasó a través de una cromatografía de intercambio aniónico y las fracciones del producto se sometieron a SDS PAGE (Figura 15).

## Resultados del ejemplo 4: Síntesis de conjugados GH-CA (dispersos anchos y estrechos)

Los conjugados GH-CA se sintetizaron satisfactoriamente. Los resultados de la SDS-PAGE (Figura 15) muestran que en el control (con GH) la migración de la muestra es similar a la de la GH fresca. En los carriles del conjugado hay desplazamientos en las bandas que típicamente indican un aumento en la masa indicativa de una GH polisialilada. El ancho de la banda se redujo significativamente en el caso de los conjugados con polímeros dispersos estrechos en comparación con los conjugados con polímeros dispersos anchos. Además, los conjugados de GH (con un polímero disperso ancho) se separaron con éxito en diferentes especies mediante cromatografía de intercambio aniónico (Fig. 19).

## Ejemplo 5: Precipitación de CA

La precipitación diferencial con etanol se usó para precipitar diferentes longitudes de cadena del ácido colominico [Fig. 16, 17].

## Resultados del ejemplo 5: Precipitación de CA

El CA (22,7; pd 1,34) no pudo precipitarse en fracciones dispersas estrechas mediante el uso de diferentes concentraciones de etanol (Fig. 17). Sin embargo, la precipitación diferencial con etanol mostró que los CA más pequeños estrechos requerían más etanol (EtOH). Se precipitó un polímero ancho de 22,7 kDa con EtOH al 70 % y dio un rendimiento > 80 % del polímero producto. Se requirió una concentración de 80 % de EtOH para precipitar > 80 % de un PM inferior de 6,5 kDa (pd <1,1). Este proceso elimina, además, parte de la sal que contamina el producto.

## Ejemplo 6: Fraccionamiento de CA por ultrafiltración

Las muestras de 22,7 kDa se purificaron por ultrafiltración sobre diferentes membranas de corte de peso molecular (5, 10, 30, 50 y 100 kDa). En todos los casos el retentado se examinó por GPC y PAGE nativa [Fig. 18].

## Resultados del ejemplo 6: Fraccionamiento de CA por ultrafiltración

Las muestras de 22,7 kDa purificadas por ultrafiltración sobre diferentes membranas de corte de peso molecular mostraron que había una disminución en la polidispersidad del polímero y un desplazamiento hacia un peso molecular más alto con el aumento en el corte de membrana (Fig. 18). La Figura 16 muestra el fraccionamiento de CA mediante la cromatografía de intercambio aniónico (izquierda) y de filtración (derecha). La IEC de CA generó fracciones con CA dispersos muy estrechos en comparación con el fraccionamiento por filtración.

## Ejemplo 7: Caracterización por espectroscopia de NMR

Los polímeros de CA fraccionados se caracterizaron por espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) and <sup>13</sup>C (100 MHz) para detectar impurezas (si existen) mediante el uso de D<sub>2</sub>O (Fig. 20).

## Resultados del ejemplo 7: Caracterización por espectroscopia de NMR

La NMR <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del material fraccionado polimérico disperso estrecho está libre de impurezas. Además, los cambios químicos de los protones H-3 en la NMR <sup>1</sup>H y el carbono C-2 en los espectros de RMN <sup>13</sup>C confirman que el polímero es realmente el material de ácido siálico unido por enlace alfa-2,8 esperado.

Ejemplo 8: Fraccionamiento de CA (39 kDa, pd 1,4) por IEC

8.1 Fraccionamiento a gran escala

5 Se empaquetó una columna XK50 (Amersham Biosciences, Reino Unido) con 900 ml de Sefarosa Q FF y se equilibró con 3 volúmenes de columna de solución amortiguadora de lavado (trimetanolamina 20 mM, pH 7,4) a una tasa de flujo de 50 ml/min. Se cargó CA (12,5 g en 200 ml de solución amortiguadora de lavado) en la columna a 50 ml por minuto a través de un orificio de jeringa. Esto se siguió por el lavado de la columna con 1,5 volúmenes de columna (1350 ml) de solución amortiguadora de lavado.

10 El CA unido se eluyó con 1,5 volúmenes de columna de solución amortiguadora de elución (trietanolamina, 20 mM, pH 7,4) que contenía diferentes concentraciones de sal (0, 200, 250, 300, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 y 525 mM de NaCl) y finalmente con NaCl 1000 mM en la misma solución amortiguadora para eliminar todos los residuos de CA y otros residuos (si quedaba alguno).

15 Las muestras se concentraron hasta aproximadamente 20 ml tanto mediante ultrafiltración a alta presión sobre una membrana de 3 o 10 kDa (Vivascience, Reino Unido) como por diafiltración con un Vivaflow 50 (filtración mediante el pase constante de la muestra a través de una membrana) con una membrana mwco de 3 kDa (Vivascience, Reino Unido). Estas muestras se intercambiaron en solución amortiguadora en agua desionizada mediante ultrafiltración repetida o Vivaflow a 4 °C. Las muestras se analizaron respecto al peso molecular promedio y otros parámetros mediante GPC (de conformidad con se indica en el Ejemplo 2) y PAGE nativa (gel de Tris-glicina al 4-20 % teñido con azul alciano) (Figuras 21 y 22).

8.2 Fraccionamiento a pequeña escala

25 El CA se fraccionó, además, a una escala más pequeña (200 mg de CA) mediante el uso de Sefarosa Q FF (matriz de 5 ml, preenvasada; Amersham Biosciences, Reino Unido) mediante el empleo de un sistema de solución amortiguadora idéntico (trimetanolamina 20 mM, pH 7,4) que contenía diferentes concentraciones de sal (0, 200, 250, 300, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550 y 575 mM de NaCl). El CA unido se eluyó mediante el lavado de la columna con 1,5 volúmenes de columna (7,5 ml) a una tasa de flujo de 1 ml con un lavado final de la columna con el uso de NaCl 1000 mM en la solución amortiguadora de trietanolamina usual.

30 Las muestras se concentraron hasta aproximadamente 0,75 ml mediante filtración en membrana de Vivaspin (mwco 3 kDa) (Vivascience, Reino Unido), se intercambió la solución amortiguadora en agua desionizada por filtración repetida por membrana a 8 °C y luego se liofilizó. Las muestras se analizaron mediante PAGE nativa (gel de trisglicina al 4-20 % teñido con azul alciano) (Figuras 23 y 24).

35 Resultados del Ejemplo 8: Se fraccionó exitosamente el CA polidisperso (39 kDa, pd 1,4) en varias especies dispersas estrechas con promedios de peso molecular comprendidos entre 7 y 97 kDa y con diferentes % de poblaciones (Figuras 21-24 y Tabla 4).

Tabla 4: Análisis por GPC de diversos CA fraccionados

Fracción de CA	Mw (kDa)	pd
475	97,2	1,285
450	52,3	1,109
425	37,9	1,062
400	28,0	1,048
375	19,0	1,080
350*	14,5	-
300*	10,0	-
250*	7,0	-

60 En el análisis, el solvente que se usó fue NaNO<sub>3</sub> 0,2 M en MECN y el PEG y el Dextrano se usaron como patrones. La temperatura era de 22° C, volumen de inyección de 100 µL y tasa de flujo de 0,7 mL/mn.

\* Valores aproximados estimados por la PAGE nativa

65 Las Figuras 21 y 23 muestran el porcentaje de población de CA en diversas fracciones como resultado del fraccionamiento de un polímero de CA de 39 kDa a gran escala (12,5 g de CA; 900 ml de matriz) y una pequeña escala (200 mg de CA; 5 ml de matriz), respectivamente. Las Figuras 22 y 24 son las PAGE nativas que se obtuvieron como

5 resultado del fraccionamiento de CA en una escala grande y pequeña. La Tabla 4 muestra los resultados de GPC de las fracciones que se obtuvieron por IEC a diversas concentraciones de sal. Los datos de GPC muestran que se generan especies de hasta 97 kDa mediante el proceso de fraccionamiento (ver el Ejemplo 9 para más detalles). Se demostró que estos polímeros de mayor peso molecular tienen un mayor porcentaje de restos fosfato presente en el extremo reductor de CA en comparación con sus homólogos de peso molecular más bajo por un ensayo de fosfato, que prueba la presencia de fosfato inorgánico (Rouser y otros, 1970).

Ejemplo 9: Caracterización de CA fraccionado por GPC

10 Las muestras de CA que recién se prepararon, mediante la disolución de, por ejemplo, CA, CAO, CAOR o CAORO (4-5 mg/ml) en NaNO<sub>3</sub> 0,2 M/0,1 % de NaN<sub>3</sub>/10 % de acetonitrilo (1 ml) (o alternativamente 10 mM de PBS, pH 7,4) y después mediante la filtración de la solución resultante sobre membranas de nylon de 0,2 µm (Whatman, Reino Unido), se analizaron por GPC.

15 Las muestras se cromatografiaron con columnas 2x GMPWxl (250 x 4,6 mm) mediante el empleo de un sistema de detección triple de GPC (SEC<sup>3</sup>) (Viscotek Europe Ltd, Reino Unido). Los detectores consistieron en un Viscotek Laser Refractometer (índice de refracción) y un Viscotek 270 Dual Detector (detector de dispersión de la luz en ángulo recto configurado con un detector viscosímetro de 4 capilares) recopilado con una estación de trabajo OmniSEC 3.1 (Viscotek Europe Ltd).

20 Las condiciones de análisis que se usaron fueron; eluyente: solución amortiguadora que se empleó para disolver la muestra de CA; tasa de flujo: 0,7ml/min; carga de la muestra: 100µl; temperatura: 22 °C. El sistema se calibró con polietilenglicol de peso molecular estrecho y materiales de referencia de Dextrano de peso molecular ancho.

25 El tiempo que lleva un polímero para eluir de la columna de GPC se convierte en su peso molecular mediante el uso de varios detectores. El detector de dispersión de luz proporciona una medición directa del peso molecular absoluto y elimina la necesidad de calibración de la columna (el detector proporciona una respuesta proporcional al peso molecular y a la concentración). El radio de giro no se calcula cuando las mediciones se realizan con un solo ángulo. El viscosímetro proporciona una medición directa de la viscosidad intrínseca y permite determinar el tamaño molecular, la conformación y la estructura (el detector da una respuesta inversamente proporcional a la densidad molecular). La respuesta del detector de índice de refracción es proporcional a la concentración de polímero: la constante de proporcionalidad es  $dn/dc$  (el mismo incremento de índice de refracción específico necesario en la dispersión de luz).

35 El sistema GPC descrito anteriormente permite determinar una serie de parámetros de CA. Por ejemplo, puede obtenerse el peso molecular promedio numérico (Mn) y el peso molecular promedio en peso (Mw) y de estos números puede calcularse la polidispersidad de CA. Otra información que se obtiene de los datos de GPC incluye el porcentaje de recuperación de CA y el grado de ramificación (si existe) en el polímero. La concentración exacta de la muestra puede determinarse, además, a partir del valor  $dn/dc$  (o alternativamente el valor  $dn/dc$  puede calcularse a partir de la concentración exacta conocida del polímero).

40 Resultados del Ejemplo 9: La Tabla 5 muestra datos típicos para un intervalo de parámetros que se obtuvo a partir del análisis de una fracción de CA (NaCl 400 mM en trietanolamina 20 mM, pH 7,4) a partir del fraccionamiento por IEC de CA (39 kDa, pd 1,4). En esta tabla, aplican las siguientes definiciones:

45	Mn	=	peso molecular promedio numérico
	Mw	=	peso molecular promedio en peso
	Mz	=	peso molecular promedio-Z
50	Mp	=	peso molecular promedio pico
	Mv	=	peso molecular promedio en viscosidad
	Mw/Mn	=	distribución del peso molecular (polidispersidad)
55	Rh	=	radio hidrodinámico
	IV	=	viscosidad intrínseca
	dn/dc	=	cambio en el índice de refracción con concentración para la muestra

60

Tabla 5: Los datos típicos de GPC de la fracción de CA (NaCl 400 mM en trietanolamina 20 mM, pH 7,4) de la IEC

Parámetros	Valores
Mn (Da)	26,666
Mw (Da)	27,956
Mz (Da)	31,129
Mp (Da)	22,969
Mw/Mn	1,048
IV (dl/g)	0.2395
Rh (nm)	4,683
Ramificaciones	0,00
Concentración de la Muestra (mg/ml)	5,600
Recobrado de la Muestra (%)	90,71
dn/dc (ml/g)	0,156
dA/dc (ml/g)	0,000
Mark-Houwink a	-0,048
Mark-Houwink logK	-0,425

Por ejemplo, 27,956 y 26,666 Da fueron los valores para Mw y Mn, respectivamente, lo que dio una polidispersidad de 1,048. La Tabla 4 muestra el intervalo de pesos moleculares dispersos estrechos que se obtuvieron mediante el análisis por GPC sobre el fraccionamiento del CA polidisperso (39 kDa, pd 1,4) con IEC, mientras que la Figura 25 muestra un cromatograma de GPC típico para las curvas combinadas del viscosímetro, refractómetro y dispersión de luz que se obtuvieron para una muestra de CA dispersa estrecha.

#### Ejemplo 10: Estudios de Optimización

##### 10.1 Optimización del análisis de CA por PAGE nativa

Los CA fraccionados y no fraccionados se analizaron adicionalmente por geles de TBE y de Tris glicina en PAGE nativa con el fin de optimizar la resolución de estos polímeros sobre el gel. En general, se cargaron 40 µg de AC disperso ancho o estrecho, como una solución de 20 µl que contenía 10 µl de solución amortiguadora de carga, por pocillo en el gel. El gel se corrió a tres velocidades diferentes (150, 25 ó 15 mV/cm) y luego se tiñó con azul alciano, seguido por la destinción con ácido acético al 2 %.

Resultados del Ejemplo 10.1: La Figura 26 muestra las diversas resoluciones que pueden obtenerse para diferentes pesos moleculares de CA con geles de 4-20 % de Tris-glicina, 4-20 % y 20 % de TBE. A partir de los geles puede observarse que puede observarse una buena separación de CA de alto y bajo peso molecular con geles de TBE dle 4-20 y 20 %, con una resolución particularmente buena con el gel de TBE al 20 %. Las bandas estrechas se observan mejor cuando el gel se ejecuta a 25 o 15 mV/cm en comparación con cuando la velocidad del gel es de 150 mV/cm.

##### 10.2 Concentración de CA

Los filtrados de la ultrafiltración a alta presión que se obtuvieron del fraccionamiento por IEC de CA (22,7 kDa, pd 1,34) se concentraron mediante Vivaflow (mwco 3 kDa). Estas muestras de CA se analizaron con los filtros correspondientes de la ultrafiltración a alta presión mediante PAGE nativa mediante el uso de un gel de TBE al 4-20 % (Figura 27) para cualquier degradación del polímero.

