

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 227**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2009 PCT/CA2009/000885**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2009 WO09155705**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009 E 09768675 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2315603**

54 Título: **Conjugados de polisacáridos y proteínas acoplados reversiblemente a través de enlaces imina**

30 Prioridad:

26.06.2008 GB 0811743

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

03.04.2019

73 Titular/es:

**THERAPURE BIOPHARMA INC. (100.0%)
2585 Meadowpine Blvd
Mississauga, ON L5N 8H9, CA**

72 Inventor/es:

**ADAMSON, GORD;
BELL, DAVID y
BROOKES, STEVEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 707 227 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de polisacáridos y proteínas acoplados reversiblemente a través de enlaces imina

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones de polisacárido oxidado-proteína, y usos de las mismas. Los conjugados preparados mediante el método descrito en este documento dan como resultado un aumento de la semivida y una actividad sostenida de la proteína *in vitro* e *in vivo* con fines terapéuticos y de diagnóstico. Las composiciones preparadas como se describe tienen una bioactividad mejorada en comparación con la proteína que no se ha preparado de este modo.

Antecedentes de la invención

15 Se ha encontrado que muchas proteínas terapéuticas y otros fármacos tienen una semivida corta en circulación y una biodisponibilidad de corta duración. La semivida está dictada por mecanismos de eliminación específicos e inespecíficos y la tasa de degradación de la proteína o el fármaco. Como consecuencia de esta biodisponibilidad de corta duración, es posible que se requieran altas dosis iniciales y regímenes de dosificación frecuentes para mantener los niveles terapéuticos del fármaco, lo que podría resultar en toxicidades relacionadas con la dosis, un cumplimiento deficiente del paciente y un aumento del coste del tratamiento. Se requieren métodos que aumenten la semivida de las proteínas y los medicamentos al tiempo que mantengan la actividad de las proteínas. Un método ideal para este propósito aumentaría la semivida de las proteínas mediante la unión a un polímero biocompatible fácilmente disponible mediante un proceso simple y escalable.

25 La unión (por ejemplo, conjugación) de fármacos y proteínas a portadores macromoleculares es un medio conocido para aumentar la semivida de los fármacos y las proteínas. Los métodos de conjugación conocidos actuales se concentran en reacciones que forman una unión irreversible entre el portador macromolecular y el fármaco o proteína. Un ejemplo de dicha bioconjugación es la unión de proteínas al portador no natural, polietilenglicol (PEG), un proceso denominado PEGilación. Los PEG son cadenas de polímeros sintéticos que pueden activarse químicamente para unirse a las proteínas, generalmente a través de un solo punto de unión de la molécula de PEG a la proteína, para aumentar el tamaño de la proteína. Se han descrito diversos conjugados de proteínas PEGiladas, por ejemplo, en las patentes US 4.002.531, US 5.122.614 y US 5.824.784. Los conjugados como el PEG-interferón han sido aprobados para su uso en el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C y demuestran una semivida más larga y una menor frecuencia de dosificación en comparación con el interferón no modificado (IFN).
35 Otras proteínas PEGiladas, incluidas las versiones PEGiladas de G-CSF, factores de coagulación sanguínea, enzimas y otras proteínas terapéuticas de alto valor, se encuentran actualmente en uso clínico o en desarrollo. Un inconveniente clave es que, con frecuencia, las proteínas PEGiladas solo sostienen una fracción de la actividad de la proteína nativa, ya que el PEG está unido directamente o está ubicado cerca de los sitios de la proteína que se requieren para la actividad. Por ejemplo, el interferon- α_{2a} PEGilado (Pegasys® de Roche) e interferon- α_{2b} PEGilado (Pegintron® de Schering), que son medicamentos aprobados, tienen solo el 6 % y el 28 % de la actividad de sus correspondientes interferones no modificados, respectivamente, y la asparaginasa PEGilada (Oncaspar® de Enzon), un tratamiento aprobado contra el cáncer, tiene solo el 50 % de la actividad de la asparaginasa no modificada. Además, los métodos de PEGilación dan como resultado una unión irreversible del PEG a la proteína, de manera que la proteína se modifica permanentemente en su forma de PEG-proteína de actividad más baja, y no se libera en una forma más activa. Como tal, la PEGilación requiere una selección cuidadosa del sitio de modificación del fármaco proteico para minimizar la pérdida de actividad.

Otras formas de aumentar la semivida del fármaco incluyen la producción de proteínas de fusión (por ejemplo, albúmina-IFN) o la adición de nuevos sitios de glicosilación a proteínas (por ejemplo, eritropoyetina glicosilada) a través de la manipulación genética, así como la modificación química para entrecruzar, estabilizar y polimerizar proteínas (por ejemplo, hemoglobina polimerizada con o-rafinosa o glutaraldehído). Cada uno de estos enfoques requiere una selección cuidadosa del sitio de modificación para minimizar la pérdida de actividad de la proteína.

La modificación de polisacáridos de las proteínas también se ha utilizado para aumentar la semivida de las proteínas. Los polisacáridos son macromoléculas naturales que pueden ser más biocompatibles que los polímeros sintéticos utilizados para la conjugación de proteínas. En un proceso típico de conjugación de polisacáridos, los dioles vecinos del polisacárido se oxidan para formar aldehídos que pueden reaccionar con las aminas de la proteína mediante un proceso de aminación reductora para formar enlaces de amina secundaria estables. El polisacárido oxidado reacciona inicialmente con la proteína para producir un intermedio de imina que se reduce en las condiciones de reacción a un enlace estable de amina secundaria. Los agentes reductores típicos utilizados para llevar a cabo el proceso de aminación reductora incluyen cianoborohidruro de sodio, borohidruro de sodio y dimetilamino borano, entre otros. Por ejemplo, la patente US 4.356.170 describe un enlace covalente de una proteína a un polisacárido antigénico oxidado a través de un enlace amina formado por aminación reductora para formar un conjugado estable. La formación de un conjugado estable que no se disocia en condiciones fisiológicas es importante porque los autores informan de un conjugado oxidado de polisacárido y toxoide tetánico que mostró propiedades inmunológicas mejoradas en comparación con el antígeno polisacárido inicial. La patente US

- 2005/0063943 describe un conjugado de hidroxialquil almidón unido covalentemente a un agente activo (como una proteína) a través de un enlace amina formado por aminación reductora. La patente US 2005/0063943 también describe el uso de un unidor para conectar indirectamente el almidón de hidroxialquilo a un agente activo mediante aminación reductora. La patente US 2007/0134197 describe conjugados de hidroxialquil almidón y una proteína formada por aminación reductora. La conjugación se realizó mediante la unión de un solo punto entre el hidroxialquil almidón y la proteína. Bajo las condiciones de aminación reductora descritas, el hidroxialquil almidón y la proteína producen inevitablemente un producto de amina secundaria. La importancia de usar condiciones reductoras se demostró mediante una reacción de control entre un aldehído-hidroxietyl almidón y eritropoyetina (EPO), que no produjo ningún conjugado en ausencia de agentes reductores. La patente US 5.177.059 describe la conjugación de polimixina B a dextrano a través de un enlace carbamato o un enlace amina mediante aminación reductora. En cada uno de estos casos, la aminación reductora se utiliza para formar conjugados de proteínas con polisacárido oxidado. Sin embargo, dichos enlaces amina no son reversibles (es decir, el enlace entre el polisacárido oxidado y la proteína no se disocia por procesos como la hidrólisis no enzimática o transaminación en condiciones fisiológicas).
- Las proteínas también se han conjugado con polisacáridos oxidados sin reducción para formar conjugados unidos a imina. La patente US 5.554.730 describe un método para preparar una micropartícula conjugada de polisacárido inmunogénico estable y proteína. Este método oxida un polisacárido y a continuación lo combina con una proteína para formar un conjugado de base de Schiff. Este método requiere la presencia de un agente de hacinamiento macromolecular para formar la micropartícula conjugada. El polisacárido se selecciona entre antígenos bacterianos capaces de inducir una respuesta inmune cuando se acopla a una proteína. Por lo tanto, para producir la respuesta inmune deseada, es importante seleccionar los componentes que forman un conjugado que no se disocia fácilmente en condiciones fisiológicas. De hecho, en el único ejemplo, un polisacárido capsular inmunogénico derivado de bacterias se conjuga con una proteína, el toxoide tetánico, que también es inmunogénico. La patente US 6.011.008 describe conjugados preparados oxidando polisacáridos tales como dextrano o arabinogalactano en un dialdehído y haciéndolos reaccionar con un fármaco o polipéptido de bajo peso molecular para formar un conjugado de base de Schiff. Este método tiene como objetivo proporcionar un conjugado soluble en agua estable cuya actividad biológica sea comparable a la actividad de la sustancia libre. Por lo tanto, se seleccionaron componentes que no se disocian fácilmente una vez que se forma un conjugado. El grado de oxidación en el dialdehído varió del 5 al 50 %. El dextrano y el arabinogalactano contienen grandes cantidades de unidades monoméricas de 1,2,3-triol que, al oxidarse, forman alfa-hidroxi aldehídos que pueden formar enlaces irreversibles a los polipéptidos en ausencia de reducción. Dichos enlaces irreversibles se forman por un reordenamiento de Amadori. Estos enlaces irreversibles limitan la liberación o disociación de la proteína del conjugado. La liberación de proteínas fue inferior al 30 % en todos los ejemplos de conjugados no reducidos en la patente US 6.011.008. La patente US 6.956.119 describe conjugados preparados por polisacáridos parcialmente oxidantes como el dextrano o el manano y haciéndolos reaccionar con un polipéptido antigénico. En particular, la patente US 6.0956.119 enseña a seleccionar el manano como el polisacárido para que el conjugado correspondiente sea captado por las células que transportan el receptor de manosa. Tanto el dextrano como el manano contienen unidades monoméricas de 1,2,3-triol que, al oxidarse, forman alfa-hidroxi aldehídos que pueden formar enlaces irreversibles a los polipéptidos.
- Singh et al., Journal of Biomedical Research, vol. 15, 1981, pp. 655-661 describe la inmovilización de la insulina en una matriz de celulosa oxidada con peryodato (matriz OC). Se examinó el perfil de liberación *in vivo* e *in vitro*. La hormona se unió a la matriz por la formación de enlaces de Schiff, y se liberó por hidrólisis de este enlace, así como por la degradación de la matriz OC. Se encontró que la liberación podría mantenerse durante períodos más largos reduciendo la base de Schiff con NaBH₄.
- Balakrishnan et al., Biomaterials, vol. 26, 2005, pp. 3941-3951 describe un material de hidrogel derivado de alginato oxidado y gelatina. Se demostró que el alginato de sodio oxidado con peryodato se reticula rápidamente con gelatina en presencia de pequeñas concentraciones de tetraborato de sodio.
- Ikada et al., Journal of Biomedical Materials Research, vol. 13, 1979, pp. 607-622 describe un estudio sobre el acoplamiento de proteínas a superficies de polímeros con el uso de almidón oxidado. Las proteínas se acoplaron a membranas de hidrogel de poli (alcohol vinílico) reticuladas y películas de copolímero de etileno-alcohol vinílico (EVA) que se injertaron previamente con almidones oxidados que tienen muchos grupos aldehídos colgantes.
- La patente CA 2 326 715 describe conjugados de hemoglobina útiles como portadores de oxígeno basados en hemoglobina que se preparan haciendo reaccionar la hemoglobina con polisacáridos de anillo abierto oxidativamente, como hidroxietyl almidón o dextrano, y almacenando el conjugado resultante en condiciones que le permiten transformarse en un producto de menor peso molecular después de la conjugación. El conjugado se estabiliza de manera reductora para formar enlaces amino secundarios entre la hemoglobina y el polisacárido.
- La patente CA 1 158 159 describe una composición para la administración de liberación controlada de un compuesto biológicamente activo a un animal, que comprende una combinación del compuesto biológicamente activo y el almidón de hidroxialquilo.
- La patente CA 2 558 725 describe conjugados de hidroxialquil almidón y una proteína, en donde los conjugados se forman por un enlace covalente entre el hidroxialquil almidón y la proteína.

Ferreira E. I. et al., Starke-Starch, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, DE, vol. 44, n.º 1, 1992, pp. 21-24 describe la síntesis de derivados de imina de almidón oxidado con antimaláricos.

5 La patente DE 101 12 825 describe compuestos que comprenden un conjugado de hidroxialquil almidón y un agente activo en donde el hidroxialquil almidón está directamente unido covalentemente al agente activo, o por medio de un unidor.

10 Todos los métodos actuales para modificar proteínas para aumentar la semivida tienen limitaciones que pueden abordarse mediante estrategias alternativas de modificación de proteínas. La composición ideal de un conjugado polímero-proteína para aumentar la semivida de la proteína y la actividad sostenida es aquella en donde la mayoría de los enlaces polímero-proteína son reversibles. Dichos enlaces entre el polímero y la proteína se disocian por procesos tales como hidrólisis, escisión o transaminación no enzimática en condiciones fisiológicas. Dichos conjugados evitan los problemas de disminución de la actividad observados con muchos conjugados conocidos. Por lo tanto, existe la necesidad de conjugados que unan reversiblemente una proteína a un portador que permita una mayor semivida de la proteína y permitan la liberación de la proteína en una forma activa para proporcionar una actividad sostenida.

15 Los inventores han descubierto un método eficaz y ampliamente aplicable para preparar composiciones de conjugados de polisacáridos y proteínas reversibles y aumentar la semivida de las proteínas y mantener la actividad. El método no requiere la selección del sitio de modificación según sea necesario para muchos de los métodos informados anteriormente. Las composiciones se preparan utilizando polisacáridos, como aquellos con bajos contenidos de 1,2,3-triol, que no forman cantidades significativas de alfa-hidroxi aldehídos tras la oxidación para minimizar la formación de enlaces irreversibles en ausencia de reducción. Las proteínas reaccionan fácilmente con el polisacárido oxidado para producir conjugados con el tamaño óptimo del producto y la carga de proteínas, estabilidad mejorada y bioactividad sostenida. Mediante la selección apropiada de las condiciones de reacción polisacárido-proteína, la estabilidad del conjugado puede ajustarse para proporcionar el perfil de liberación de proteína deseado.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso como agente terapéutico o de diagnóstico, en donde la composición comprende un polisacárido oxidado y una proteína; donde menos del 20 % del total de unidades monoméricas de polisacárido oxidado contienen unidades de alfa-hidroxi aldehído, y en donde el polisacárido oxidado y la proteína se conjugan a través de uno o más enlaces imina; en donde la composición de polisacárido oxidado-proteína es soluble a pH fisiológico en un disolvente acuoso y la composición es capaz de liberar la proteína; y en donde el polisacárido oxidado se selecciona entre almidón oxidado y derivados de hidroxihidrocarbilo oxidados de almidón.

25 También se describe en el presente documento una composición de polisacárido oxidado-proteína obtenida mediante un método como se describe en el presente documento.

30 Como se describe en este documento, la composición de polisacárido oxidado-proteína sirve para su uso en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o afección. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona entre deficiencia hormonal, hemostasia, trombosis, deficiencia de enzimas metabólicas, trastorno pulmonar, trastorno gastrointestinal, inmunodeficiencia, hematopoyesis, trastornos de fertilidad, inmunorregulación, trastornos endocrinos, hemofilia, choque, regulación del crecimiento, cáncer, trasplante, enfermedades infecciosas, inflamación y detoxificación.

35 Las composiciones de polisacárido-proteína, sus procesos de preparación y usos como se describen en el presente documento ofrecen varias ventajas sobre las de los conjugados de proteínas previamente descritos. Los conjugados previos preparados mediante el enlace de una proteína a polímeros como PEG y polisacárido tienen una menor actividad proteica como resultado de la modificación irreversible de los sitios en la proteína esencial para la actividad. Dichos conjugados tenían actividad proteica reducida tras el análisis o después de la administración. Los intentos de limitar esta disminución de la actividad requieren métodos químicos específicos del sitio y una selección cuidadosa de los sitios específicos de unión del polímero en la proteína. Por lo tanto, en el campo de las composiciones terapéuticas de proteínas conjugadas destinadas a aumentar la semivida y la duración de la actividad *in vivo*, existe la necesidad de conjugados de polisacáridos y proteínas con la capacidad de recuperar la actividad o aumentar la actividad después de la administración, al minimizar el número de enlaces irreversibles entre el polisacárido y la proteína.

40 Las composiciones descritas en el presente documento comprenden una mezcla soluble de una proteína y un polisacárido, en donde la composición permite la liberación sostenida de proteína en la circulación con todos los beneficios añadidos de dicha tecnología de liberación sostenida. La composición comprende preferiblemente una combinación de una proteína y un polisacárido en donde la composición es capaz de liberar la proteína en una forma activa. La actividad de la proteína puede disminuir inicialmente como resultado del enlace con el polisacárido, y la actividad perdida puede recuperarse parcial o totalmente tras la liberación de la forma de conjugado polisacárido-proteína unida. De esta manera, la actividad específica de la proteína total puede aumentar después de la

- administración. El conjugado de polisacárido y proteína unido está compuesto por moléculas de polisacárido oxidadas unidas covalentemente a moléculas de proteína a través de enlaces que permiten la liberación de la proteína del componente de polisacárido. Los enlaces son enlaces imina (también conocidos como bases de Schiff o azometinas), que pueden liberarse o disociarse mediante hidrólisis no enzimática o transaminación a través de péptidos, aminoácidos, proteínas u otras aminas endógenas en plasma. Los enlaces se forman entre los grupos aldehído en el polisacárido oxidado y los grupos amino en la proteína por condensación en condiciones seleccionadas. Estos enlaces preferiblemente representan la totalidad o la mayoría de los enlaces en la composición.
- Las composiciones que comprenden el conjugado se ajustan preferiblemente a un pH, fuerza iónica y concentración para mantener la mayoría de la proteína total en la forma de conjugado de polisacárido-proteína unida antes de la administración a un animal o uso en condiciones que requieren la liberación de la proteína de la composición.
- Se encontró que las propiedades del conjugado estaban controladas a través de la selección de parámetros de reacción que incluían el grado de oxidación del polisacárido, el tamaño y la polidispersidad del polisacárido, el grado de hidroxietilación, la proporción de polisacárido oxidado a la proteína, la concentración de la proteína, así como el pH, la temperatura y el tiempo de reacción. Se ha encontrado que estas condiciones de reacción afectan las propiedades del conjugado o de las composiciones que comprenden el conjugado. La selección de los parámetros de reacción se utiliza para controlar las propiedades de la composición, incluida la cantidad de proteína conjugada con el polisacárido, la velocidad de liberación de la proteína, la actividad de la proteína modificada en la composición, el perfil de actividad en el tiempo de la proteína en soluciones que contienen la composición, la semivida circulatoria de la proteína y su biodistribución y actividad *in vivo*, así como la estabilidad, solubilidad e inmunogenicidad de la proteína.
- Composición
- Preferiblemente, la composición de polisacárido oxidado-proteína se obtiene mediante un método como se describe en el presente documento.
- En algunos aspectos, la composición puede comprender además una proteína no conjugada.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende:
- (i) un conjugado de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el presente documento; y
 - (ii) proteína no conjugada;
- en donde la proteína no conjugada (ii) proporciona actividad inicial y la proteína conjugada (i) proporciona actividad sostenida.
- En el presente documento se describe un método para proporcionar una actividad mejorada de una proteína en un paciente que comprende la etapa de administrar a un sujeto una composición como se describe en el presente documento.
- En el presente documento también se describe un método para proporcionar una actividad mejorada de una proteína en un paciente que comprende la etapa de administrar a un sujeto una composición que comprende:
- (i) un conjugado de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el presente documento; y
 - (ii) proteína no conjugada
- en donde la proteína no conjugada (ii) proporciona actividad inicial y la proteína conjugada (i) proporciona actividad sostenida.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende:
- (i) un conjugado de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el presente documento; y
 - (ii) proteína no conjugada;
- para su uso en el tratamiento de una enfermedad, en donde después de la administración de la composición, la proteína no conjugada (ii) proporciona actividad inicial y la proteína conjugada (i) proporciona actividad sostenida.
- Preferiblemente, la proteína conjugada (i) mejora la semivida circulatoria ($t_{1/2}$) en relación con la semivida circulatoria de la proteína no conjugada.
- Por lo tanto, dependiendo del nivel de purificación aplicado o la duración de la reacción, la composición puede contener una fracción del contenido de proteína total en forma no conjugada (es decir, en forma no unida o libre), ya

5 sea por adición de la proteína o en forma de proteína residual sin reaccionar de la reacción del polisacárido oxidado con la proteína o en forma de proteína no conjugada (o libre) en equilibrio con la forma unida reversiblemente en el conjugado. Una fracción de proteína libre en la composición puede proporcionar actividad inmediata tras la administración de la composición, y también puede existir en equilibrio con la forma de proteína unida reversiblemente para mantener una fracción de la proteína total en forma unida.

La composición también puede comprender un excipiente adecuado para la administración a un ser humano o un animal. Dichos excipientes podrían incluir aminoácidos u otras proteínas.

10 Adecuadamente, la relación y la concentración de proteína no conjugada a proteína conjugada con polisacárido en la composición se controlan para mantener una proporción sustancial de la proteína en la forma conjugada. Preferiblemente, la proporción de la proteína en la forma conjugada es mayor o igual al 50 %; preferiblemente mayor o igual al 60 %; preferiblemente mayor o igual al 70 %; preferiblemente mayor o igual al 80 %; preferiblemente mayor o igual al 90 %.

15 La concentración de proteína total en la composición se puede ajustar para mantener una relación de equilibrio de proteína no conjugada a proteína unida a polisacárido de menos de 0,5:1; preferiblemente menos de 0,4:1; preferiblemente menos de 0,3:1; preferiblemente menos de 0,2:1; preferiblemente menos de 0,1:1.