Resultados del Ejemplo 10.2: Los resultados de la PAGE nativa (Figura 27) de las muestras de CA obtenidas mediante la purificación de Vivaflow de los filtrados muestran que ambos materiales tenían el mismo peso molecular. Esta observación de la presencia de CA en los filtrados de ultrafiltración a alta presión puede explicarse por un proceso conocido como *reptación*, de manera que debido a la flexibilidad, capacidad de deformación y a su conformación similar a bacilos del polímero de CA, el polímero puede pasar a través de la membrana y da como resultado la presencia de CA en los filtrados. El gel muestra, además, que tanto Vivaflow como la ultrafiltración pueden emplearse con éxito para procesar las fracciones que se obtuvieron por fraccionamiento por IEC de CA.

Ejemplo 11: Fraccionamiento de CA (22,7 kDa, pd 1,34) por IEC mediante el uso del aumento de la fuerza iónica de la trietanolamina/HCl

5 El CA polidisperso se fraccionó, además, mediante Sefarosa Q FF (matriz de 1 ml, preenvasada) mediante el uso de un intervalo de concentraciones de trietanolamina a pH 7,4 en ausencia de cualquier sal tal como NaCl. Así, se cargó CA (40 mg, 1 ml) (22,7 kDa, pd 1,34) en una columna QFF (matriz de 1 ml, preenvasada, Amersham Biosciences). La AC unida se eluyó mediante el paso de 1 ml de trietanolamina tamponada (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 y 1200 mM de trietanolamina) a través de la columna a una tasa de flujo de 1 ml/min con un lavado final de la columna con el uso de trietanolamina 2000 mM. Las muestras se liofilizaron directamente y después se analizaron por PAGE nativa (gel TBE teñido con azul alciano).

Resultados del Ejemplo 11: La Figura 28 demuestra que puede lograrse el fraccionamiento de CA en presencia de una concentración variable de trietanolamina a pH 7,4.

15 Ejemplo 12: Fraccionamiento de CA (22,7 kDa, pd 1,34) por IEC mediante el uso del aumento de la fuerza iónica del acetato de trietanolamina

20 El CA polidisperso se fraccionó, además, mediante Sefarosa Q FF (matriz de 1 ml, preenvasada) mediante el uso de un intervalo de concentraciones de acetato de trietanolamina a pH 7,4 en ausencia de cualquier sal tal como NaCl. El solución amortiguadora de acetato de trietanolamina se preparó mediante el uso de trietanolamina y el ajuste del pH a 7,4 mediante el uso de ácido acético. Se cargó un CA polidisperso (40 mg, 1 ml) (22,7 kDa, pd 1,34) a una columna QFF (matriz de 1 ml; preenvasada). El AC unido se eluyó mediante el pase de 1 ml de cada solución amortiguadora de acetato de trietanolamina (acetato de trietanolamina 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 y 1500 mM) a través de la columna a una velocidad de flujo de 1 ml/min con un lavado final de la columna con acetato de trietanolamina 2000 mM. Una pequeña muestra de cada fracción (20 µl) se intercambió después con agua mediante el uso de un sistema de diálisis de micromembrana, se liofilizó y después se analizó mediante PAGE nativa (gel TBE al 20 % teñido con azul alciano).

25 Resultados del Ejemplo 12: La Figura 29 demuestra que el fraccionamiento de CA puede conseguirse exitosamente en presencia de una concentración variable de trietanolamina a pH 7,4.

30 Ejemplo 13: Fraccionamiento de CA (22,7 kDa, pd 1,34) mediante el uso de un gradiente de pH

35 El sistema de solución amortiguadora de etanolamina y HEPES se usó para crear un gradiente por etapas de pH. Se establecieron soluciones amortiguadoras a pH 7,6, 7,8 y 8,0 mediante el uso de concentraciones crecientes de HEPES de 10 a 50 mM y el ajuste del pH al valor apropiado con NaOH. La concentración de iones de sodio no superó los 36 mM. Se crearon soluciones amortiguadoras a pH 8,2, 8,3, 8,5, 8,7, 8,9, 9,1, 9,3, 9,5 y 9,7 mediante la mezcla de cantidades apropiadas de etanolamina 1 M (concentración final de 20 a 70 mM) con HEPES 50 mM (concentración final de 10 a 50 mM) y el ajuste del pH con NaOH, de manera que se asegurara que la concentración de ion sódico no excediera los 30 mM. La solución amortiguadora final fue una etanolamina 70 mM pH 11.

40 Se disolvieron 30 mg de CA polidisperso (22,7 kDa, pd 1,34) en solución amortiguadora de pH 7,6 (1 mL) y se cargó en una columna de DEAE sefarosa (1 ml de matriz, preenvasada) también con la solución amortiguadora de pH 7,6. La columna se lavó con 5 ml del solución amortiguadora de pH 7,6 (tasa de flujo 1 ml/min) seguido de pasar 2 ml de cada solución amortiguadora a través de la columna, y de la recogida de fracciones de 1 ml. Se liofilizaron 500 µl de cada fracción eluida y después se redisolieron en 50 µl de agua desionizada para el análisis mediante PAGE nativa (gel de TBE al 20 % teñido con azul alciano).

45 Resultados del Ejemplo 12: La Figura 30 demuestra que el fraccionamiento de CA puede lograrse exitosamente en presencia de una fuerza de pH creciente. La DEAE sefarosa es una matriz de intercambio aniónico con un grupo amino terciario, *N*-dietil-amino-etilo, que pierde su carga a pH alto. Por lo tanto, se usa un pH alto para desprotonar la matriz, cambiar su carga y eluir cualquier especie unida por interacciones iónicas en la columna. Puede usarse, además, un gradiente mixto donde primero se usa un gradiente de pH para fraccionar las especies de bajo peso molecular seguido por un gradiente de fuerza iónica para eluir las especies de masa molecular más alta.

55

## Referencias

- 5 Bendele, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G., Shopp, G., Renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol conjugated proteins, *Toxicological sciences*, 42 (1998) 152-157.
- Beranova, M., Wasserbauer, R., Vancurova, D., Stifter, M., Ocenaskova, J., Mora, M., *Biomaterials*, 11 (2000) 521-524.
- Beranova, M., Wasserbauer, R., Vancurova, D., Stifter, M., Ocenaskova, J., Mora, M., *Biomaterials*, 11 (2000) 521-524.
- 10 Brocchini, S., *Polymers in medicine: a game of chess. Drug Discovery Today*, 8, (2003) 111-112.
- Cheng T, Wu, M., Wu, P., Chern, J, Roffer, SR., Accelerated clearance of polyethylene glycol modified proteins by anti-polyethylene glycol IgM. *Bioconjugate chemistry*, 10 (1999) 520-528.
- 15 Cho, J.W. y Troy, F. A., PSA engineering: Synthesis of polysialylated neoglycosphingolipid by using the polytransferase from neuroinvasive *E.coli* K1, *Proceedings of National Academic Sciences, USA*, 91 (1994) 11427-11431.
- Constantino, P. y otros. (1999) *Vaccine* 17, 1251-63.
- 20 Convers, C. D. , Lejeune, L. , Shum, K. , Gilbert, C. , Shorr, R.G.L, Physiological effect of polyethylene glycol conjugation on stroma-free bovine hemoglobin in the conscious dog after partial exchange transfusion, *Artificial organ*, 21 (1997) 369-378.
- Dyer, J.R., Use of periodate oxidation in biochemical analysis, *Methods of Biochemical Analysis*, 3 (1956) 111-152.
- 25 Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1341 (1997) 26-34.
- Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., Synthesis, characterization and properties of polysialylated catalase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1293 (1996) 92-96.
- 30 Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implications in its pharmacokinetics, *International Journal of Pharmaceutics*, 217 (2001) 215-224.
- 35 Fleury, P., Lange, J., Sur l'oxydation des acides alcools et des sucres par l'acid periodique, *Comptes Rendus Academic Sciences* , 195 (1932) 1395-1397.
- Gregoriadis, G., *Drug and vaccine delivery systems*, en: PharmaTech, World Markets Research Centre Limited, London (2001) 172-176.
- 40 Gregoriadis, G., Fernandes, A., McCormack, B., Mital, M., Zhang, X, Polysialic acids: Potential for long circulating drug, protein, liposome and other microparticle constructs, en Gregoriadis, G y McCormack, B (Eds), *Targeting of Drugs, Stealth Therapeutic Systems*, Plenum Press, Nueva York (1998) 193-205.
- 45 Gregoriadis, G., Fernandes, A., Mital, M., McCormack, B., Polysialic acids: potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57 (2000) 1964-1969.
- Gregoriadis, G., McCormack, B., Wang, Z., Lively, R., Polysialic acids: potential in drug delivery, *FEBS Letters*, 315 (1993) 271-276.
- 50 Hreczuk-Hirst, D. , Jain, S., Genkin, D., Laing, P., Gregoriadis, G., Preparation and properties of polysialylated interferon- $\alpha$ -2b, *AAPS Annual Meeting*, 2002, Toronto, Canadá, M1056
- Hunter, A. C, Moghimi, S. M., Therapeutic synthetic polymers: a game of Russian Roulette. *Drug Discovery Today*, 7 (2002) 998-1001.
- 55 Jain, S., Hirst, D. H., McCormack, B., Mital, M., Epenetos, A., Laing, P., Gregoriadis, G., Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1622 (2003) 42-49.
- 60 Jain, S., Hirst, D.H., Laing, P., Gregoriadis, G., Polysialylation: The natural way to improve the stability and pharmacokinetics of protein and peptide drugs, *Drug Delivery Systems and Sciences*, 4(2) (2004) 3-9.
- Jennings, H. J., Lugowski, C., Immunogenicity of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide tetanus toxoid conjugates, *Journal of Immunology*, 127 (1981) 1011-1018.
- 65

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

5 Mital, M., Polysialic acids: a role for optimization of peptide and protein therapeutics, Ph.D. Thesis, Universidad de Londres, 2004.

Muflenhoff, M., Ectehardt, M., Gerardy-Schohn, R., Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function, *Current opinions in Structural Biology*, 8 (1998) 558-564.

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

Ravenscroft, Roth, J., Rutishauser, U., Troy, F.A. (Eds.), Polysialic acid: from microbes to man, Birkhäuser Verlag, Basel, *Advances in Life Sciences*, 1993.

15 Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A; *Lipids*, 1970, 5, 494-496.

Rutishauser, U., Polysialic acid as regulator of cell interactions en: R.U. Morgoles y R.K. Margalis (eds.), *Neurobiology of Glycoconjugates*, págs. 367-382, Plenum Press, Nueva York, 1989.

20 Satake, K., y otros, *J. Biochem.*, 47, 654, (1960).

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

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

Troy, F. A. Polysialylation of neural cell adhesion molecules, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 2 (1990) 430-449.

30 Troy, F.A. , Polysialylation: From bacteria to brain, *Glycobiology*, 2 (1992) 1-23.

Zhang, Y, Separation of oligo/polymer of 5-N-Acetylneuraminic Acid, 5-N-Glycolylneuraminic Acid, and 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactononionic Acid by High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector, *Analytical Biochemistry* 250 (1997), 245-251.

35

40

45

50

55

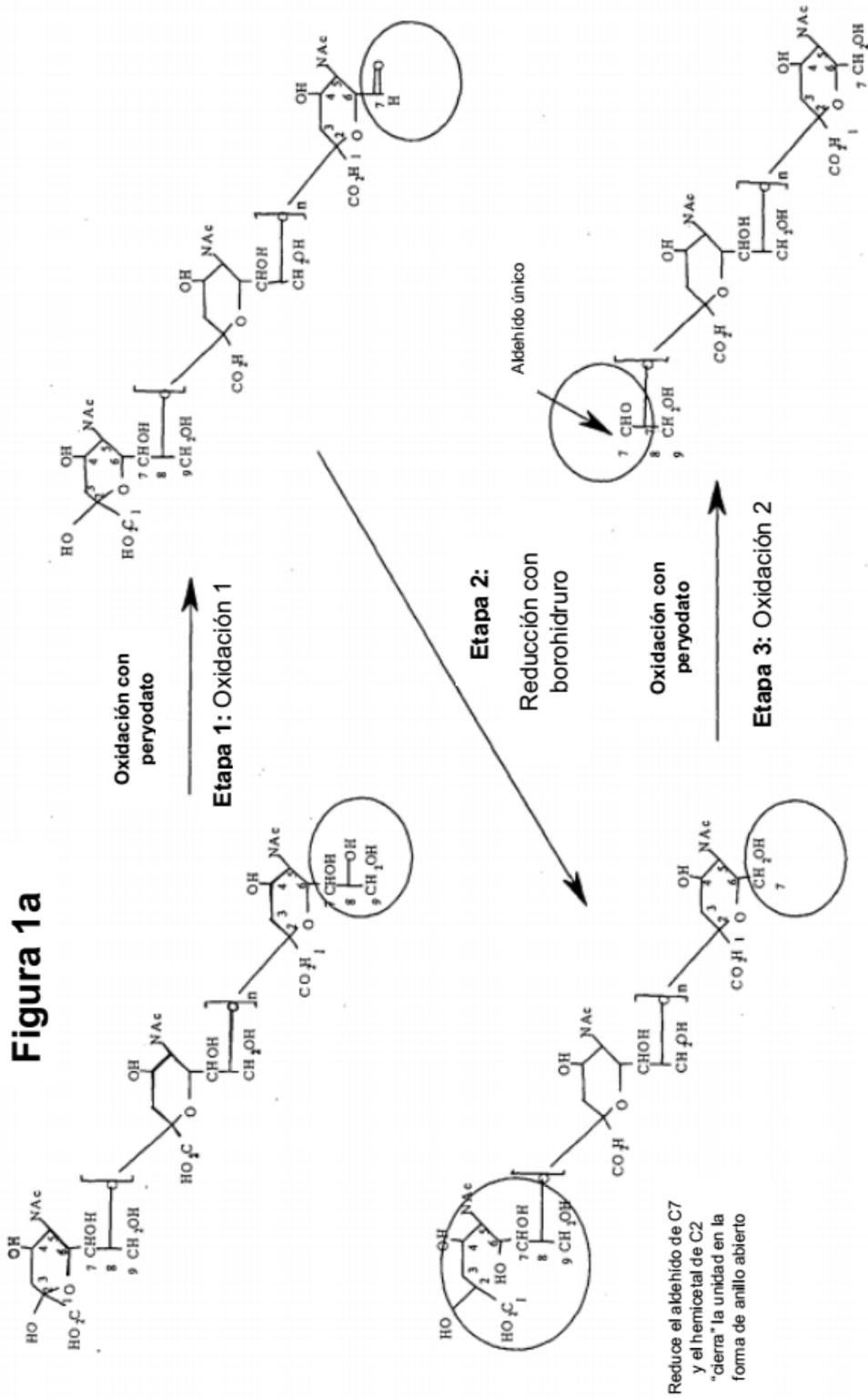
60

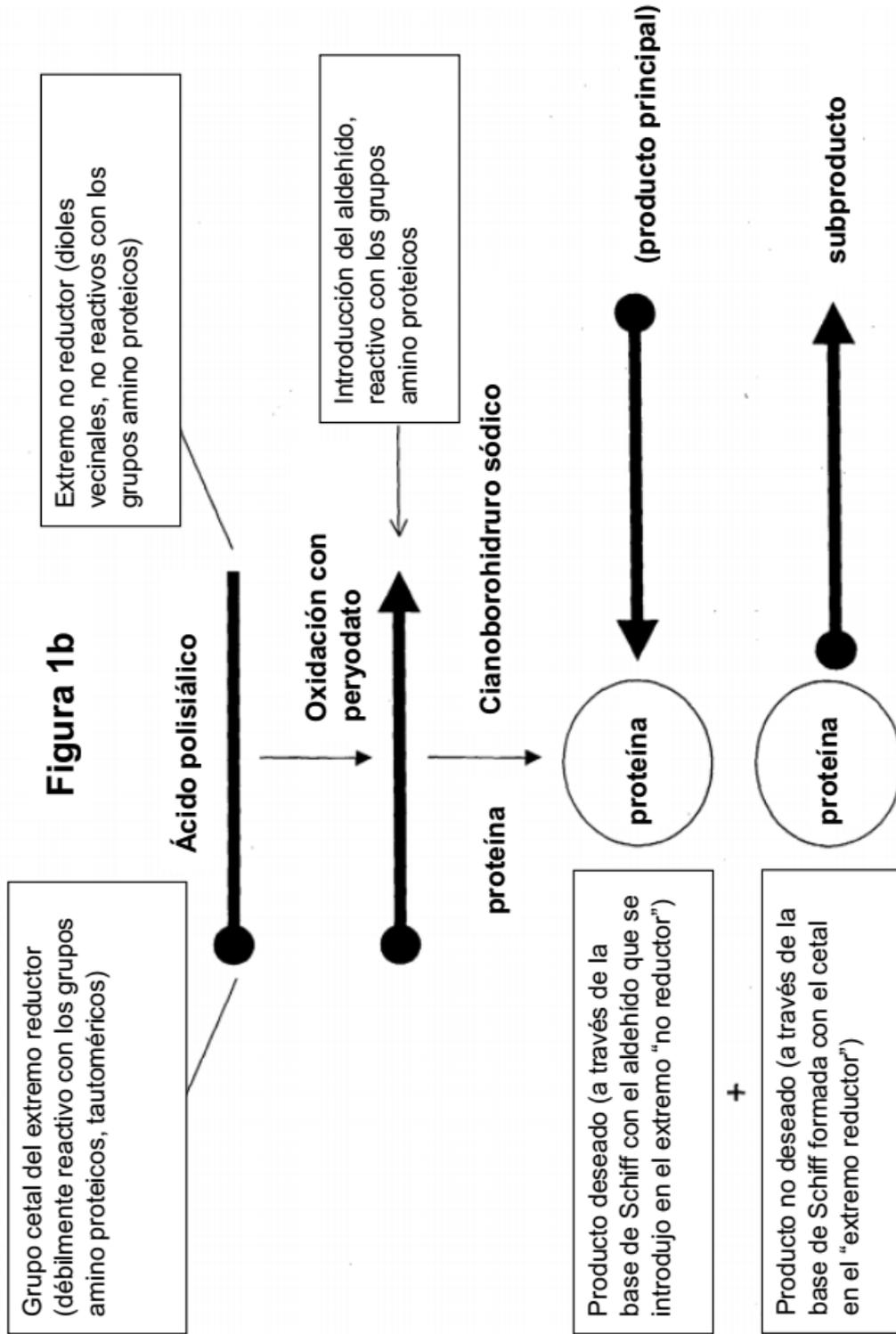
65

## Reivindicaciones

- 5 1. Un proceso para separar un polisacárido polidisperso cargado iónicamente en fracciones, en el que una solución acuosa del polisacárido polidisperso se pone en contacto con una resina de intercambio iónico en una columna, se somete a una elución selectiva mediante una solución amortiguadora de elución acuosa y se recupera el polisacárido a partir de las fracciones eluidas, caracterizado porque la elución selectiva implica lavar la resina en la columna secuencialmente con al menos tres soluciones amortiguadoras de elución cada una de las cuales tiene una fuerza iónica y/o pH diferentes y constantes y en donde la segunda y subsecuentes soluciones amortiguadoras tienen mayor fuerza iónica y/o pH que las soluciones amortiguadoras de la etapa inmediatamente anterior, y porque las fracciones eluidas tienen cada una un peso molecular promedio diferente y el producto polisacárido que se recupera de las fracciones eluidas tiene una polidispersidad inferior a 1,5 y en donde el producto polisacárido es un polímero o copolímero de ácido siálico.
- 15 2. Un proceso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el producto polisacárido que se recupera de las fracciones eluidas tiene una polidispersidad inferior a 1,25.
3. Un proceso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el producto polisacárido que se recupera de las fracciones eluidas tiene una polidispersidad de 1,1 o menos.
- 20 4. Un proceso de conformidad con la reivindicación 1 en el que las soluciones amortiguadoras de elución tienen todas el mismo pH.
5. Un proceso de conformidad con la reivindicación 1 en el que la diferencia entre la fuerza iónica de etapas sucesivas es sustancialmente la misma.
- 25 6. Un proceso de conformidad con la reivindicación 5 en el que dicha diferencia es de 0,005 a 0,1 M.
7. Un proceso de conformidad con cualquier reivindicación anterior en el que varía la fuerza iónica mediante la variación del nivel de una sal de un ácido mineral fuerte y una base mineral fuerte.
- 30 8. Un proceso de conformidad con la reivindicación 1 en el que las soluciones amortiguadoras de elución tienen valores de pH sucesivamente más altos.
- 35 9. Un proceso de conformidad con la reivindicación 8 en el que la diferencia entre el pH de etapas sucesivas es sustancialmente la misma.
10. Un proceso de conformidad con la reivindicación 9 en el que dicha diferencia es de 0,2 unidades de pH.
- 40 11. Un proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH de cada solución amortiguadora está en el intervalo de 7,4-13.
- 45 12. Un proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a la 11 en el que la segunda solución amortiguadora y las posteriores tienen mayor fuerza iónica y pH que las soluciones amortiguadoras de la etapa inmediatamente anterior.
- 50 13. Un proceso de conformidad con cualquier reivindicación anterior en donde cada solución amortiguadora de elución se usa en una cantidad de al menos 1,0 volumen de columna.
- 55 14. Un proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la solución amortiguadora de elución contiene un ácido o base volátil y en el que la recuperación implica la volatilización del ácido o la base volátil de las fracciones eluidas.
- 60 15. Un proceso de conformidad con la reivindicación 14 en el que la solución amortiguadora contiene una base que es una amina.
- 65 16. Un proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el peso molecular promedio en peso del polisacárido polidisperso es de al menos 5 kDa.
17. Un proceso de conformidad con cualquier reivindicación anterior en el que la elución selectiva comprende al menos cinco etapas secuenciales de elución con soluciones amortiguadoras de elución de fuerza iónica sucesivamente creciente.
18. Un proceso de conformidad con la reivindicación 17, en el que la elución selectiva comprende de seis a doce etapas secuenciales de elución con soluciones amortiguadoras de elución de fuerza iónica sucesivamente creciente.

19. Un proceso de conformidad con cualquier reivindicación anterior que comprende una etapa preliminar antes del contacto con la resina de intercambio iónico de precipitación con un no solvente.
- 5 20. Un proceso de conformidad con cualquier reivindicación anterior en el que el polisacárido es un polisacárido de origen natural, un producto de la hidrólisis de este o un derivado funcionalizado de cualquiera de estos.
21. Un proceso de conformidad con la reivindicación 20 en el que el polisacárido de origen natural es un polisacárido bacteriano.
- 10 22. Un proceso de conformidad con la reivindicación 1 en el que el polisacárido es un ácido polisiálico en una forma hidrolizada.
23. Un proceso de conformidad con la reivindicación 1 en el que el polisacárido es un poli(ácido siálico unido por enlaces 2,8), un poli(ácido siálico unido por enlaces 2,9) o un PSA unido por enlaces alternantes 2,8-2,9.
- 15 24. Un proceso de conformidad con la reivindicación 1 en el que el polisacárido es ácido colominico (CA), o un derivado oxidado, reducido, aminado y/o de hidrazida de este.
- 20 25. Un proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones de la 22 a la 24 en donde la polidispersidad del peso molecular del polisacárido polidisperso es menor que 1,2.
26. Un proceso de conformidad con cualquier reivindicación anterior en el que la polidispersidad del peso molecular del polisacárido polidisperso es de al menos 2,0.
- 25 27. Un proceso de conformidad con cualquier reivindicación anterior que comprende conjugar el polisacárido fraccionado a una proteína.
28. Un proceso de conformidad con cualquier reivindicación anterior para separar conjugados polisacárido-proteína polidispersos cargados iónicamente por cromatografía de intercambio aniónico o catiónico.
- 30 29. Un ácido polisiálico que consiste en unidades de ácido siálico, que tiene una polidispersidad del peso molecular (Mn/Mw) de menos que 1,26.
- 35 30. Un ácido polisiálico de conformidad con la reivindicación 29 en el que la polidispersidad no es superior a 1,2.
31. Un ácido polisiálico de conformidad con la reivindicación 30 en el que la polidispersidad está en el intervalo de 1,01 a 1,10.
- 40 32. Un ácido polisiálico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31 que es un CA, o un derivado oxidado, reducido, aminado y/o de hidrazida de este.
33. Un ácido polisiálico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32 que tiene un peso molecular (Mw) de al menos 5 kDa.
- 45 34. Un conjugado del ácido polisiálico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 29 a 33 y una proteína.