20 Preferiblemente, la composición es una formulación líquida.

Como se describe en el presente documento, la composición es soluble en disolvente acuoso a pH fisiológico; preferiblemente soluble en ausencia de glicol, polivinilpirrolidona y/o agentes de hacinamiento macromoleculares.

25 Preferiblemente, la composición de polisacárido oxidado-proteína comprende además al menos una proteína adicional y cada proteína se conjuga con el polisacárido oxidado a través de uno o más enlaces imina. Preferiblemente hay una proteína adicional. Adecuadamente, la proteína es la estreptoquinasa y la proteína adicional es la albúmina.

30 Conjugado

En este documento se describe un método para preparar un conjugado de polisacárido oxidado-proteína que comprende las etapas de:

35 (a) oxidar un polisacárido con un agente oxidante para formar un polisacárido oxidado; y

(b) hacer reaccionar el polisacárido oxidado con una proteína para formar un conjugado en donde el polisacárido oxidado y la proteína se conjugan a través de uno o más enlaces imina; y en donde el polisacárido oxidado esencialmente no comprende unidades de alfa-hidroxi aldehído; y opcionalmente

40 (c) reducir el pH del conjugado de polisacárido oxidado-proteína a un pH de 5 a 6 para los fines de formulación.

También se describe en el presente documento un conjugado de polisacárido oxidado-proteína preparado por un método como se describe en el presente documento.

45 Según la invención, se proporciona un conjugado de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o afección en donde el conjugado comprende una proteína conjugada con el polisacárido oxidado a través de uno o más enlaces imina.

50 El conjugado de polisacárido oxidado-proteína es soluble en solvente acuoso a pH fisiológico; preferiblemente soluble en ausencia de glicol, polivinilpirrolidona y/o agentes de hacinamiento macromoleculares.

Preferiblemente, el conjugado de polisacárido oxidado-proteína tiene un tamaño de menos de 0,1 μm ; preferiblemente menos de 0,09 μm ; preferiblemente menos de 0,08 μm ; preferiblemente menos de 0,07 μm .

55 Preferiblemente, el polisacárido oxidado y la proteína se conjugan a través de dos o más enlaces imina.

Semivida

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición o conjugado de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el presente documento, en donde la semivida circulatoria ($t_{1/2}$) de una proteína que está conjugada aumenta en relación con la semivida circulatoria de una proteína no conjugada.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición o conjugado de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el presente documento en donde la semivida circulatoria ($t_{1/2}$) o la bioactividad de una proteína

que está conjugada aumenta en relación con la semivida o actividad circulatoria de una proteína no conjugada liberando gradualmente la proteína del conjugado a lo largo del tiempo.

5 Adecuadamente, la composición permite la liberación gradual de una proteína activa en circulación.
 Adecuadamente, la composición permite la liberación gradual de una proteína activa en circulación a pH fisiológico.
 Adecuadamente, la liberación gradual se produce mediante procesos tales como hidrólisis no enzimática o
 transiminación en condiciones fisiológicas. Los polisacáridos adecuadamente oxidados con diversos grados de
 oxidación como se describe en el presente documento se conjugan con la proteína para permitir la liberación gradual
 10 de la proteína en circulación. Los polisacáridos adecuadamente oxidados con pesos moleculares promedio en peso
 variables, como se describe en el presente documento, se conjugan a la proteína para permitir la liberación gradual
 de la proteína en circulación.

Usos

15 En un aspecto adicional, se proporciona una composición de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el
 presente documento para su uso como agente terapéutico o de diagnóstico, en donde el polisacárido oxidado está
 presente en la composición en una cantidad suficiente para prolongar la biodisponibilidad y/o la bioactividad de la
 proteína en la circulación de un sujeto.

20 En un aspecto adicional, se proporciona una composición de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el
 presente documento para su uso como agente terapéutico o de diagnóstico, en donde la semivida circulatoria ($t_{1/2}$) o
 la bioactividad de una proteína que está conjugada se potencia en relación con la semivida circulatoria de una
 proteína no conjugada.

25 En un aspecto adicional, se proporciona una composición de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el
 presente documento para su uso como agente terapéutico o de diagnóstico, en donde la composición comprende un
 conjugado tal que la semivida circulatoria ($t_{1/2}$) o bioactividad de una proteína que se conjuga se potencia en relación
 con la semivida circulatoria de una proteína no conjugada.

30 En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende:

- (i) un conjugado de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el presente documento; y
- (ii) proteína no conjugada;

35 para su uso en el tratamiento de una enfermedad,
 en donde después de la administración de la composición, la proteína no conjugada (ii) proporciona actividad inicial
 y la proteína conjugada (i) proporciona actividad sostenida.

40 Los conjugados, composiciones y procesos se pueden utilizar de la siguiente manera (independientemente o en
 combinación):

- como agente terapéutico o diagnóstico para su uso humano.
- para incrementar la semivida de la proteína.
- para incrementar la actividad de la proteína *in vitro*.
- 45 • para preservar la actividad de la proteína *in vitro*.
- para incrementar la actividad de la proteína *in vivo*.
- para preservar la actividad de la proteína *in vivo*.
- para sostener la actividad de la proteína.
- para sostener la actividad de la proteína en donde la actividad sostenida es un resultado de la liberación de
 50 proteína en plasma.
- para retrasar la actividad de la proteína.
- para administrar la proteína con actividad reducida en comparación con la proteína no conjugada, en donde la
 actividad de la proteína se recupera o aumenta después de la administración.
- para administrar una enzima con actividad específica total reducida en comparación con la enzima no conjugada,
 55 en donde la actividad específica total aumenta después de la administración.
- para proporcionar una forma latente de una enzima, que se vuelve más activa durante la circulación en el cuerpo.
- para proporcionar una forma de proteína que tiene una capacidad reducida para interactuar con agentes de
 activación o inhibidores endógenos, en donde esta capacidad se recupera después de la administración.
- para proporcionar una forma de proteína que tiene una capacidad reducida para interactuar con sustratos o
 60 receptores o ligandos endógenos, en donde esta capacidad se recupera después de la administración.
- para estabilizar la proteína.
- para disminuir temporalmente la actividad de la proteína.
- para aumentar la solubilidad de la proteína.

En un aspecto, se proporciona el uso de una composición de polisacárido oxidado-proteína descrita en el presente documento para solubilizar insulina.

Polisacárido

5 Preferiblemente, el polisacárido es un polisacárido que esencialmente no contiene unidades monoméricas de 1,2,3-triol (definidas como R-CHOH-CHOH-CHOH-R'). Las unidades monoméricas de 1,2,3-triol también se conocen como unidades monoméricas alfa-beta-gamma-triol.

10 La condición de que el polisacárido no contenga esencialmente unidades monoméricas de 1,2,3-triol significa que preferiblemente menos de aproximadamente el 20 % de las unidades totales de monómero del polisacárido son unidades monoméricas de 1,2,3-triol. Preferiblemente, menos de aproximadamente el 15 % de las unidades monoméricas de polisacárido totales son unidades monoméricas de 1,2,3-triol; preferiblemente menos de aproximadamente el 10 %; preferiblemente menos de aproximadamente el 5 %; preferiblemente menos de aproximadamente el 3 %; preferiblemente menos de aproximadamente el 2 %; preferiblemente menos de aproximadamente el 1 % son unidades monoméricas de 1,2,3-triol.

20 La cantidad de unidades monoméricas de 1,2,3-triol se puede calcular a partir de una consideración del polisacárido particular que se está utilizando. Por ejemplo, el hidroxietil almidón (HES) está compuesto de amilopectina de almidón de maíz natural y consiste en monómeros de D-glucosa unidos por enlaces lineales α 1,4. Normalmente, en el HES, aproximadamente la mitad de los monómeros de glucosa están hidroxietilados en uno o más de sus grupos hidroxilo a través de un proceso de hidroxietilación industrial, para minimizar la degradación del HES por la amilasa *in vivo*. También se pueden usar relaciones de hidroxietilación más altas o más bajas para preparar HES. Los monómeros de glucosa unidos en α 1,4 (unidos a monómeros de glucosa vecinos en los grupos hidroxilo C1 y C4, y también en C6 si están en un punto de ramificación) contienen grupos diol vecinos (en C2 y C3), pero no grupos 1,2,3-triol. Los puntos finales de la ramificación contienen grupos 1,2,3-triol (en C2, C3 y C4) y pueden formar grupos alfa-hidroxi aldehído tras la oxidación, que sufrirían la transposición de Amadori si reaccionan con la proteína. Asimismo, el primer monómero en el polímero también contiene un grupo 1,2,3-triol (en C1, C2 y C3).

30 La información relevante para calcular la cantidad de unidades monoméricas de 1,2,3-triol, como la frecuencia de ramificación, se puede estimar a partir de estudios estructurales utilizando una combinación de oxidación e hidrólisis de peryodato seguido de un análisis de ácido fórmico, formaldehído y otros fragmentos (por ejemplo, véase "Periodate Oxidation of Diol and Other Functional Groups" de Glenn Dryhurst, Vol. 2 en la serie "Monographs in Organic Functional Group Analysis", Pergamon Press, 1970).

35 La frecuencia de ramificación en el HES es 1 en cada 17-20 monómeros. Por lo tanto, ~5-6 % de todos los monómeros de glucosa en el HES serían puntos finales. Sin embargo, no todos estos contienen grupos 1,2,3-triol, debido a la hidroxietilación en el HES. Dado que solo ~5-6 % de los monómeros de glucosa son grupos terminales, y la mitad de ellos están hidroxietilados, y debido a que la modificación del grupo hidroxilo C2 representa al menos dos tercios de la hidroxietilación en el HES, entonces ~3 % de los monómeros de HES contendrán grupos 1,2,3-triol.

El polisacárido se selecciona entre almidón y sus derivados de hidroxihidrocarbilo.

45 El polisacárido se selecciona entre almidón y sus derivados hidroxialquílicos. En los polisacáridos que contienen grupos 1,2,3-triol, la hidroxialquilación de uno o más de los grupos hidroxilo en el triol evitará la oxidación del triol, y evitará la formación de grupos alfa-hidroxi aldehído tras la oxidación.

Preferiblemente, el polisacárido se selecciona entre almidón y hidroxialquil almidón.

50 Preferiblemente, el polisacárido es hidroxietil almidón.

El polisacárido puede seleccionarse entre polisacáridos que contienen grupos diol vecinos que pueden oxidarse para formar dialdehídos, y excluyendo polisacáridos como el dextrano y otros polisacáridos similares que, después de la oxidación, pueden formar enlaces irreversibles con proteínas a través de la transposición de Amadori.

55 El polisacárido a usar en la presente invención puede modificarse opcionalmente antes de la oxidación para alterar sus propiedades de estabilidad y biodistribución, por ejemplo, mediante hidroxietilación y mediante la selección del grado y la ubicación de estas modificaciones.

60 Una amplia gama de proteínas puede beneficiarse de las diversas modificaciones del polisacárido, incluidas aquellas que requieren la liberación de proteínas no modificadas para una actividad óptima, proteínas que se benefician de la polimerización para aumentar la actividad o para presentaciones múltiples de la proteína en la superficie del conjugado, o para aumentar la semivida y reducir el aclaramiento. A través del diseño apropiado, la modificación del polisacárido idealmente puede ser adecuada para aumentar la semivida de la enzima mientras mantiene la actividad, o enmascara la actividad hasta su liberación.

65

Preferiblemente, los polisacáridos oxidados son polifuncionales, lo que significa que se oxida más de un monómero de azúcar. Cuando se oxida más de un monómero de azúcar, se forman más de dos grupos aldehído en el polisacárido. La polifuncionalidad permite la polimerización a través del polisacárido, o permite múltiples puntos de unión entre el polisacárido oxidado y la proteína. El grado de polifuncionalidad del polisacárido oxidado se controla mediante el grado de oxidación del polisacárido; niveles más altos de oxidación producen niveles más altos de polifuncionalidad. Una polifuncionalidad más alta puede proporcionar más sitios de unión entre el polisacárido oxidado y la proteína, y por lo tanto influye en el grado de modificación y la velocidad de liberación de la proteína del polisacárido oxidado, con un mayor número de puntos de unión que proporcionan una velocidad de liberación de la proteína más lenta.

Preferiblemente, el polisacárido es un polisacárido ramificado. Preferiblemente, el grado de ramificación se produce a menos de 1 en 30 unidades monoméricas; preferiblemente menos de 1 en 25 unidades monoméricas; preferiblemente menos de 1 en 20 unidades monoméricas; preferiblemente menos de 1 en 15 unidades monoméricas; preferiblemente menos de 1 en 10 unidades monoméricas; preferiblemente menos de 1 en 5 unidades monoméricas.

Derivados del hidroxihidrocarbilo

Los derivados de hidroxihidrocarbilo de polisacáridos son derivados en los que un grupo -OH del polisacárido se ha sustituido con un grupo -O-R₁-OH, en donde -R₁- es un grupo hidrocarbilo.

El término "grupo hidrocarbilo" como se usa en este documento significa un grupo que comprende al menos C y H. Además, el grupo hidrocarbilo puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes adecuados adicionales. Los ejemplos de dichos sustituyentes pueden incluir halo, alcoxi, nitro, un grupo hidrocarburo, un grupo N-acilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarbilo comprende más de un C, entonces esos carbonos no necesitan estar necesariamente unidos entre sí. Por ejemplo, al menos dos de los carbonos pueden estar unidos a través de un elemento o grupo adecuado. Por lo tanto, el grupo hidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno.

En una realización preferida de la presente invención, el grupo hidrocarbilo es un grupo hidrocarburo.

En el presente documento el término "hidrocarburo" significa cualquiera de un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo acilo. El grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo acilo puede ser lineal, ramificado o cíclico, o un grupo arilo. El término hidrocarburo también incluye aquellos grupos, pero en los que se han sustituido opcionalmente. Si el hidrocarburo es una estructura ramificada que tiene uno o más sustituyentes en el mismo, entonces la sustitución puede ser en el esqueleto del hidrocarburo o en la ramificación; alternativamente, las sustituciones pueden estar en el esqueleto de hidrocarburo y en la ramificación.

Preferiblemente, el grupo hidroxihidrocarbilo es un grupo hidroxialquilo.

Preferiblemente, el grado de sustitución del grupo hidroxihidrocarbilo en el polisacárido es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,9; preferiblemente de aproximadamente 0,09 a aproximadamente 0,8; preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,7; preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,6.

Derivados hidroxialquílicos

Los derivados hidroxialquílicos de los polisacáridos son derivados en los que un grupo -OH del polisacárido se ha reemplazado por un grupo -OR₂-OH, en donde -R₂-OH es un grupo hidroxialquilo.

Cuando está presente un grupo hidroxialquilo, preferiblemente el grupo hidroxialquilo tiene de 1 a 10 átomos de carbono. El grupo hidroxialquilo puede ser lineal o ramificado. Preferiblemente, el grupo hidroxialquilo se selecciona entre grupos hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo e hidroxibutilo. Más preferiblemente, el grupo hidroxialquilo es un grupo hidroxietilo.

Preferiblemente, el grado de sustitución del grupo hidroxialquilo en el polisacárido es de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,9; preferiblemente de aproximadamente 0,09 a aproximadamente 0,8; preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,7; preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,6.

Grado de oxidación

Preferiblemente, el grado de oxidación del polisacárido oxidado es del 1 al 100 %; más preferiblemente del 10 al 100 %.

En algunos aspectos, preferiblemente el grado de oxidación del polisacárido oxidado es de al menos aproximadamente el 20 %; al menos aproximadamente el 25 %; al menos aproximadamente el 30 %; al menos aproximadamente el 40 %; al menos aproximadamente el 50 %; al menos aproximadamente el 60 %; al menos aproximadamente el 70 %; al menos aproximadamente el 75 %; al menos aproximadamente el 80 %; al menos aproximadamente el 90 %.

En un aspecto, preferiblemente el grado de polisacárido oxidado es del 50 % o del 100 %.

Peso molecular promedio en peso del polisacárido

Preferiblemente, el peso molecular promedio en peso del polisacárido es de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 kDa. Preferiblemente, el peso molecular promedio en peso del polisacárido es de aproximadamente 8 a aproximadamente 2000 kDa; preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 kDa; preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 750 kDa; preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 kDa; preferiblemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 kDa; preferiblemente de aproximadamente 125 a aproximadamente 250 kDa.

En un aspecto, el peso molecular promedio en peso del polisacárido es de aproximadamente 1, aproximadamente 10, aproximadamente 25, aproximadamente 70, aproximadamente 125,8, aproximadamente 130, aproximadamente 200, aproximadamente 250 o aproximadamente 450 kDa.

Preferiblemente, el peso molecular promedio en peso del polisacárido es de aproximadamente 200 kDa.

El peso molecular promedio en peso (PMPP) del polisacárido se puede seleccionar para controlar el peso molecular de la composición, la semivida circulatoria y la biodistribución, así como la estabilidad y la carga de proteínas. La polidispersidad del peso molecular del polisacárido también se puede seleccionar con un efecto similar en las propiedades de la proteína.

Polisacárido oxidado

El polisacárido oxidado esencialmente no contiene unidades de alfa-hidroxi aldehído.

Esta condición de que el polisacárido oxidado esencialmente no contiene unidades de alfa-hidroxi aldehído significa que menos de aproximadamente el 20 % de las unidades totales de monómero de polisacárido oxidado contienen unidades de alfa-hidroxi aldehído. Preferiblemente, menos de aproximadamente el 15 % de las unidades monoméricas de polisacárido oxidado total contienen unidades de alfa-hidroxi aldehído; preferiblemente menos de aproximadamente el 10 %; preferiblemente menos de aproximadamente el 5 %; preferiblemente menos de aproximadamente el 3 %; preferiblemente menos de aproximadamente el 2 %; preferiblemente menos de aproximadamente el 1 %.

La cantidad de unidades de alfa-hidroxi aldehído se puede calcular a partir de la consideración del polisacárido particular que se está utilizando. Por ejemplo, el hidroxietil almidón (HES) está compuesto de amilopectina de almidón de maíz natural y consiste en monómeros de D-glucosa unidos por enlaces lineales α 1,4. Normalmente, en el HES, aproximadamente la mitad de los monómeros de glucosa están hidroxietilados en uno o más de sus grupos hidroxilo. Se pueden usar relaciones de hidroxietilación más altas o más bajas para preparar HES. Los monómeros de glucosa unidos en α 1,4 (unidos a monómeros de glucosa vecinos en los grupos hidroxilo C1 y C4, y también en C6 si están en un punto de ramificación) contienen grupos diol vecinos (en C2 y C3), pero no grupos 1,2,3-triol. La oxidación de los dioles vecinos no produce alfa-hidroxi aldehídos, que son necesarios para que se produzca la transposición de Amadori tras la reacción con la proteína. Los puntos finales de la ramificación contienen grupos 1,2,3-triol (en C2, C3 y C4) y pueden formar grupos alfa-hidroxi-aldehído tras la oxidación, que sufrirían la transposición de Amadori si reaccionan con la proteína. Asimismo, el primer monómero en el polímero también contiene un grupo 1,2,3-triol (en C1, C2 y C3).

Se puede encontrar un método para medir el grado de hidroxialquilación en Sommermeyer, K., Cech, F., Schmidt, M., Weidler, B.: "Hydroxyethyl starch in clinical use: A physical-chemical characterization" (Original en alemán), Krankenhauspharmazie 8: 271 (1987).

La frecuencia de ramificación en el HES es 1 en cada 17-20 monómeros. Por lo tanto, ~5-6 % de todos los monómeros de glucosa en el almidón serían puntos finales. Sin embargo, no todos estos serían oxidables, debido a la hidroxietilación en el HES. La hidroxietilación de cualquiera de los grupos hidroxilo C2, C3 o C4 (miembros del 1,2,3-triol) de un monómero terminal evitará la oxidación a un alfa-hidroxi aldehído. Dado que solo el ~5-6 % de los monómeros de glucosa son grupos terminales, y la mitad de ellos están hidroxietilados, y debido a que la modificación del grupo hidroxilo C2 representa al menos dos tercios de la hidroxietilación en el HES, entonces el ~3 % de los monómeros HES podrían oxidarse para formar alfa-hidroxi aldehídos. En otras palabras, en un compuesto típico de HES, solo el 3 % de los monómeros de HES podrían formar enlaces irreversibles con las proteínas.

Las unidades de alfa-hidroxi aldehído pueden formarse por la oxidación parcial de 1,2,3-trioles.

Preferiblemente, el polisacárido oxidado tiene dos o más sitios para la conjugación con la proteína. Por lo tanto, preferiblemente el polisacárido oxidado permite la unión multidentada a la proteína.

5

Relación de polisacárido oxidado a proteína

Preferiblemente, la relación de polisacárido oxidado a proteína es de 0,01:1 a 100:1; preferiblemente la relación es de 0,1:1 a 20:1; preferiblemente la relación es de 0,2:1 a 17,5:1; preferiblemente de 0,3:1 a 16:1; preferiblemente de 0,4:1 a 15:1; preferiblemente de 0,5:1 a 12:1, preferiblemente de 0,6:1 a 10:1; preferiblemente de 0,7:1 a 9:1; preferiblemente de 0,8:1 a 8:1.

10

Dependiendo de la relación de polisacárido oxidado a proteína seleccionada, la proteína puede modificarse sustancialmente con el polisacárido para limitar el reconocimiento o la actividad de la proteína, o la proteína puede polimerizarse a través de la conjugación con el polisacárido, o la proteína puede presentarse en el exterior del polisacárido oxidado de manera que el reconocimiento requerido para la bioactividad no se vea afectado.