**Figura 2**

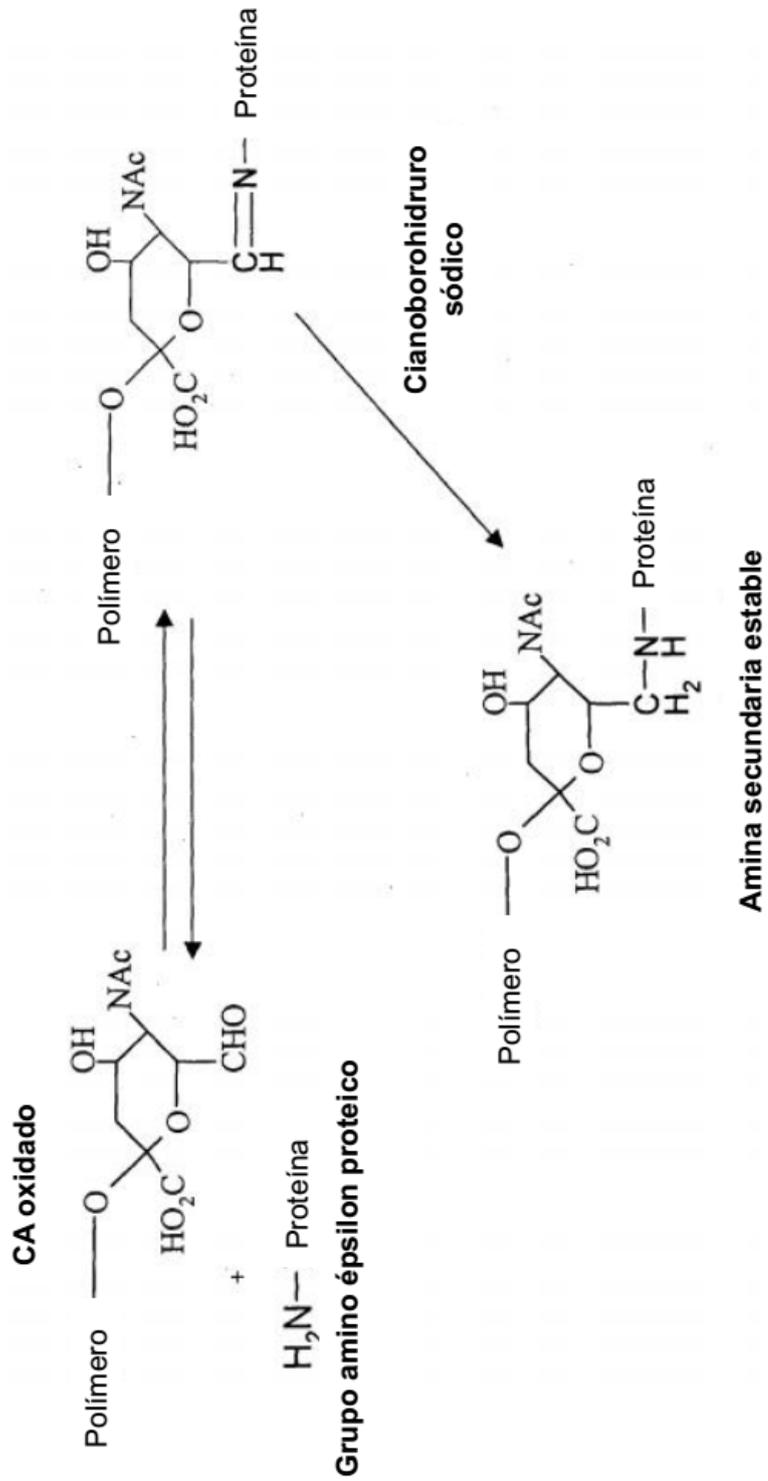


Figura 3

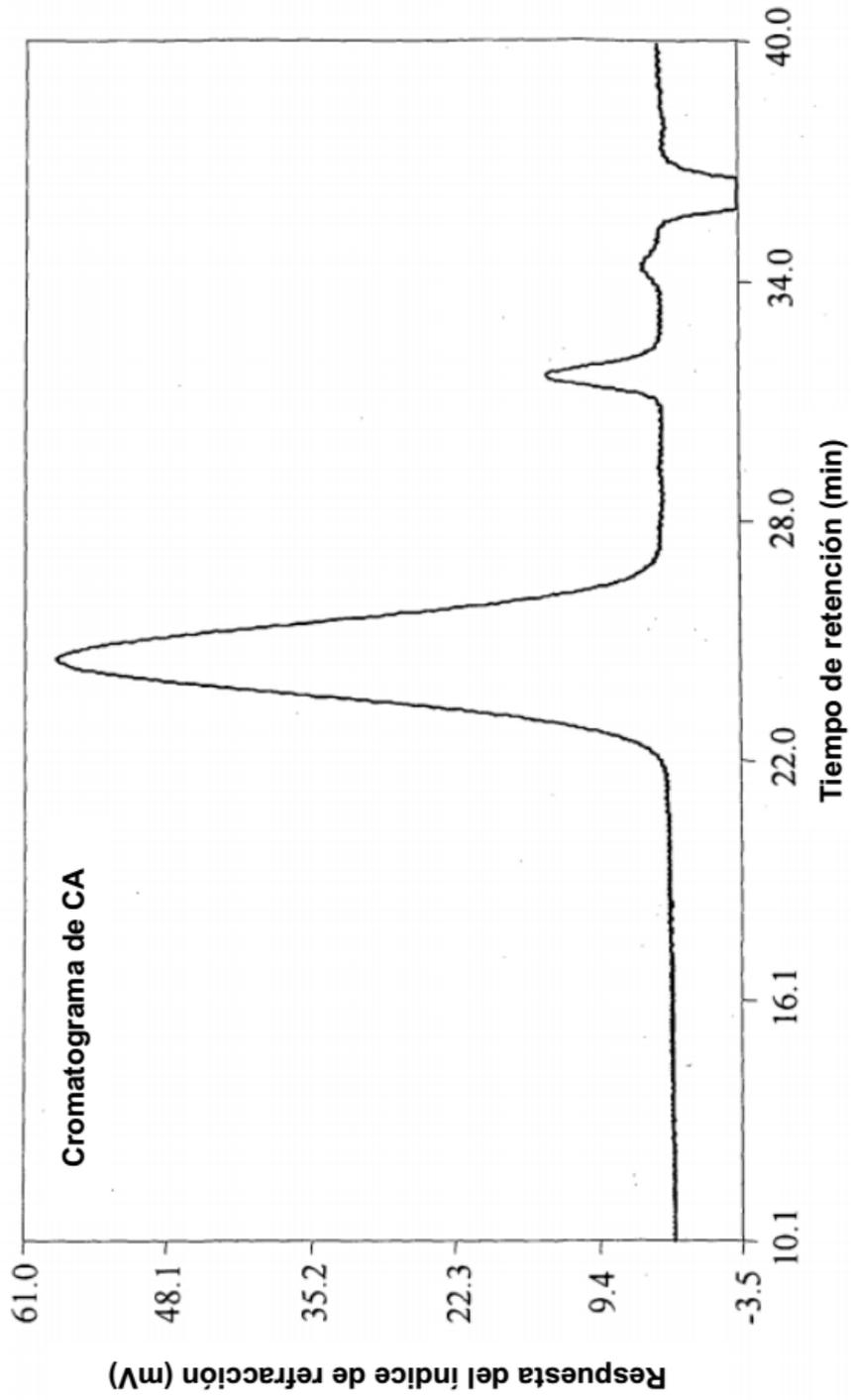
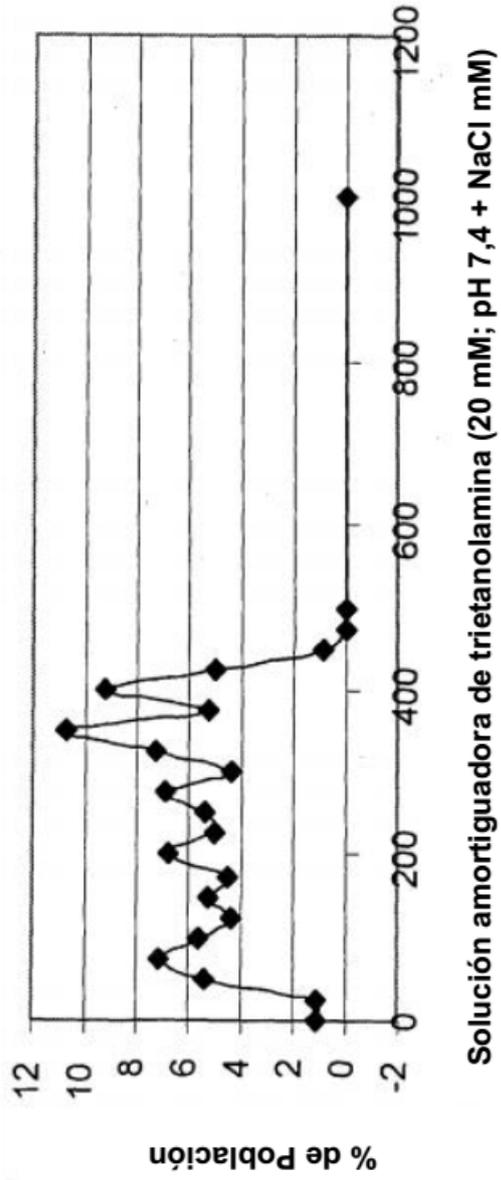
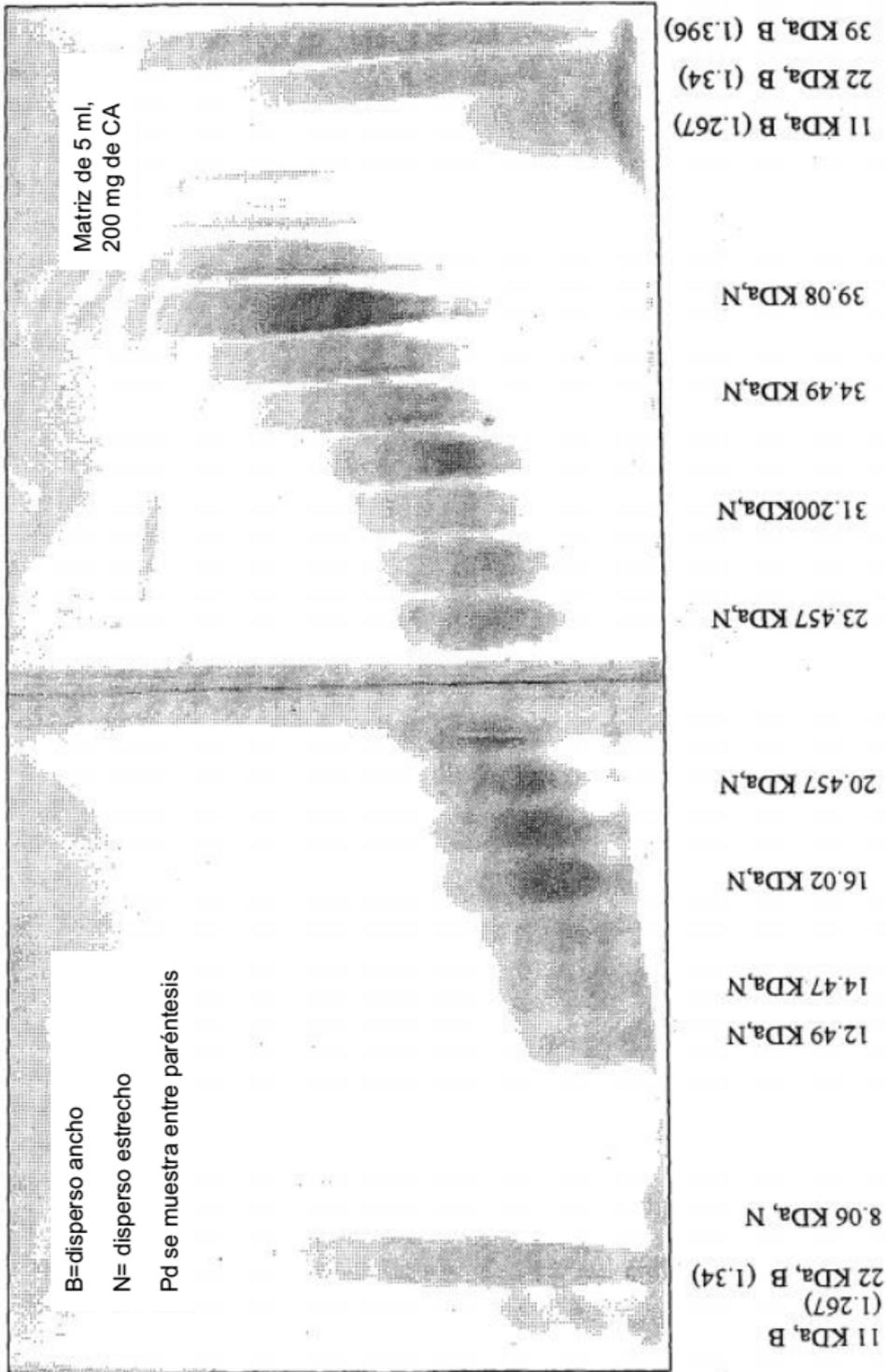


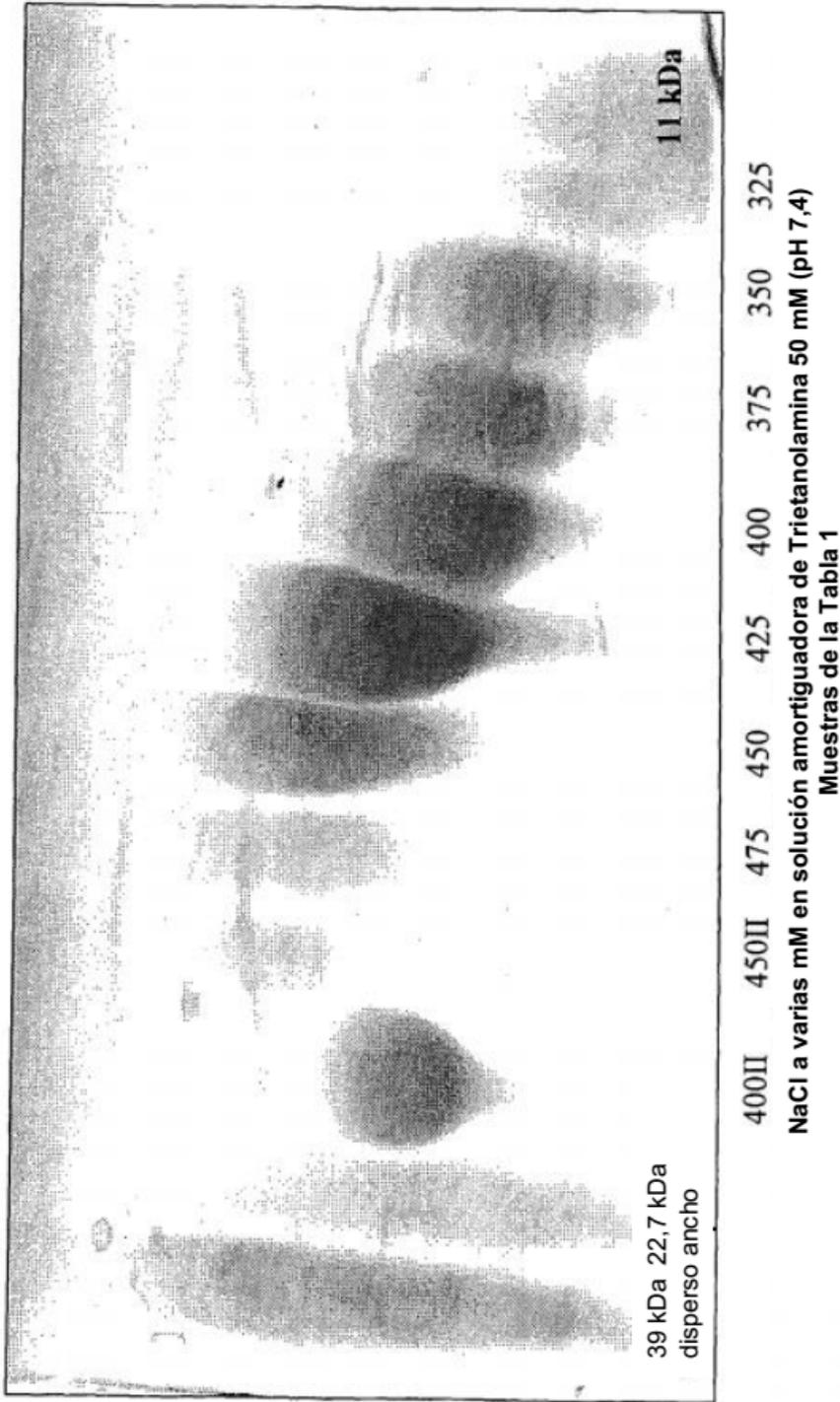
Figura 4



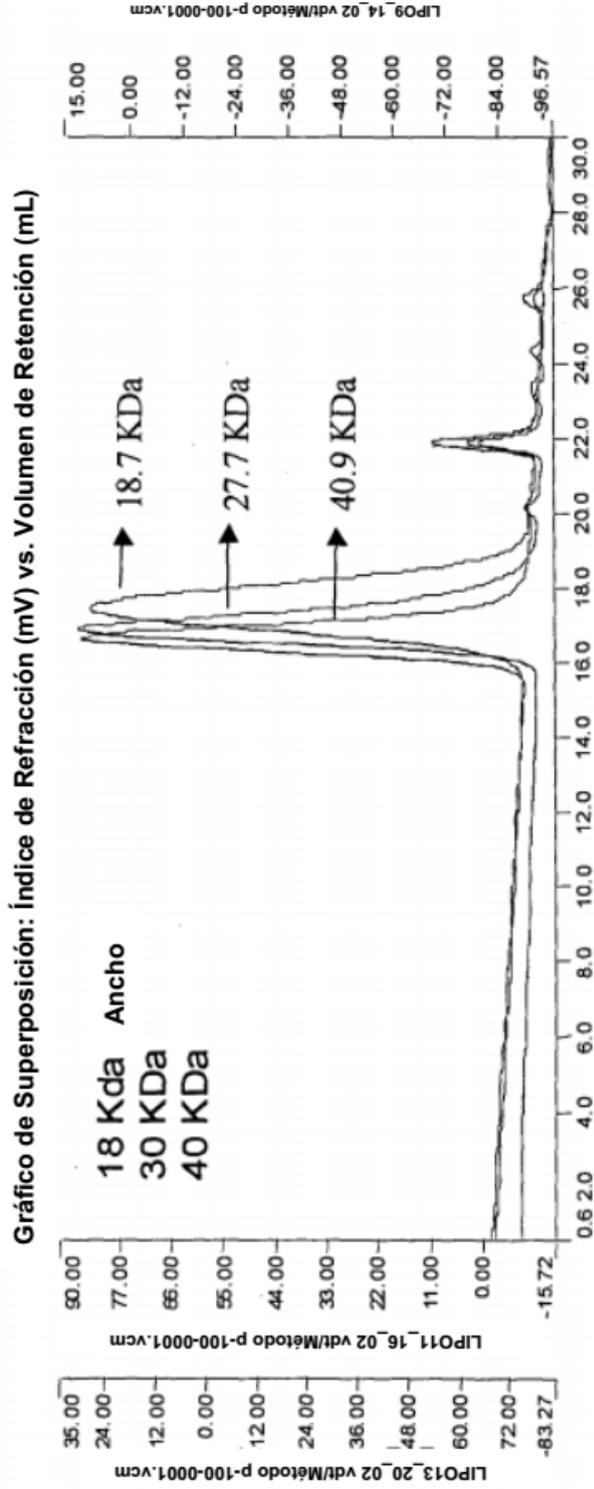
**Figura 5**



**Figura 6**



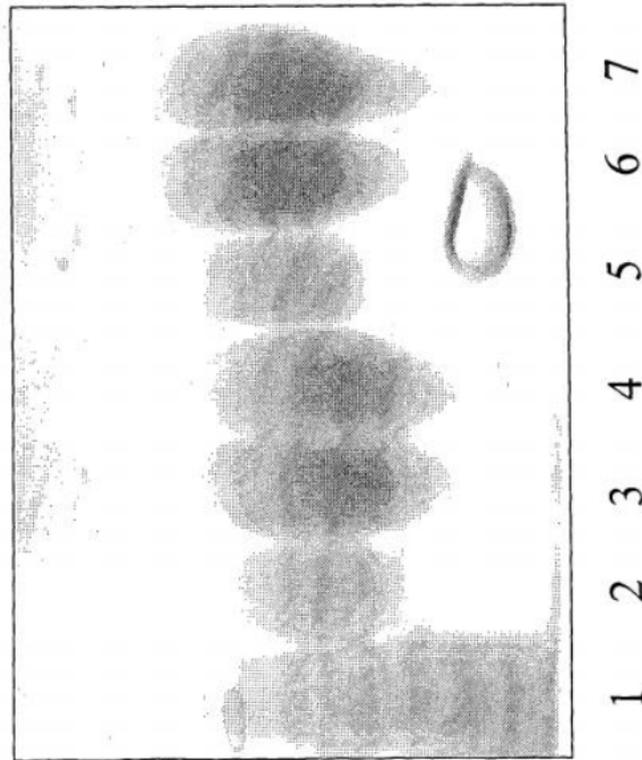
**Figura 7**



Volumen de Retención (mL)