15

Proteína

El componente proteico de la composición puede seleccionarse entre proteínas, péptidos y derivados de componentes de la misma que contienen grupos amino capaces de reaccionar con grupos aldehído para formar enlaces imina, incluidas proteínas que cumplen con este criterio que se describen en Learner et al., Nature Reviews 2008; 7: 21-39. Las proteínas adecuadas para la modificación incluyen las de diversos tipos mecanísticos (por ejemplo, proteínas que reemplazan a las proteínas faltantes o deficientes, que aumentan o interfieren con las vías existentes, que proporcionan una función o actividad novedosa, vacunas o diagnósticos), clases funcionales (por ejemplo, señalización, regulador, estructural, enzimática, anticuerpos), clases estructurales (monomérico, polimérico [covalentemente frente a no covalentemente asociado], glicosilados), clases terapéuticas (por ejemplo, deficiencia hormonal, hemostasia y trombosis, deficiencia de enzimas metabólicas, trastorno pulmonar y gastrointestinal, inmunodeficiencia, hematopoyesis, fertilidad, inmunorregulación, trastornos endocrinos, regulación del crecimiento, cáncer, trasplante, enfermedad infecciosa, detoxificación) y aquellas proteínas que se han modificado utilizando PEG (por ejemplo, interferones, G-CSF, GM-CSF, adenosina desaminasa, asparaginasa, hormonas del crecimiento, certolizumab, hematida, uricasa), proteínas de fusión (por ejemplo, interferón, metaloproteinasas inhibidoras de tejidos, interleucina, hormonas), o en formas encapsuladas.

20

25

30

Preferiblemente, la o cada proteína se selecciona entre un anticuerpo, una citoquina, una enzima, un péptido, un factor de crecimiento y una proteína reguladora. Preferiblemente, la proteína se selecciona entre una citoquina y una enzima.

35

Preferiblemente, la o cada proteína es un anticuerpo o un fragmento activo u homólogo del mismo. Preferiblemente, el anticuerpo se selecciona entre anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa (Anti-TNF α), anticuerpo CD163, anti-VEGF, anticuerpo antitrombina, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-IgG1, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-IgG2a y anticuerpo anti-EGFR.

40

Preferiblemente, la o cada proteína es una citoquina. Preferiblemente, la citoquina se selecciona entre interferón (IFN), eritropoyetina (EPO) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

45

Preferiblemente, la o cada proteína es una enzima. Preferiblemente, la enzima se selecciona entre uricasa, elastasa, estreptoquinasa, asparaginasa y beta-glucocebrosidasa.

Preferiblemente, la o cada proteína es un factor de crecimiento. Preferiblemente el factor de crecimiento es la insulina.

50

Preferiblemente, la o cada proteína es una proteína reguladora. Preferiblemente, la proteína reguladora se selecciona entre inhibidor de la esterasa C1 y alfa-1 antitripsina.

55

Para algunas proteínas, la actividad depende de la interacción de un sitio de proteína con sustratos, cofactores, inhibidores, activadores, receptores, ligandos, moduladores alostéricos u otras moléculas que interactúan. El sitio de la proteína para dicha interacción puede estar obstruido por un impedimento estérico o una modificación directa por el polisacárido en el conjugado, o por otras moléculas de proteína en una composición o formulación que comprende el conjugado, para producir una actividad disminuida de la proteína. Tras la liberación de la proteína de la forma conjugada, se elimina el impedimento estérico, de manera que la actividad aumenta con respecto a la forma conjugada de la proteína. Esta propiedad de la composición puede ser especialmente pronunciada en los casos en que la molécula que interactúa no es lo suficientemente pequeña como para acceder o está bloqueada por la proteína.

60

65

En el caso de que la actividad de la proteína sea dependiente del movimiento intramolecular (a nivel secundario, terciario o cuaternario), o dependa de la interacción entre subunidades de la proteína, este movimiento o interacción puede estar obstruido por un impedimento estérico o por una modificación directa por el polisacárido en el conjugado, o por otras moléculas de proteína en una composición o formulación que comprende el conjugado, para dar como resultado una actividad disminuida de la proteína. Tras la liberación de la proteína de la forma conjugada, se elimina el impedimento estérico, de manera que la actividad aumenta con respecto a la forma conjugada de la proteína.

Se pueden incorporar múltiples copias de la proteína de interés en el conjugado, lo que puede mejorar los eventos de reconocimiento en los que se requieren múltiples estímulos locales de la proteína o son beneficiosos, como ocurre con ciertos receptores de la superficie celular.

Las proteínas y los péptidos contienen universalmente grupos amino que pueden usarse para unir la proteína a un polisacárido oxidado sin la necesidad de agentes activadores o enlazadores químicos adicionales.

La proteína puede comprender más de un grupo amino y puede conjugarse con el polisacárido oxidado mediante uno o más enlaces imina. La proteína puede conjugarse con el polisacárido oxidado mediante dos o más enlaces imina.

Preferiblemente, el conjugado de polisacárido oxidado-proteína comprende una proteína cuya solubilidad aumenta en el conjugado en comparación con la proteína no conjugada.

Preferiblemente, la o cada proteína se selecciona entre EPO, G-CSF, uricasa, beta-glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa, inhibidor de C-1, estreptoquinasa, ADNsel, alfa-1 antitripsina, asparaginasa, arginina desaminasa, Factor IX, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IIa (trombina), anticuerpo anti-TNF-alfa, activador tisular del plasminógeno, hormona del crecimiento humana, superóxido dismutasa, catalasa, anticuerpo CD163, anti-VEGF, anticuerpo anti-trombina, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-IgG1, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-IgG2a, anticuerpo anti-EGFR, histona, interferón, insulina, albúmina y mezclas de los mismos.

Preferiblemente, la o cada proteína tiene un peso molecular promedio en peso mayor que aproximadamente 8 kDa; preferiblemente mayor que 10 kDa; preferiblemente mayor que 20 kDa; preferiblemente mayor que 30 kDa; preferiblemente mayor que 40 kDa; preferiblemente mayor que 50 kDa.

Preferiblemente, la o cada proteína tiene un peso molecular promedio en peso de 8 kDa a 1000 kDa; preferiblemente de 20 kDa a 900 kDa; preferiblemente de 50 a 800 kDa.

Preferiblemente, la histona es histona H1.

En un aspecto, la o cada proteína es una proteína marcada. Adecuadamente, la proteína está marcada con un marcador fluorescente.

Concentración de proteínas

Preferiblemente, la concentración de reacción de la proteína en la etapa (b) es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 g/l; preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 g/l; preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 4 g/l; preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 2 g/l; preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 g/l; preferiblemente de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 g/l.

Método

En el presente documento se describe un método que comprende la etapa:

(a) seleccionar un polisacárido que no contenga esencialmente unidades monoméricas de 1,2,3-triol y oxidar dicho polisacárido con un agente oxidante para formar un polisacárido oxidado; y

(b) hacer reaccionar el polisacárido oxidado con una proteína para formar una composición que comprende un conjugado, en donde el polisacárido oxidado y la proteína se conjugan a través de uno o más enlaces imina.

Opcionalmente, el polisacárido oxidado se puede purificar para eliminar el agente oxidante y sus subproductos. Esta purificación puede comprender la etapa de diafiltración usando una membrana de corte de peso molecular. Las membranas adecuadas incluyen membranas de corte de peso molecular de 1 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 50 kDa y 100 kDa.

Preferiblemente, el polisacárido oxidado se hace reaccionar con una proteína en la etapa (b) en ausencia de un agente de hacinamiento molecular.

Preferiblemente, el polisacárido oxidado se hace reaccionar con una proteína en la etapa (b) en ausencia de un agente reductor.

5 Preferiblemente, el polisacárido oxidado se hace reaccionar con una proteína en la etapa (b) en ausencia de un agente de hacinamiento molecular y en ausencia de un agente reductor.

10 Opcionalmente, la composición formada en la etapa (b) puede purificarse para eliminar iones y componentes basados en polisacáridos por debajo de un peso molecular seleccionado. Esta purificación puede comprender la etapa de dializar una solución que contiene el conjugado contra un disolvente utilizando una membrana de diálisis o por diafiltración. Adecuadamente, el disolvente es solución salina tamponada con fosfato u otro tampón fisiológicamente aceptable. Adecuadamente, la membrana de diálisis se selecciona con un corte de peso molecular de 2, 3,5, 7, 10, 20, 50 o 100 kDa. Adecuadamente, la membrana de diálisis tiene un corte de peso molecular de 10 kDa.

15 En el método descrito en el presente documento, el polisacárido oxidado se puede hacer reaccionar con una proteína en la etapa (b) en presencia de al menos una proteína adicional, de manera que la composición de polisacárido oxidado-proteína comprenda más de una proteína y cada proteína esté conjugada con polisacárido a través de uno o más enlaces imina. En este aspecto, preferiblemente hay una proteína adicional. Adecuadamente, la proteína es la estreptoquinasa y la proteína adicional es la albúmina.

20 Opcionalmente, la composición puede purificarse por cromatografía.

Opcionalmente, la composición puede ser una fracción de peso molecular purificada después de la eliminación de componentes de peso molecular bajo y/o alto.

25 Opcionalmente, el método puede comprender una etapa (c) adicional de secado por congelación de la composición, o la formulación de la composición a una concentración, pH y fuerza iónica que estabiliza la composición.

30 Agente oxidante

En el método descrito en el presente documento, el agente oxidante es preferiblemente un compuesto de peryodato. Preferiblemente, el compuesto de peryodato es un compuesto de peryodato de metal alcalino. Los agentes oxidantes adecuados se seleccionan entre peryodato de litio, peryodato de sodio y peryodato de potasio.

35 Preferiblemente, el agente oxidante es peryodato sódico.

pH

40 En el método descrito en el presente documento, la etapa (b) se lleva a cabo preferiblemente a un pH de 6 a 10 °C a temperatura ambiente (25 °C); preferiblemente un pH de 6,5 a 9; preferiblemente un pH de 7 a 8.

El pH de la composición de polisacárido oxidado-proteína se puede reducir a un pH de 5 a 6 (medido a temperatura ambiente de 25 °C) para los fines de formulaciones.

45 Tiempo de reacción

En el método descrito en el presente documento, el polisacárido oxidado se hace reaccionar con una proteína en la etapa (b) durante 0,01 a 100 horas; preferiblemente de 0,01 a 80 horas; preferiblemente de 0,01 a 72 horas; preferiblemente de 0,01 a 48 horas; preferiblemente de 0,01 a 36 horas; preferiblemente de 0,02 a 24 horas.

50 Temperatura

En el método descrito en el presente documento, la etapa (a) se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de menos de 20 °C; preferiblemente menos de 15 °C; preferiblemente menos de 10 °C; preferiblemente menos de 5 °C.

55 Preferiblemente, la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura de al menos 5 °C; preferiblemente al menos 10 °C; preferiblemente al menos 15 °C; preferiblemente al menos 20 °C.

60 Preferiblemente, la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura de 5 a 50 °C; preferiblemente de 10 a 48 °C; preferiblemente de 15 a 45 °C; preferiblemente de 20 a 42 °C; preferiblemente de 25 a 40 °C.

Tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o afección

65 Como se describe en el presente documento, el conjugado o las composiciones que contienen el conjugado se pueden usar para el tratamiento o diagnóstico de una variedad de trastornos. El trastorno puede seleccionarse entre oncología, enfermedades infecciosas, trastornos metabólicos, trastornos cardiovasculares.

Como se describe en el presente documento, el conjugado o las composiciones que contienen el conjugado se pueden usar para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o afección. La enfermedad o afección puede seleccionarse adecuadamente entre deficiencia de hormonas, hemostasia, trombosis, deficiencia de enzimas metabólicas, trastorno pulmonar, trastorno gastrointestinal, inmunodeficiencia, hematopoyesis, trastornos de fertilidad, inmunorregulación, trastornos endocrinos, hemofilia, choque, regulación del crecimiento, cáncer, trasplante, enfermedad infecciosa, inflamación y detoxificación.

Preferiblemente, los trastornos/enfermedades o afecciones pueden seleccionarse adecuadamente entre una infección por el virus de la hepatitis C (VHC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), deficiencia de alfa-1 antitripsina (AAT), anemia, hiperuricemia crónica, hemofilia, hemorragia, neutropenia inducida por quimioterapia, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, angioedema hereditario, melanoma maligno, carcinoma hepatocelular (CHC), lesión por reperfusión, infarto de miocardio, embolia pulmonar, psoriasis, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis ulcerosa A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, diabetes, septicemia, choque hipovolémico y deficiencia de la hormona del crecimiento.

Preferiblemente, la composición se administra a un sujeto y la proteína se libera del conjugado a lo largo del tiempo, de modo que la semivida circulatoria de la proteína que está conjugada se potencia con respecto a la semivida circulatoria de la proteína no conjugada.

Otras características

En el método descrito en el presente documento, el polisacárido oxidado se hace reaccionar preferiblemente con una proteína en la etapa (b) en ausencia de un agente de hacinamiento molecular. Preferiblemente, el polisacárido oxidado se hace reaccionar con una proteína en la etapa (b) en ausencia de un agente de hacinamiento macromolecular. Para los fines de esta memoria descriptiva, un agente de hacinamiento macromolecular se define en el presente documento como un compuesto que atrae agua y permite que las moléculas se agreguen. Los ejemplos de agentes de hacinamiento macromolecular son polímeros lineales solubles, tales como polivinilpirrolidona, polietilenglicol, dextrano, nonoxifenol-toxilatos, alcohol polivinílico y mezclas de los mismos.

Opcionalmente, la composición o el conjugado se pueden liofilizar o formular a una concentración, pH y fuerza iónica que estabiliza la composición o el conjugado.

El tamaño y la estabilidad *in vivo* de una composición de proteína-polisacárido se pueden controlar mediante la selección adecuada del grado de hidroxietilación u otra modificación del polisacárido (por ejemplo, la oxidación), que controlará la velocidad de disociación o degradación del polisacárido y la liberación de la proteína. Además, el tamaño y la estabilidad *in vivo* de una composición de proteína-polisacárido se pueden controlar mediante la selección adecuada del pH de conjugación, la concentración de proteína durante la conjugación, la temperatura durante la conjugación, la duración de la conjugación, los excipientes agregados después de la conjugación y la formulación del conjugado.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición de polisacárido oxidado-proteína o un conjugado como se describe en el presente documento en donde el grado de oxidación del polisacárido oxidado, y/o el peso molecular promedio en peso del polisacárido, y/o la relación de polisacárido oxidado a proteína y/o grado de sustitución del grupo hidroxihidrocarbilo en el polisacárido, y/o la polidispersidad del polisacárido se usa para controlar:

- la actividad de la proteína en la composición;
- la actividad de la proteína conjugada;
- la actividad de la proteína liberada;
- la semivida circulatoria de la proteína;
- la velocidad de liberación de la proteína activa del conjugado;
- la estabilidad del conjugado frente a la degradación;
- la solubilidad de la proteína conjugada

Como se describe en el presente documento, se proporciona un conjugado de polisacárido oxidado-proteína o una composición como se describe en el presente documento en donde el conjugado es capaz de liberar proteína en presencia de componentes del plasma.

Como se describe en el presente documento, se proporciona un conjugado de polisacárido oxidado-proteína o una composición como se describe en el presente documento en donde el enlace entre la proteína y el polisacárido oxidado se disocia por procesos tales como hidrólisis no enzimática y transaminación en condiciones fisiológicas.

Como se describe en el presente documento, se proporciona un conjugado de polisacárido oxidado-proteína, una composición o procesos como se describe en el presente documento para la estabilidad del conjugado seleccionado en plasma.

Como se describe en el presente documento, se proporciona un conjugado de polisacárido oxidado-proteína, una composición o un proceso como se describe en el presente documento para la estabilidad del conjugado seleccionado en solución, manteniéndose la mayoría de la proteína en forma conjugada o manteniendo una relación seleccionada entre proteína no conjugada: proteína conjugada, controlada opcionalmente por la selección del pH, la fuerza iónica o la concentración de la composición.

Como se describe en el presente documento, se proporciona un conjugado de polisacárido oxidado-proteína o una composición como se describe en el presente documento en donde la proteína es una enzima y el conjugado o composición tiene una actividad enzimática enmascarada, latente, durmiente o conservada.

Como se describe en el presente documento, se proporciona un conjugado de polisacárido oxidado-proteína, una composición o procesos como se describe en el presente documento para aumentar la semivida o bioactividad de la proteína *in vivo*.

En el presente documento también se describe un método para conjugar reversiblemente una proteína con un polisacárido oxidado que comprende las etapas de preparar una composición de polisacárido oxidado-proteína como se describe en el presente documento, y disolver la composición de polisacárido oxidado-proteína en un disolvente.

Combinaciones específicas

Adecuadamente, los conjugados, composiciones, métodos y usos descritos en el presente documento pueden comprender un polisacárido seleccionado entre almidón e hidroxietil almidón, y una proteína que es interferón. Adecuadamente, el grado de oxidación del polisacárido oxidado se selecciona entre el 1, 10, 25, 50, 75 y 100 % para aumentar la semivida del interferón. Adecuadamente, se usa hidroxietil almidón con un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 1, 10, 25, 70, 200 o 450 kDa para aumentar la semivida del interferón y/o permitir la liberación gradual del interferón activo en circulación. De manera adecuada, se utiliza almidón con un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 125,8 kDa para aumentar la semivida del interferón y/o permitir la liberación gradual del interferón activo en la circulación. Adecuadamente, la composición ha aumentado la semivida/duración de la actividad en comparación con el interferón.

Los grupos amino del interferón se pueden conjugar al almidón oxidado o al hidroxietil almidón mediante más de un enlace imina.

Adecuadamente, los conjugados, composiciones, métodos y usos descritos en el presente documento pueden comprender una formulación de 200 kDa de hidroxietil-almidón-proteína en donde la proteína es una enzima que tiene actividad reducida en la forma conjugada, en comparación con la enzima liberada del conjugado. Adecuadamente, la enzima se selecciona entre uricasa, elastasa, asparaginasa, estreptoquinasa y beta-glucocerebrosidasa.

Adecuadamente, los conjugados, composiciones, métodos y usos como se describen en este documento pueden comprender una formulación de 200 kDa de hidroxietil-almidón-proteína en donde la proteína es una proteína reguladora. Adecuadamente, la proteína reguladora se selecciona entre inhibidor de la esterasa C1 y alfa-1 antitripsina.

Adecuadamente, los conjugados, composiciones, métodos y usos como se describen en este documento pueden comprender una formulación de 200 kDa de hidroxietil-almidón-proteína en donde la proteína es una citoquina. Adecuadamente, la citoquina se selecciona entre interferón (IFN), eritropoyetina (EPO) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

Adecuadamente, los conjugados, composiciones, métodos y usos descritos en este documento pueden comprender una formulación de 200 kDa de hidroxietil-almidón-proteína en donde la proteína es un anticuerpo. Adecuadamente, el anticuerpo se selecciona entre anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa (Anti-TNF α), antitrombina y anti-CD163. Otros ejemplos incluyen Rituxan® (anti-CD20), Mylotarg® (anti-CD33), Erbitux® (anti-EGFR) y Avastin® (anti-VEGF).

Hidroxietil almidón

Un polisacárido preferido es hidroxietil almidón. El hidroxietil almidón se ha utilizado ampliamente como expansor del volumen sanguíneo aprobado durante décadas y se ha infundido en grandes volúmenes (~3 g de hidroxietil almidón/kg de peso corporal) en un gran número de pacientes.

El hidroxietil almidón es una forma modificada aprobada de almidón natural y, por lo tanto, puede ser más compatible biológicamente (por ejemplo, fácilmente metabolizado) que otras macromoléculas, especialmente aquellas que son sintéticas.

El enlace hidroxietil-almidón-proteína implica la interacción directa de los aldehídos en el hidroxietil almidón oxidado con los grupos amino en la proteína para formar un enlace imina, sin enlace químico intermedio.

5 Son posibles grandes conjugados con una semivida y una carga proteica aumentadas correspondientemente para la modificación del hidroxietil almidón, debido a los altos pesos moleculares disponibles del hidroxietil almidón, y debido a la posibilidad de oligomerización. La hidroxietilación del almidón aumenta la estabilidad del almidón al deteriorar la degradación de la amilasa *in vivo*.

10 Los conjugados adecuados de hidroxietil almidón y proteína pueden tener

- o hasta el 100 % de los dioles vecinos en el hidroxietil almidón que se han oxidado a aldehídos, o
- o la proteína contiene grupos amino capaces de formar enlaces imina con los aldehídos del hidroxietil almidón oxidado, o
- o la mayoría de las proteínas se conjugan con el hidroxietil almidón oxidado a través de enlaces imina, o
- 15 o la actividad de la proteína conjugada puede disminuir en relación con la proteína no conjugada, o
- o la mayoría de la proteína conjugada es capaz de ser liberada del conjugado, o
- o la actividad de la proteína liberada es mayor o igual que la proteína conjugada, o
- o la actividad de la proteína liberada es menor que la proteína conjugada (en el caso posible de que el HES ayude en el reconocimiento de receptores o la unión de sustratos, etc.).

20 Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describirá ahora con más detalle a modo de ejemplo solo con referencia a las figuras adjuntas en las que:

- 25 La Figura 1 es un cromatograma representativo (registro de HPLC de IFN modificado).
- La Figura 2 es un gráfico de la actividad de la proteína frente al tiempo (datos de actividad *ex vivo* para el IFN).
- La Figura 3 es un registro de HPLC que muestra la reversibilidad de HES-IFN.
- La Figura 4 es un registro de HPLC que muestra la reversibilidad de HES-albúmina.
- 30 La Figura 5 es un gráfico que muestra los niveles plasmáticos de histona H1 e histona H1 modificada con HES en ratones CD-1 después de la infusión *iv*.
- La Figura 6 es un registro de HPLC que muestra HES-uricasa (alto peso molecular).
- La Figura 7 es un gráfico de actividad de formulaciones de HES-uricasa (ensayo de ácido úrico) que utiliza muestras de conjugados seleccionados diluidos a 15,6 µg/ml (50 mU/ml) y a continuación se analiza para
- 35 determinar su tasa de consumo de ácido úrico.
- La Figura 8 es un registro de HPLC que muestra HES-uricasa (peso molecular muy alto).
- La Figura 9 es un gráfico de la estabilidad plasmática de HES-uricasa (peso molecular muy alto).
- La Figura 10 es un registro de HPLC que muestra HES-asparaginasa.
- La Figura 11 es un gráfico que muestra la farmacocinética de la asparaginasa y HES-asparaginasa en ratones
- 40 BDF₁.
- La Figura 12 es un registro de HPLC que muestra HES-A1AT.
- La Figura 13 es un gráfico que muestra la farmacocinética de rhA1AT y HES-A1AT en ratones Balb/c.
- La Figura 14 es un registro de HPLC que muestra HES-antiCD163mAb.
- La Figura 15a es un gráfico que muestra la intensidad de fluorescencia media de las células HEK 293 que
- 45 expresan CD163 incubadas con plasma que contiene anticuerpos a las 0 h y 24 h después de la incubación.
- La Figura 15b es un gráfico que muestra la intensidad de fluorescencia media de células HEK 293 que expresan CD163 incubadas con plasma que contiene anticuerpo modificado con HES a las 0 h y 24 h después de la incubación.
- La Figura 16 es un registro de HPLC que muestra HES-G-CSF.
- 50 La Figura 17 es un registro de HPLC que muestra HES-insulina.
- La Figura 18 es un registro de HPLC que muestra HES-estreptoquinasa.
- La Figura 19 es un registro de HPLC que muestra HES-Factor VIII.

55 Ejemplos

La presente invención se describirá ahora con más detalle a modo de ejemplos. Aunque se emplearon diversas condiciones, como el PM del polisacárido, el grado de oxidación del polisacárido, la temperatura de reacción, el pH de la reacción, la concentración de proteína, la relación de polisacárido a proteína y la duración de la reacción con todas las proteínas, solo se muestran ejemplos específicos.

60 Preparación de polisacáridos oxidados

Ejemplo 1

65 Procedimiento general para preparar polisacáridos oxidados

El polisacárido se disolvió agitando en agua. Se añadió suficiente peryodato sódico (NaIO_4) para lograr el nivel de oxidación deseado y se agitó. Después de un tiempo adecuado, la mezcla de reacción se concentró y se diafiltró contra agua pura usando una membrana de corte de bajo peso molecular. Alternativamente, las sales de bajo peso molecular se eliminaron mediante diálisis, cromatografía u otros métodos. La concentración de polisacárido oxidado del retenido recuperado se determinó liofilizando partes alícuotas del retenido y pesando el residuo seco.

Ejemplo 2

Preparación de hidroxietil almidón oxidado (oxiHES)

En condiciones asépticas, se disolvieron 10,6 g de hidroxietil almidón (HES, peso molecular promedio en peso de 200 kDa (PMPP), grado de sustitución de hidroxietilo 0,5) agitando en 225 ml de agua durante la noche mientras se enfriaba a 4 °C. Se añadieron 8,8 g de peryodato sódico (NaIO_4) (1,1 eq. por diol vecinal) y se continuó agitando en oscuridad a 4 °C. La mezcla de reacción se concentró a continuación a 100 ml y se diafiltró contra 10 volúmenes de agua usando una membrana de polietersulfona con un peso molecular de corte (PMCO) de 5 kDa.

El HES oxidado al 50 % se preparó mediante el mismo proceso, utilizando 10,9 g del HES y 4,1 g de NaIO_4 (0,5 eq. por diol vecinal). El HES oxidado al 10 y al 25 % se prepararon de manera similar, al igual que las versiones oxidadas de almidón (sin hidroxietilación), usando las cantidades apropiadas de peryodato de sodio para producir el grado de oxidación deseado.

Las muestras de HES y almidón con peso molecular promedio en peso (PMPP) entre 1 y 2000 kDa, específicamente aquellas con PMPP de 25, 70, 130, 200, 250 y 450 kDa se trataron de manera similar para lograr materiales de polisacáridos oxidados con niveles de oxidación del 1, 10, 25, 50, 75 y 100 %, usando las cantidades apropiadas de peryodato de sodio para producir el grado de oxidación deseado.

Ejemplo 3

Preparación de almidón oxidado al 50 %

Se disolvieron 10,01 g de almidón (maíz céreo degradado, 125,8 kDa) en 200 ml de agua a 4 °C. A esto se le añadieron 5,69 g de peryodato sódico (NaIO_4 :monómero productor de aldehído = 0,5:1). La mezcla se dejó reaccionar durante 4 horas a 4 °C. La mezcla de reacción resultante se concentró y se diafiltró contra 10 volúmenes de agua usando una membrana de PMCO de 5 kDa. La solución final de oxi-almidón se concentró y filtró antes de su uso. El rendimiento global fue del 87 %.

Preparación de composiciones de polisacárido oxidado-proteína

Ejemplo 4

Procedimiento general para preparar composiciones de polisacárido oxidado-proteína

La solución de proteína acuosa se combinó con una solución de polisacárido oxidado y un tampón, de modo que la relación molar final de polisacárido oxidado/proteína se encontraba entre 0,1:1 y 50:1. La concentración de proteína estuvo entre 0,1 y 10 mg/ml. El pH de la reacción estuvo entre 6 y 8. La temperatura de reacción estuvo entre 4 °C y 37 °C. La duración de la reacción varió entre 5 minutos y 72 h. El peso molecular del polisacárido estaba entre 8 y 450 kDa. El grado de oxidación del polisacárido estaba entre el 10 y el 100 %. Después del tiempo de reacción adecuado para lograr una modificación sustancial de la proteína por el polisacárido oxidado, la mezcla de reacción se dividió para la preparación de los conjugados no reducidos y reducidos. Se prepararon composiciones de conjugado no reducido adecuadas para el uso *in vitro* o *in vivo* mediante diálisis, diafiltración o cromatografía para eliminar las sales de bajo PM y para formular la composición en el tampón requerido. En algunos casos, el pH se redujo para mantener el perfil de peso molecular deseado mediante dilución con tampón a pH 5 o 5,5 antes de la diálisis.

Ejemplo 5

Preparación de la composición reducida de polisacárido oxidado-proteína

El conjugado reducido se preparó combinando una parte alícuota de la mezcla de reacción de polisacárido oxidado-proteína con un agente reductor adecuado, tal como una combinación de solución de acetato de sodio y cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN). La mezcla de reacción de reducción se selló y se mezcló. Las composiciones de conjugado reducido adecuadas para su uso *in vitro* o *in vivo* se prepararon mediante diálisis, diafiltración o cromatografía para eliminar las sales de bajo PM y para formular la composición en el tampón requerido.

Preparación de composiciones de polisacáridos y proteínas: no reducidas y reducidas

Los polisacáridos con PMPP de 8 a 450 kDa se seleccionaron para la oxidación como se ha descrito anteriormente. Para los polisacáridos que contienen un grupo hidroxietilo, el grado de hidroxietilación se seleccionó de 0 a 0,7. El grado de oxidación del polisacárido se seleccionó del 1 al 100 %. La relación de reacción de polisacárido oxidado:proteína se seleccionó de 0,2:1 a 17,5:1. Los tiempos de reacción se seleccionaron de 0,5 a 72 horas. El pH de la reacción se seleccionó de un intervalo entre 6 y 8. La concentración de la proteína de reacción se seleccionó de 0,5 a 10,0 g/l.

10 Ejemplo 6

Preparación de composiciones de HES oxidado al 100 %-interferón: No reducidas y reducidas

15 Se combinaron 100 µl de una solución de 10 microgramos/microlitro de interferón alfa-2b (IFN) en agua con 689 microlitros de agua, 50 microlitros de solución salina tamponada con fosfato al 0,9 % (PBS, pH 7,4) y 161 microlitros de HES oxidado al 100 % (64,3 mg/ml, 200 kDa de PMPP). La relación molar final de oxiHES:IFN fue de 1:1. Después de 24 horas de mezcla a 25 °C, la mezcla de reacción se dividió para la preparación de las composiciones no reducidas y reducidas. Para preparar la composición no reducida, se diluyeron 440 microlitros con 2,4 ml de PBS y se dializaron a 4 °C contra PBS usando una membrana de 10 kDa. El retenido se filtró a continuación (0,22 micrómetros) y se diluyó a 4,4 ml con PBS.

25 La composición reducida se preparó combinando 500 microlitros de la mezcla de reacción dividida con 89 microlitros de acetato de sodio 0,3 M (NaOAc) y 391 microlitros de cianoborohidruro de sodio al 10 % recién preparado (NaBH₃CN) en agua. La mezcla de reacción de reducción se selló y se mezcló a 25 °C durante 16-24 h, a continuación se combinó con 2 ml de PBS y se dializó a 4 °C contra PBS usando una membrana de 10 kDa. El retenido se filtró a continuación (0,22 micrómetros) y se diluyó a 3,9 ml con PBS. El alto peso molecular de los conjugados reducidos y no reducidos que contienen IFN, en comparación con los IFN no modificados, se demostró mediante cromatografía de exclusión de tamaño.

30 Ejemplo 7

Preparación de composiciones de HES oxidado al 50 %-interferón: No reducidas y reducidas

35 Las composiciones de HES oxidado al 50 %-IFN no reducidas y reducidas se prepararon usando el oxiHES al 50 % mediante un proceso similar al utilizado para las composiciones de HES oxidado al 100 % descritas anteriormente. Se combinaron 100 microlitros de una solución de 10 microgramos/microlitros de IFN en agua con 215 microlitros de agua, 50 microlitros de PBS (pH 7,4) y 635 microlitros de HES oxidado al 50 % (116 mg/ml). La relación molar final de oxiHES:IFN fue de 7,1:1. Después de 24 h de mezcla a 25 °C, la mezcla de reacción se dividió y las composiciones no reducidas y reducidas se prepararon como se describe para las composiciones de HES oxidado al 40 100 % anteriores. La composición reducida se preparó utilizando 250 microlitros de conjugado, 94 microlitros de acetato de sodio 0,3 M (NaOAc) y 694 microlitros de solución de NaBH₃CN.

Ejemplo 8

45 Preparación de conjugado de almidón oxidado al 50 %-interferón

8 microlitros de solución de interferón (IFN) (10 microgramos/microlitros) se conjugaron a 1,0 microgramos/microlitros, con una relación de oxi-HES a IFN de 1,0:1. A esta solución se le añadieron 56,2 microlitros de agua, 8 microlitros de tampón Bis-Tris 1,0 M, pH 7,0 y 7,8 microlitros de solución de oxi-almidón preparada como se describe anteriormente (125,8 kDa). Las reacciones se llevaron a cabo a 23 °C. A las 0,5, 1, 2, 6 y 24 horas de conjugación, se extrajeron partes alícuotas de cada mezcla de conjugación y se redujeron con una solución al 10 % de NaBH₃CN en agua en presencia de NaOAc (30 mM) durante 20 horas. El análisis SDS-PAGE indicó que todo el IFN se había convertido en conjugados HES-IFN, sin IFN libre visible.

55 Ejemplo 9

Preparación de composiciones de polisacárido e interferón: No reducidas y reducidas

60 Las composiciones no reducidas y reducidas de interferón y polisacáridos se prepararon como se describe en los ejemplos anteriores. Los ejemplos seleccionados de las condiciones usadas para preparar composiciones de polisacárido-IFN se enumeran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Ejemplos seleccionados de condiciones de reacción utilizadas para preparar composiciones de polisacárido-IFN.

Entrada de tabla	PMPP PS (kDa)	Sustitución de hidroxietilo (fracción)	Oxidación del PS (%)	Relación de PS:IFN Rxn	Tiempo Rxn (h)
1	450	0,7	100	0,5:1	0,5, 2, 6
2	450	0,7	100	1:1	0,5, 2, 6
3	200	0,5	100	0,5:1	0,5, 2, 6
4	200	0,5	100	1:1	0,5, 2, 6, 24
5	200	0,5	100	2:1	24
6	200	0,5	50	2:1	24
7	200	0,5	50	5:1	24
8	200	0,5	50	7,1:1	24
9	125,8	0	10	0,2:1	0,5, 1, 2, 6, 24
10	125,8	0	25	0,2:1	0,5, 1, 2, 6, 24
11	125,8	0	75	0,2:1	0,5, 1, 2, 6, 24
12	125,8	0	10	0,5:1	0,5, 1, 2, 6, 24
13	125,8	0	25	0,5:1	0,5, 1, 2, 6, 24
14	125,8	0	50	0,5:1	0,5, 1, 2, 6, 24
15	125,8	0	75	0,5:1	0,5, 1, 2, 6, 24
16	125,8	0	25	1:1	0,5, 1, 2, 6, 24
17	125,8	0	50	1:1	0,5, 1, 2, 6, 24
18	70	0,5	100	0,5:1	0,5, 2, 6
19	70	0,5	100	1:1	0,5, 2, 6
20	70	0,57	100	1:1	24
21 ^A	70	0,57	100	2:1	0,5, 1, 2, 6
22	70	0,57	100	17,5:1	7, 24, 48, 72
23	70	0,57	50	2:1	24
24	70	0,57	100	5:1	0,5, 2, 7, 24, 48, 72
25 ^A	70	0,57	100	5:1	0,5, 1, 2, 6
26 ^A	8	0,45	100	5:1	7, 24, 48
27 ^A	8	0,45	100	17,5:1	7, 24, 48
28	8	0,5	100	0,5:1	24
29	8	0,5	100	1:1	24
30	8	0,5	100	10:1	0,5, 2, 6
31 ^B	8	0,5	100	10:1	0,5, 2, 6

Las temperaturas de reacción fueron de 23-25 °C a menos que se especifique lo contrario. La concentración del IFN de reacción fue de 1,0 g/l a menos que se especifique lo contrario. El pH de la reacción fue de 7 a menos que se especifique lo contrario.

5

(A) - El pH de la reacción fue 8.

(B) - La concentración del IFN de reacción fue de 0,5 g/l.

Las condiciones de reacción en las entradas 4 (24 horas) y 8 de la Tabla 1 se prefirieron para la preparación del HES-IFN para la evaluación *in vivo*.

10

Ejemplo 10

15

Procedimiento general para la caracterización del peso molecular de polisacárido oxidado y la concentración de proteína total

20

Las composiciones de polisacárido oxidado-proteína se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) para determinar la distribución del peso molecular (PM) y para determinar el contenido de proteínas libres. Las muestras se eluyeron en una columna SEC apropiada, pre-equilibrada con fase móvil de elución apropiada. La elución se llevó a cabo a una velocidad de flujo apropiada con la fase móvil apropiada y la detección se realizó a una longitud de onda adecuada. La modificación de la proteína en las composiciones de polisacárido oxidado-proteína fue evidente por la presencia de componentes de alto PM (tiempo de retención temprano) y el nivel más bajo de proteína no modificada (bajos niveles de componentes con el tiempo de elución es igual que el patrón de proteína no modificada). El contenido de proteína no modificada se estimó a partir del área del pico correspondiente al patrón de proteína no modificada. La concentración de proteína total se determinó mediante la comparación de las concentraciones de aminoácidos de proteína con un patrón interno (análisis de aminoácidos). Se demostró que las composiciones no reducidas contenían niveles variables de proteína no modificada y diferentes distribuciones de PM, incluyendo conjugados no reducidos de alto peso molecular adecuados para aumentar la semivida de la proteína y permitir la liberación de la proteína en forma activa. Además, se identificaron

25

composiciones que contenían proporciones de proteínas modificadas y no modificadas adecuadas para proporcionar actividad de proteínas inmediata y sostenida. Estos parámetros de composición dependían de las variables del proceso, incluido el PMPP del polisacárido, el grado de oxidación del polisacárido, el grado de hidroxietilación del polisacárido, así como la relación polisacárido oxidado:proteína y la concentración de proteína en la reacción.

Ejemplo 11

Caracterización del peso molecular del HES-IFN y la concentración total de interferón

Las composiciones de polisacárido-IFN se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaños utilizando un sistema de HPLC para determinar la distribución del peso molecular (PM) y para determinar el contenido de IFN libre. Las muestras se eluyeron en una columna Superdex 200 10x30 mm, previamente equilibradas con PBS a pH 7,4. La elución se llevó a cabo a 0,4 ml/min de PBS a pH 7,4 y la detección se realizó a 220 nm. Un cromatograma representativo que compara las distribuciones de PM del HES-IFN no reducido y reducido preparado a partir de HES oxidado al 100 %, comparado con el patrón IFN no modificado, se muestra en la **Figura 1**. La modificación del IFN en las composiciones de HES-IFN es evidente por la presencia de componentes de alto PM (tiempo de retención temprano) con absorción a 220 nm, y el bajo nivel de IFN no modificado (niveles bajos de componentes con absorción a 220 nm con un tiempo de elución que es igual que el patrón IFN no modificado). En las muestras de HES-IFN no reducidas y reducidas, se encontró que los picos que aparecían a un tiempo de elución de aproximadamente 47 minutos eran componentes de oxiHES de bajo PM. El contenido de IFN no modificado se estimó a partir del área del pico correspondiente al patrón de IFN no modificado. La concentración total de IFN se determinó mediante la comparación de las concentraciones de aminoácidos de IFN con una concentración de patrón interno (norleucina) después de la hidrólisis, el marcaje con fenilisotiocianato (PITC) y el análisis cromatográfico. Los datos representativos de la concentración de IFN para los conjugados de HES-IFN preparados con HES oxidado al 50 % y al 100 % se enumeran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Propiedades del conjugado de HES-IFN.

Artículo de ensayo	de HES (kDa)	Oxidación de HES (%)	Tipo de Enlace HES	[IFN] microgramo/mililitro (ACAA) ¹	IFN libre (%) (estimado) ²
Conjugado de Hb-HES (en PBS)	200	100	No reducido	31,7	<1
	200	100	Reducido	58,7	<1
	200	50	No reducido	58,1	<1
	200	50	Reducido	44,8	<1
Control positivo	IFN α 2b en PBS			66,5	100
Control negativo	PBS			-	-

¹ ACAA: Análisis cuantitativo de aminoácidos. La concentración de IFN se determinó mediante la comparación de las concentraciones de aminoácidos de IFN con una concentración de patrón interno (norleucina) después de la hidrólisis, el marcaje con fenilisotiocianato (PITC) y el análisis cromatográfico.

² El contenido de IFN no modificado se estimó por área del pico utilizando cromatografía de exclusión por tamaños. El IFN libre se identificó mediante la comparación del tiempo de elución con el patrón de IFN, y el porcentaje estimado de IFN libre fue igual al área del pico de IFN libre dividido por el área del pico total (220 nm).

Ejemplo 12

Determinación de la duración de la actividad de IFN *in vivo* para composiciones de HES-IFN

Para comparar la duración de la actividad de IFN de conjugados del HES-IFN frente a IFN no modificado, se administraron composiciones a ratones y se obtuvieron muestras de plasma en diversos puntos de tiempo y se analizaron para determinar la actividad de IFN. Este ejemplo utiliza composiciones de HES-IFN no reducidas y reducidas preparadas a partir de HES oxidado al 50 % y al 100 %. Se asignaron ratones CD1 macho a uno de siete grupos (12 ratones por grupo, Tabla 3). Los animales en los grupos 1 a 6 se inyectaron a través de la vena de la cola con composiciones de HES-IFN o soluciones de control (0,0035 ml/g). Se utilizó IFN α 2b no modificado como control positivo. Se usó PBS como control negativo, ya que todos los artículos de ensayo y el control de IFN se formularon en PBS. La sangre se extrajo mediante punción cardíaca (terminal) de tres ratones por grupo a los 15 minutos, 4 horas, 24 horas y 48 horas después del inicio de la inyección del artículo de ensayo. También se extrajo sangre de 3 ratones no tratados como controles de referencia. El plasma se preparó a partir de cada muestra de sangre y se dividió en tubos estériles y se congeló a -80 °C. Se descongelaron alícuotas de los 3 animales en cada punto de tiempo y se combinaron para el análisis de la actividad de IFN. Todas las alícuotas y muestras se mantuvieron en hielo durante la manipulación. Las actividades de IFN se analizaron usando un ensayo de inhibición viral estandarizado. El interferón se valoró con el uso del ensayo de inhibición del efecto citopático descrito por Rubenstein et al. (Rubenstein, S., Familletti, PC, y Pestka, S. (1981) "Convenient Assay for Interferons", J. Virol.37, 755-758; Familletti, PC, Rubenstein, S., y Pestka, S (1981) "A Convenient and Rapid Cytopathic Effect Inhibition Assay for Interferon", en Methods in Enzymology, Vol. 78 (S. Pestka, ed.), Academic Press, Nueva York, 387-394).

En este ensayo antiviral para interferón, aproximadamente 1 unidad/ml de interferón es la cantidad necesaria para

producir un efecto citopático del 50 %. Las unidades se determinan con respecto al patrón de referencia internacional para el interferón alfa A humano (Hu-IFN- α A) proporcionado por los Institutos Nacionales de la Salud (Pestka, S. (1986) "Interferon Standards and General Abbreviations, in Methods in Enzymology (S. Pestka, ed.), Academic Press, Nueva York 119, 14-23). La actividad se mide en células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK) con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). La actividad del IFN en plasma y en suero reportada en el presente documento es para muestras descongeladas y mantenidas a 4 °C durante 16 horas antes del ensayo. Dado que todos los animales recibieron dosis de volumen iguales de cada producto, y las concentraciones de IFN en los productos eran diferentes, la actividad de IFN se corrigió para la concentración total de IFN dividiendo los datos del ensayo MDBK (U/ml) por las concentraciones de IFN de los productos dosificados (microgramo/mililitro).