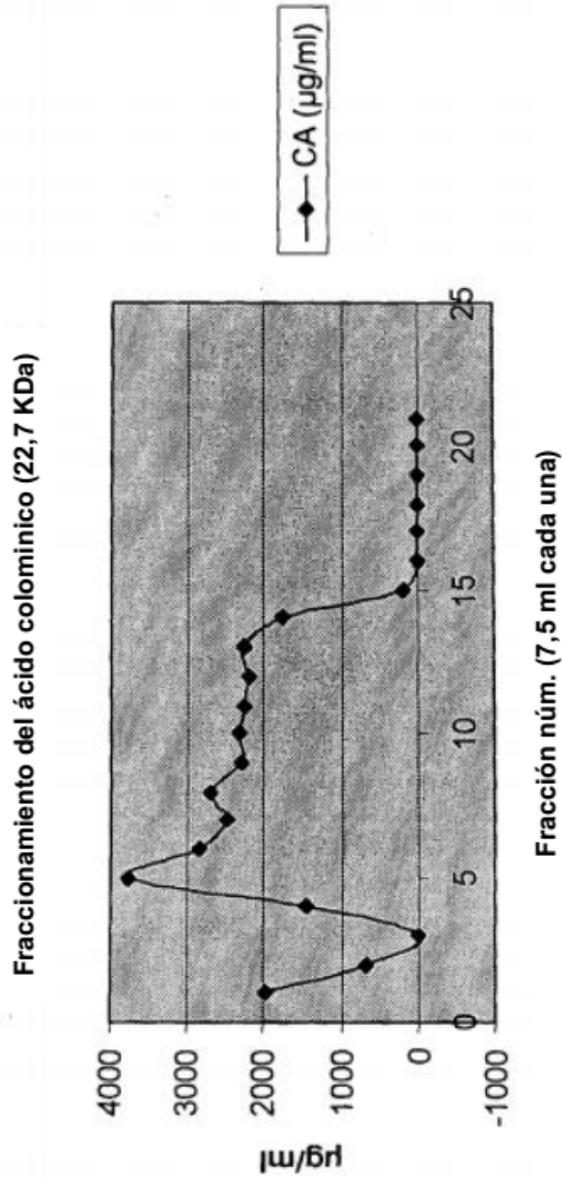
Muestra	Mw (Da)	Mn (Da)	pd
1	18.727	15.016	1,25
2	26.677	25.095	1,10
3	40.950	40.279	1,02

**Figura 8**



- 1) CA disperso ancho de 18,7 KDa
- 2) CA de IEC de 32,2 KDa
- 3) CA ultrafiltrado de 32,2 KDa
- 4) CA pos oxidación de 32,2 KDa
- 5) CA de IEC de 40,9 KDa
- 6) CA ultrafiltrado de 40,9 KDa
- 7) CA pos oxidación de 40,9 KDa

**Figura 9**



Flujo: 2 ml/min; solución amortiguadora Tris pH 7,4; Matriz: 5ml

Los estudios de unión con 50, 100, 150 y 200 mg de CA (con 200 mg se ve una pequeña cantidad de CA en el flujo a través del fraccionamiento del lavado)

**Figura 10**



7.412 KDa (1,065)  
12.310 KDa (1,076)  
12.310KDa (1,076)  
14.1200KDa (1,013)  
39 KDa, B (1,396)  
22 KDa, B (1,34)

**B = disperso ancho  
pd se muestra entre paréntesis**

**Figura 11**

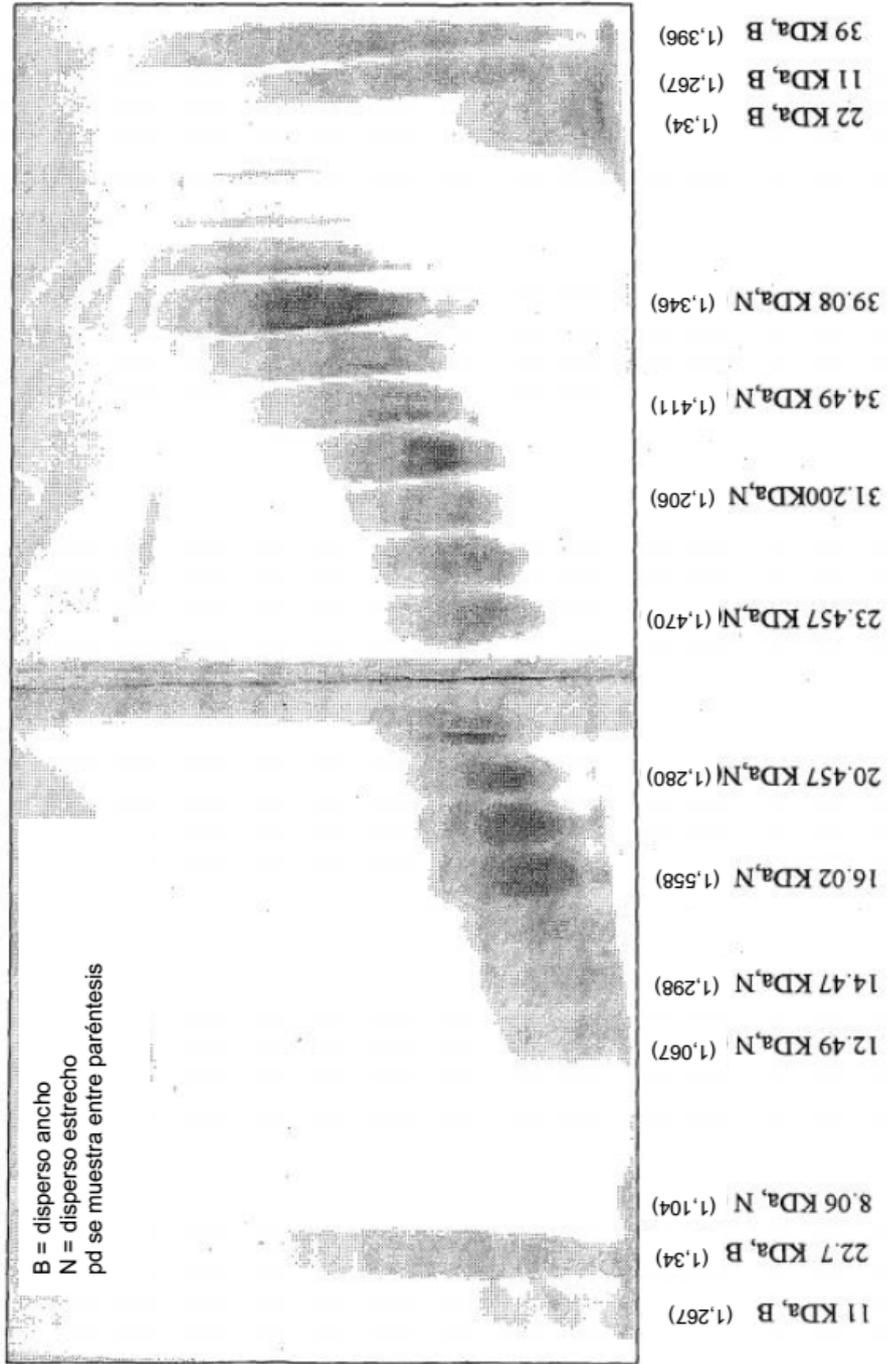
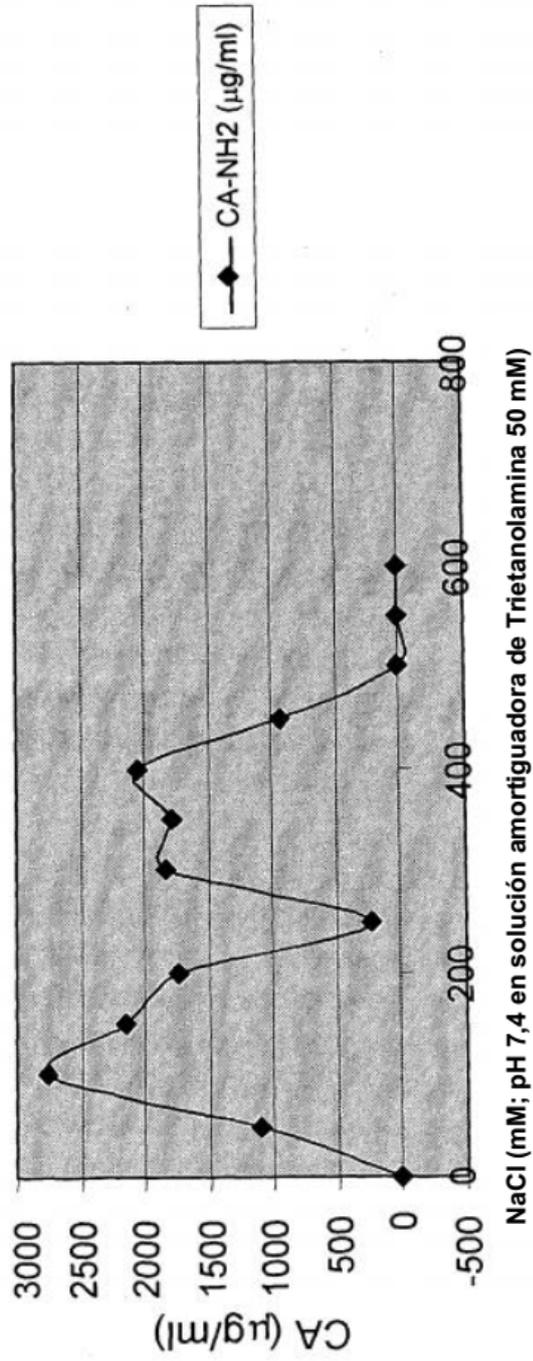
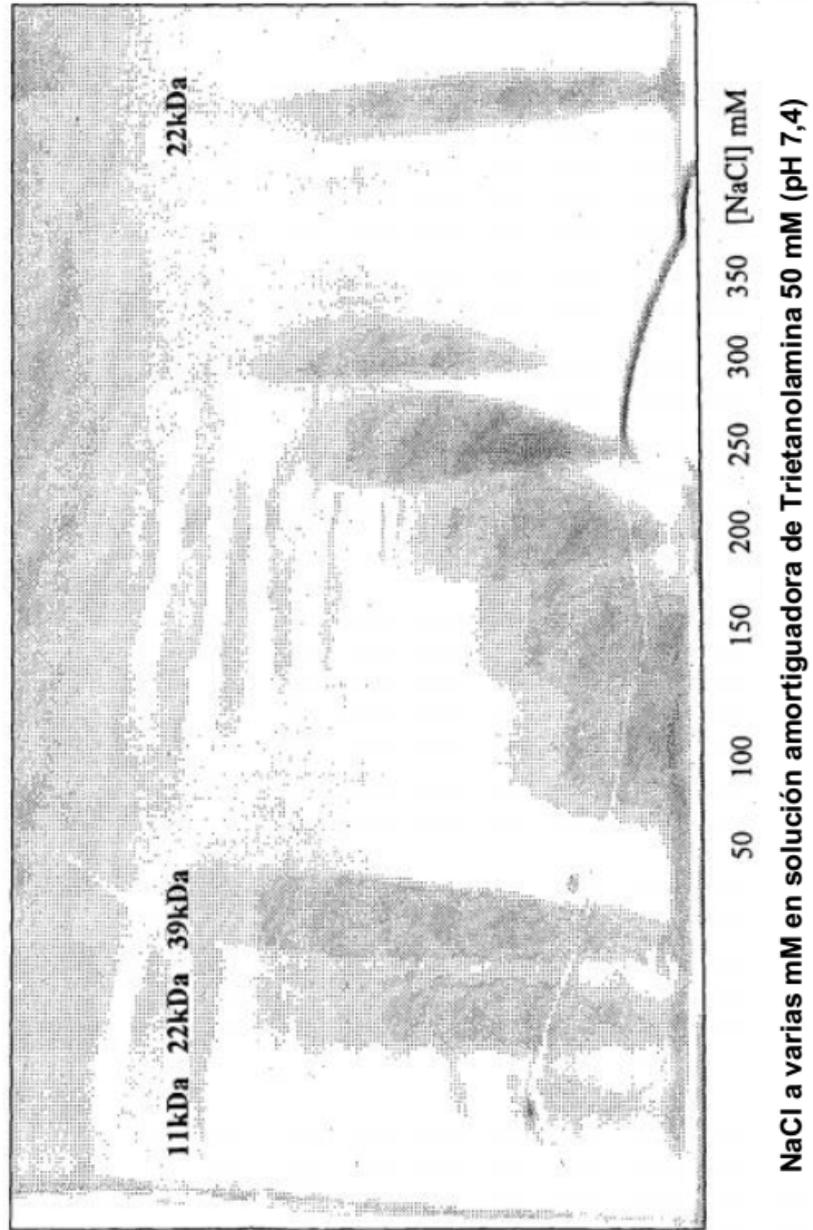


Figura 12



**Figura 13**



**NaCl a varias mM en solución amortiguadora de Trietanolamina 50 mM (pH 7,4)**

**Figura 14**

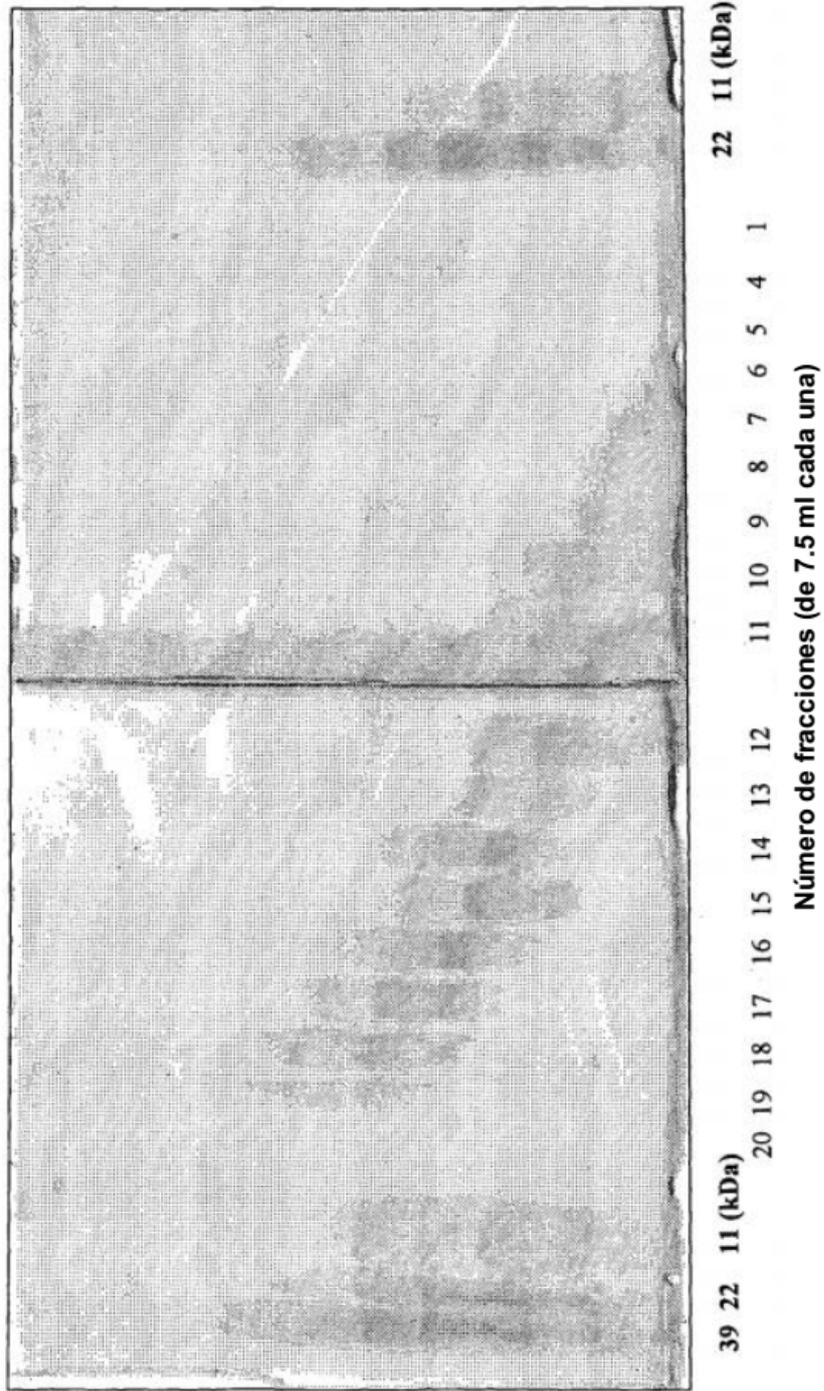


Figura 15



GH+CA  
GH+40,9KDa (pd=1,09)  
GH+22,7KDa (pd=1,09)  
GH+22,7KDa (pd=1,34)  
GH  
Marcadores

**Figura 16**

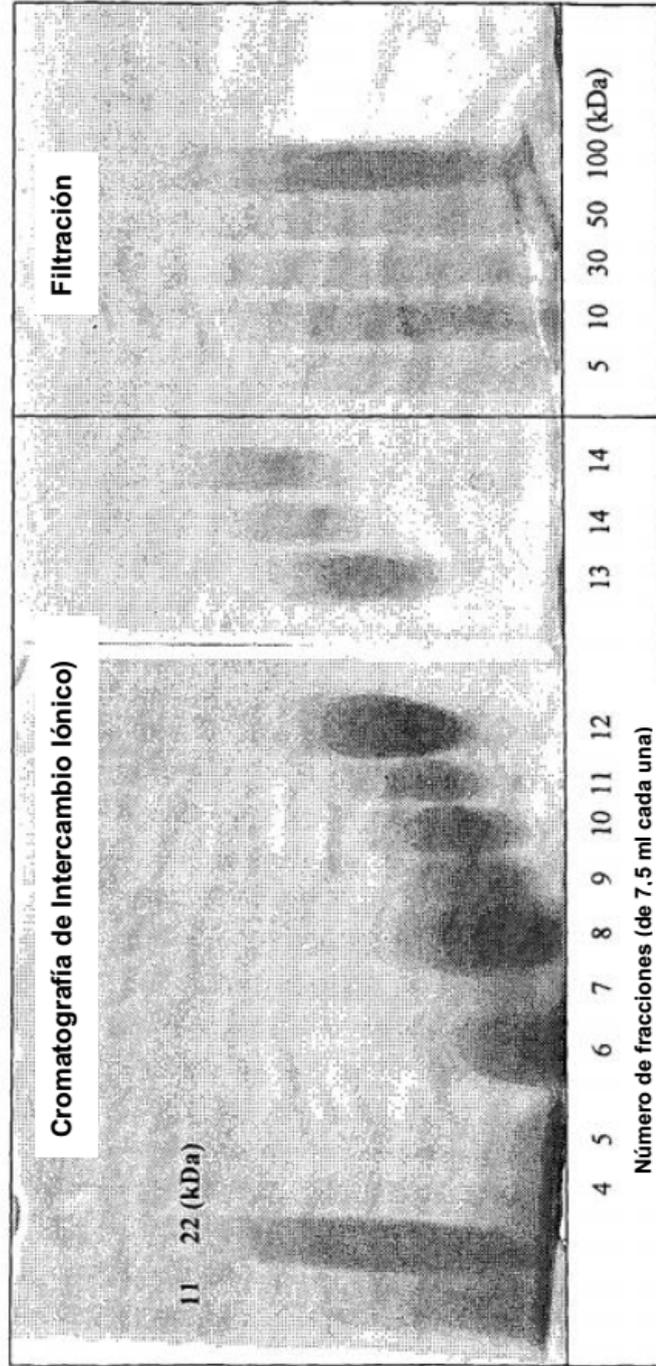


Figura 17

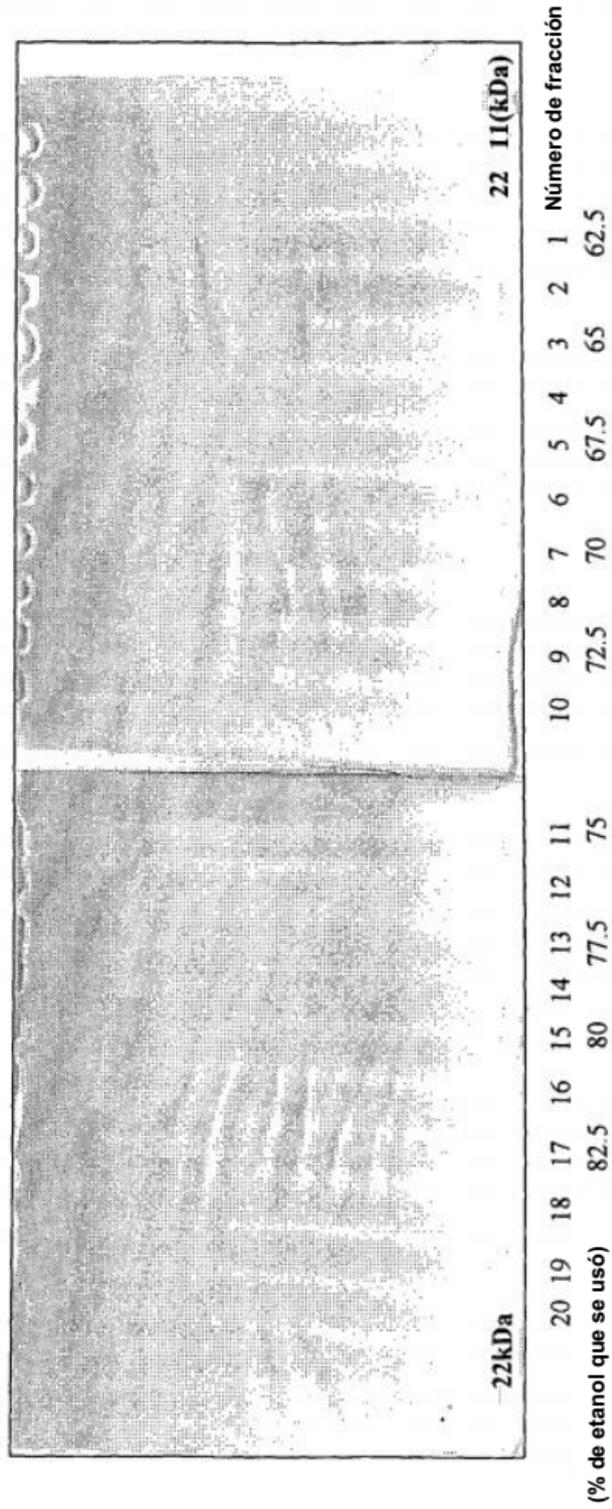
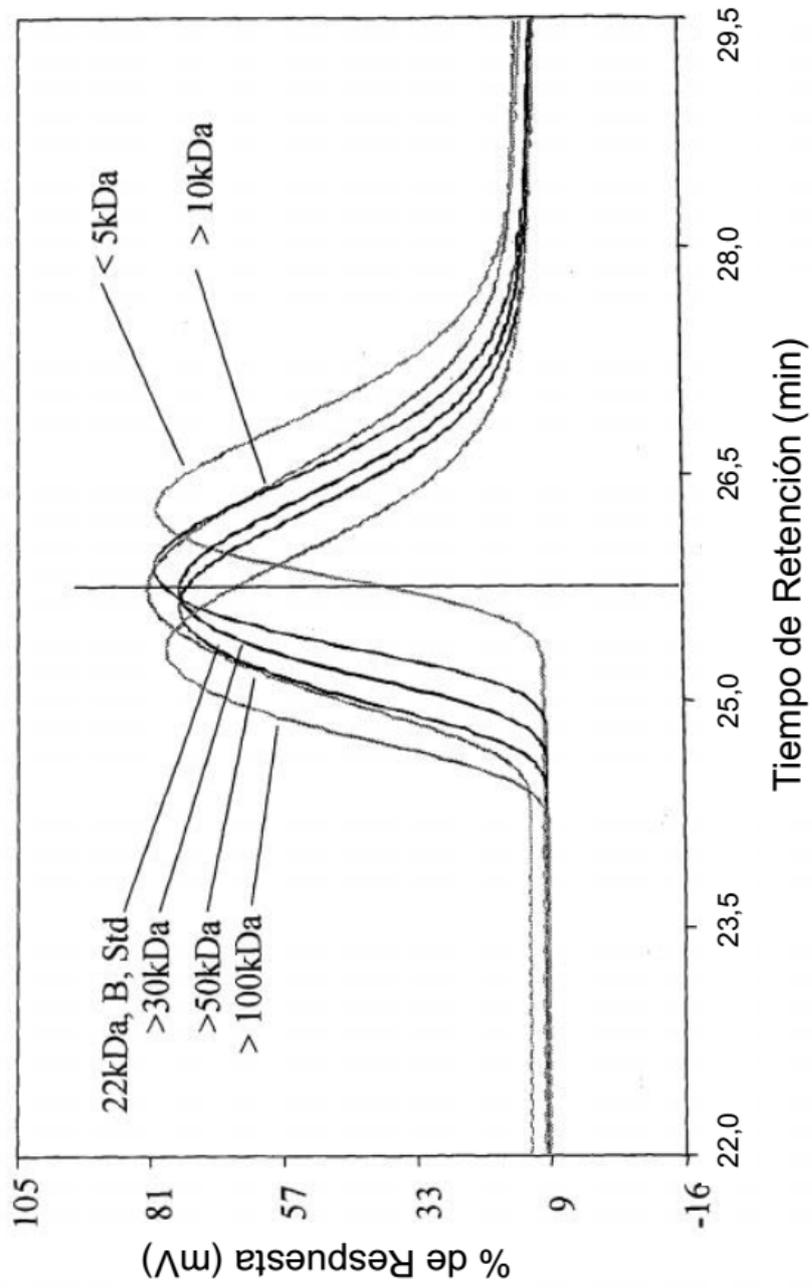
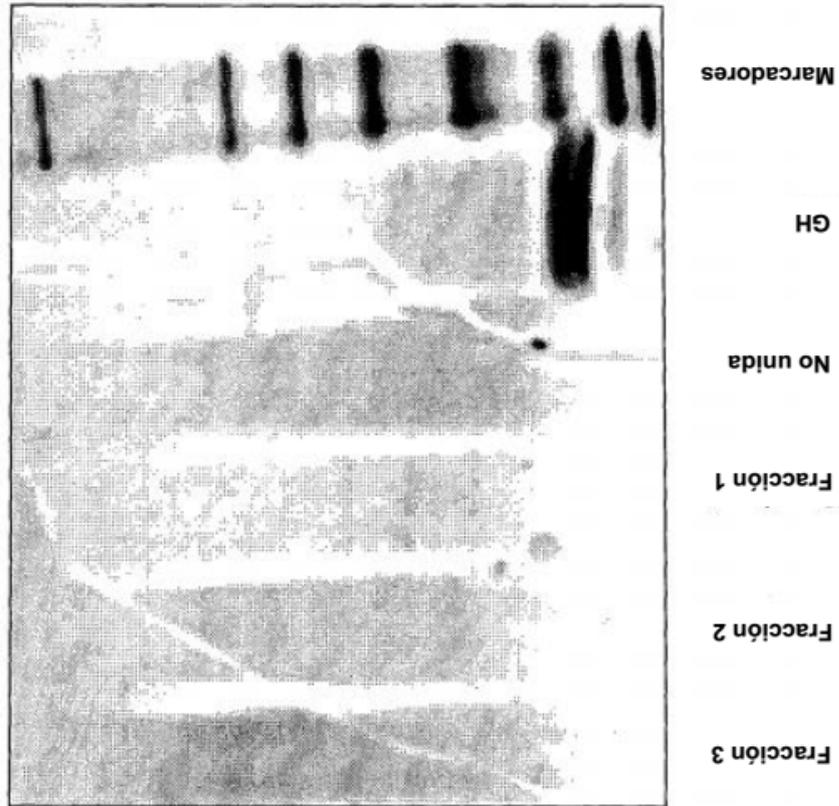