Todos los animales sobrevivieron hasta la extracción terminal de sangre. Los datos de actividad se corrigen para el IFN total (microgramos) inyectado. Las actividades del grupo PBS de control negativo estaban por debajo del límite de detección en todos los puntos de tiempo (~0,07 U/microgramo). La actividad del grupo IFN de control positivo fue de 1,398 U/microgramo a los 15 min y disminuyó a 3 U/microgramo a las 4 h, y a continuación por debajo del límite de detección (LDD) a las 24 y 48 h, lo que indica que el IFN libre se elimina rápidamente de la circulación (Tabla 3, Figura 2). La actividad del IFN para ambos conjugados reducidos (HES oxidado al 100 % y 50 %) fue de 7-37 U/microgramo a los 15 min, disminuyó a 2-3 U/microgramo a las 4 h, y a continuación por debajo del LDD a las 24 y 48 h. Ambos conjugados no reducidos tenían actividades de IFN más altas en todos los puntos de tiempo en comparación con los conjugados reducidos. El conjugado de HES oxidado no reducido al 50 % tuvo una actividad a los 15 min más alta que el conjugado de HES oxidado al 100 % (3,201 frente a 293 U/microgramo), y ambos conjugados no reducidos tuvieron actividades iguales en los puntos temporales posteriores.

Tabla 3. Actividad de IFN después de la administración del artículo de ensayo en ratones.

Grupo	Artículo de ensayo	Actividad IFN (U/microgramo)			
		15 min	4 h	24 h	48 h
1	HES oxidado 100 % no reducido	293	147	13	3
2	HES oxidado al 100 % reducido	7	2	<0,07	<0,07
3	HES oxidado al 50 % no reducido	3,201	80	7	2
4	HES oxidado al 50 % reducido	37	3	<0,07	<0,07
5	IFN	1,398	3	<0,07	<0,07
6	PBS	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07
7	Control no tratado	ND	ND	ND	ND

25 *Farmacocinética in vivo*

Los ratones no mostraron una respuesta adversa a las composiciones de HES-IFN después de la administración. Las composiciones de HES-IFN tenían una semivida circulatoria más larga que la IFN no modificada, como indica la mayor duración de la actividad en las composiciones no reducidas. La actividad en los grupos de la composición no reducida fue aproximadamente 25-50x mayor que para el grupo de IFN libre a las 4 h, y al menos 25-250x por encima del LDD de 24-48 h, cuando el grupo de IFN libre no mostró actividad restante. Las composiciones de HES-IFN no reducidas tenían aproximadamente 25-250 veces más actividad inicial y sostenida que las composiciones reducidas. Esto se debe probablemente a la lenta disociación y liberación de IFN activo de las composiciones no reducidas. Un grado menor de oxidación del HES se correlacionó con una mayor actividad temprana tanto para las composiciones reducidas como para las no reducidas. En el caso de las composiciones no reducidas, esto probablemente se deba a una disociación más fácil de IFN del HES menos oxidado, que tendría menos grupos aldehídos para la unión a la proteína que el HES más oxidado (ver Figura 2).

40 Ejemplo 13

Procedimiento general de caracterización *in vitro* y bioactividad

Las composiciones no reducidas que contienen <25 % de proteína no modificada se consideran adecuadas para el análisis de bioactividad. Estas composiciones se seleccionan para la caracterización de la tasa de disociación de proteínas del conjugado y para el análisis de bioactividad. Las composiciones no reducidas y sus análogos reducidos se preparan a mayor escala y se purifican por ultrafiltración. Las composiciones se incuban en plasma de roedor, PBS o PBS que contiene albúmina y aminas plasmáticas representativas a 37 °C a concentraciones que simulan infusiones del 0,1, 1 y 10 % del volumen de sangre animal. A las 0, 2, 8, 24, 48 y 72 h, se extraen las alícuotas y se analizan mediante SEC o PAGE para determinar el grado de modificación de la proteína y la distribución del peso molecular (DPM) de los componentes que contienen proteínas. Las alícuotas también se analizan para determinar la actividad biológica utilizando métodos establecidos.

50 Ejemplo 13a

55 Demostración de la capacidad de liberación

Las proteínas modificadas con HES se incubaron con varios aminoácidos, sulfato de amonio o albúmina para demostrar la reversibilidad de la unión mediante procesos de transiminación similares a los que se producirían *in vivo*.

5 La Figura 3 muestra un registro de HPLC de la reversibilidad de HES-IFN. El interferón (IFN, 35 min) se modifica con HES (200 kDa, oxidado al 100 %) para formar interferón modificado con HES (HES-IFN) y da como resultado un producto amplio, de alto peso molecular y que eluye más pronto (20-34 min). El pico correspondiente al interferón libre se volvió a formar en solución durante 72 h con la adición de glicina o sulfato de amonio, lo que indica una liberación lenta de la proteína del portador de HES mediante transiminación.

10 La Figura 4 muestra un registro de HPLC de reversibilidad de HES-albúmina. La albúmina (SAH, 38 min) se modifica con HES (200 kDa, oxidada al 100 %) para formar albúmina modificada con HES (HES-SAH) y da como resultado un producto amplio, de alto peso molecular y que eluye más pronto (20-38 min). El pico correspondiente a la albúmina libre se volvió a formar en solución durante 72 h con adición de glicina o sulfato de amonio, indicativo de la liberación lenta de la proteína del portador de HES por transiminación.

15 Ejemplo 14

20 Procedimiento general de caracterización *in vivo* y bioactividad

Las composiciones de proteínas no reducidas que contienen <25 % de proteína no modificada se consideran adecuadas para estudios de bioactividad *in vitro* e *in vivo*. Las composiciones no reducidas y en algunos casos sus análogos reducidos se preparan a mayor escala en condiciones estériles y se purifican por ultrafiltración. Las composiciones se administran a modelos animales adecuados por vía intravenosa. Las proteínas y el vehículo no modificados se administran en grupos de animales separados como controles. Las muestras de sangre se extraen y el plasma se prepara para la cuantificación de la proteína y la medición de la actividad de la proteína. La cantidad de proteína se cuantifica mediante técnicas convencionales. La actividad se mide utilizando un ensayo establecido de actividad de proteína.

30 Ejemplo 14a

Detección *in vivo* de la histona H1 marcada por fluorescencia Alexa Fluor 488 como proteína modelo

35 La histona H1 marcada por fluorescencia (f-histona H1, de Invitrogen) se usó como proteína modelo debido a su pequeño tamaño (y, por lo tanto, un gran potencial para beneficiarse de la modificación del HES con una mejora del pK resultante). La farmacocinética de IFN en el Ejemplo 12 se basó en mediciones de la actividad del IFN y no en la detección real de IFN (la modificación con HES hace que sea intrínsecamente difícil usar técnicas tradicionales como ELISA y HPLC para detectar las proteínas modificadas en plasma debido a la presencia de otras proteínas plasmáticas a una mayor concentración que co-eluyen bajo las condiciones de cromatografía). La f-histona H1 (2 colorantes Alexa Fluor 488 por proteína) se modificó con oxiHES (200 kDa, oxidado al 100 %, relación molar 1:1 en función del PMPP del HES, PBS a pH 7,4, 37 °C, 15 min, sin purificación). La formulación se diluyó a 0,05 mg/ml con PBS, pH 7,4, y se congeló hasta su inyección. La solución descongelada en PBS (0,05 mg/ml) se dosificó en ratones CD-1 a 0,2 mg/kg utilizando un volumen de dosis de 100 µl. Se sacrificaron 27 ratones en puntos de tiempo específicos (3 ratones por punto de tiempo, 4 puntos de tiempo: 15 min, 1, 4 y 24 h para HES-f-histona H1 y f-histona H1, más tres ratones de control que recibieron PBS) mediante exanguinación por punción cardíaca y los plasmas se recolectaron. Los plasmas se analizaron en un lector de placas a 485 nm y longitudes de onda de absorción y emisión de 530 nm para la detección de Alexa Fluor 488. Los valores de fluorescencia en plasma se convirtieron en µg/ml de proteína en función de la fluorescencia específica de la proteína marcada en plasma determinada previamente. La Figura 5 muestra las curvas de concentración. La f-histona H1 no modificada con HES 50 mostró una gran prolongación en el plasma en comparación con la proteína no modificada y apenas fue detectable en cualquier momento. La HES-f-histona H1 permaneció detectable durante la duración del experimento (24 h).

Ejemplo 15

55 Preparación, caracterización y actividad de la composición de enzima-polisacárido

Preparación de composiciones

60 Se prepararon una serie de composiciones que comprendían una enzima y un polisacárido oxidado por métodos similares y se caracterizaron. Las enzimas utilizadas incluían L-asparaginasa, uricasa, desoxirribonucleasa, superóxido dismutasa, catalasa y estreptoquinasa.

65 Las composiciones se preparan como se describe en el Ejemplo 4 anterior. En varios puntos de tiempo, las alícuotas se extraen y se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de los componentes que contienen enzima. Las muestras también se extraen y se dializan si es necesario contra PBS o un tampón alternativo adecuado utilizando una

membrana de PMCO de 10 kDa y las concentraciones se ajustan para obtener composiciones adecuadas para la evaluación *in vitro* o *in vivo*.

Caracterización *in vitro* y bioactividad

5 Las composiciones no reducidas que contienen <25 % de enzima no modificada se consideran adecuadas para el análisis de bioactividad. Estas composiciones se seleccionan para la caracterización de la velocidad de disociación enzimática del conjugado y para el análisis de la actividad enzimática. Las composiciones no reducidas y sus análogos reducidos se preparan a mayor escala en condiciones estériles y se purifican por ultrafiltración. Las
10 composiciones se incuban en plasma de roedor, PBS o PBS que contiene albúmina y aminas plasmáticas representativas a 37 °C a concentraciones que simulan infusiones del 0,1, 1 y 10 % del volumen de sangre animal. A las 0, 2, 8, 24, 48, 72 y 96 h, las alícuotas se extraen y se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de los
15 componentes que contienen enzima. Las alícuotas también se analizan para determinar la actividad enzimática utilizando métodos establecidos. Todos los métodos se corrigen para la interferencia potencial de los componentes de las composiciones.

Caracterización *in vivo* y bioactividad

20 Las composiciones de enzimas no reducidas que contienen <25 % de enzimas no modificadas y que muestran un aumento en el contenido de enzimas libres y la actividad enzimática durante los estudios de incubación *in vitro* se consideran adecuadas para estudios de bioactividad *in vivo*. Las composiciones no reducidas y sus análogos reducidos se preparan a mayor escala en condiciones estériles y se purifican por ultrafiltración. Las composiciones se administran a roedores por vía intravenosa, y en estudios separados, por vía subcutánea (por vía intravenosa). La
25 enzima y el vehículo no modificados se administran en grupos de animales separados como controles. Las muestras de sangre se extraen y el plasma se prepara para la cuantificación de la enzima y la medición de la actividad enzimática. La cantidad de enzima se cuantifica mediante nefelometría o PAGE. La actividad se mide utilizando un ensayo de actividad enzimática establecido.

30 Ejemplo 15a

HES-uricasa

35 *Preparación de composiciones*

Las composiciones se preparan como se describe en el Ejemplo 4 anterior. En varios puntos de tiempo, las alícuotas se extraen y se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de los componentes que contienen enzima. Las muestras también se extraen y se dializan, si es necesario, contra PBS o un tampón adecuado utilizando una membrana de
40 PMCO de 10 kDa y las concentraciones se ajustan para obtener composiciones adecuadas para la evaluación *in vitro* o *in vivo*.

Preparación de oxiHES-uricasa utilizando HES de 200 kDa oxidado al 100 %

45 La uricasa (de *Candida utilis*, Worthington Biochemical) se preparó hasta 10 mg/ml en WFI. Se mezclaron 100 µl de la solución de uricasa con 50 µl de 20X PBS a pH 7,4 y 72 µl de 38,2 mg/ml del HES de 200 kDa oxidado al 100 % (preparado como se describe en el Ejemplo 1) y se diluyeron con 778 µl de WFI para dar un volumen de reacción total de 1 ml que contiene 1 mg/ml de uricasa. La relación de HES a uricasa fue de 1,75:1 basada en el PMPP de 200 kDa para el oxiHES y de 125 kDa para la uricasa. La mezcla se agitó suavemente a 25 °C y se controló
50 mediante inyección de HPLC en diversos puntos de tiempo (1, 2, 3, 6, 7, 24, 48, 72 h).

Caracterización biofísica

La composición contenía muy poca uricasa sin reaccionar después de solo 1,5 h de tiempo de reacción según se
55 analizó mediante HPLC de exclusión por tamaños (columna Phenomenex BioSep SEC S4000, fase móvil de tampón de PBS a pH 7,4, 1 ml/min, absorbencia medida a 214 y 280 nm). El producto apareció como una distribución de mayor peso molecular de la uricasa modificada que se eluye más rápido y va que oscila de 600 kDa a 150 kDa. La Figura 6 muestra el perfil de HPLC en los puntos de tiempo seleccionados de la reacción. Esto demuestra que la uricasa (10 min) cuando se modifica con HES (200 kDa, oxidado al 100 %) da como resultado un producto
60 modificado con HES que eluye más pronto (HES-uricasa, 7-9,5 min) con un perfil amplio y de alto peso molecular por HPLC de SEC.

*Caracterización *in vitro* y bioactividad*

65 La composición se analizó para determinar la actividad después de 2 h de reacción usando un ensayo que mide la tasa de agotamiento del ácido úrico al controlar la disminución en la absorbancia de 293 nm de la solución del

ensayo en donde la proteína se incubaba con ácido úrico sustrato en tampón de borato a pH 9. La actividad de la uricasa modificada con HES tuvo una actividad comparable a la uricasa nativa después de 1,5 h de reacción y la actividad se atribuye a la uricasa modificada, ya que después de este tiempo de reacción había muy poca uricasa nativa presente sin reaccionar. En el ensayo, la uricasa y la HES-uricasa se analizaron a la misma concentración con factores de dilución iguales.

Preparación de oxiHES-uricasa utilizando HES de 200 kDa oxidado al 25 %

La uricasa (de *Candida utilis*, Worthington Biochemical) se preparó hasta 10 mg/ml en WFI. Se mezclaron 100 µl de la solución de uricasa con 50 µl de 20X PBS a pH 7,4 y 4 µl de 69,9 mg/ml del HES de 200 kDa oxidado al 100 % (preparado como se describe en el Ejemplo 1) y se diluyeron con 778 µl de WFI para dar un volumen de reacción total de 1 ml que contiene 1 mg/ml de uricasa. La relación de HES a uricasa fue de 0,2:1 basada en el PMPP de 200 kDa para el oxiHES y de 125 kDa para la uricasa. La mezcla se agitó suavemente a 25 °C y se controló mediante inyección de HPLC en diversos puntos de tiempo (1, 2, 3, 6, 7, 24, 48, 72 h).

Caracterización biofísica

La composición contenía muy poca uricasa sin reaccionar después de solo 1,5 h de tiempo de reacción según se analizó mediante HPLC de exclusión por tamaños (columna Phenomenex BioSep SEC S4000, fase móvil de tampón PBS a pH 7,4, 1 ml/min, absorbencia medida a 214 y 280 nm). El producto apareció como una distribución de peso molecular muy alta de elución rápida de uricasa modificada que va desde > 600 kDa hasta 200 kDa. La Figura 8 muestra el perfil de HPLC en los puntos de tiempo seleccionados de la reacción. Esto muestra que la uricasa (10 min) cuando se modifica con HES (200 kDa, oxidado al 25 %) da como resultado un producto polimerizado de muy alto peso molecular modificado con HES que se eluye más pronto (HES-uricasa, 6-8 min).

Caracterización in vitro y bioactividad

La composición se analizó para determinar su actividad después de 24 h de reacción usando el ensayo de ácido úrico descrito anteriormente. La actividad de la uricasa modificada con HES tuvo una actividad comparable a la uricasa nativa después de 24 h de reacción y la actividad se atribuye a la uricasa modificada, ya que después de este tiempo de reacción había muy poca uricasa nativa sin reaccionar. Un conjugado similar compuesto con oxiHES de 450 kDa también tuvo bioactividad equivalente a la uricasa nativa en el ensayo. En el ensayo, la uricasa y la HES-uricasa se analizaron a la misma concentración con factores de dilución iguales. La Figura 7 muestra las curvas de actividad para los productos y la uricasa nativa para su comparación. Además, el producto formado a partir de oxiHES de 200 kDa se diluyó tanto en plasma de ratón CD-1 como en plasma humano y se incubó a 37 °C. Después de 1, 4 y 24 h, se extrajeron alícuotas y se analizaron para determinar su actividad usando el ensayo Amplex Red (Invitrogen). Brevemente, la uricasa y la HES-uricasa se incubaron en plasma a una concentración de 100 mU/ml (~30 µg/ml en base a la actividad específica de 3200 mU/mg para la uricasa) y las alícuotas se diluyeron 20 veces con el kit de tampón para la medición en el ensayo. El conjugado tenía una actividad comparable a la uricasa nativa para todos los puntos temporales. La Figura 9 muestra los resultados del ensayo Amplex Red donde se analizaron los conjugados seleccionados para determinar la duración de la actividad en plasma humano (el 100 % de OxiHES 200K más uricasa [que también aparece en la Figura 6] está indicado por, ▲, el 25 % de OxiHES 200K más uricasa [que también aparece en la Figura 8] está indicado por, ◆ en la Figura 9). Las muestras mantuvieron su actividad durante varios días *in vitro* en plasma humano.

Caracterización in vivo y bioactividad

Para fines de comparación, el conjugado de HES-uricasa formado a partir de la reacción de HES oxidado al 25 % que se hizo reaccionar con uricasa en una relación de HES:proteína de 1:10 se trató con un exceso de 3,4 veces de complejo de dimetilamina borano por HES aldehído para reducir todas las bases de Schiff y los aldehídos reactivos para preparar un conjugado reducido e irreversible. Esta formulación se probó en ratones CD-1 (Charles River Labs, St. Constant, QC, Canadá) en comparación con los de ratones no reducido y la uricasa nativa. Las dos formulaciones de HES-uricasa, no reducidas y reducidas en DMB, tuvieron una actividad equivalente a la uricasa nativa según se determinó usando el ensayo de ácido úrico. Los ratones (12 por grupo, 3 por punto de tiempo) recibieron una dosis intravenosa de 200 µl de 1 mg/ml (3200 mU/ml) del artículo de ensayo, lo que resultó en una dosis de ~8 mg/kg de uricasa (640 mU por ratón). Las muestras de plasma se recolectaron después de una exsanguinación terminal mediante punción cardíaca. La actividad de la uricasa de las muestras de plasma se determinó utilizando el ensayo Amplex Red. La Tabla 4 a continuación muestra las actividades relativas de los plasmas de ratones inyectados con artículos de ensayo en comparación con los de ratones a los que se les administró uricasa nativa, lo que indica que la HES-uricasa no reducida proporcionó mayor actividad en los puntos temporales posteriores que la HES-uricasa reducida y la uricasa nativa, esta última que no proporcionó actividad detectable después de 4 h.

Tabla 4. Actividades plasmáticas de ratones CD-1 inyectados con uricasa, HES-uricasa y HES-uricasa reducida en DMB

Artículo de ensayo	Tiempo (h) después de la inyección	Actividad de la uricasa detectada en plasma (mU/ml)
Uricasa	8	Indetectable
	24	Indetectable
HES-uricasa reducida en DMB	8	62,7 ± 6,5
	24	Indetectable
HES-uricasa (no reducida)	8	73,1 ± 25,1
	24	44,8 ± 18,5

Ejemplo 15b

5

HES-Asparaginasa

Preparación de composiciones

10 Las composiciones se preparan como se describe en el Ejemplo 4 anterior. En varios puntos de tiempo, las alícuotas se extraen y se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de los componentes que contienen enzima. Las muestras también se extraen y se dializan, si es necesario, contra PBS o un tampón adecuado utilizando una membrana de PMCO de 10 kDa y las concentraciones se ajustan para obtener composiciones adecuadas para la evaluación *in vitro* o *in vivo*.

15

Para cada preparación del HES oxidado, se combinó la enzima en WFI con 1 M de fosfato de sodio a pH 8 y HES oxidado en WFI para lograr una relación molar final de oxiHES:asparaginasa de 0,2:1 y 1:1 y una concentración final de asparaginasa de 5 mg/ml. (L-Asparaginasa, de *E. coli*, Prospec-Tany, Israel). Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C. A los 5 min, 25 min, 1 h, 4 h y 24 h, se extrajeron alícuotas y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de las mezclas que contienen asparaginasa. Las muestras se inactivaron con 100 mM de acetato de sodio a pH 5 y se purificaron mediante diálisis frente a WFI.

20

25 *Preparación de oxiHES-asparaginasa utilizando HES de 100 kDa oxidado al 100 %*

La asparaginasa se preparó hasta 10 mg/ml en WFI. Se mezclaron 150 µl de la solución de asparaginasa con 30 µl de tampón de fosfato de sodio 1 M, pH 8 y 50 µl de 38,2 mg/ml del HES de 200 kDa oxidado al 100 % (preparado como se describe en el Ejemplo 1) y se diluyeron con 70 µl de WFI para dar 0,3 ml de volumen de reacción total que contiene 5 mg/ml de asparaginasa. La relación de HES a asparaginasa fue de 1:1 basada en el PMPP de 200 kDa para el oxiHES y de 140 kDa para la asparaginasa. La mezcla se incubó a 37 °C y se controló mediante inyección de HPLC en varios puntos de tiempo (5 min, 25 min, 1 h, 4 h y 24 h).

30

Caracterización biofísica

35

La composición contenía muy poca asparaginasa sin reaccionar después de solo 5 min de tiempo de reacción según se analizó mediante HPLC de exclusión por tamaños (columna Phenomenex BioSep SEC S4000, fase móvil de tampón PBS a pH 7,4, 1 ml/min, absorbancia medida a 214 y 280 nm). El producto apareció como una distribución amplia de asparaginasa modificada, de mayor peso molecular y de elución más rápida, que va que oscila de 600 kDa a 150 kDa. La Figura 10 muestra el perfil de HPLC después de 5 min de reacción. Esto muestra que la asparaginasa (10,2 min) cuando se modifica con HES (200 kDa, oxidado al 100 %) da como resultado un producto modificado con HES que eluye más pronto (HES-asparaginasa, 7-10 min) con un perfil amplio y de alto peso molecular según HPLC de SEC.