Figura 18



**Figura 19**



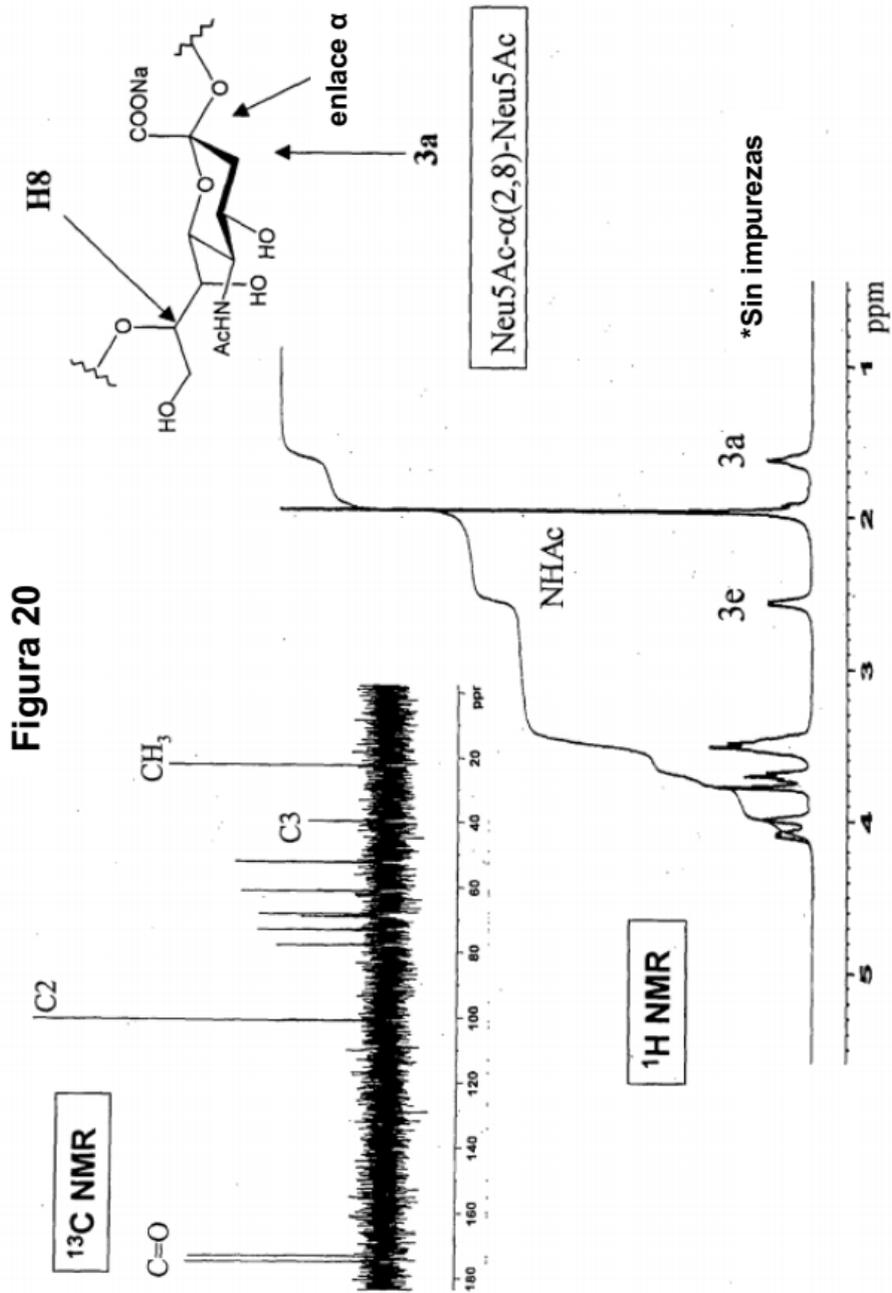
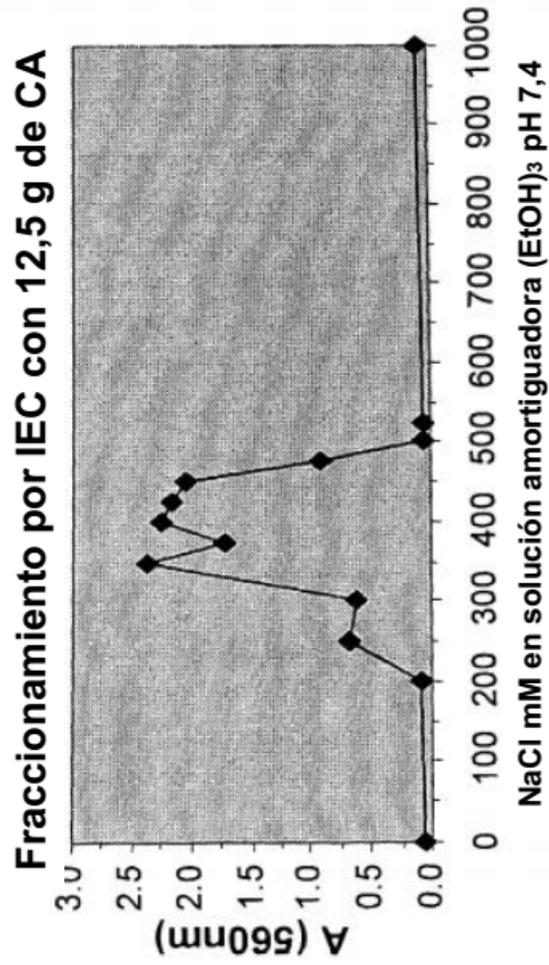


Figura 21



NaCl mM	% de población de CA
0	0
200	0.3
250	4.8
300	4.3
350	18.0
375	13.0
400	17.0
425	16.3
450	15.4
475	6.8
500	0.1
525	0.0
1000	0.2

**Figura 22**

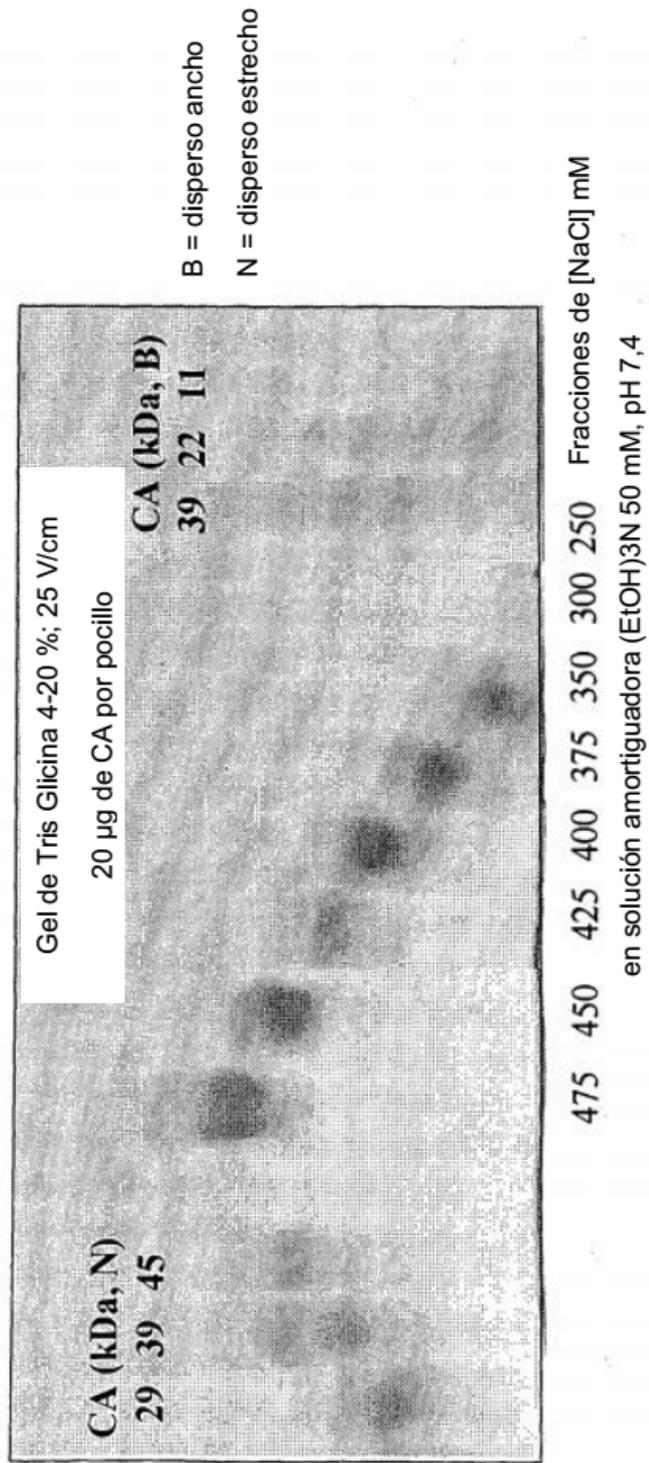
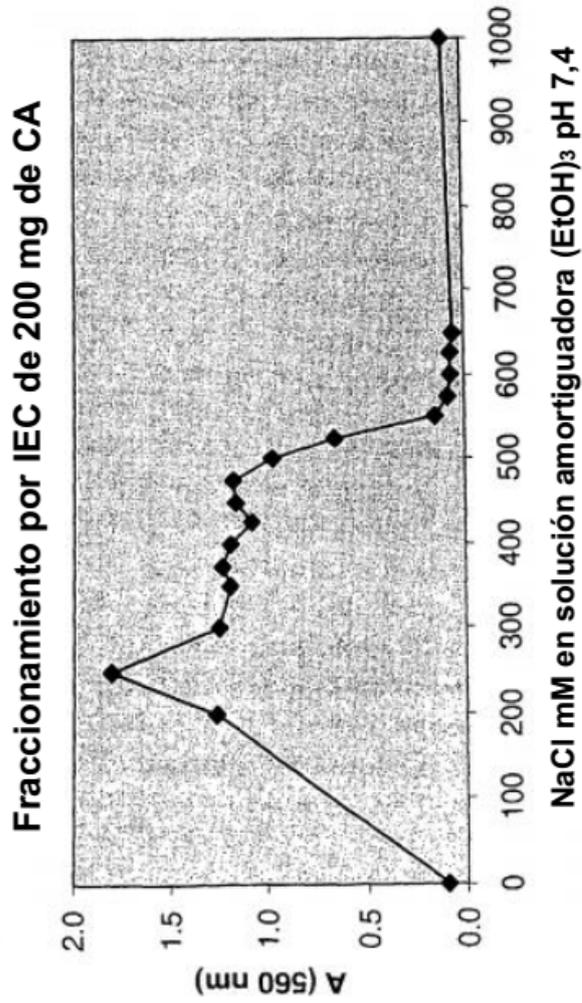


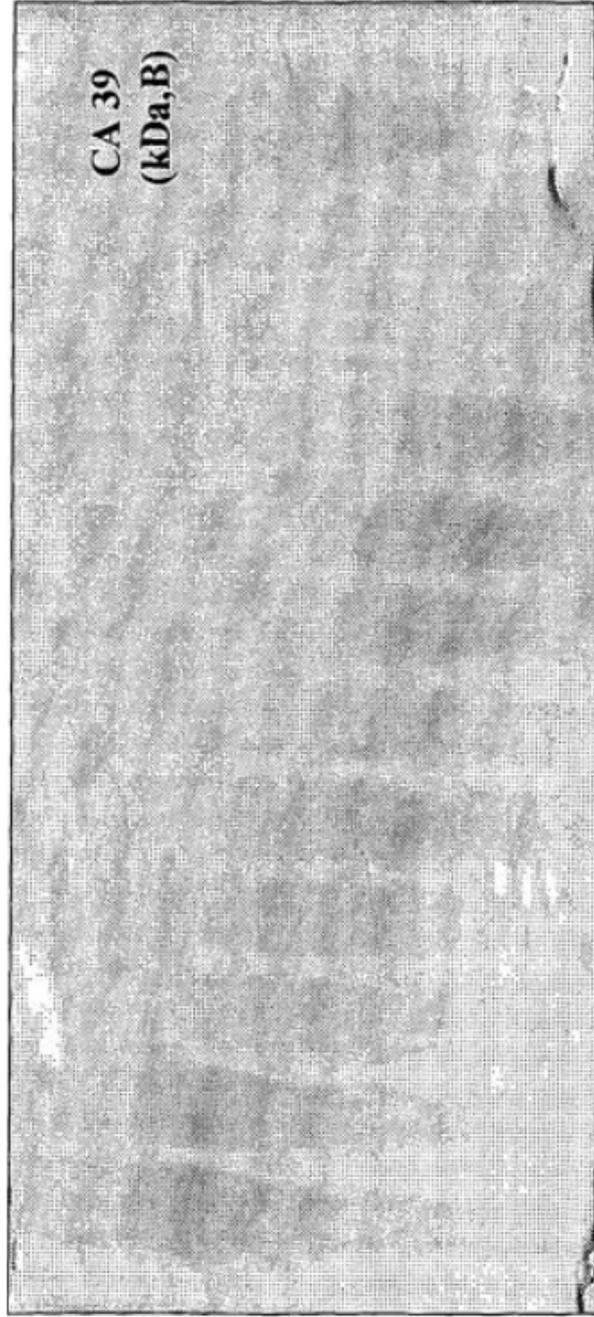
Figura 23



NaCl mM	% de población de CA
0	0.5
200	11.4
250	16.5
300	11.2
350	10.7
375	11.1
400	10.7
425	9.7
450	10.4
475	10.6
500	8.7
525	5.7
550	0.9
575	0.3
600	0.1
1000	0.4

**Figura 24**

Gel de Tris Glicina 4-20 %; corrido a 50 V/cm, 30 µg de CA por pocillo



**Figura 25**

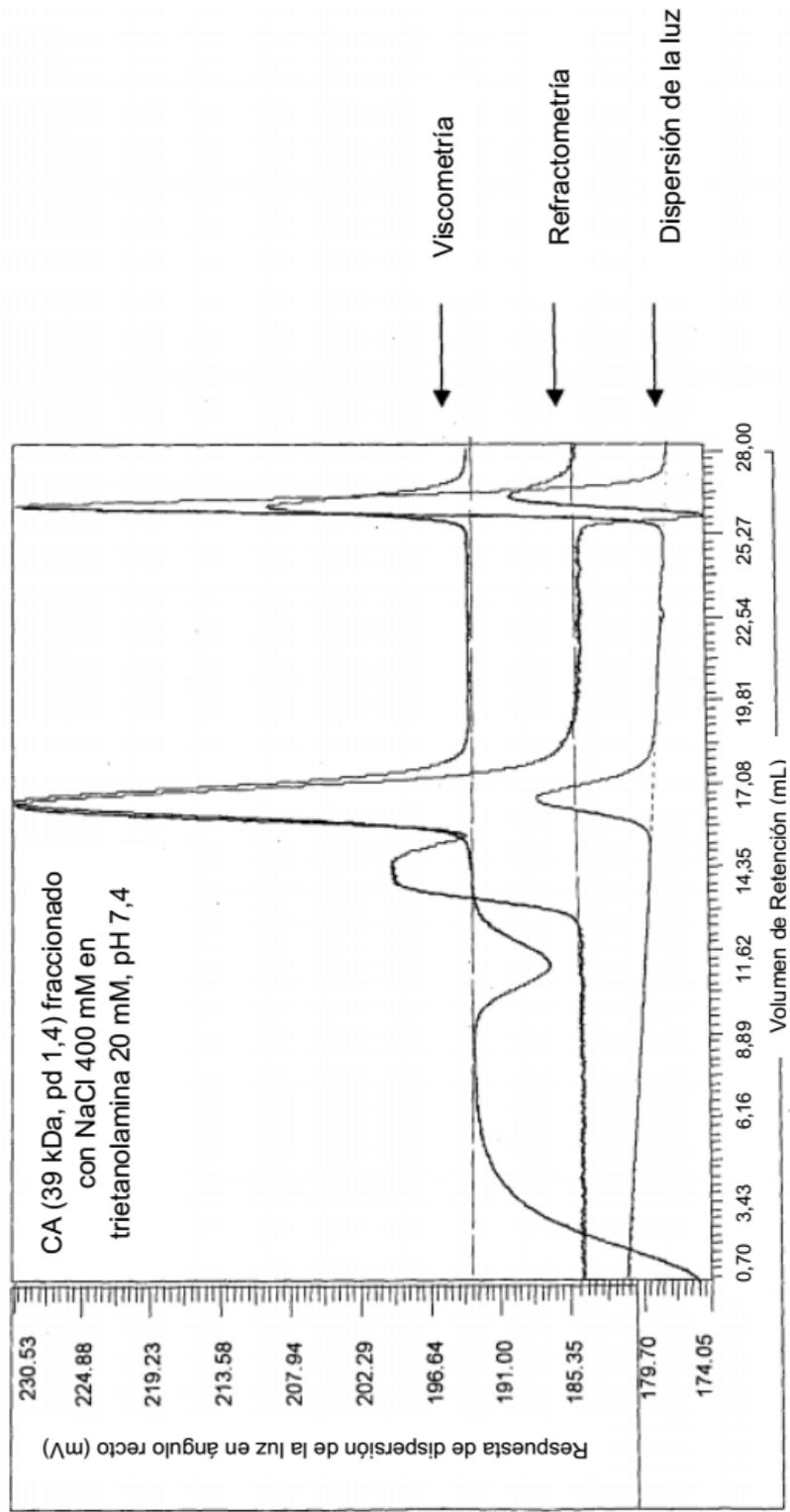


Figura 26

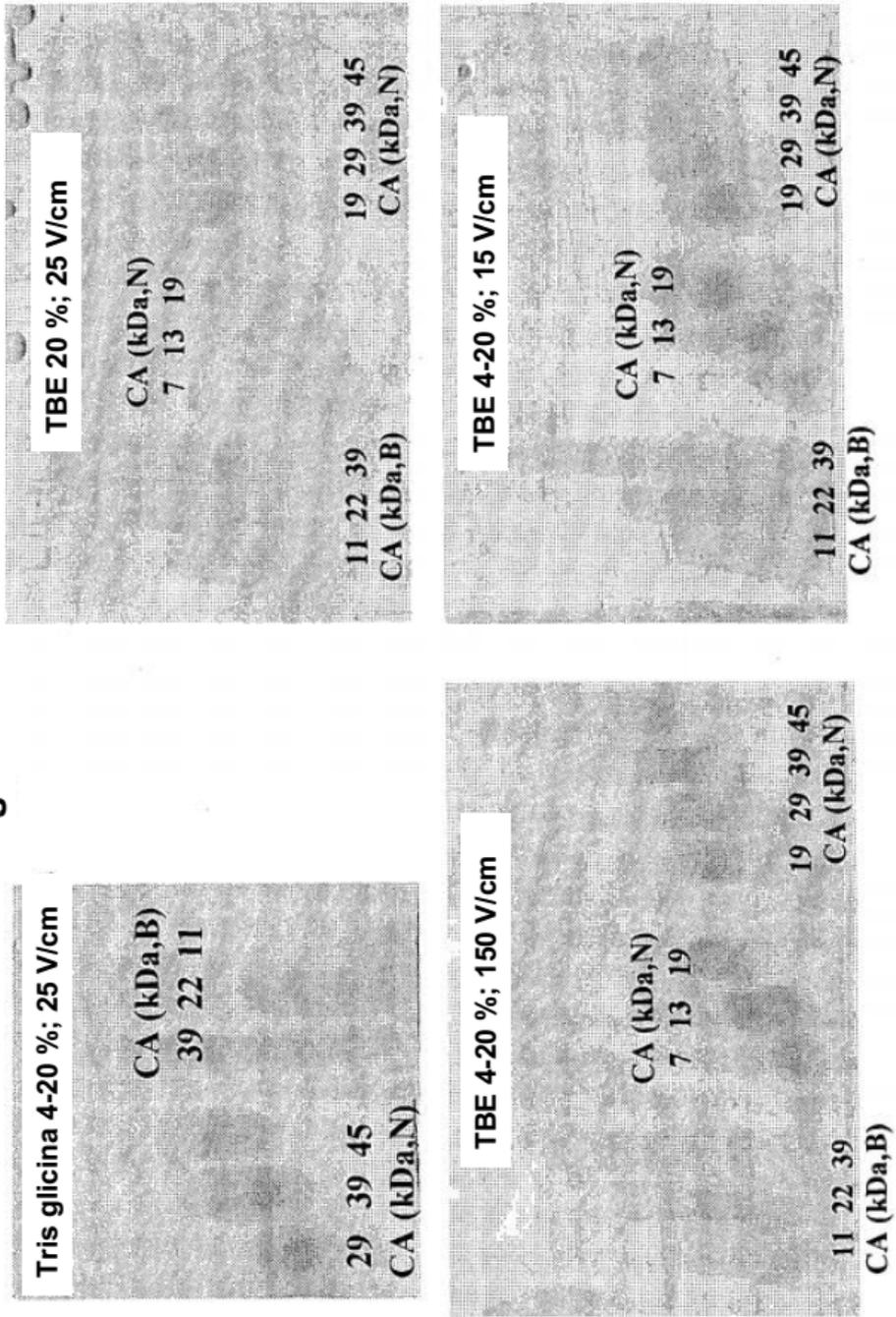
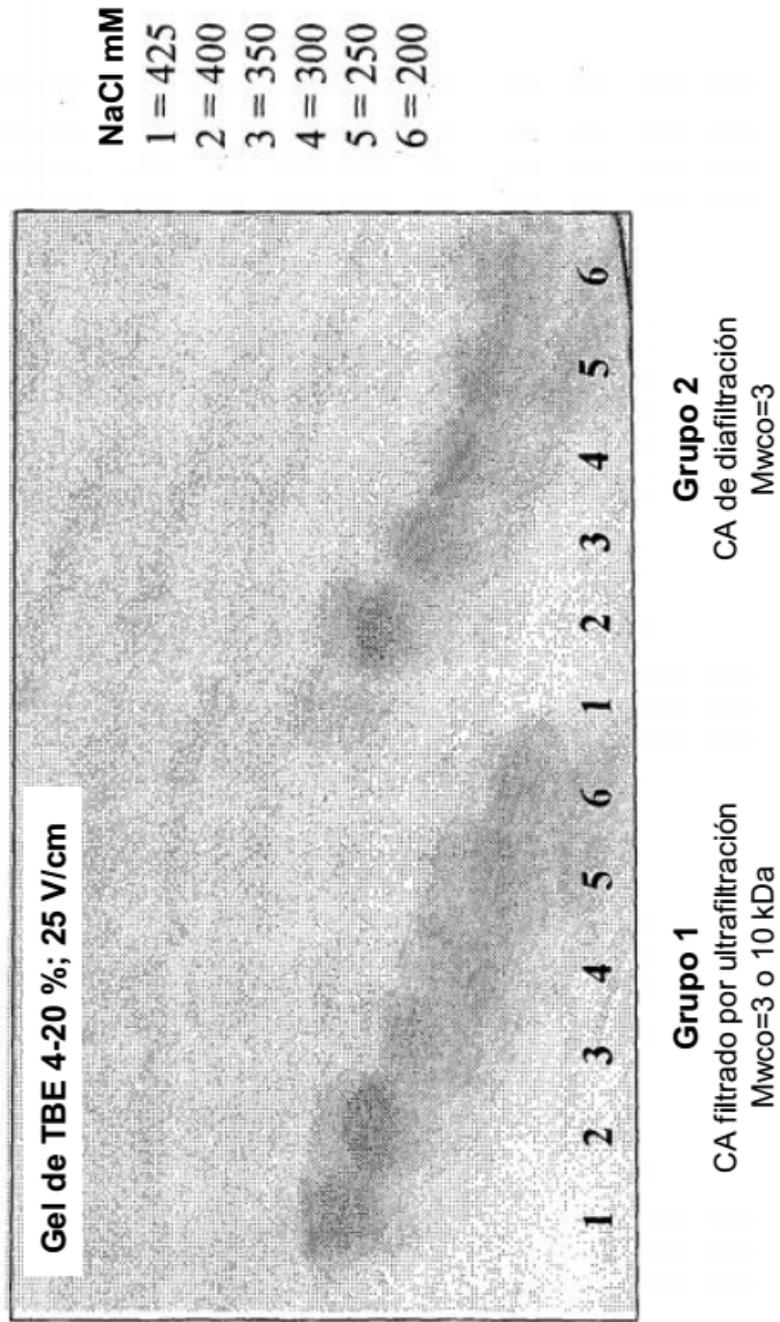
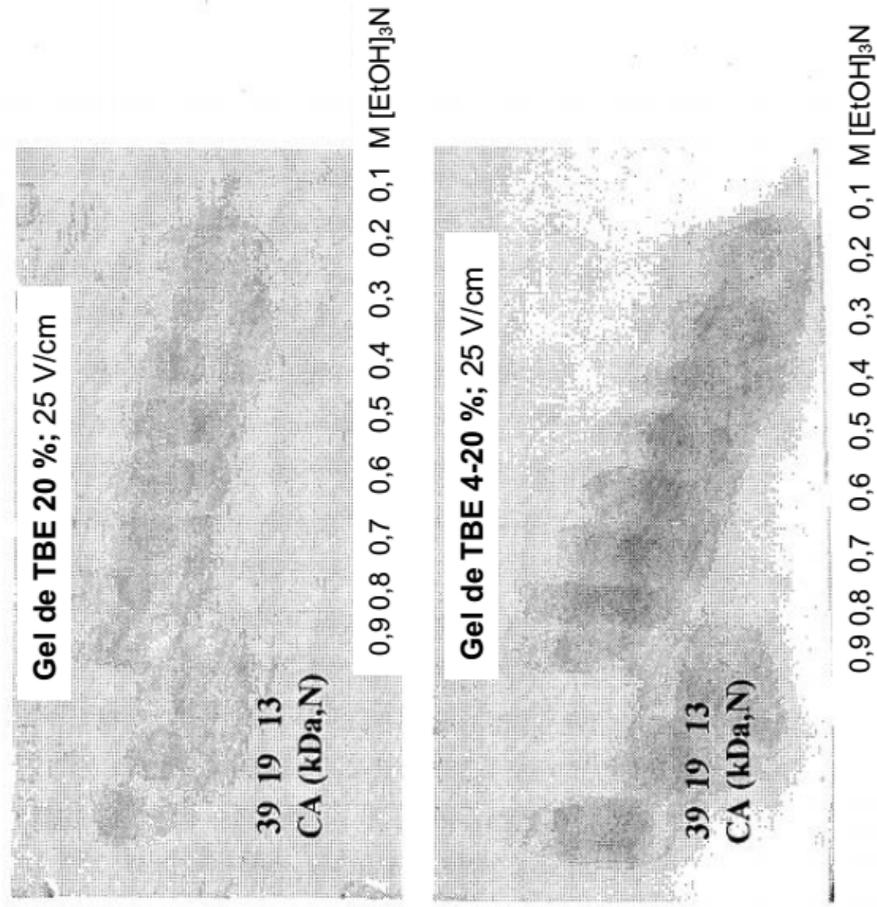


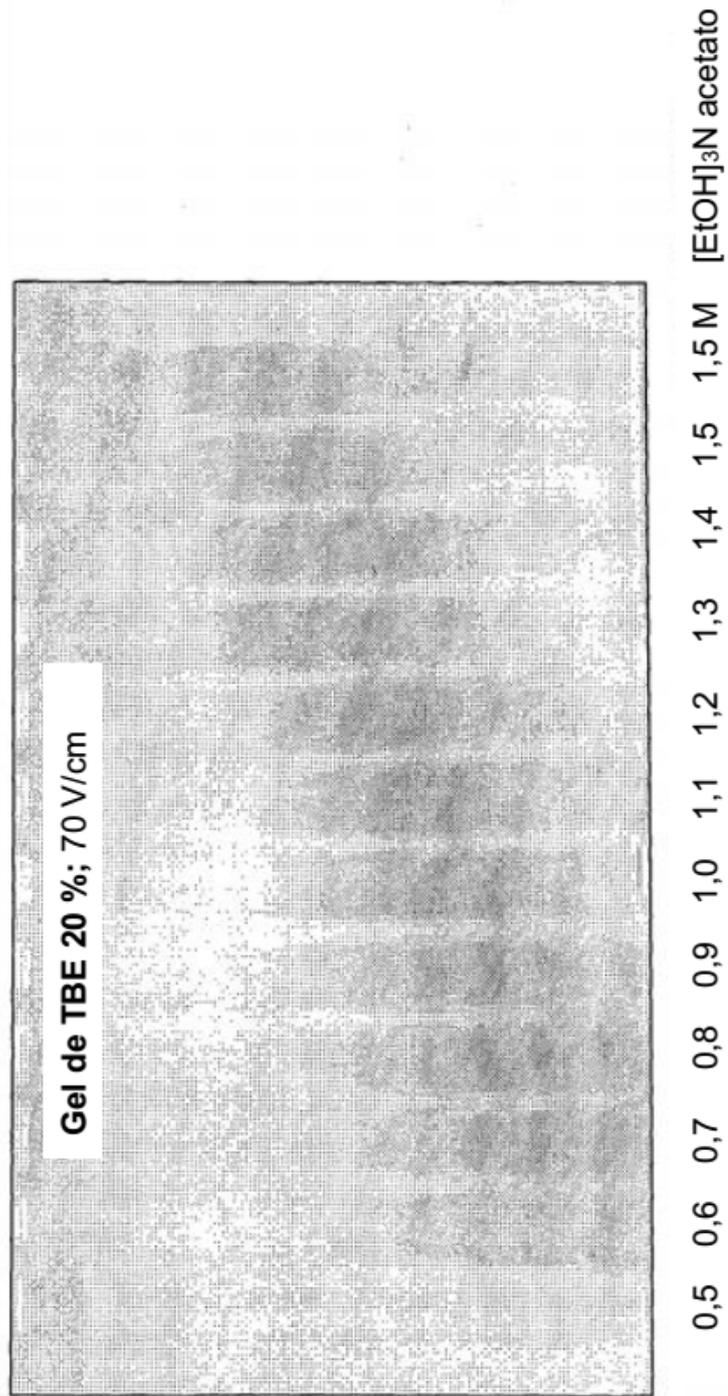
Figura 27



**Figura 28**



**Figura 29**



**Figura 30**