40

45 *Caracterización in vitro y bioactividad*

La HES-asparaginasa y la asparaginasa se analizaron para determinar su actividad utilizando un ensayo basado en la cuantificación del amoníaco liberado de la asparagina tras la incubación con la enzima utilizando el reactivo de Nessler (Ensayo enzimático de asparaginasa de Sigma, EC 3.5.1.1). La actividad específica de la asparaginasa y la HES-asparaginasa fue comparable con una pérdida mínima en la actividad específica.

50

Caracterización in vivo y bioactividad

Las muestras de plasma se analizaron utilizando el ensayo Sigma modificado para medir muestras de plasma. La Figura 11 muestra los niveles de actividad plasmática de asparaginasa para ratones a los que se administró asparaginasa en comparación con aquellos que recibieron HES-asparaginasa. Diseño del estudio: 27 ratones (macho BDF₁) se inyectaron (intraperitoneal, ip, 100 µl, 0,22 mg/ml de asparaginasa, ~5 UI/ratón) y se sacrificaron

55

en puntos de tiempo específicos (3 ratones por punto de tiempo, 4 puntos de tiempo: 15 min, 1, 4 y 24 h para HES-asparaginasa y asparaginasa, más tres ratones de control que reciben PBS) por exsanguinación mediante punción cardíaca y los plasmas se recolectaron. Los plasmas se analizaron para determinar la actividad de la asparaginasa de acuerdo con el ensayo Sigma utilizando el reactivo de Nessler. La asparaginasa no modificada proporcionó un pico en la actividad de la asparaginasa en 1 h, pero a continuación no proporcionó ninguna actividad detectable por encima de la línea de base del plasma. La HES-asparaginasa proporcionó una actividad máxima después de 1 h, seguida de una actividad detectable durante la duración del experimento (24 h), manteniendo el 62 % de la actividad máxima en el punto temporal de 24 h.

10 Ejemplo 16

Preparación, caracterización y actividad de la composición de inhibidor de enzima-polisacárido

15 Las composiciones de polisacáridos oxidados y una proteína que es un inhibidor enzimático (alfa-1 antitripsina) se preparan y caracterizan como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 15 para composiciones de polisacárido-enzima. La actividad se refiere a la bioactividad de la proteína utilizada. Los ensayos para la detección y cuantificación de proteínas modificadas y no modificadas, y los ensayos para la actividad de la proteína, se seleccionan entre los métodos adecuados para la proteína utilizada.

20 Ejemplo 16a

HES-alfa-1 antitripsina (HES-A1AT)

Preparación de composiciones

25 Las composiciones se preparan como se describe en el Ejemplo 4 anterior. En varios puntos de tiempo, las alícuotas se extraen y se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de los componentes que contienen enzima. Las muestras también se extraen y se dializan, si es necesario, contra PBS o un tampón adecuado utilizando una membrana de PMCO de 10 kDa y las concentraciones se ajustan para obtener composiciones adecuadas para la evaluación *in vitro* o *in vivo*. Para cada preparación del HES oxidado, se combinó A1AT humana, o rhA1AT, en WFI con tampón de fosfato de sodio 1 M (pH 6, 7 u 8) y HES oxidado (70, 200 y 450 kDa, oxidado al 25-100 %) en WFI para lograr una relación molar final de oxiHES: A1AT de 0,2:1 y 1:1 y una concentración final de A1AT de 5 mg/ml. Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C. A los 5 min, 25 min, 3 h, 6 h y 24 h, se extrajeron alícuotas y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de A1AT y la distribución de pesos moleculares (DPM) de las mezclas que contienen A1AT. Las muestras se inactivaron con 100 mM de acetato de sodio a pH 5 y se purificaron mediante diálisis frente a WFI.

40 Preparación de oxiHES-A1AT utilizando HES de 200 kDa oxidado al 200 %

45 La A1AT humana recombinante se preparó hasta 10 mg/ml en WFI. Se mezclaron 250 µl de la solución A1AT con 50 µl de tampón de fosfato de sodio 1 M, pH 8 y 200 µl de 38,2 mg/ml del HES de 200 kDa oxidado al 100 % (preparado como se describe en el Ejemplo 1) para obtener un volumen de reacción total de 0,5 ml que contiene 5 mg/ml de A1AT. La relación de HES a A1AT fue de 1:1 basada en el PMPP de 200 kDa para el oxiHES y de 52 kDa para la A1AT. La mezcla se incubó a 37 °C y se controló mediante inyección de HPLC en varios puntos de tiempo (5 min, 25 min, 3 h, 6 h y 24 h).

Caracterización biofísica

50 La composición contenía muy poco A1AT sin reaccionar después de 25 min de tiempo de reacción según se analizó mediante HPLC de exclusión por tamaños (columna Phenomenex BioSep SEC S4000, fase móvil de tampón PBS a pH 7,4, 1 ml/min, absorbancia medida a 214 y 280 nm). El producto apareció como una amplia distribución de A1AT modificada, de mayor peso molecular y de elución más rápida, que va que oscila de 600 kDa a 150 kDa. La Figura 12 muestra el perfil de HPLC después de 25 min de reacción. Esto muestra que la alfa-1 antitripsina (A1AT, 10,6 min) cuando se modifica con HES (200 kDa, oxidado al 100 %) da como resultado un producto modificado con HES que eluye más pronto (HES-A1AT, 8-10,5 min) con un efecto amplio y un alto perfil de peso molecular por HPLC de SEC.

Caracterización in vitro y bioactividad

60 Se analizó la actividad del HES-A1AT y A1AT utilizando un ensayo basado en el deterioro de la elastasa de neutrófilos para escindir un sustrato espectrofotométricamente activo después de la unión a A1AT o HES-A1AT. El método es como se describe en Samis et al. (Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2, p. 1535-44). El A1AT no modificado se midió que tenía una Cl_{50} de 0,02 µl, y el HES-A1AT tenía una Cl_{50} de 0,03 µl cuando los artículos de ensayo se analizaron a 5,5 mg/ml basándose en el contenido de proteína A1AT.

Caracterización in vivo y bioactividad

Se usó un kit de detección ELISA comercial para determinar el efecto de la modificación del HES en el tiempo de circulación del plasma de rhA1AT después de la administración. Se inyectaron 27 ratones (Balb/c, Charles River) (iv, 100 µl, 0,5 mg/ml de A1AT) y se sacrificaron en puntos de tiempo especificados (3 ratones por punto de tiempo, 4 puntos de tiempo: 15 min, 1, 4 y 24 h para HES-A1AT y A1AT, más tres ratones de control que recibieron PBS) por exsanguinación mediante punción cardíaca y los plasmas se recolectaron. Los plasmas se analizaron utilizando un ELISA disponible en el mercado (ICL Inc., n.º catálogo E-80A1T). La afinidad de unión de los mAbs del kit para la proteína se redujo debido a la naturaleza de la modificación de HES como se esperaba (unión reducida aproximadamente 30 veces). A pesar de que la detección por ELISA fue menor para HES-A1AT que para A1AT, el nivel de A1AT detectable en plasma no disminuyó tan rápidamente con el tiempo *in vivo* para HES-A1AT como lo hizo para A1AT, que disminuyó muy rápidamente en relación con el conjugado modificado con HES, especialmente en las primeras 4 h (Figura 13).

Ejemplo 17

Preparación, caracterización y actividad de la composición de anticuerpos y polisacáridos

Las composiciones de polisacáridos oxidados y proteínas que son anticuerpos (incluido el anti-CD163) se preparan y caracterizan como se ha descrito anteriormente para composiciones de polisacáridos y enzimas. La actividad se refiere a la bioactividad de la proteína utilizada. Los ensayos para la detección y cuantificación de proteínas modificadas y no modificadas, y los ensayos para la actividad de la proteína, se seleccionan entre los métodos adecuados para la proteína utilizada.

Ejemplo 17a

Anticuerpo monoclonal anti-CD163 HES

Preparación del mAb oxiHES-anti-CD163 utilizando HES de 200 kDa oxidado al 100 %

Las composiciones se preparan como se describe en el Ejemplo 4 anterior. En varios puntos de tiempo, las alícuotas se extraen y se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de los componentes que contienen enzima. Las muestras también se extraen y se dializan, si es necesario, contra PBS o un tampón adecuado utilizando una membrana de PMCO de 10 kDa y las concentraciones se ajustan para obtener composiciones adecuadas para la evaluación *in vitro* o *in vivo*.

El mAb anti-CD163 derivado de hibridoma murino (2E9A2) se preparó hasta 10 mg/ml en WFI. Se mezclaron 250 µl de la solución de mAb anti-CD163 con 50 µl de tampón de fosfato sódico 1 M, pH 8, 90 µl de 38,2 mg/ml de HES de 200 kDa oxidado al 100 % (preparado como se describe en el Ejemplo 1) y 110 µl del diluyente WFI para dar un volumen de reacción total de 0,5 ml que contiene 5 mg/ml de mAb anti-CD163. La relación de HES a mAb anti-CD163 fue de 1:1 basada en el PMPP de 200 kDa para el oxiHES y de 150 kDa para el mAb anti-CD163. La mezcla se incubó a 37 °C y se controló mediante inyección de HPLC en varios puntos de tiempo (5 min, 25 min, 1 h, 2 h y 6 h de reacción).

Caracterización biofísica

La composición contenía anticuerpos predominantemente modificados después de solo 5 min de tiempo de reacción según se analizó mediante HPLC de exclusión por tamaños (columna Phenomenex BioSep SEC S4000, fase móvil de tampón PBS a pH 7,4, 1 ml/min, absorbancia medida a 214 y 280 nm). El producto apareció como una amplia distribución de mAb anti-CD163 modificado de elución molecular más rápida, con un intervalo de 600 kDa a 200 kDa. La Figura 14 muestra el perfil de HPLC después de 25 min de reacción. Esto muestra que el anticuerpo monoclonal anti-CD163 (mAb anti-CD163, 10 min) cuando se modifica con HES (200 kDa, oxidado al 100 %) da como resultado un producto modificado con HES que eluye más pronto (HES-anti-CD163 mAb, 6,2-10 min) con un perfil amplio y de alto peso molecular por HPLC de SEC.

Caracterización in vitro y bioactividad

La unión del anticuerpo anti-CD163 derivado de hibridoma murino, 2E9A2, se determinó mediante citometría de flujo. Tanto las células HEK.293 de tipo silvestre (wt) como las células HEK.293 que expresan el receptor CD163 recombinante se incubaron primero con las preparaciones de anticuerpo 2E9A2 sin marcar. Las células se lavaron y a continuación se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de cabra anti-ratón (GAM) marcado con R-ficoeritrina (PE) para la detección. Después de un lavado final, las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo Beckman Coulter Epics XL para detectar células fluorescentes.

Modelo de estudio de unión in vivo

En las Figuras 15a y 15b, los histogramas muestran la distribución de la intensidad de fluorescencia de las células HEK.293.CD163⁺ incubadas con plasma que contiene anticuerpos y anticuerpos modificados con HES y GAM.PE. Las señales para ambos son altas y muy similares (0 h de incubación) en relación con los controles negativos (células no marcadas y células marcadas solo con anticuerpo secundario GAM.PE), aunque el grado de modificación del HES para el HES-mAb es extenso. El grado de unión del HES-mAb a las células HEK.293.CD163⁺ después de 24 h de incubación del HES-mAb en plasma no se vio afectado (las muestras de plasma de 24 h que contenían el mAb y el HES-mAb mostraron los mismos eventos de unión o MFI). No se detectó unión del anticuerpo o HES-mAb en las células HEK.293 wt (que no expresan CD163). Estos datos sugieren que la modificación con HES no afecta a la porción de unión del mAb y el conjugado o que el mAb liberado conserva su capacidad de unirse a su antígeno (receptor CD163) en plasma durante 24 h.

Ejemplo 18

Preparación, caracterización y actividad de la composición de polisacáridos y citoquinas

Las composiciones de polisacáridos oxidados y proteínas que son citoquinas (incluyendo G-CSF e insulina) se preparan y caracterizan como se ha descrito anteriormente para las composiciones de polisacárido-enzima. La actividad se refiere a la bioactividad de la proteína utilizada. Los ensayos para la detección y cuantificación de proteínas modificadas y no modificadas, y los ensayos para la actividad de la proteína, se seleccionan entre los métodos adecuados para la proteína utilizada.

Ejemplo 18a

HES-G-CSF

Preparación de oxiHES-G-CSF utilizando HES de 200 kDa oxidado al 100 %

Las composiciones se preparan como se describe en el Ejemplo 4 anterior. En varios puntos de tiempo, las alícuotas se extraen y se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de los componentes que contienen enzima. Las muestras también se extraen y se dializan, si es necesario, contra PBS o un tampón adecuado utilizando una membrana de PMCO de 10 kDa y las concentraciones se ajustan para obtener composiciones adecuadas para la evaluación *in vitro* o *in vivo*.

El G-CSF humano recombinante (Prospec-Tany, Israel) formulado como 0,9 mg/ml en tampón de acetato de sodio 10 mM a pH 4 se usó como solución madre. Se mezclaron 250 μ l de la solución de G-CSF con 50 μ l de tampón de fosfato de sodio 1 M, pH 8, 70 μ l de 38,2 mg/ml del HES de 200 kDa oxidado al 100 % (preparado como se describe en el Ejemplo 1) y 130 μ l de diluyente WFI para dar un volumen de reacción total de 0,5 ml que contiene 0,45 mg/ml de G-CSF. La relación de HES a G-CSF fue de 1:1 basada en el PMPP de 200 kDa para el oxiHES y de 18,8 kDa para el G-CSF. La mezcla se incubó a 37 °C y se controló mediante inyección de HPLC en varios puntos de tiempo (15 min, 45 min, 4 h y 24 h de reacción).

Caracterización biofísica

La composición contenía G-CSF predominantemente modificado después de 45 min de tiempo de reacción según se analizó mediante HPLC de exclusión por tamaños (columna Phenomenex BioSep SEC S4000, fase móvil de tampón PBS a pH 7,4, 1 ml/min, absorbancia medida a 214 y 280 nm). El producto apareció como una distribución amplia de mayor peso molecular de elución más rápida de G-CSF modificado que oscila de 600 kDa a 200 kDa. La Figura 16 muestra el perfil de HPLC después de 25 min de reacción. Esto muestra que el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, 12 min) cuando se modifica con HES (200 kDa, oxidado al 100 %) da como resultado un producto modificado con HES que eluye más pronto (HES-G-CSF, 8-12 min) con un perfil amplio y de alto peso molecular por HPLC de SEC. El pico a los 12-13 min es un subproducto de oxiHES de bajo peso molecular que co-eluye parcialmente con el G-CSF no modificado.

Caracterización in vitro y bioactividad

El HES-G-CSF y el G-CSF se analizaron para determinar su efecto proliferativo sobre las células NFS-60. Los artículos de ensayo se diluyeron en serie (1:4) en células en una placa de 96 pocillos (20.100 células/pocillo) desde 10.000 ng/ml hasta 0,0002 ng/ml y sus DE₅₀ se determinaron con relación al patrón interno de G-CSF (PeprTech G-CSF comercial) mediante la lectura de la DO (490 nm) 48 h después de la adición del Promega Substrate Cell Titer a los pocillos que contienen las células y los artículos de ensayo incubados. El G-CSF de Prospec-Tany tuvo una DE₅₀ entre 0,01 y 0,02 ng/ml y el HES-G-CSF tuvo una actividad específica más baja de entre 0,1 y 0,15 ng/ml en las células con respecto al G-CSF de Peprotech (0,03-0,04 ng/ml).

Caracterización in vivo y bioactividad

En ratones inyectados con HES-G-CSF, los niveles plasmáticos de G-CSF después de 15 min se encontró que eran 4 veces más altos que los niveles de G-CSF de ratones inyectados con G-CSF después de 15 min. Los niveles de G-CSF se cuantificaron utilizando el ensayo de actividad descrito anteriormente y corrigiendo la diferencia en actividades específicas.

Ejemplo 18b

HES-Insulina

Preparación de oxiHES-insulina utilizando HES de 200 kDa oxidado al 100 %

Las composiciones se preparan como se describe en el Ejemplo 4 anterior. En varios puntos de tiempo, las alícuotas se extraen y se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de los componentes que contienen enzima. Las muestras también se extraen y se dializan, si es necesario, contra PBS o un tampón adecuado utilizando una membrana de PMCO de 10 kDa y las concentraciones se ajustan para obtener composiciones adecuadas para la evaluación *in vitro* o *in vivo*. La insulina humana recombinante (250 µl, Sigma-Aldrich, compuesta de hasta 1 mg/ml en agua) se mezcló con 50 µl de tampón de fosfato de sodio 1 M, pH 8, 113 µl de 67 mg/ml de HES de 200 kDa oxidado al 100 % (preparado como se describe en el Ejemplo 1), y 87 µl de diluyente WFI para dar un volumen de reacción total de 0,5 ml que contiene 0,5 mg/ml de insulina. La relación de HES a insulina fue de 1:1 basada en el PMPP de 200 kDa para el oxiHES y de 6 kDa para la insulina. La mezcla se incubó a 37 °C y se controló mediante inyección de HPLC en varios puntos de tiempo (5 min, 25 min, 1 h, 4 h y 24 h de reacción). La insulina se preparó hasta 0,5 mg/ml sin la adición de oxiHES, es decir, agua sustituida en el mismo volumen, no era soluble, mientras que el conjugado de insulina sí lo era.

Caracterización biofísica

La composición contenía insulina predominantemente modificada después de 5 min de tiempo de reacción según se analizó mediante HPLC de exclusión por tamaños (columna Phenomenex BioSep SEC S4000, fase móvil de tampón PBS a pH 7,4, 1 ml/min, absorbancia medida a 214 y 280 nm). El producto apareció como una distribución amplia de insulina modificada, de mayor peso molecular y de elución más rápida, que oscila de 600 kDa a 100 kDa. La Figura 17 muestra el perfil de HPLC después de 5 min de reacción. Esto muestra que la insulina (12,5 min) cuando se modifica con HES (200 kDa, oxidado al 100 %) da como resultado un producto modificado con HES que eluye más pronto (HES-insulina, 7,5-12 min) con un perfil de peso molecular amplio y alto por HPLC de SEC. El pico a los 12-13 min es un subproducto de oxiHES de bajo peso molecular que co-eluye con insulina no modificada. Esto se puede eliminar por diálisis.

Caracterización in vitro y bioactividad

La HES-insulina y la insulina fueron analizadas por su efecto proliferativo en las células MCF-7. Los artículos de ensayo se diluyeron en serie (1:5) en células (20.000 células/ml, 100 µl) en una placa de 96 pocillos de 5000 ng/ml a 0,001 ng/ml y sus DE₅₀ se determinaron en relación con el patrón interno IGF-1 (patrón comercial de PeprTech) leyendo la DO (490 nm) 92 h después de la adición del Promega Substrate Cell Titer a los pocillos que contienen las células y los artículos de ensayo incubados. La insulina de Sigma tuvo una DE₅₀ entre 0,12 y 0,18 ng/ml y la HES-insulina tuvo una actividad específica más baja de entre 7,3 y 11 ng/ml en las células con respecto al IGF-1 humano de Peprtech (0,11-0,17 ng/ml).

Ejemplo 19*Preparación, caracterización y actividad de la composición de polisacárido-factor de coagulación*

Las composiciones de polisacáridos oxidados y proteínas que son factores de coagulación (incluidas la estreptoquinasa y el factor VIII) se preparan y caracterizan como se ha descrito anteriormente para las composiciones de polisacárido-enzima. La actividad se refiere a la bioactividad de la proteína utilizada. Los ensayos para la detección y cuantificación de proteínas modificadas y no modificadas, y los ensayos para la actividad de la proteína, se seleccionan entre los métodos adecuados para la proteína utilizada.

Ejemplo 19a

HES-estreptoquinasa

Preparación de oxiHES-estreptoquinasa utilizando HES de 200 kDa oxidado al 100 %

Las composiciones se preparan como se describe en el Ejemplo 4 anterior. En varios puntos de tiempo, las alícuotas se extraen y se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de los componentes que contienen enzima. Las muestras también se extraen y se dializan, si es necesario, contra PBS o un tampón adecuado utilizando una membrana de PMCO de 10 kDa y las concentraciones se ajustan para obtener composiciones adecuadas para la evaluación *in vitro* o *in vivo*. Se preparó estreptoquinasa humana recombinante (Prospec-Tany, Israel) hasta 20 mg/ml en agua y se dializó exhaustivamente contra PBS. La solución madre también contenía 14 mg/ml de seroalbúmina humana (SAH). 15 µl de la solución madre de estreptoquinasa que contenía SAH se mezclaron con 30 µl de tampón de fosfato de sodio 1 M, pH 8, 147 µl de 43,4 mg/ml de HES de 200 kDa oxidado al 100 % (preparado como se describe en el Ejemplo 1) y 108 µl de diluyente WFI para dar un volumen de reacción total de 0,3 ml que contiene 5 mg/ml de estreptoquinasa. La relación de HES a estreptoquinasa fue de 1:1 basada en el PMPP de 200 kDa para el oxiHES y de 47 kDa para la estreptoquinasa. La mezcla se incubó a 37 °C y se controló mediante inyección de HPLC en varios puntos de tiempo (15 min, 45 min, 4 h y 24 h de reacción).

15 *Caracterización biofísica*

La composición contenía predominantemente estreptoquinasa modificada y albúmina después de 45 min de tiempo de reacción según se analizó mediante HPLC de exclusión por tamaños (columna Phenomenex BioSep SEC S4000, fase móvil de tampón PBS a pH 7,4, 1 ml/min, absorbancia medida a 214 y 280 nm). El producto apareció como una distribución amplia de estreptoquinasa y albúmina modificada, de mayor peso molecular que eluye más pronto, que oscila de 600 kDa a 200 kDa. La Figura 18 muestra el perfil de HPLC después de 25 min de reacción. Esto muestra que la estreptoquinasa (10,5 min) cuando se modifica con HES (200 kDa, oxidado al 100 %) da como resultado un producto modificado con HES que eluye más pronto (HES-estreptoquinasa, 6-10,5 min) con un perfil de peso molecular amplio y alto por HPLC de SEC. El producto en realidad es una mezcla de estreptoquinasa, SAH y oxiHES, ya que la relación de SAH a estreptoquinasa en la solución madre fue de aproximadamente 0,7:1, y no hay un pico detectable por encima del registro de la distribución de picos del producto HES correspondiente a donde eluiría la albúmina si estuviera presente en una forma no conjugada a esa concentración.

30 Ejemplo 19b

HES-Factor VIII

Preparación de oxiHES-factor VIII utilizando HES de 200 kDa oxidado al 100 %

Las composiciones se preparan como se describe en el Ejemplo 4 anterior. En varios puntos de tiempo, las alícuotas se extraen y se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaños para determinar el grado de modificación de la enzima y la distribución del peso molecular (DPM) de los componentes que contienen enzima. Las muestras también se extraen y se dializan, si es necesario, contra PBS o un tampón adecuado utilizando una membrana de PMCO de 10 kDa y las concentraciones se ajustan para obtener composiciones adecuadas para la evaluación *in vitro* o *in vivo*. El factor VIII recombinante (Prospec-Tany, Israel) se disolvió en PBS para obtener una solución madre de 1 mg/ml. Después de la diálisis, se determinó que la concentración era de 0,6 mg/ml debido a la hinchazón y la dilución. Se mezclaron 500 µl de la solución de factor VIII con 100 µl de tampón de fosfato de sodio 1 M, pH 8, 238 µl de 38,2 mg/ml del HES de 200 kDa oxidado al 100 % (preparado como se describe en el Ejemplo 1) y 162 µl de diluyente WFI para dar un volumen de reacción total de 1 ml que contiene 0,3 mg/ml de factor VIII. La relación de HES a factor VIII fue de 44:1 basada en el PMPP de 200 kDa para el oxiHES y de 18,8 kDa para el factor VIII. La mezcla se incubó a 37 °C y se controló mediante inyección de HPLC en varios puntos de tiempo (15 min, 45 min, 4 h y 24 h de reacción).

50 *Caracterización biofísica*

La composición contenía predominantemente factor VIII modificado después de 45 min de tiempo de reacción según se analizó mediante HPLC de exclusión por tamaños (columna Phenomenex BioSep SEC S4000, fase móvil de tampón PBS a pH 7,4, 1 ml/min, absorbancia medida a 214 y 280 nm). El producto apareció como una distribución amplia de factor VIII modificado, de mayor peso molecular, y de elución más rápida, que oscila entre 600 kDa y 200 kDa. La Figura 19 muestra el perfil de HPLC después de 25 min de reacción. Esto muestra que el factor VIII (FVIII, principalmente a 8,9 min) cuando se modifica con HES (200 kDa, oxidado al 100 %) da como resultado un producto modificado con HES que se eluye más pronto con un pico agudo de peso molecular muy alto (6 min) así como algunos picos de peso molecular amplios y altos (entre 6,5 y 9 min) cuando se analizan mediante HPLC de SEC.

60 Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso como agente terapéutico o de diagnóstico, en donde la composición comprende un polisacárido oxidado y una proteína;
- 5 donde menos del 20 % del total de unidades monoméricas de polisacárido oxidado contienen unidades de alfa-hidroxi aldehído, y en donde el polisacárido oxidado y la proteína se conjugan a través de uno o más enlaces imina; en donde la composición de polisacárido oxidado-proteína es soluble a pH fisiológico en un disolvente acuoso; y la composición es capaz de liberar la proteína; y en donde el polisacárido oxidado se selecciona entre almidón oxidado y derivados de hidroxihidrocarbilo oxidados de almidón.
- 10 2. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polisacárido oxidado es hidroxietil almidón oxidado.
3. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el grado de oxidación del polisacárido oxidado es del 1 al 100 %.
- 15 4. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación de polisacárido oxidado a proteína es de 0,1:1 a 20:1.
- 20 5. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición de polisacárido oxidado-proteína comprende más de una proteína y cada proteína está conjugada al polisacárido oxidado a través de uno o más enlaces imina.
- 25 6. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la o cada proteína se selecciona entre anticuerpos, citoquinas, enzimas, factores de crecimiento y proteínas reguladoras.
- 30 7. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la o cada proteína se selecciona entre eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), uricasa, beta-glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa, inhibidor C-1, estreptoquinasa, ADNsel, alfa-1 antitripsina, asparaginasa, arginina desiminasa, factor IX, factor VIIa, factor VIII, factor IIa (trombina), anticuerpo anti-TNF-alfa, activador del plasminógeno tisular, hormona del crecimiento humano, superóxido dismutasa, catalasa, anticuerpo CD163, anti-VEGF, anticuerpo anti-trombina, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-IgG1, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-IgG2a, anticuerpo anti-EGFR, histona, interferón, insulina, albúmina y mezclas de los mismos.
- 35 8. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjugado de polisacárido oxidado-proteína tiene un tamaño inferior a 0,1 µm.
- 40 9. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína tiene un peso molecular promedio en peso mayor que aproximadamente 1 kDa.
- 45 10. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición de polisacárido oxidado-proteína comprende además proteína no conjugada.
- 50 11. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición sirve para su uso en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o afección, en donde la enfermedad o afección se selecciona entre infección por el virus de la hepatitis C (VHC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), deficiencia de alfa-1 antitripsina (AAT), anemia, hiperuricemia crónica, hemofilia, hemorragia, neutropenia inducida por quimioterapia, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, angioedema hereditario, melanoma maligno, carcinoma hepatocelular (CHC), lesión por reperfusión, infarto de miocardio, embolia pulmonar, psoriasis, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, fibrosis quística, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, diabetes, septicemia, choque hipovolémico y deficiencia de hormona del crecimiento; en donde la composición de polisacárido oxidado-proteína es soluble en un disolvente acuoso; y la composición es capaz de liberar la proteína, y en donde el polisacárido oxidado se selecciona entre almidón oxidado y derivados de hidroxihidrocarbilo oxidados del almidón.
- 55 60 12. Una composición de polisacárido oxidado-proteína para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la composición se administra a un sujeto y la proteína se libera del conjugado a lo largo del tiempo, de tal manera que la semivida circulatoria de la proteína que está conjugada mejora en relación con la semivida circulatoria de la proteína no conjugada.
- 65

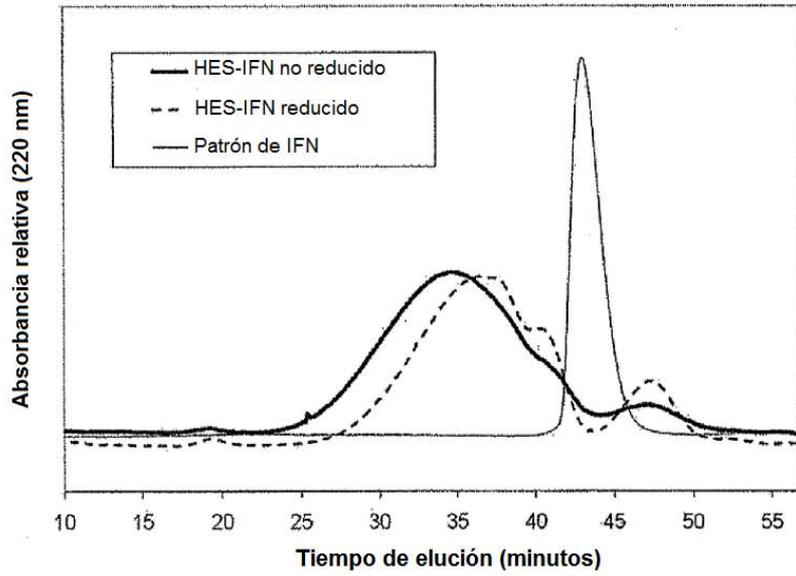


Figura 1

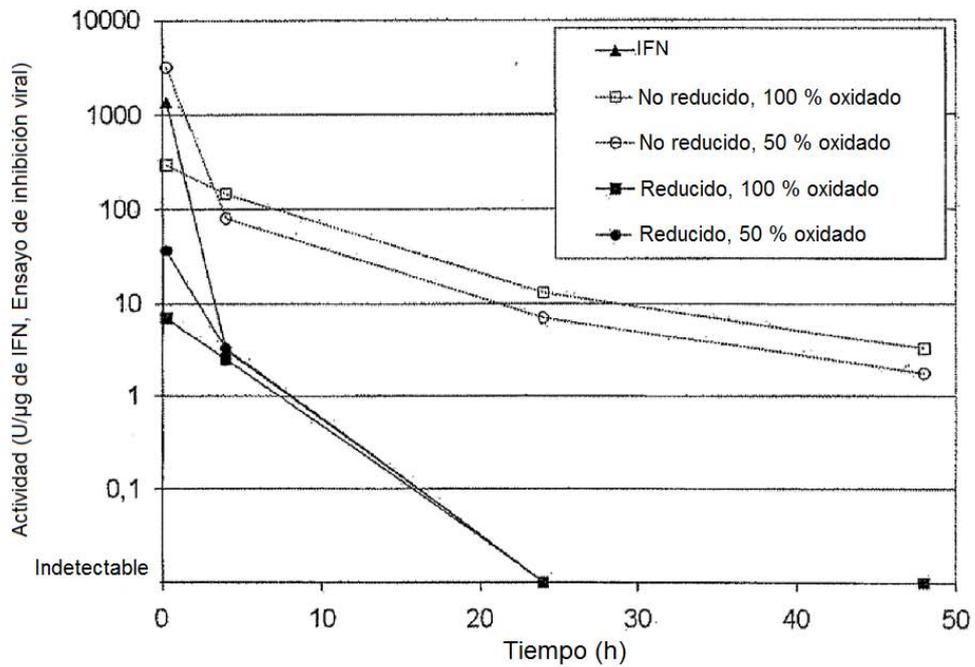


Figura 2

Figura 3

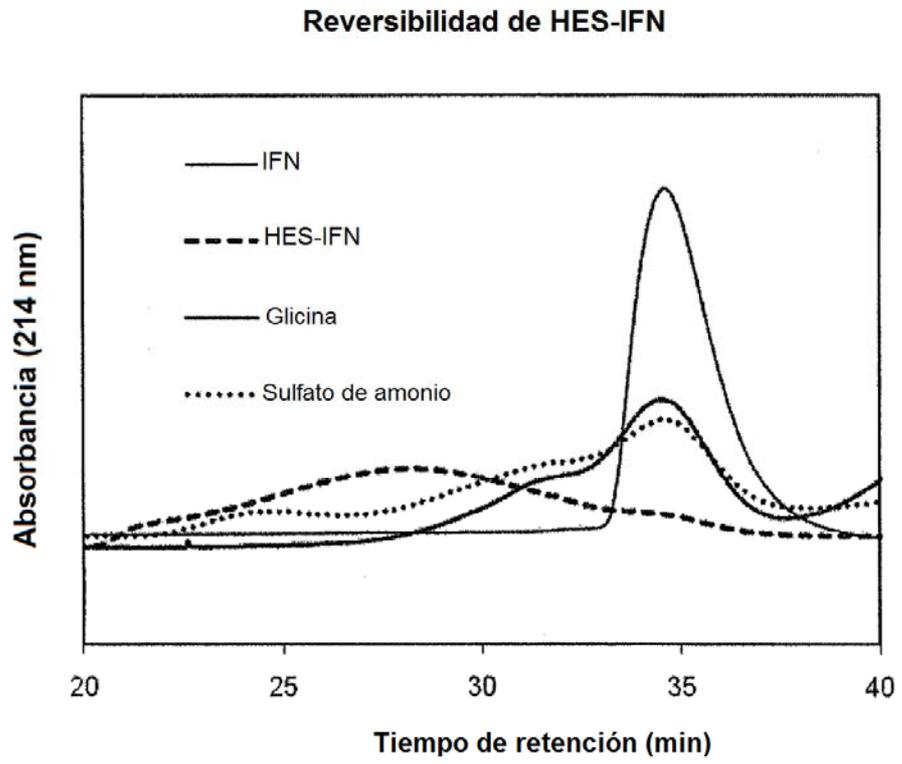


Figura 4

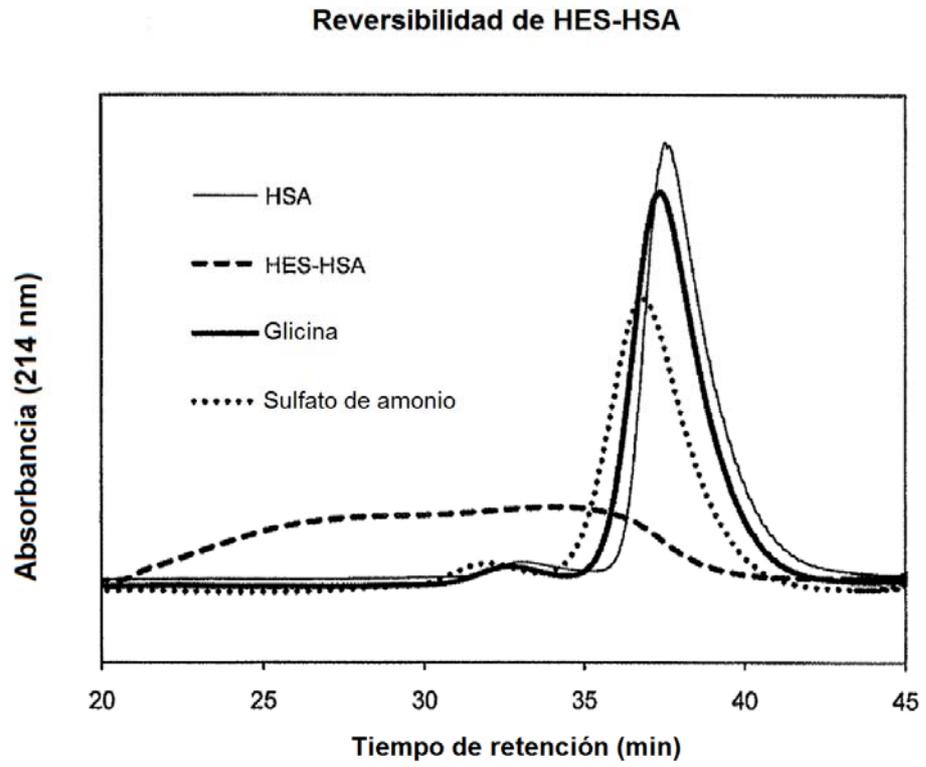


Figura 5

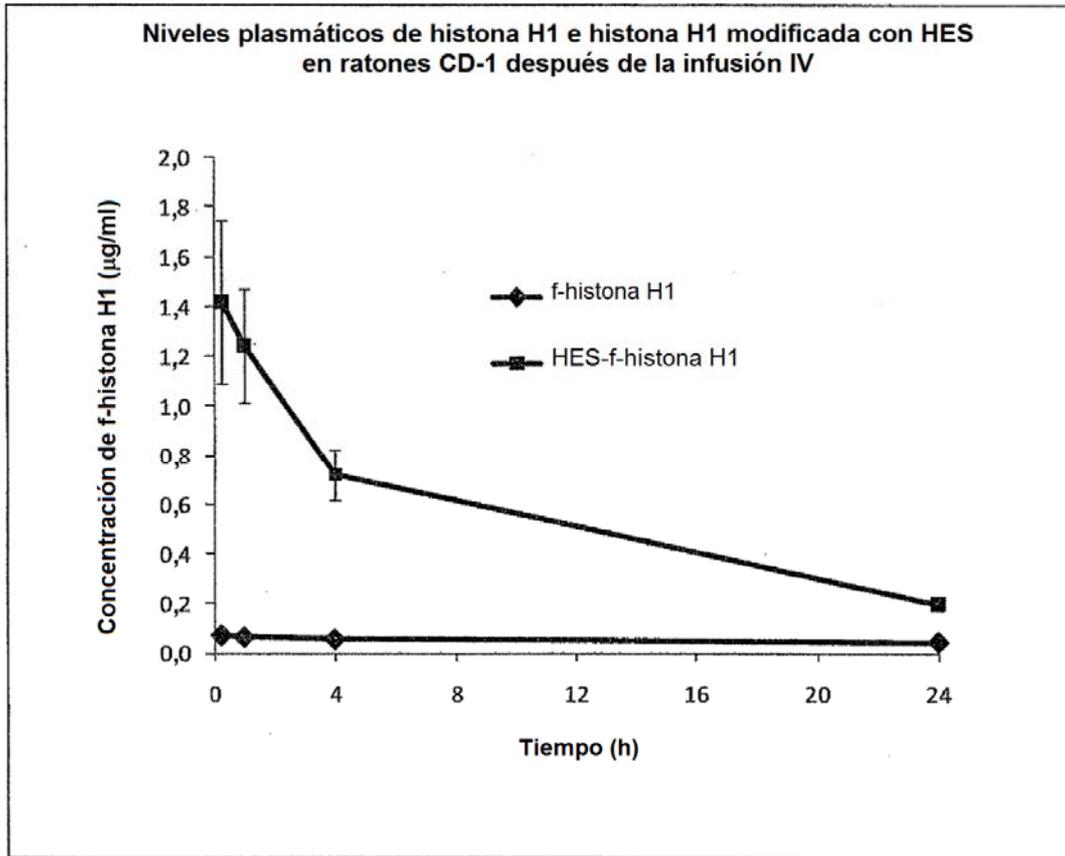


Figura 6

100 % de OxiHES 200K más uricasa a 22 °C, 1:1, PBS pH 7,4,
6 h

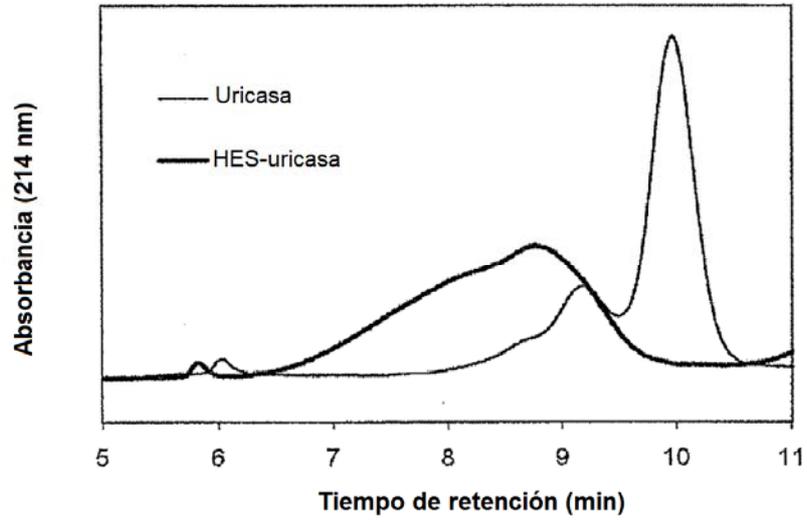


Figura 7

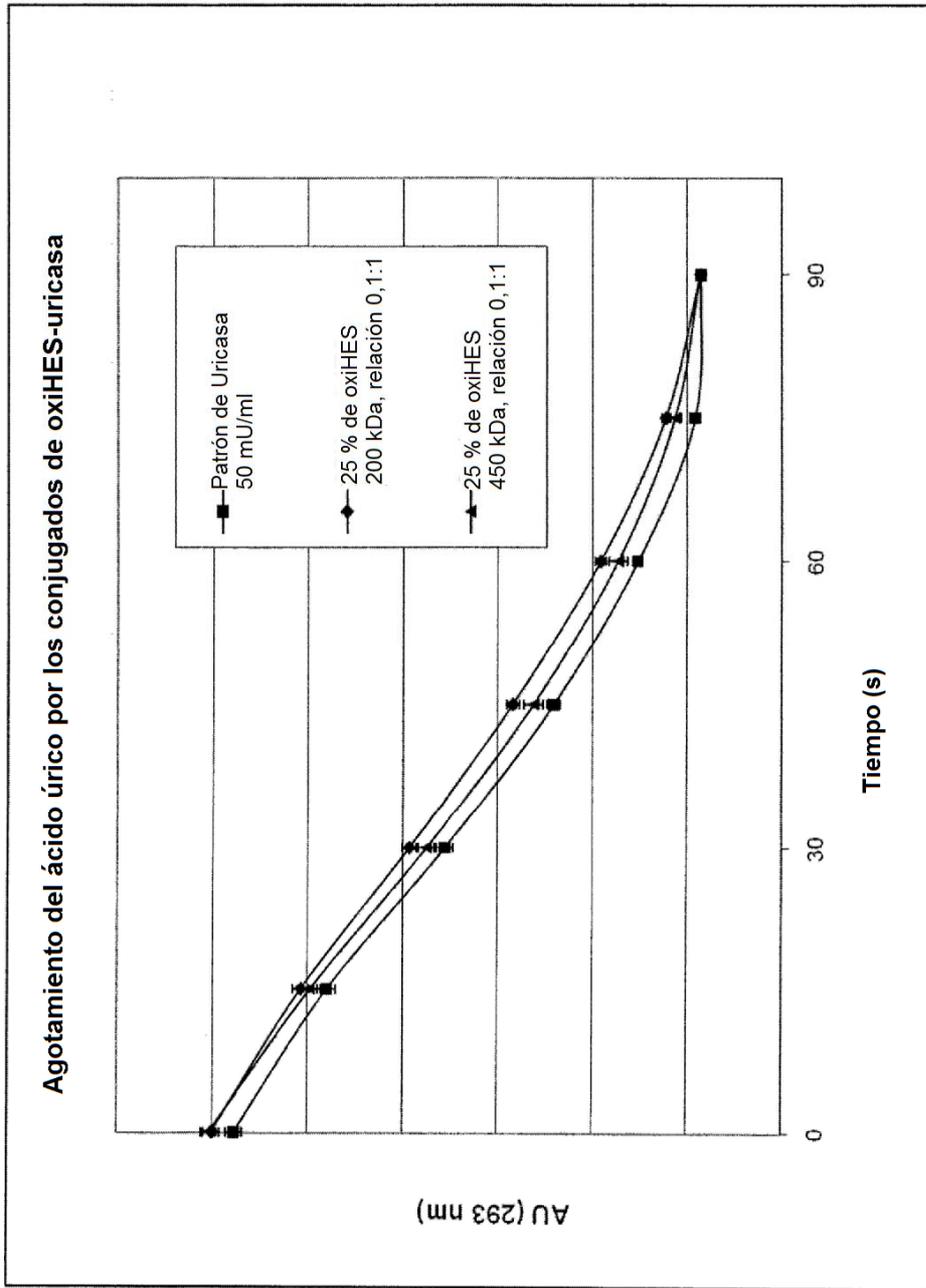
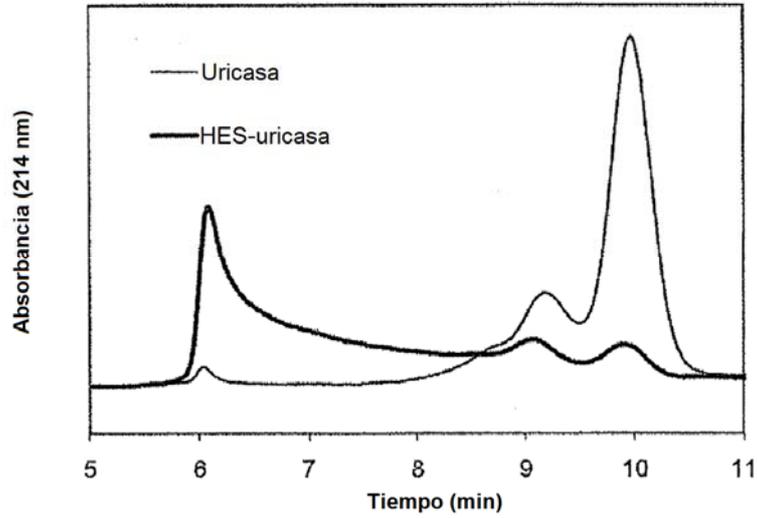


Figura 8

25 % de OxiHES 200K más uricasa a 22 °C, 0,1:1, PBS pH 7,4,
20 h



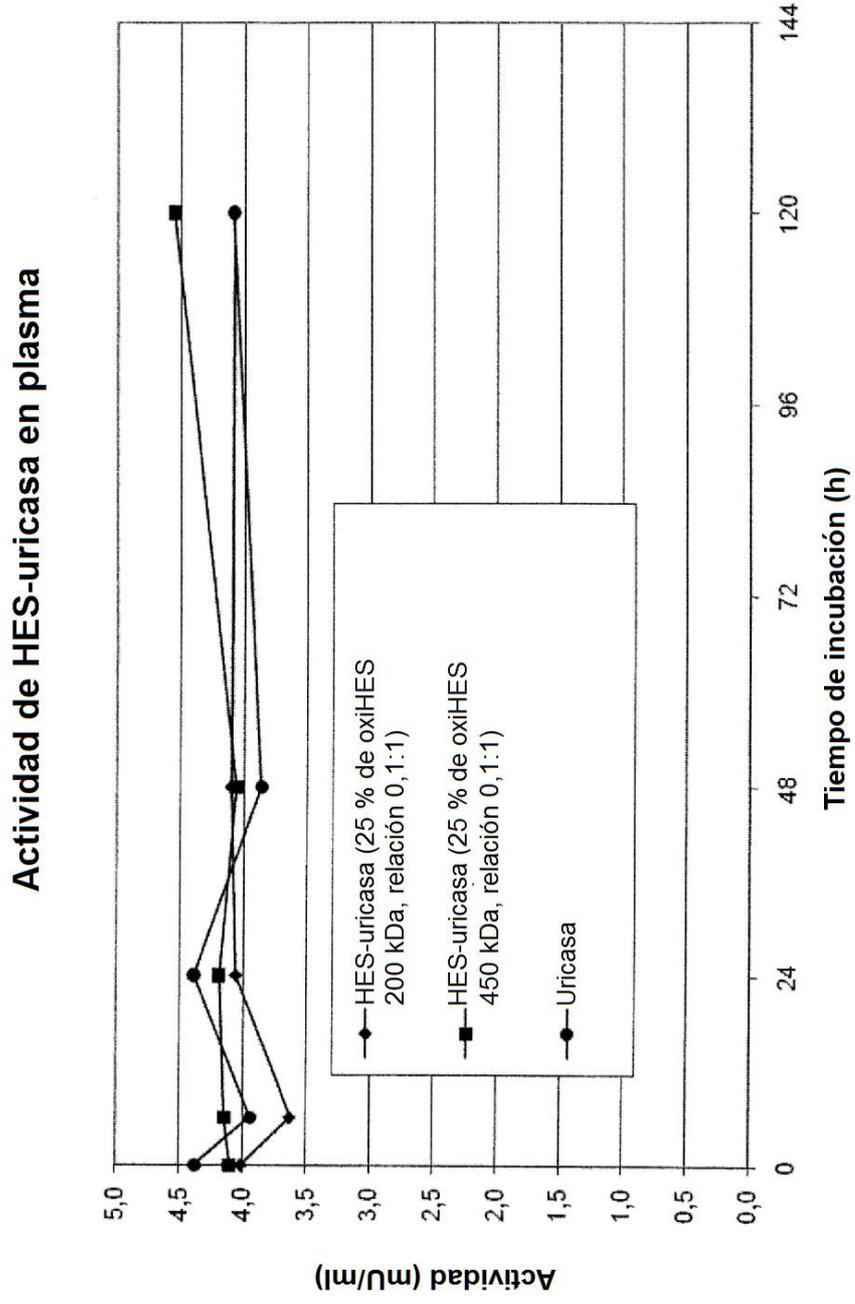


Figura 9

Figura 10

100 % de OxiHES 200K más asparaginasa (5 mg/ml)
37 °C, 1:1, fosfato de sodio 100 mM, pH 8, 5 min.

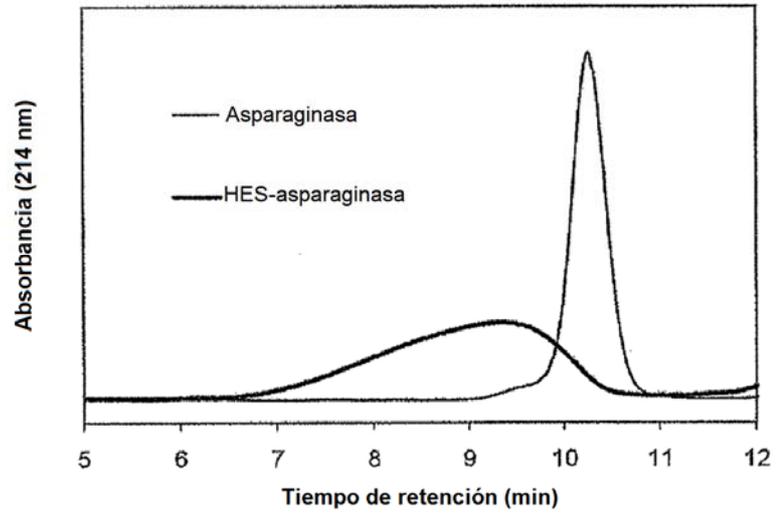


Figura 11

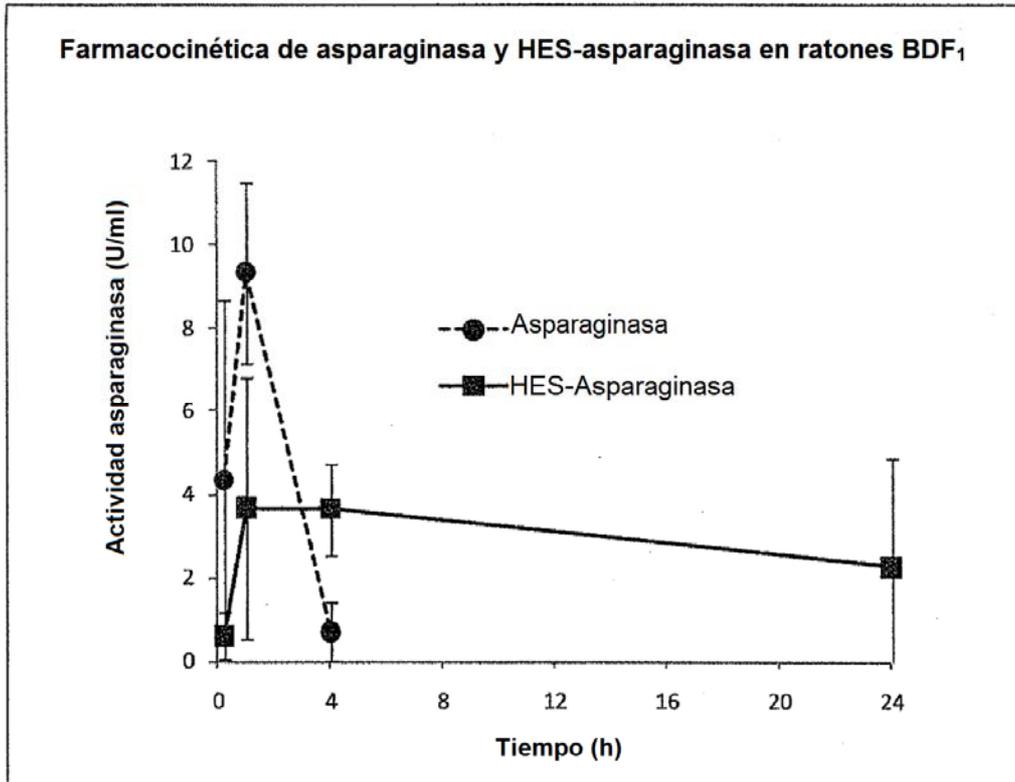


Figura 12

100 % de OxiHES 200K más rhA1AT
37 °C, 1:1, NaPO₄ 100 mM, pH 8, 25 min.

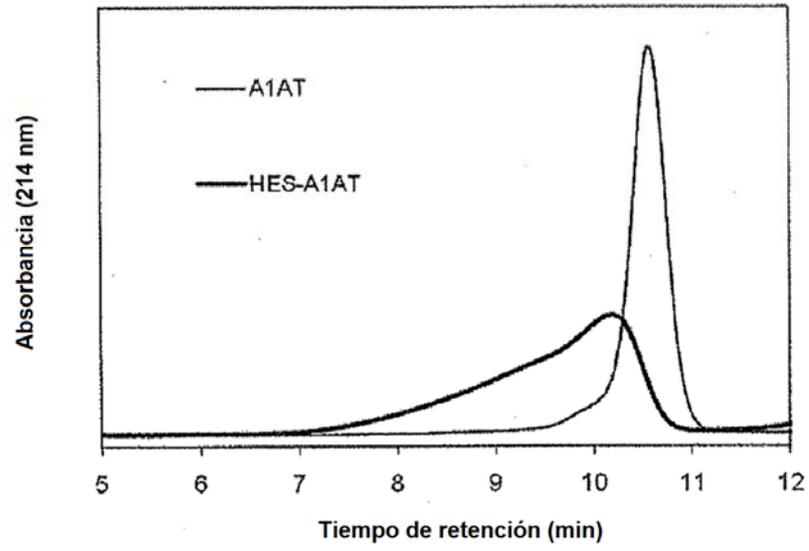


Figura 13

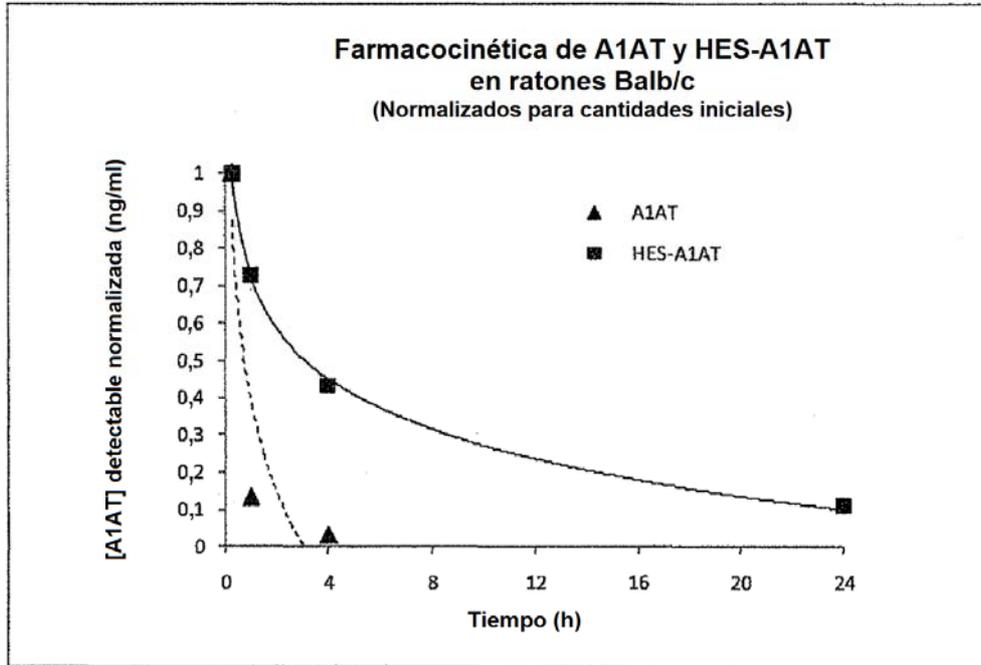


Figura 14

100 % de OxiHES 200K más anti-CD163mAb (5 mg/ml)
37 °C, 1:1, fosfato de sodio 100 mM, pH 8, 25 min.

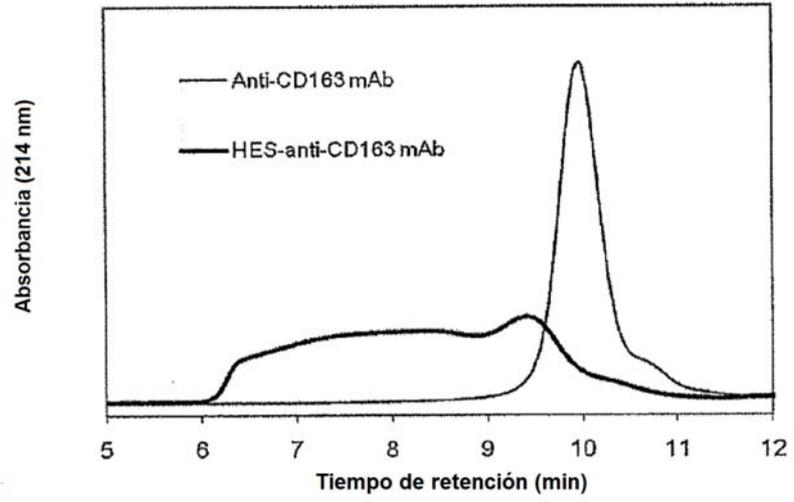


Figura 15a

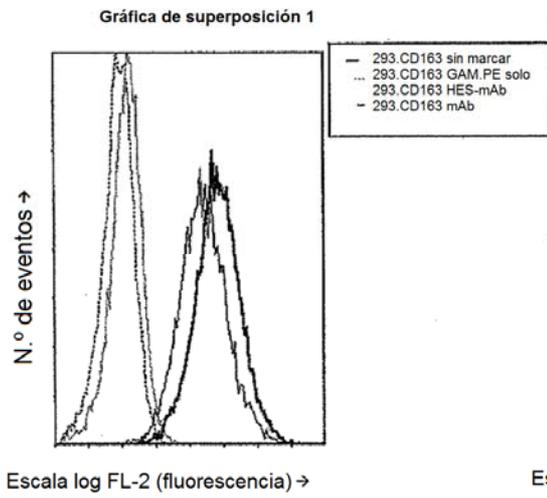


Figura 15b

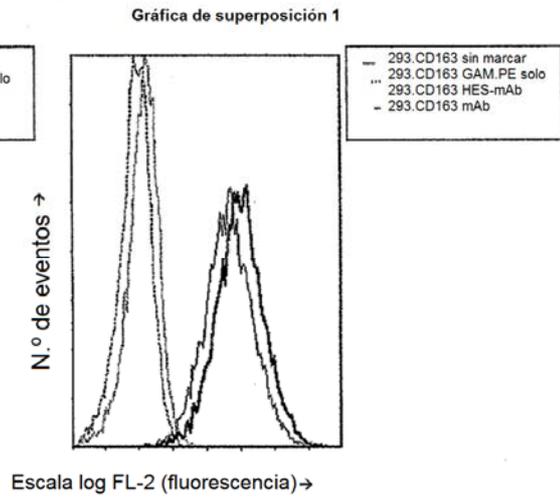


Figura 16

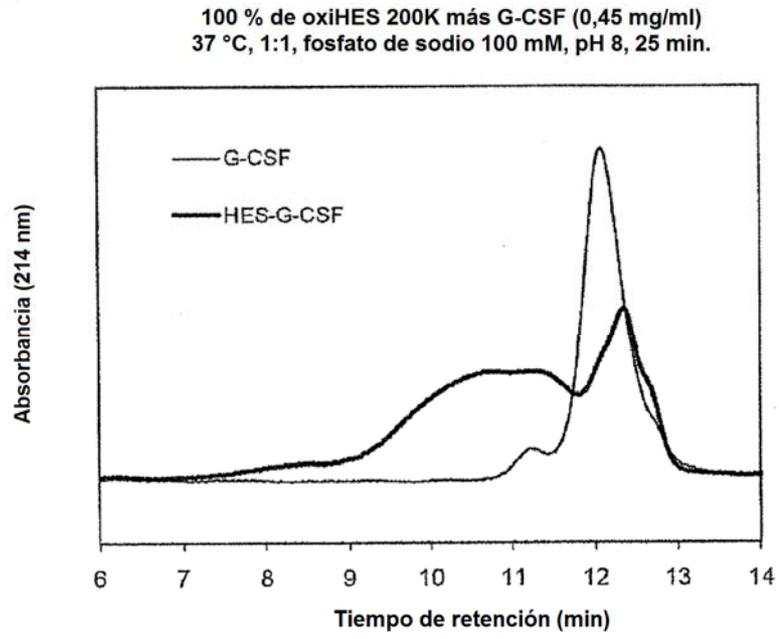


Figura 17

100 % de OxiHES 200K más insulina (0,5 mg/ml)
37 °C, 1:1, fosfato de sodio 100 mM, pH 8, 5 min.

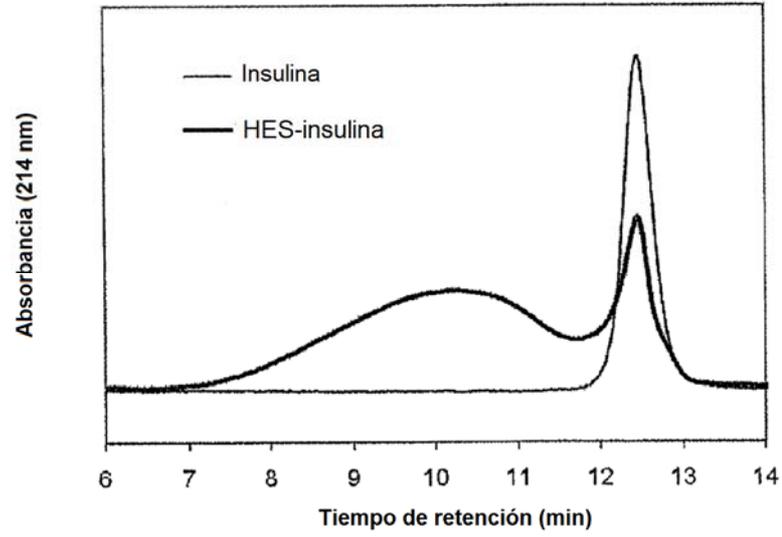


Figura 18

100 % de OxiHES 200K más estreptoquinasa (5 mg/ml)
37 °C, 1:1, fosfato de sodio 100 mM, pH 8, 25 min.

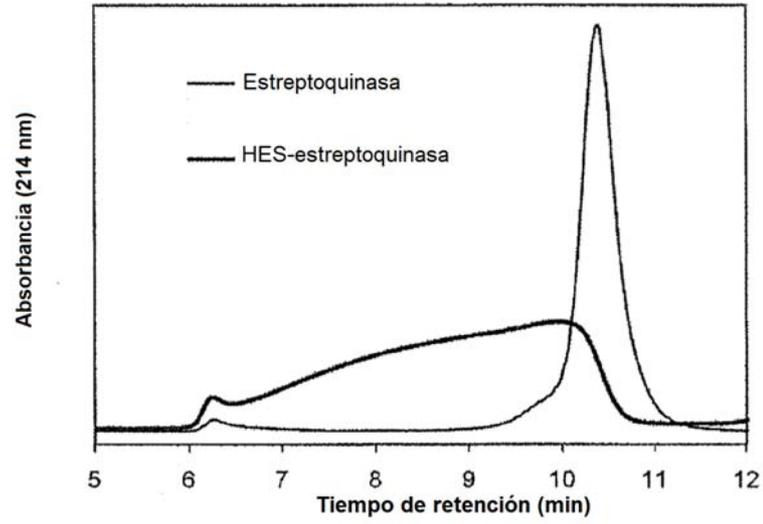


Figura 19

